

Tesis Doctoral

Rol y mecanismos de acción de RSUME en la regulación de PTTG e impacto en un modelo tumoral hipofisario

Fuertes, Mariana

2014-03-19

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fuertes, Mariana. (2014-03-19). Rol y mecanismos de acción de RSUME en la regulación de PTTG e impacto en un modelo tumoral hipofisario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fuertes, Mariana. "Rol y mecanismos de acción de RSUME en la regulación de PTTG e impacto en un modelo tumoral hipofisario". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-19.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Rol y mecanismos de acción de RSUME en la regulación de PTTG e impacto en un modelo tumoral hipofisario

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

Lic. Mariana Fuertes

Director de tesis: Dr. Eduardo Arzt

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Arzt

Lugar de trabajo:

- a. Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires - CONICET - Instituto Partner de la Sociedad Max Planck
- b. Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular - Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires, 2014

Fue el tiempo que pasaste con tu
rosa lo que la hizo tan importante

ÍNDICE	4
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	12
I.1. Modificación de proteínas por SUMO	13
I.1.A. SUMO y Ubiquitina	13
I.1.B. Funciones	15
I.1.C. Mecanismo de conjugación	16
I.1.D. De-sumoilación e inhibición de la sumoilación	18
I.1.E. Secuencia consenso de conjugación a SUMO	19
I.1.F. SUMO y estrés	20
I.2. Hipófisis	20
I.2.A. Tumores hipofisarios	22
I.3. PTTG	27
I.3.A. Perfil de expresión de PTTG	27
I.3.B. Regulación de la expresión de PTTG	28
I.3.C. Proteína PTTG	28
I.3.C.a. Expresión dependiente del ciclo celular	29
I.3.C.b. Modificaciones post-traduccionales	30
I.3.C.c. Localización subcelular	30
I.3.D. Funciones fisiológicas	31
I.3.D.a. Securina	32
I.3.D.b. Daño/reparación del ADN	33
I.3.D.c. Actividad transcripcional	33
I.3.E. Mecanismos tumorigénicos	34
I.3.E.a. Proliferación celular	34

I.3.E.b. Transformación celular	34
I.3.E.c. Aneuploidía e inestabilidad genética	34
I.3.E.d. Apoptosis	35
I.3.E.e. Invasión y angiogénesis	35
I.3.F. PTTG en tumores de hipófisis	35
I.4. RSUME	36
I.4.A. Expresión de RSUME	37
I.4.B. Funciones	38
II. OBJETIVOS	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
III.1. Aparatos o dispositivos especiales	43
III.2. Anticuerpos, estímulos y productos relacionados	43
III.2.A. Anticuerpos	43
III.2.B. Estímulos y otros reactivos/materiales	44
III.3. Cultivo celular	45
III.3.A. Generación de clones AtT-20 shRSUME y AtT-20 shSCRAMBLE	47
III.3.B. Cultivo primario de MEF	47
III.4. Adenomas de hipófisis humanos	48
III.5. Plásmidos	49
III.5.A. Plásmidos utilizados	49
III.5.B. Preparación de Bacterias Competentes	50
III.5.C. Transformación Bacteriana	50
III.5.D. Preparación de plásmidos a pequeña escala o mini-preparaciones	51
III.5.E. Análisis de plásmidos por enzimas de restricción	51
III.5.F. Preparación de plásmidos a gran escala o maxi-preparaciones	52

III.6. Transfecciones	53
III.6.A. Transfección con PEI	53
III.6.B. Transfección con Lipofectamina	53
III.6.C. Transfección con Lipofectamina 2000	54
III.6.D. Transfección con fosfato de calcio	54
III.7. Western Blot	55
III.8. Inmunoprecipitación y purificación con resina de níquel	56
III.9. Ensayos de actividad de Luciferasa	57
III.10. Inmunofluorescencia y microscopía	58
III.11. Extendidos cromosómicos	58
III.12. Proliferación celular	59
III.12.A. Método de Wst-1	59
III.12.B. Citometría de flujo	59
III.13. Tratamiento estadístico de los datos	60
IV. RESULTADOS	61
IV.1. Regulación de los niveles proteicos de PTTG	62
IV.1.A. Expresión de PTTG bajo condiciones de estrés	62
IV.1.B. Acción de RSUME sobre los niveles proteicos de PTTG	63
IV.1.C. Estabilidad proteica de PTTG en las fases del ciclo celular	65
IV.2. Sumoilación de PTTG e interacción con ubiquitinación	67
IV.3. Localización celular de RSUME, PTTG y SUMO-1	76
IV.4. Consecuencias funcionales del efecto de RSUME sobre PTTG	85
IV.4.A. Acción de RSUME sobre proteínas del ciclo celular reguladas por PTTG	85
IV.4.B. Regulación de la actividad de PTTG en mitosis	93
IV.4.C. Capacidad tumorigénica de RSUME	98

V. DISCUSIÓN	101
V.1. Regulación de la estabilidad proteica y modificaciones post-traduccionales de PTTG	103
V.2. Distribución subcelular de PTTG, RSUME y SUMO-1	107
V.3. Consecuencias funcionales de la desregulación de PTTG	108
V.4. Modelo integrador	111
VI. CONCLUSIONES	113
VII. BIBLIOGRAFÍA	115

REŞUMEN



Rol y mecanismos de acción de RSUME en la regulación de PTTG e impacto en un modelo tumoral hipofisario

Los tumores de hipófisis son adenomas benignos de incidencia frecuente que se originan a partir de los distintos tipos celulares hipofisarios por expansión clonal. En todos los tipos de adenomas hipofisarios se ha visto una sobreexpresión de *pituitary tumor transforming gene* (PTTG). PTTG facilita la progresión del ciclo celular ya que actúa como securina, regulando la correcta separación de las cromátidas hermanas en metafase, entre otras funciones. Por tratarse de un regulador del ciclo celular, el balance de los niveles de expresión de PTTG en la célula es importante, y la desregulación de estos niveles por defecto o exceso conduce a inestabilidad genómica, aneuploidía, apoptosis, daño al ADN, y conlleva al desarrollo de tumores. Se desconoce la causa que provoca el desbalance de PTTG al momento inicial del desarrollo de tumores de hipófisis. En este trabajo identificamos y describimos por primera vez un mecanismo de desregulación de los niveles de expresión de la proteína PTTG, que desencadena su acción como oncogen, permitiendo el avance de la tumorigenicidad hipofisaria. El mismo involucra la sobreexpresión de RWD-containing sumoylation enhancer (RSUME) al momento inicial del proceso tumoral y, como consecuencia, la inducción de la modificación de PTTG por SUMO, reduciendo su degradación por ubiquitinación y aumentando su estabilidad proteica. Este efecto de RSUME conduce a un aumento de la actividad PTTG y conlleva a hiperactividad del ciclo celular, aneuploidía, anormalidades cromosómicas, células multinucleadas y otros efectos tumorigénicos mediados por PTTG. Además, demostramos que PTTG y RSUME colocalizan a nivel celular y su expresión correlaciona positivamente en adenomas hipofisarios humanos.

Palabras claves: PTTG, RSUME, tumores de hipófisis, sumoilación, ubiquitinación, ciclo celular, securina

ABSTRACT



Role and mechanisms of action of RSUME in regulating PTTG and impact in a pituitary tumor model

Pituitary tumors are benign adenomas of frequent incidence originating from different pituitary cell types by clonal expansion. In all types of pituitary adenomas has been an overexpression of *pituitary tumor transforming gene* (PTTG). PTTG facilitates cell cycle progression by acting as securin, regulating the correct separation of sister chromatids in metaphase. Being a cell cycle regulator, the balance of PTTG expression levels in the cell is important, and deregulation of these default levels or excess leads to genetic instability, aneuploidy, apoptosis, DNA damage, among others, and leads to the development of tumors. The underlying cause of the imbalance of PTTG the initial stage of development of pituitary tumors is unknown. In this paper we identify and describe for the first time a mechanism for deregulation of the expression levels of PTTG protein, which triggers its action as oncogene, allowing the advance of pituitary tumorigenicity. It involves overexpression of *RWD-containing sumoylation enhancer* (RSUME) at the initial moment of the tumor process and, as a result, induction of PTTG by SUMO modification, reducing degradation by ubiquitination and increasing protein stability. This effect of RSUME leads to an increase of PTTG activity and leads to hyperactivity of the cell cycle, aneuploidy, chromosomal abnormalities, multinucleated cells and other tumorigenic effects mediated by PTTG. Furthermore, we demonstrate that PTTG and RSUME colocalize at the cellular level and its expression correlates positively in human pituitary adenomas.

Keywords: PTTG, RSUME, pituitary tumors, sumoylation, ubiquitination, cell cycle, securin

I. INTRODUCCIÓN



I.1. Modificación de proteínas por SUMO

Las modificaciones post-traduccionales de proteínas por unión covalente de grupos químicos, lípidos, azúcares y otras proteínas son importantes para la regulación espacial y temporal de su función debido a que pueden causar cambios rápidos de proteínas preexistentes. El subconjunto de estas modificaciones basadas en el acoplamiento de otras proteínas incluye a ubiquitina (Ub), la primera de estas originalmente descrita (Ciechanover, 1994), y las proteínas del tipo Ub (Ubls, del inglés *ubiquitin-like proteins* (Hochstrasser, 2009)), que incluyen a SUMO (del inglés *Small Ubiquitin-like MOdifier*) (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

La sumoilación es una rápida y reversible modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de la proteína SUMO a una proteína blanco (Hay, 2005). Originalmente, la sumoilación se consideraba un proceso nuclear, pero cada vez más proteínas citosólicas o de membrana se identifican como blanco de sumoilación (Martin et al., 2007).

I.1.A. SUMO y Ubiquitina

A pesar de su falta de similitud de secuencia (~18% homología), Ub y SUMO son pequeñas proteínas (Ub ~8.5kDa, SUMO ~11kDa), de un solo dominio, que comparten el mismo plegamiento β -GRASP (Bayer et al., 1998; Vijay-Kumar et al., 1987) (**Figura 1**). Sin embargo, sus residuos de superficie y sus distribuciones de carga son diferentes, apoyando las distintas funciones de estos modificadores de proteínas. Otra diferencia incluye la existencia de cuatro isoformas de SUMO en mamíferos (SUMO-1, 2, 3 y 4) frente a una sola forma de Ub.

Todas las proteínas SUMO contienen una secuencia de 10-25 aminoácidos no estructurados en su N-terminal que no se encuentra en otras proteínas Ubls. Además, todas las proteínas SUMO se expresan en una proforma inmadura, conteniendo un segmento carboxilo C-terminal de largo variable (2 a 11 aminoácidos) luego del dipéptido

glicina-glicina que es invariable y marca el extremo C-terminal de la proteína madura, procesada por hidrolasas. Las formas maduras de SUMO-2 y SUMO-3 comparten 97% de identidad de secuencia aminoacídica y sólo tienen ~47% de identidad con SUMO-1 (Lapenta et al., 1997). SUMO-2 y SUMO-3 son capaces de formar cadenas debido a que poseen un extremo N-terminal flexible, que está ausente en SUMO-1. Se cree que SUMO-1 y SUMO-2/3 tienen funciones distintas *in vivo* porque son conjugadas a diferentes proteínas blanco (Rosas-Acosta et al., 2005; Vertegaal et al., 2006).

En cuanto a SUMO-4, su relevancia fisiológica no está clara ya que su mensajero solo se expresa en células de riñón y bazo, y se desconocen sus sustratos (Bohren et al., 2007). Se piensa que SUMO-4 es un pseudogen o actúa por interacción no covalente.

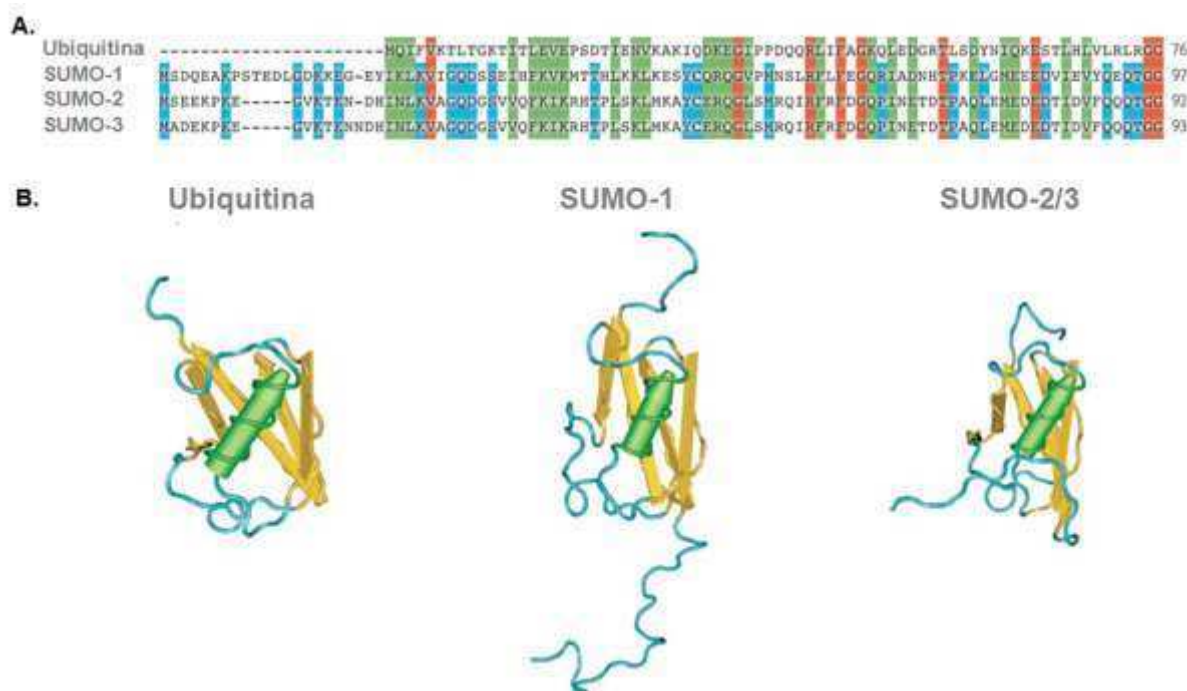


Figura 1. Comparación de la secuencia primaria y la estructura tridimensional de Ubiquitina, SUMO-1 y SUMO-2/3. **A.** Alineamiento de secuencias de las formas maduras de Ub, SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3 humanas. Los residuos que son idénticos en las cuatro proteínas se muestran en rojo, los residuos con cambios conservativos se muestran en verde, y los residuos que son idénticos entre los SUMO se muestran en azul. **B.** Diagrama representando las estructuras de NMR de Ub (UniProt: 1D3Z), SUMO-1 (UniProt: 1A5R) y SUMO-2 (UniProt: 2AWT) humanas. A pesar de su baja homología de secuencia, Ub y SUMO comparten una estructura tridimensional altamente conservada. Las estructuras de SUMO-2 y SUMO-3 son idénticas ya que solo difieren en tres residuos de su secuencia primaria madura. Figura adaptada de Martin et al., 2007.

I.1.B. Funciones

Las diferencias entre Ub y SUMO se traducen en distintos roles fisiológicos. Inicialmente, la Ub se identificó por su capacidad de dirigir a degradación a las proteínas vía el proteasoma 26S (Hershko y Ciechanover, 1982), mientras SUMO fue caracterizado por realizar lo contrario, conduciendo a la estabilización de las proteínas blanco. Es decir, clásicamente las vías de SUMO y Ub han sido descritas por tener un rol antagónico (Huang y D'Andrea, 2006). Incluso, se conocen algunas proteínas donde la conjugación de SUMO ocurre en la misma lisina que es blanco de ubiquitinación. Así, la lisina sumoilada no puede ser ubiquitinada, lo que resulta en la estabilización de la proteína blanco. Este es el caso de I κ B cuya estabilización por SUMO resulta en la inhibición de la actividad transcripcional de NF- κ B (Desterro et al., 1998).

Sin embargo, otros estudios han revelado que SUMO y Ub no son simplemente antagónicos sino que muestran distintos tipos de interacción (Ulrich, 2005). También son complejas las interacciones entre SUMO y otras modificaciones post-traduccionales como acetilación y fosforilación (Anckar y Sistonen, 2007). Estas interacciones aumentan aún más el espectro de funciones.

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 incluyen transcripción (Sapetschnig et al., 2002; Savare et al., 2005; Valin y Gill, 2007; Verger et al., 2003; Yang y Sharrocks, 2004), estructura de la cromatina (Ouyang y Gill, 2009), reparación del ADN y estabilidad genómica (Heideker et al., 2009; Lee y O'Connell, 2006; Zhao y Blobel, 2005), vías de señalización celulares (Miyazono et al., 2008; Yang et al., 2003) y función neuronal (Dorval y Fraser, 2007; Martin et al., 2007; Navascues et al., 2008; Wilkinson et al., 2008), además de control del ciclo celular, respuesta a estrés, endocitosis y tráfico vesicular (Anckar y Sistonen, 2007; Kerscher et al., 2006; Ulrich, 2005).

De particular interés son las modificaciones post-traduccionales de las proteínas reguladores del ciclo celular. Estas modificaciones han sido objeto de una amplia investigación para comprender tanto fisiológica como fisiopatológicamente la división celular (Gutierrez y Ronai, 2006; Wan et al., 2012). Se conoce un complejo conjunto de proteínas quinasas, ligasas de Ub y Ubls como SUMO que actúan en conjunto controlando y garantizando una distribución igual e idéntica del genoma a cada célula hija en mitosis.

La delección de los genes de SUMO o de los componentes de la vía de sumoilación es fatal para las células de mamíferos (Hayashi et al., 2002).

I.1.C. Mecanismo de conjugación

La unión covalente de Ub y Ubls requiere una serie de pasos secuenciales llevados a cabo por las enzimas activadora (E1), conjugasa (E2) y ligasa (E3) que catalizan la formación de un enlace entre la glicina del extremo C-terminal de la Ub o la Ubl, a un residuo lisina de la proteína blanco (Hochstrasser, 2000; Hochstrasser, 2009; Kerscher et al., 2006; Schwartz y Hochstrasser, 2003; Tatham et al., 2001). Múltiples rondas de este proceso de modificación conduce a la formación de cadenas de SUMO o Ub.

En 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 (Desterro et al., 1999; Gong et al., 1999; Johnson et al., 1997) (**Figura 2**). Esta reacción utiliza ATP para la formación de un intermediario SUMO-adenilato, en el que el extremo C-terminal de SUMO está covalentemente unido a AMP. La ruptura de la unión SUMO-AMP es seguida de la formación de un enlace tioester entre el grupo carboxilo del C-terminal de SUMO y el grupo -SH de la cisteína catalítica en SAE2 (C173). En el segundo paso de la reacción, SUMO es transferido desde SAE2 a la enzima conjugasa E2 específica de SUMO, Ubc9, formando un nuevo enlace tioester, esta vez entre la cisteína catalítica de Ubc9 (C93) y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de SUMO (Desterro et al., 1997; Johnson y Blobel, 1997). Una característica que diferencia a

Ubc9 del resto de las enzimas E2 de las Ubls es su capacidad de reconocer al sustrato proteico directamente. De esta manera, el complejo entre SUMO y Ubc9 unidos mediante un enlace tioester (Ubc9~S~SUMO) cataliza la formación de la unión isopeptídica entre SUMO y el sustrato (Capili y Lima, 2007; Desterro et al., 1997; Lin et al., 2002; Reverter y Lima, 2005; Yunus y Lima, 2006). 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 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 aproximando 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 SUMO-1 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 Pc2 también lo hace (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Topors es 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, pero se desconoce el mecanismo mediante el cual aumenta la sumoilación.

En los últimos años se produjo un gran avance en el descubrimiento de cómo se regula el proceso de sumoilación, pero solo se conoce un número limitado de componentes responsables de la compleja regulación de este proceso (Geiss-Friedlander y Melchior,

2007). Recientemente se identificó a la proteína RSUME (del inglés *RWD-containing sumoylation enhancer*) como un enhancer de la sumoilación general (Carbia-Nagashima et al., 2007), que se describe en detalle en el Capítulo IV. A diferencia del proceso de ubiquitinación, en sumoilación existe una única enzima E2, Ubc9, lo que hace pensar que la participación de proteínas accesorias como RSUME resulta clave para la regulación del proceso (Metzger et al., 2014).

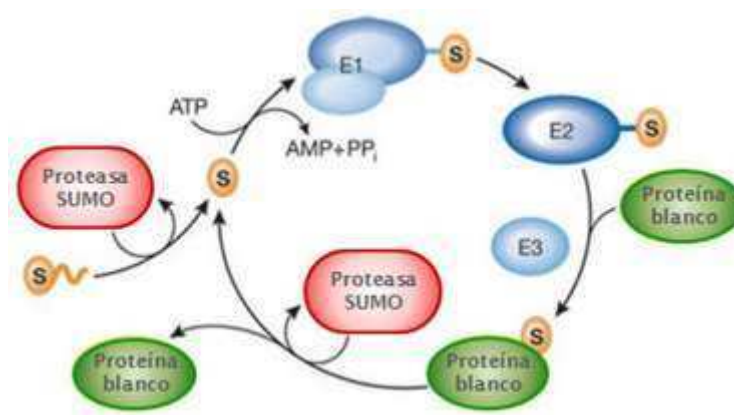


Figura 2. Mecanismo de sumoilación. SUMO es sintetizado como precursor y procesado por proteasas específicas de SUMO (Senp). Luego, SUMO es activado por un proceso dependiente de ATP que resulta en la formación de una unión thioester con la enzima E1. El SUMO activado es transferido a la cisteína del sitio activo de la enzima E2. La enzima E2 puede directamente reconocer a la proteína sustrato de sumoilación y catalizar la transferencia de SUMO a ella, o puede participar una enzima E3 en este proceso. Ambos caminos resultan en la formación de una unión isopeptídica entre SUMO y la lisina blanco del sustrato. Posteriormente, SUMO puede ser removido de la proteína blanco mediante la actividad isopeptidasa de Senp. Figura adaptada de Gillies y Hochstrasser, 2012.

I.1.D. De-sumoilación e inhibición de la sumoilación

La sumoilación es una modificación reversible dado que existe una familia de cisteín proteasas específicas de SUMO, compuesta por seis proteínas en humanos denominadas Senp-1, 2, 3, 5, 6 y 7 (Drag y Salvesen, 2008; Kim y Baek, 2009; Mukhopadhyay y Dasso, 2007; Yeh, 2009) (**Figura 2**). Estas proteasas, además de su función como isopeptidasas, poseen actividad de hidrolasa C-terminal necesaria para la maduración de las proteínas SUMO antes de ser conjugadas a un sustrato (Drag y Salvesen, 2008). Las distintas Senp

difieren en su actividad isopeptidasa e hidrolasa y también difieren en su selectividad por los distintos SUMO (Mukhopadhyay y Dasso, 2007).

También se identificó una proteína del adenovirus aviar CELO, denominada Gam1, como un inhibidora general de la sumoilación de proteínas ya que inactiva a la enzima SAE1/SAE2 e inducción de la degradación de las enzimas SAE1/SAE2 y Ubc9 (Boggio et al., 2004).

I.1.E. Secuencia consenso de conjugación a SUMO

Tradicionalmente se creía que la proteína blanco de sumoilación tenía que contener una secuencia consenso para la conjugación de SUMO definida como $\Psi KX[D/E]$ (donde Ψ es un aminoácido grande e hidrofóbico, K es la lisina blanco de la reacción, X es cualquier aminoácido, D es ácido glutámico y E es ácido aspártico) y además tenía que contener una señal de localización nuclear para ser modificada por SUMO *in vivo* (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 los métodos de predicción de secuencias blanco de sumoilación se actualizan continuamente. 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).

Adicionalmente, algunas proteínas tienen un sitio de sumoilación dependiente de fosforilación, PDSM (del inglés *Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motif*). Este motivo consiste en la secuencia convencional mencionada anteriormente seguida de entre 2 y 5 aminoácidos cualquiera, seguidos de una serina fosforilada y una prolina ($\Psi KXD/EX_{2-5}pSP$) (Hietakangas et al., 2006). Se postula que la carga negativa del grupo fosfato podría estimular la interacción entre Ubc9 y el sustrato (Mohideen et al., 2009). Por análisis de secuencias de muchos sustratos de sumoilación se le asigna un rol importante a los

residuos cargados negativamente en posiciones hacia el extremo carboxilo de la lisina aceptora (Blomster et al., 2009). Esto llevó a la identificación de un segundo motivo extendido, NDSM (del inglés *N*egatively charged aminoacid-*D*ependent *S*umoilation *M*otif). 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).

Estudios recientes han descubierto nuevos motivos de conjugación a SUMO como la secuencia consenso invertida [D/E]XKΨ y el motivo consenso ampliado con un cluster N-terminal hidrofóbico (Matic et al., 2010), por lo que la diversidad de sitios que sufren modificación por SUMO no se conoce completamente.

I.1.F. SUMO y estrés

La sumoilación es un importante mecanismo de adaptación homeostática al estrés. Varios tipos de estrés (osmótico, térmico o heat shock, oxidativo) aumentan la sumoilación a nivel global por SUMO-2/3 y, en mucha menor medida, por SUMO-1 (Saitoh y Hinchey, 2000). Además, el estrés por hipoxia y heat shock inducen la expresión de SUMO-1 (Saitoh y Hinchey, 2000; Shao et al., 2004).

Los efectos del estrés celular sobre la sumoilación varían para cada sustrato, y dependen de la intensidad y duración del estrés (Tempe et al., 2008).

I.2. Hipófisis

La hipófisis es una glándula pequeña que se encuentra en la base del cerebro, sobre la fosa del hueso esfenoides denominada silla turca (**Figura 3**). Consta de tres partes: lóbulo anterior o adenohipófisis, hipófisis medial o pars intermedia, y lóbulo posterior o neurohipófisis. En los humanos la hipófisis medial es prácticamente inexistente pero en

otras especies de vertebrados es más grande y funcional. La adenohipófisis es una estructura glandular de origen epitelial, mientras que la neurohipófisis está formada por tejido nervioso.

La hipófisis anterior es una glándula muy vascularizada que actúa como regulador central del sistema endócrino. Comprende varios tipos de células diferentes, cada uno responsable de la síntesis y secreción de una hormona específica, que están organizadas en lagunas rodeadas de capilares sinusoides a los cuales se vierte la secreción hormonal: las células corticotrofas producen la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), las células tirotrofas producen la hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina (TSH), las células somatotrofas producen hormona de crecimiento (GH), los lactotrofos producen prolactina (PRL), y los gonadotrofos producen hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). En la glándula también encontramos células folículo-estrelladas, no secretoras de hormonas, pero que sintetizan numerosos factores con funciones autócrinas y parácrinas (Allaerts et al., 1990). Estas hormonas regulan la función de diferentes tejidos y órganos: ACTH tiene su efecto sobre la glándula adrenal; TSH en tiroides; GH en músculo, hueso, tejido adiposo y demás tejidos corporales; PRL en glándula mamaria; LH y FSH en las gónadas.

De esta manera, la hipófisis regula el funcionamiento de las glándulas endocrinas más importantes del organismo. Un mal funcionamiento de la hipófisis conduce a un desequilibrio grave y total de todo el sistema endócrino (Melmed, 2011b; Perez-Castro et al., 2012).

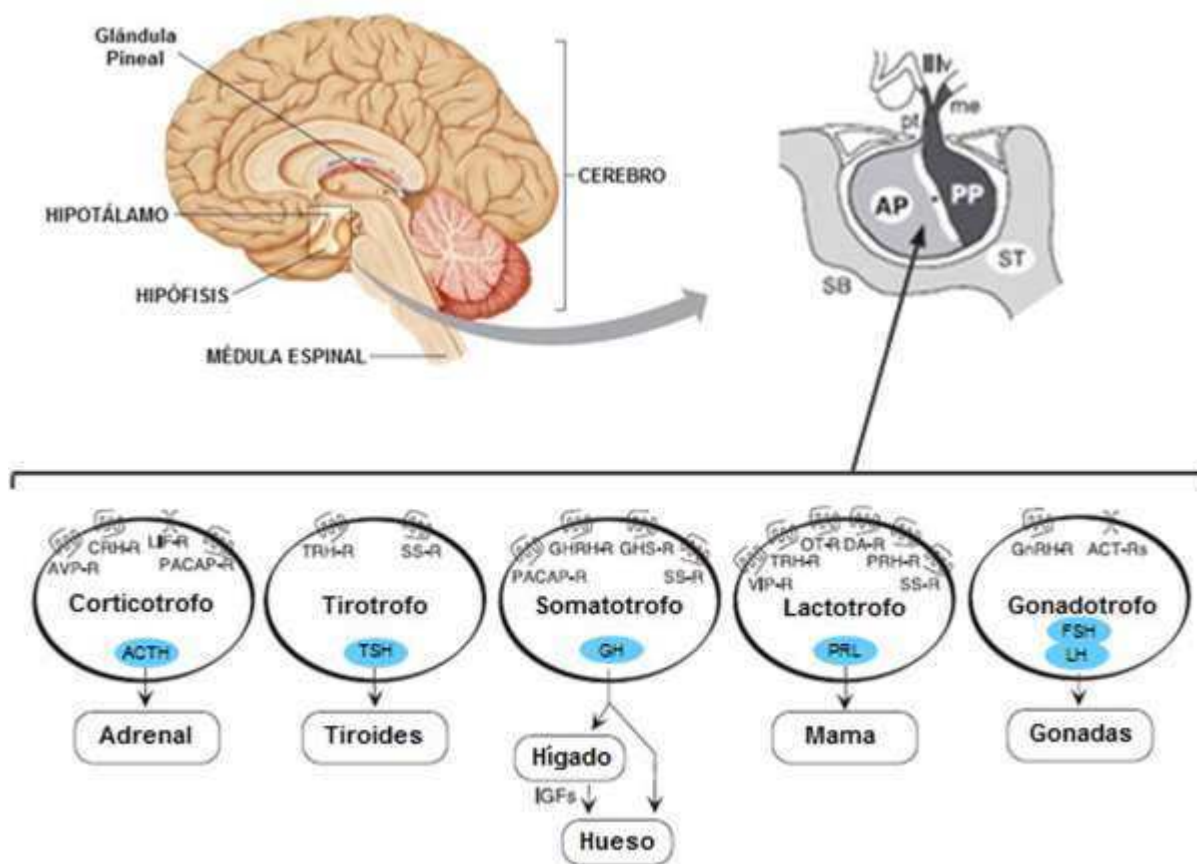


Figura 3. Ubicación y estructura de la hipófisis. La hipófisis se ubica debajo del tercer ventrículo del cerebro, justo detrás del quiasma óptico, y se apoya sobre la silla turca (ST) del hueso esfenoides (SB). La hipófisis de mamíferos está compuesta de tres lóbulos, la hipófisis posterior (PP), el lóbulo intermedio, y la hipófisis anterior (AP). Los factores hipotalámicos son liberados a la eminencia media y transportados por el sistema porta hipotálamo-hipofisario para actuar sobre las células secretoras de la AP. Las distintas células secretoras liberan sus hormonas (ACTH, TSH, GH, PRL, FSH y LH) al torrente sanguíneo, y de esta manera acceden a sus distintos órganos blancos.

I.2.A. Tumores hipofisarios

Cada uno de los tipos celulares de la hipófisis anterior puede dar lugar a un subtipo de tumor hipofisario que es o bien hormonalmente activo o inactivo (no funcional) (Dworakowska y Grossman, 2012; Melmed, 2011a), dando lugar a un espectro de subtipos de tumores hipofisarios definidos por sus características bioquímicas/funcionales. Mientras que la mayoría de los tumores de la hipófisis comprenden adenomas de crecimiento lento no metastásicos, aproximadamente un tercio se convertirá en invasor y una proporción muy pequeña (~0,1%) se malignizará (Melmed, 2011a). Independientemente de las

características de crecimiento, los tumores hormonalmente activos dan lugar a síndromes clínicos graves, como acromegalia o enfermedad de Cushing. Los tumores más agresivos (de crecimiento rápido) pueden dar lugar a síntomas debido al aumento en la masa intracraneal, como hipopituitarismo y/o alteraciones visuales, y los tumores malignos, de muy baja frecuencia, mostrarán evidencias de diseminación intra y/o extra-craneal (Mete et al., 2012; Raverot et al., 2012).

Las patologías hipofisarias tienen una incidencia del 17% (Ezzat y Asa, 2006) y hasta una décima parte de la población humana muestra alguna evidencia de neoplasia hipofisaria en la autopsia (incidentalomas). Estudios de autopsias demuestran que existe una mayor incidencia con la edad, ya que más del 30% de individuos de entre 50-60 años de edad presentaron tumores clínicamente indetectables (Asa y Ezzat, 1998; Kovacs et al., 2001). Los tipos de tumores hipofisarios más comunes son los prolactinomas y los gonadotrofinomas no funcionantes (Melmed, 2011a). Los adenomas hipofisarios suelen pasar desapercibidos, y en la mayoría de los casos se presentan como lesiones bien delimitadas, de crecimiento lento, con bajo índice mitótico, y raramente progresan a malignidad (Melmed, 2011a).

La patogénesis de la formación de tumores en la hipófisis anterior ha sido estudiada intensivamente. Se han postulado dos teorías acerca de los eventos fisiológicos o moleculares responsables de la tumorigénesis hipofisaria: la teoría de estimulación hormonal y la de mutaciones intrínsecas de la hipófisis. La glándula hipofisaria por su función está sometida a múltiples factores regulatorios estimulatorios e inhibitorios. La primer teoría postula que un exceso de estimulación hormonal, por factores hipotalámicos, factores de crecimiento o citoquinas, como así también la pérdida de regulación hormonal inhibitoria, produce un aumento de la proliferación celular. En células normales este efecto proliferativo lleva a hiperplasia e incrementa el riesgo de ocurrencia de mutaciones genéticas durante las progresivas mitosis, produciéndose una mutación monoclonal. A su

vez el desarrollo tumoral a partir de esta célula transformada dependerá de los mismos estímulos que aumentaron la proliferación. Existen evidencias que marcan a los factores hipofisiotróficos provenientes del hipotálamo, factores intrahipofisarios, o a muchos factores de crecimiento y citoquinas, como posibles candidatos (Arzt et al., 1999; Asa y Ezzat, 1998; Melmed, 1999). La segunda teoría se basa en que el origen monoclonal de los adenomas hipofisarios ocurre por una mutación espontánea como paso inicial que lleva a la transformación celular (Alexander et al., 1990; Herman et al., 1990), sobre la cual actuarían a posteriori los factores hipofisiotróficos y de crecimiento. Un importante estudio ha demostrado que el 60% de los tumores recurrentes presentan monoclonalidad, pero ésta es distinta a la del tumor original (Clayton y Farrell, 2001). Una mutación puntual conduciría a una hiperplasia hipofisaria, proceso que al aumentar el índice de mitosis predispone a la aparición de nuevas mutaciones en una o más células, y si esta nueva mutación aumenta la proliferación de la célula portadora, pronto este clon se convertirá en dominante frente a un segundo clon mutante que crece más lentamente. A su vez el clon dominante puede inhibir el crecimiento de otros clones al secretar factores inhibidores del crecimiento. Luego de la extracción del tumor original, un tumor recurrente podría originarse a partir de este segundo clon que ahora es dominante frente al tejido normal. Por lo tanto, al inicio del proceso tumorigénico podría coexistir más de un clon transformado aunque uno solo domina, y los estudios de clonalidad reflejan al clon dominante ya que comprende la mayor proporción del tumor. De esta manera en caso de existir un tumor recurrente, tendrá un origen monoclonal distinto al inicial. Actualmente, se postula que ambos procesos pueden ocurrir (**Figura 4**). Los adenomas de la glándula hipofisaria que se desarrollan a partir de células transformadas, son dependientes de la estimulación de hormonas y factores de crecimiento para la progresión del tumor. La progresión de un tumor a partir de una única célula requiere entonces de estímulos de crecimiento.

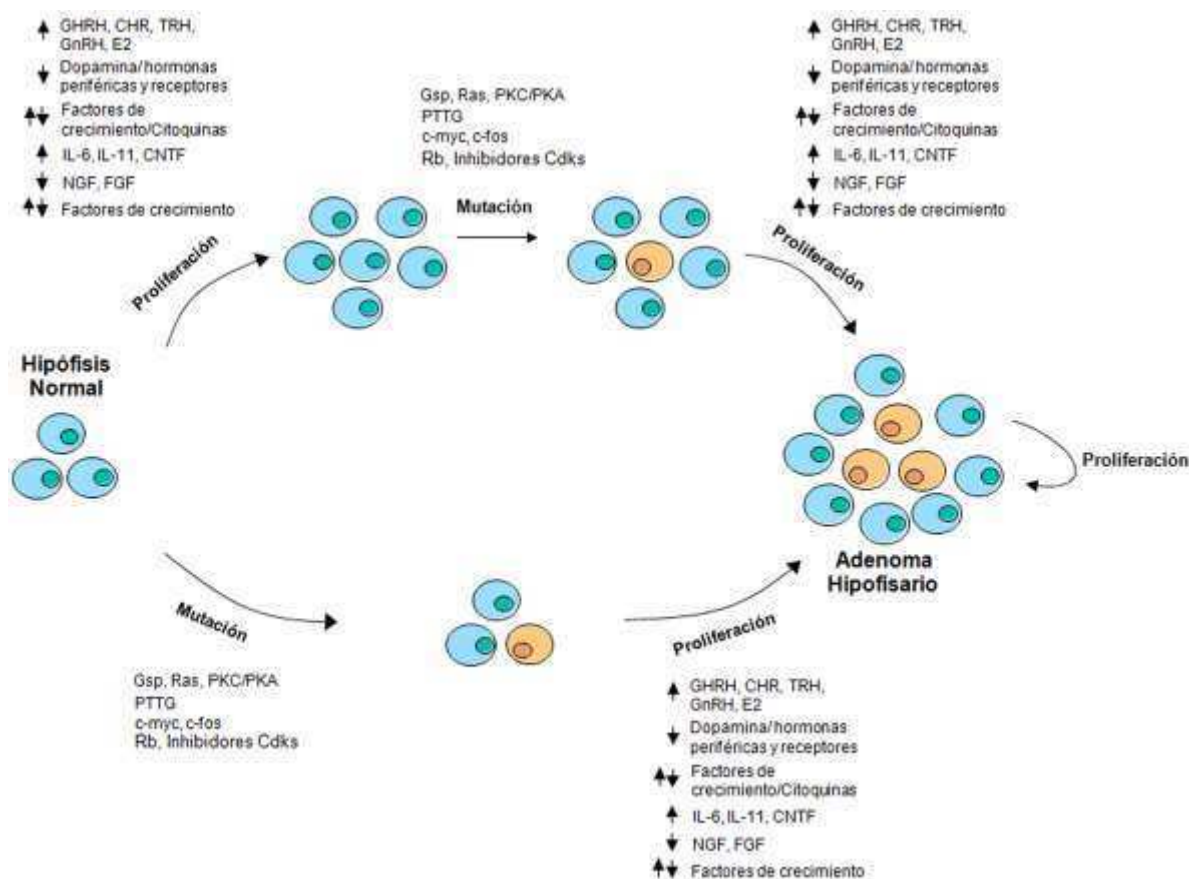


Figura 4. Modelo de tumorigénesis hipofisaria. Un enfoque integrado sobre el origen de los adenomas de hipófisis propone que los factores de crecimiento así como una estimulación hormonal, pueden inducir un aumento de la proliferación celular hipofisaria predisponiendo a la célula a mutaciones y formación de tumores. A su vez, dado que muchos adenomas no se asocian con una hiperplasia local, las células pueden amplificar una mutación preexistente a través de factores de crecimiento, hormonas o citoquinas favoreciendo así también el desarrollo de adenomas.

Se han descrito varias alteraciones genéticas o epigenéticas en tumorigénesis hipofisaria, entre ellas mutación activante en la proteína Gas (Lyons et al., 1990; Vallar et al., 1987), mutación en el oncogen Ras (Pei et al., 1994), pérdida de heterocigosis cerca del locus de Rb en el cromosoma 13 (Cryns et al., 1993; Hu et al., 1994; Pei et al., 1995), pérdida de heterocigosis en el cromosoma 11 (Boggild et al., 1994; Herman et al., 1993; Thakker et al., 1993), mayor expresión y actividad de PKC (Alvaro et al., 1992), altos niveles de expresión del factor de transcripción c-fos (Suhardja et al., 2001). Sin embargo, estas alteraciones ocurren solo en un pequeño porcentaje de tumores de hipófisis. Solo las mutaciones en la proteína G son altamente sistemáticas en adenomas esporádicos secretores de GH, en

adenomas no funcionantes y otras neoplasias funcionales hipofisarias (Spada y Vallar, 1992; Spada et al., 1992; Tordjman et al., 1993; Williamson et al., 1995). En adición a estos genes, un gran número de alteraciones en tumores de hipófisis se dan en reguladores del ciclo celular: hipermetilación del promotor de pRb, p16 y p15 (Ogino et al., 2005; Simpson et al., 2000; Woloschak et al., 1997; Yoshino et al., 2007); sobreexpresión de las ciclinas D1 (Simpson et al., 2001a; Simpson et al., 2001b), D3 (Saeger et al., 2001), E (Jordan et al., 2000) y A (Nakabayashi et al., 2001), de JAB1 (Korbonits et al., 2002) y de PTTG1 (del inglés *Pituitary tumor transforming gene*) (Zhang et al., 1999a); expresión reducida de p18 (Morris et al., 2005) y p27Kip1 (Bamberger et al., 1999; Lidhar et al., 1999). Únicamente PTTG parece expresarse en la mayoría de los tumores de hipófisis esporádicos, aunque no se han detectado mutaciones en la región codificante de su gen y se desconoce el motivo de su temprana desregulación proteica y consecuente oncogenicidad. Esto sugiere que otras proteínas o eventos postraduccionales estarían mediando el potencial oncogénico de PTTG (PTTG se describirá en detalle en el siguiente Capítulo).

En nuestro grupo se ha descrito el rol de las citoquinas de la familia de interleuquina 6 (IL-6) como estímulo del desarrollo de tumores de hipófisis. Dicha familia está compuesta por IL-6, LIF (del inglés *leukemia inhibitory factor*), IL-11, oncostatina M, CNTF (del inglés *ciliary neurotrophic factor*), cardiotrofina-1, citoquina similar a cardiotrofina, y neurotrofina-1 (Kishimoto et al., 1995), y utiliza como transductor de señales común a la glicoproteína gp130. Estas citoquinas regulan la secreción hormonal (Arzt et al., 1999; Auernhammer y Melmed, 2000; Perez Castro et al., 2001; Perez Castro et al., 2000; Ray y Melmed, 1997; Spangelo y Gorospe, 1995; Spangelo et al., 1989) y la proliferación (Arzt et al., 1993; Renner et al., 1997; Sawada et al., 1995) de las células hipofisarias normales y tumorales. A partir de un clon estable de la línea tumoral hipofisaria lactosomatotrófica de rata GH3, sobreexpresor de gp130 (Castro et al., 2003), se clonó RSUME mediante la técnica de ARNm differential display (Carbia-Nagashima et al., 2007). Estas células sobreexpresoras

de gp130 generaron tumores agresivos y altamente vascularizados cuando fueron inyectadas en ratones *nude* (Castro et al., 2003), lo que avala la participación de la vía de señalización de las citoquinas de la familia de IL-6 en la progresión de los tumores adenohipofisarios.

I.3. PTTG

rPTTG fue aislado de la línea celular GH4 de hipófisis de rata secretora de GH por la técnica de differential mRNA display (Pei y Melmed, 1997). Posteriormente, se identificó el homólogo en humanos (hPTTG) (Zhang et al., 1999b) y en ratón (mPTTG) (Wang y Melmed, 2000). El gen mPTTG tiene un 88% de identidad de secuencia con rPTTG y un 78% de identidad con hPTTG.

El gen de hPTTG se localiza en el cromosoma 5, tiene un largo de 10kb y está compuesto por cinco exones y cuatro intrones (Kakar, 1999; Zhang et al., 1999b). La secuencia entre -126 y +34pb constituye el promotor mínimo, y entre los nucleótidos -706 y -407 se localiza un enhancer. La familia PTTG incluye a PTTG1, PTTG2 y PTTG3, pero PTTG1 es el más abundante y extensamente estudiado. PTTG1 humano tiene un 91 y 89% de homología con PTTG2 y PTTG3 respectivamente (Prezant et al., 1999).

I.3.A. Perfil de expresión de PTTG

El ARN mensajero de PTTG1 en tejidos humanos es abundante en testículo (Dominguez et al., 1998; Kakar, 1999; Zhang et al., 1999b), tiene alta expresión en timo, y se expresa más débilmente en colon, intestino delgado, placenta, bazo, cerebro, páncreas y pulmón (Dominguez et al., 1998; Zhang et al., 1999b). En tejidos fetales humanos, el ARNm de PTTG1 solo fue detectado en hígado (Dominguez et al., 1998; Kakar, 1999; Zhang et al., 1999b). PTTG1 se expresa abundantemente en varias líneas tumorales humanas (Dominguez et al., 1998; Kakar, 1999; Lee et al., 1999; Zhang et al., 1999b). Además,

PTTG1 tiene altos niveles de expresión en muchos tumores como los de hipófisis (Hunter et al., 2003; McCabe et al., 2003; Saez et al., 1999; Zhang et al., 1999b), tumores colorectales (Heaney et al., 2000), de esófago (Shibata et al., 2002), carcinoma hepatocelular (Cho-Rok et al., 2006), tumores de testículo, ovario y mama (Puri et al., 2001), leiomyomas de útero (Tsai et al., 2005), cáncer de tiroides (Boelaert et al., 2003) y pulmón (Rehfeld et al., 2006). El ARNm de PTTG2 se expresa en hipófisis, cerebro, placenta, intestino delgado, colon, hígado, bazo, timo, próstata, testículos y ovarios, así como en adenomas de hipófisis, fibroblastos primarios de la línea LL-24 y cinco líneas tumorales (Chen et al., 2000; Prezant et al., 1999). Por el contrario, el ARNm de PTTG3 es extremadamente bajo o no se expresa en estos tejidos (Chen et al., 2000). En general, las variantes de PTTG compiten entre sí, y su balance determina la función (Wang y Melmed, 2000).

I.3.B. Regulación de la expresión de PTTG

La expresión del ARNm de PTTG1 en hipófisis es inducida por estrógenos (Heaney et al., 2002; Heaney et al., 1999; Yin et al., 2001), en células de Leydig H-500 por calcio extracelular (Tfelt-Hansen et al., 2003), en células tumorales de mama MCF-7 y astrocitos malignos por insulina e IGF-1 (Chamaon et al., 2005; Thompson y Kakar, 2005), y en astrocitoma U87 por EGF, TGF α y HGF (Tfelt-Hansen et al., 2004). Pero no queda claro si en estos modelos la inducción de la expresión de PTTG ocurre como un efecto directo del tratamiento con los distintos estímulos o como un efecto secundario de la activación de la proliferación y de la maquinaria del ciclo celular.

I.3.C. Proteína PTTG

La proteína PTTG1 está formada por 196 aminoácidos en ratón, 199 aminoácidos en rata y 202 aminoácidos en humano (Pei y Melmed, 1997; Wang y Melmed, 2000; Zhang et al., 1999b). PTTG1 de mamíferos tiene un dominio N-terminal regulatorio y un dominio C-terminal funcional (Dominguez et al., 1998; Yu y Melmed, 2001) (**Figura 5**). hPTTG1 es una

proteína pequeña y extremadamente hidrofílica. Posee una región N-terminal rica en aminoácidos básicos (de la posición 58 a 101, 32% de residuos básicos) (Zhang et al., 1999b) y dos motivos ricos en prolina en el C-terminal ($^{163}\text{PPSP}^{166}$ y $^{170}\text{PSP}^{173}$) que constituyen dominios SH-3BD (del inglés *Src homology (SH-3)-binding domain*) de interacción con proteínas con dominio SH-3 y son críticos para su funcionalidad (Kakar y Jenness, 1999). También presenta un dominio de unión al ADN y un dominio de transactivación (Pei, 2000; Pei, 2001). El dominio N-terminal contiene dos secuencias implicadas en la degradación de PTTG, D-box (RKALGTVN o destruction box) y KEN-box (Zou et al., 1999).

Por una variedad de técnicas biofísicas se determinó que PTTG humana es una proteína nativamente desestructurada en solución y adquiere un plegamiento determinado al interactuar con otras proteínas, lo que le otorga una alta plasticidad de interacción (Sanchez-Puig et al., 2005).

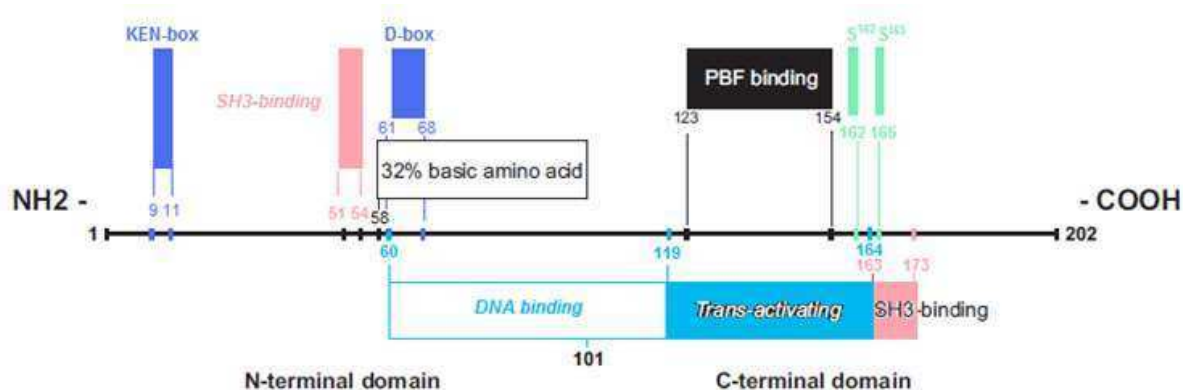


Figura 5. Esquema de la estructura de la proteína PTTG1 en mamíferos. PTTG1 comprende un dominio N-terminal regulatorio y un dominio C-terminal funcional. En la figura se indican dominios de degradación KEN-box y D-box (azul), sitios de unión a proteínas con dominio SH3 (rosa); dominio de unión a PBF (negro), dominios de unión al DNA y de transactivación (celeste), sitios de fosforilación (verde). La posición aminoacídica de los elementos se muestra con números. Figura adaptada de Vlotides et al., 2007.

I.3.C.a. Expresión dependiente del ciclo celular

Los niveles de PTTG varían a lo largo del ciclo celular (Ramos-Morales et al., 2000). Particularmente, al iniciarse la mitosis los niveles de PTTG aumentan, alcanzan su máximo

en metafase para inhibir la separación prematura de las cromátidas hermanas, y disminuyen inmediatamente después de mitosis (Yu et al., 2000b; Zou et al., 1999). Además, PTTG se expresa en la fase G1 ya que media la transición G1/S, cooperativamente con el factor de transcripción Sp1 (Tong et al., 2007). PTTG interactúa con Sp1 y este complejo se une a los promotores de ciclina D3, activando su transcripción (Tong et al., 2007), y de p21, inhibiendo su expresión (Chesnokova et al., 2007). De esta manera se produce la progresión a lo largo de la fase G1 y se inhibe la entrada a S.

I.3.C.b. Modificaciones post-traduccionales

PTTG1 se fosforila por CDK1 o Cdc2 (del inglés *cell division control protein 2 homolog*) de manera dependiente del ciclo celular (Ramos-Morales et al., 2000). CDK1 actúa en la transición G2/M en asociación con las ciclinas A y B (Jackman y Pines, 1997).

Además PTTG1 es fosforilado por MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*), DNA-PK (del inglés *DNA-dependent protein kinase*) y PI3K (del inglés *phosphoinositol-3-kinase*) (Chamaon et al., 2005; Ramos-Morales et al., 2000; Romero et al., 2001).

PTTG1 es degradado al final de metafase por ubiquitinación. Esta degradación es catalizada por las subunidades fzy y fzr del complejo ligasa de ubiquitina APC (del inglés *Anaphase-Promoting Complex*), que marca para degradación además a otras proteínas del ciclo celular, y ocurre en los dominios KEN-box y D-box (**Figura 5**) (Nakayama y Nakayama, 2006; Zou et al., 1999; Zur y Brandeis, 2001).

I.3.C.c. Localización subcelular

PTTG1 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma (Chien y Pei, 2000; Dominguez et al., 1998; Saez et al., 1999; Stratford et al., 2005; Yu et al., 2000b; Zhang et al., 1999a), pero esta localización es controversial y varía de acuerdo a la línea celular o el tipo de tumor examinado. Se piensa que PTTG nuclear funciona como securina y como activador transcripcional, pero se desconoce la función de PTTG citoplasmático (Kim et al., 2003;

Tfelt-Hansen et al., 2006; Zhang et al., 1999b; Zhou et al., 2005). La expresión de PTTG dependiente del ciclo celular también podría explicar estas diferencias (Akino et al., 2005; Fujimoto et al., 1999; Hunter et al., 2003; Zou et al., 1999). En algunas células, PTTG1 se localiza en la membrana plasmática (Yu et al., 2000b).

Aunque PTTG no posee una señal de localización nuclear (NLS), puede entrar al núcleo por su pequeño tamaño. Sin embargo, PBF (del inglés *PTTG-binding factor*) puede mediar la translocación al núcleo ya que tiene una NLS (Chien y Pei, 2000), o dicha translocación puede estar mediada por la señalización de MAPK (Pei, 2000).

En células tumorales de hipófisis se demostró que PTTG es una proteína secretoria (Minematsu et al., 2007). La localización subcelular de PTTG aparece como un factor importante en la determinación de su rol tumorigénico debido a que la expresión nuclear de PTTG se asoció con tumores de hipófisis más agresivos (Wierinckx et al., 2007).

I.3.D. Funciones fisiológicas

En la **Figura 6** se muestra un esquema de las principales funciones fisiológicas de PTTG a lo largo del ciclo celular.

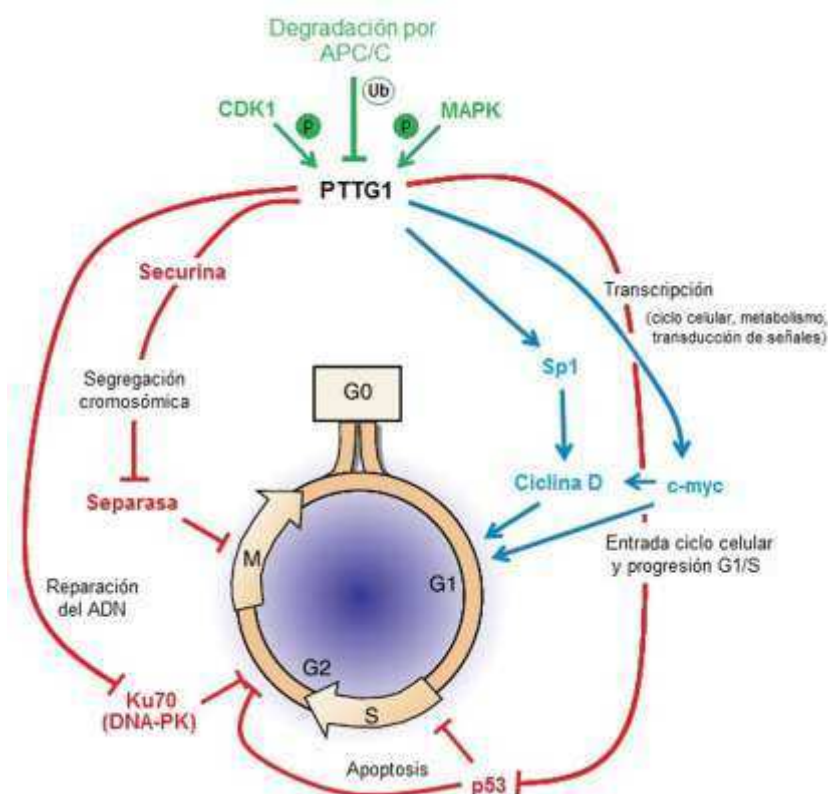


Figura 6. Modelo de activación y acción de PTTG1 a lo largo del ciclo celular. La proteína PTTG1 puede ser fosforilada por CDK1 o MAPK, y sufre degradación vía proteasoma mediante ubiquitinación por el complejo APC/C. PTTG1 actúa como securina, como factor de transcripción e interactúa con proteínas implicadas en apoptosis y reparación del ADN. Figura adaptada de Quereda y Malumbres, 2009.

I.3.D.a. Securina

PTTG tiene actividad de securina. Durante metafase, las cromátidas hermanas recién replicadas se mantienen unidas por un complejo de cohesinas, un proceso esencial para la correcta orientación de los cromosomas en el huso mitótico (Tanaka et al., 2000). En mamíferos, la disociación de las cohesinas ocurre en parte durante la profase por fosforilación de las subunidades Scc3-like de PLK1 (del inglés *Polo-like kinase*) (Hauf et al., 2005; Sumara et al., 2002) y al comienzo de la anafase mediante el clivaje de Scc1 por separasa (Uhlmann et al., 1999). Durante la mayor parte del ciclo, securina se une a separasa y así inhibe su actividad proteolítica (Waizenegger et al., 2002), en adición a la inhibición por fosforilación del complejo CDK1-ciclina B (Stemmann et al., 2001). En la

transición metafase/anafase, cuando se completa la orientación de los cromosomas, securina es degradada por ubiquitinación, separasa se libera de la inhibición, el complejo de cohesinas es clivado, y las cromátidas hermanas se separan de manera igual a las células hijas (Wirth et al., 2006).

I.3.D.b. Daño/reparación del ADN

PTTG regula a la enzima DNA-PK por medio de su interacción con la subunidad reguladora Ku70 de dicha enzima. Frente a roturas de ADN doble cadena, se inhibe la unión de PTTG con Ku70, con lo que DNA-PK se activa iniciando los mecanismos de reparación del ADN (Romero et al., 2001). Al mismo tiempo, mientras se produce la reparación del ADN, PTTG inhibe la separación de las cromátidas hermanas retrasando la mitosis.

I.3.D.c. Actividad transcripcional

Se ha comprobado la función de PTTG como factor de transcripción de numerosos genes implicados en regulación del ciclo celular, control metabólico y señalización celular (Tong y Eigler, 2009). La acción de PTTG involucra en algunos casos la interacción con otros factores de transcripción como p53, Sp1 y USF-1 (Bernal et al., 2002; Pei, 2001; Tong et al., 2007).

PTTG1 regula positivamente la transcripción de c-myc, PKC β -1, MEK1, MEK3, HSP70, FGF-2, PRL y ciclina D3, entre otros, e inhibe la transcripción de p21 (Boelaert et al., 2004; Chien y Pei, 2000; Horwitz et al., 2003; Pei, 2001; Tong et al., 2007). La activación de c-myc induce la entrada al ciclo celular y estimula el crecimiento/división celular entre las fases G0/G1 a S (Kelly y Siebenlist, 1985). Ciclina D3 actúa como subunidad reguladora y su actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular (Peters, 1994). La inhibición de la expresión de p21 impide la inhibición de la actividad de los complejos CDK2/ciclina A y CDK2/ciclina E, bloqueando así la entrada a la fase S (Gartel y Radhakrishnan, 2005).

I.3.E. Mecanismos tumorigénicos

PTTG1 es considerado un oncogen por sus efectos en desarrollo y crecimiento tumoral. Altos niveles de expresión de PTTG1 correlacionan con grado de agresividad tumoral, invasión y vascularización (Heaney et al., 2000; Hlubek et al., 2006).

I.3.E.a. Proliferación celular

El efecto de PTTG en la proliferación celular no está claro. Como proteína oncogénica sería esperable un aumento de la actividad proliferativa, pero como securina debería inhibir dicha proliferación (Vlotides et al., 2007). Ambos efectos han sido demostrados tanto *in vitro* como en estudios clínicos (Abbud et al., 2005; Heaney et al., 2002; Kim et al., 2007). Se propuso que el estado de fosforilación de PTTG puede estar relacionado con la variación en el efecto en proliferación celular (Boelaert et al., 2004).

I.3.E.b. Transformación celular

La capacidad de PTTG para inducir transformación celular está bien establecida por las técnicas de formación de colonias en agar y generación de tumores en ratones *nude* (Pei y Melmed, 1997; Zhang et al., 1999b).

I.3.E.c. Aneuploidía e inestabilidad genética

Algunas evidencias sugieren que el mecanismo de transformación celular por sobreexpresión de PTTG involucra la inducción de inestabilidad genética y aneuploidía. Esto se debe principalmente a proliferación descontrolada sin citoquinesis y deficiente clivaje de las cohesinas, y los efectos son acumulativos al sucederse repetidas rondas de división celular. La sobreexpresión de PTTG1 aumenta la frecuencia de aparición de signos de aneuploidía como micronúcleos, macronúcleos, puentes mitóticos, o citocinesis asimétrica sin segregación cromosómica en diversos tumores y líneas celulares (Jallepalli et al., 2001; Kim et al., 2007; Yu et al., 2000a; Yu et al., 2003).

I.3.E.d. Apoptosis

La sobreexpresión de PTTG induce un aumento de p53 y su translocación al núcleo, así como apoptosis en células tumorales. Se ha reportado que la apoptosis en la adenohipófisis cumple un rol en la regresión del estado hiperplásico (Candolfi et al., 2006). Además PTTG, induce apoptosis de manera independiente de p53 en líneas tumorales deficientes de p53 (Hamid y Kakar, 2004; Yu et al., 2006; Yu et al., 2000a). En contraste, también se reportó inhibición de la apoptosis por PTTG de manera dependiente de p53 (Bernal et al., 2002; Cho-Rok et al., 2006).

I.3.E.e. Invasión y angiogénesis

La sobreexpresión de PTTG parece actuar de forma auto-parácrina incrementando la expresión de ciertos factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis como FGF-2 y VEGF (Vlotides et al., 2007). Estudios *in vitro* e *in vivo* correlacionaron la sobreexpresión de PTTG con la neovascularización y la expresión de FGF-2 y VEGF-A (Ishikawa et al., 2001; Kim et al., 2007; Zhang et al., 1999a).

I.3.F. PTTG en tumores de hipófisis

En todos los estudios donde se analiza el rol de PTTG en adenomas hipofisarios se encontró una mayor expresión en los tumores que en la hipófisis normal (Cristina et al., 2007; Chamaon et al., 2010; Chesnokova et al., 2008; Filippella et al., 2006; Hunter et al., 2003; McCabe et al., 2002; McCabe et al., 2003; Minematsu et al., 2006; Passos et al., 2009; Tena-Suck et al., 2008; Wierinckx et al., 2007; Zhang et al., 1999a). Pero no se ha descrito el evento primario que desregula la expresión de PTTG. Además, existen discrepancias en cuanto al grado de sobreexpresión respecto del tipo de tumor y a si se analizó el ARNm o la proteína PTTG. No se encontró relación entre la sobreexpresión de PTTG y características clínicas tales como edad, sexo o síntomas clínicos al momento del diagnóstico (Chesnokova et al., 2008; Filippella et al., 2006; McCabe et al., 2003). La

secreción de GH *in vitro* y el grado de sobreexpresión de PTTG correlacionan positivamente en adenomas humanos (Hunter et al., 2003).

En cuanto a características patológicas, se encontró una correlación positiva entre la sobreexpresión de PTTG y la invasión del seno esfenoidal en adenomas secretores de hormonas (Zhang et al., 1999a), y entre el volumen tumoral y el grado de sobreexpresión de PTTG (Hunter et al., 2003). Sin embargo, otros trabajos no encontraron diferencias. La concentración de PTTG y la proliferación celular correlacionan y han sido asociadas con un peor pronóstico (Filippella et al., 2006; Wierinckx et al., 2007). Hay una asociación de PTTG, VEGF y su receptor KDR (McCabe et al., 2002), o entre PTTG y el número de vasos en adenomas somatotrofos (Minematsu et al., 2006). En un estudio con 27 pacientes se encontró que los adenomas con mayor sobreexpresión de PTTG y altas concentraciones de Ki67 (marcador de proliferación) presentaban un menor tiempo de recidiva (Filippella et al., 2006).

I.4. RSUME

RSUME es una proteína pequeña, cuyo gen se expresa diferencialmente en clones hipofisarios GH3 sobreexpresores de gp130 (Carbia-Nagashima et al., 2007; Castro et al., 2003). Actualmente, se conocen siete variantes de splicing del ARN mensajero de RSUME humano, cinco de las cuales codifican para las isoformas de 185, 195, 200, 252 y 267 aminoácidos (RSUME185: NP_001265176, RSUME195: NP_001121614, RSUME200: NP_001186611, RSUME252: NP_001265177, y RSUME267: NP_056300). Las otras dos variantes son ARNs no codificantes que van a degradación por NMD (del inglés *nonsense-mediated RNA decay*) (Gerez et al., 2013) y base de datos RefSeq). Todas las isoformas proteicas de RSUME tienen un dominio RWD y pertenecen a la familia de proteínas RWDD3 (del inglés *RWD domain-containing protein 3*). La estructura del dominio RWD en solución de esta familia fue resuelta y depositada en la base de datos Protein Data Bank

(PDB) por el consorcio de genómica estructural (PDBid: 2EBK). No se conoce su función, pero se sugiere que se trata de un dominio de interacción proteína-proteína (Doerks et al., 2002). A pesar de que no presentan similitud de secuencia, la estructura del dominio RWD se asemeja al dominio conjugasa de ubiquitina (UBCc), aunque la cisteína catalítica crítica para la actividad conjugasa de ubiquitina no está conservada (Nameki et al., 2004). Además, el dominio RWD es estructuralmente homólogo a la conjugasa de SUMO Ubc9 (Nameki et al., 2004; Tong et al., 1997).

En este trabajo nos centraremos en la isoforma RSUME195 que tiene una alta expresión en tumores de hipófisis (Carbia-Nagashima et al., 2007; Gerez et al., 2013; Shan et al., 2012), y la denominaremos simplemente RSUME.

La secuencia de la proteína RSUME es altamente conservada en vertebrados y se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Carbia-Nagashima et al., 2007).

I.4.A. Expresión de RSUME

Mediante análisis de dot blot-mRNA array se determinó que el gen de RSUME se expresa en una gran variedad de tejidos humanos adultos (cerebelo, cuerpo calloso, hipófisis, corazón, estómago, duodeno, yeyuno, apéndice, riñón, músculo esquelético, bazo, timo, nódulos linfáticos, médula ósea, tráquea, placenta, útero, próstata, hígado, páncreas, glándula adrenal, glándula salival) y en tejidos fetales (corazón, riñón, hígado, pulmón) (Carbia-Nagashima et al., 2007).

Además, el ARN mensajero de RSUME fue detectado en muchos tumores como gliomas (neoplasias de cerebro y médula espinal), feocromocitomas (neoplasias de la glándula adrenal), hemangioblastomas (tumores del sistema nervioso central y retina) y todos los tipos de tumores de hipófisis, incluyendo tumores no-funcionantes, secretores de PRL, secretores de GH, así como también secretores de ACTH (Carbia-Nagashima et al., 2007; Gerez et al., 2013; Shan et al., 2012).

La expresión de RSUME se induce en condiciones de estrés tales como hipoxia (Carbia-Nagashima et al., 2007) y estrés hipertérmico o heat shock (Druker et al., 2013). Particularmente, la expresión de RSUME aumenta en tumores de hipófisis sometidos a hipoxia (Carbia-Nagashima et al., 2007), en líneas tumorales hipofisarias y tumores hipofisarios donde se simuló hipoxia con CoCl_2 (Shan et al., 2012), y en la zona más interna de gliomas (hipóxica y necrótica) (Carbia-Nagashima et al., 2007; Gerez et al., 2013).

I.4.B. Funciones

RSUME es un enhancer de sumoilación, ya que potencia la conjugación de SUMO-1, 2 y 3 a las proteínas favoreciendo tanto la formación de la unión thioester entre Ubc9 y SUMO, como la transferencia de SUMO al sustrato. Estas propiedades de RSUME como enhancer de SUMO dependen de la integridad de su dominio RWD (Carbia-Nagashima et al., 2007). Por medio de su efecto en sumoilación, RSUME regula dos vías principales de tumorigénesis y angiogénesis en mamíferos (**Figura 7**). Inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B sobre blancos como Cox-2 e IL-8, a través de la estabilización de la proteína I κ B por sumoilación. Activa a HIF (principal factor de transcripción de la respuesta adaptativa a hipoxia), y consecuentemente a VEGF, estabilizando a su subunidad inducible por hipoxia HIF-1 α mediante sumoilación (Carbia-Nagashima et al., 2007). Por predicción con el Software Kinasephos se determinaron al menos dos sitios posibles de fosforilación de RSUME por JAK-STAT, quinasas pertenecientes a la vía de señalización de citoquinas IL-6 y gp130. Se propuso que la activación de esta vía, por aumento de citoquinas durante inflamación o por hipoxia, podría conducir a un aumento de la expresión y/o actividad de RSUME (Fowkes y Vlotides, 2012). Además, RSUME interactúa con el receptor de glucocorticoides (GR), aumenta su sumoilación y regula su actividad transcripcional, alterando en consecuencia la expresión de sus genes blancos como FKBP51 y S100P (Druker et al., 2013).

Por estas funciones, se ha descrito que RSUME cumple un rol en el inicio de la neovascularización de tumores de hipófisis a través de la regulación de los niveles proteicos de HIF-1 α , y de la subsecuente producción de VEGF-A (Shan et al., 2012).

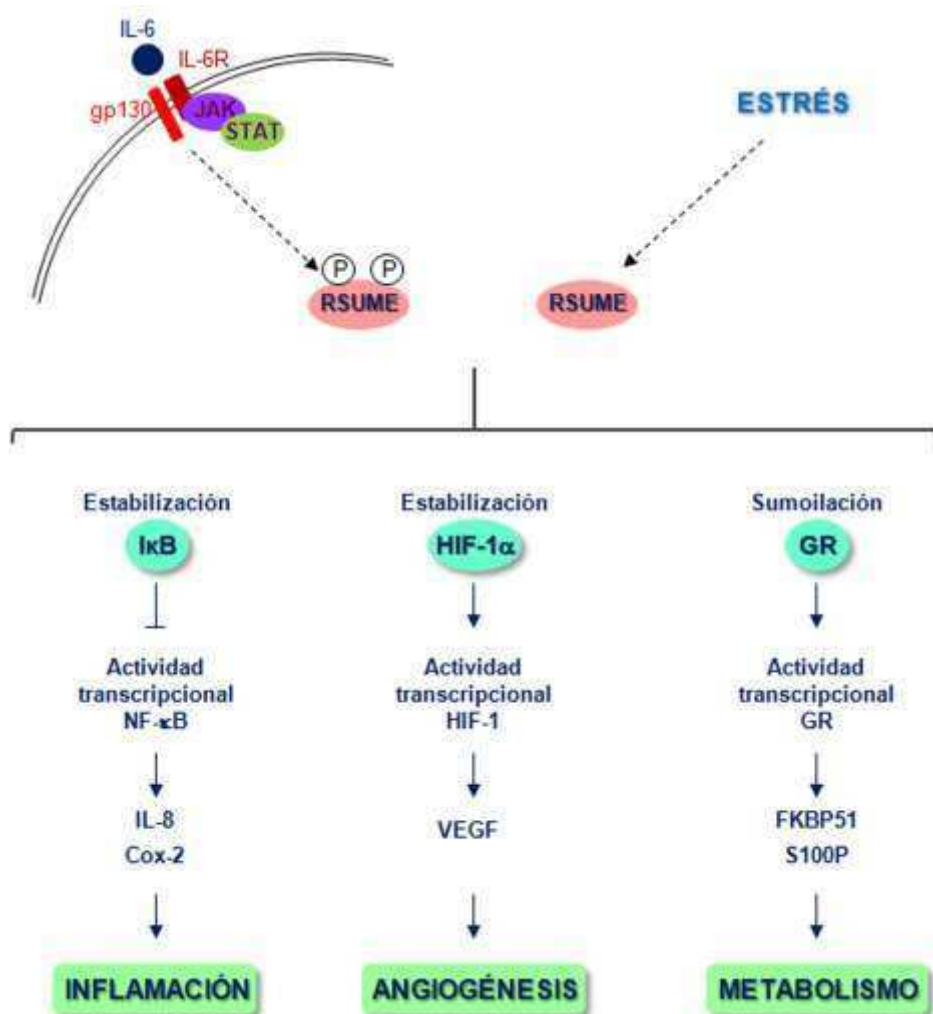


Figura 7. Modelo de activación y acción de RSUME. El estrés celular (hipoxia, heat shock o inflamación) inducen la expresión y/o activación de RSUME. Un mecanismo posible es por fosforilación al activarse la vía de señalización de citoquinas IL-6, receptor IL-6 (IL-6R), gp130, JAK y STAT. El efecto de RSUME sobre sumoilación induce la estabilización de IκB, HIF-1 α y GR, y como consecuencia se inhibe el proceso inflamatorio, se activa la angiogénesis, y se desencadena la respuesta adaptativa a estrés.

II. OBJETIVOS



El **objetivo general** de este trabajo es analizar el rol regulatorio de *RWD-containing sumoylation enhancer* (RSUME) sobre *Pituitary tumor transforming gene* (PTTG) con énfasis en la sumoilación y su impacto funcional en la tumorigénesis en general, y en tumores de hipófisis en particular.

Para ello nos propusimos los siguientes **objetivos específicos**:

Objetivo 1. *Identificar y caracterizar la regulación ejercida por RSUME sobre la estabilidad proteica PTTG.*

Objetivo 2. *Determinar si PTTG es modificado por sumoilación y si existe una vinculación entre dicha sumoilación y la modificación de PTTG por ubiquitina.*

Objetivo 3. *Analizar la localización subcelular de PTTG, RSUME y SUMO-1.*

Objetivo 4. *Determinar el impacto funcional del efecto de RSUME sobre PTTG a lo largo del ciclo celular, y sus consecuencias en el desarrollo tumoral de hipófisis.*

La **hipótesis** de trabajo es que el aumento de RSUME al momento inicial del proceso tumoral, por efecto del estrés o del ambiente pro-proliferativo, podría estar induciendo un aumento de los niveles de expresión de PTTG al contribuir a su estabilidad vía sumoilación. Así, los niveles de expresión de PTTG se desregularían, y esta desregulación de PTTG desencadenaría su acción como oncogen, permitiendo el avance de la tumorigenicidad. Centraremos nuestros estudios en el modelo tumoral de hipófisis dado que PTTG cumple un rol central en la tumorigénesis de esta glándula, pero se desconoce la causa que provoca su sobreexpresión en estadios tempranos del desarrollo tumoral. Además, ambas proteínas, RSUME y PTTG, fueron aisladas de células tumorales de hipófisis y su expresión está aumentada en todos los tipos de tumores hipofisarios.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



III.1. Aparatos o dispositivos especiales

Incluimos sólo aquellos aparatos que tienen alguna característica específica de aplicación en los experimentos de este trabajo, no aquellos generales como campanas de flujo laminar, freezers o centrífugas.

- Analizador digital para western blot Odyssey[®] Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR)
- Cámara de hipoxia ProOx Model 110 (BioSpherix)
- Citómetro BD FACS Canto[™] II (BD)
- Espectrofotómetro iMark[™] Microplate Reader (Bio-Rad)
- Homogenizador de tejidos ULTRA-TURRAX[®] dispersers PRO sc-250 (IKA)
- Luminómetro Junior (EG&G Berthold)
- Microscopio AXIO Vert.A1 (Carl Zeiss)
- Microscopio de fluorescencia AxioObserver Z1 LED Colibrí (Carl Zeiss)
- Microscopio de fluorescencia confocal LSM 710 AxioObserver (Carl Zeiss)
- Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Termociclador DNAEngine (Bio-Rad)

III.2. Anticuerpos, estímulos y productos relacionados

Se detallan los principales productos utilizados en este trabajo de tesis y las empresas proveedoras de los mismos.

III.2.A. Anticuerpos

Abcam: IgG policlonal de ratón anti-GAPDH (usado 1:10000); IgG monoclonal de ratón anti- α -Tubulina [TU-01] (usado 1:200); IgG monoclonal de ratón anti-Vimentina [VI-10] (usado 1:200); IgG policlonal de conejo anti-RWDD3 (usado 1:1000); IgG policlonal de conejo anti-V5 (usado 1:3000 para WB y 1:200 para inmunofluorescencia).

Bio-Rad: IgG-HRP policlonal de cabra anti-conejo (usado 1:3000); IgG-HRP policlonal de cabra anti-ratón (usado 1:3000).

Cell Signalling: IgG de cabra anti-rata (usado 1:10000).

Covance: IgG monoclonal de ratón anti-HA clon 16B12 (usado 1:200); IgG monoclonal de ratón anti-6xHis.

Life Technologies Invitrogen: IgG monoclonal de ratón anti-SUMO-1 (usado 1:1000 para WB y 1:200 para inmunofluorescencia); IgG policlonal de conejo anti-PTTG1 (usado 1:100 a 1:1000 para WB dependiendo de la línea celular); IgG-Alexa Fluor 555 de burro anti-ratón (usado 1:200); IgG-Alexa Fluor 488 de cabra anti-conejo (usado 1:200); IgG-Alexa Fluor 647 de cabra anti-ratón (usado 1:200).

Santa Cruz Biotechnology: IgG monoclonal de ratón anti- β -Actina [C4] (usado 1:3000); IgG monoclonal de ratón anti-Ciclina D3 (usado 1:1000); IgG policlonal de conejo anti-Ciclina A (usado 1:1000); IgG monoclonal de ratón anti-Ciclina B1 (usado 1:1000); IgG policlonal de conejo anti-fosfo-Histona H3 [Ser10] (usado 1:1000).

Hecho en el laboratorio: IgG policlonal de rata anti-RSUME (usado 1:1000).

III.2.B. Estímulos y otros reactivos/materiales

Anedra: Cobalto(II) cloruro hexahidratado.

Bio-Rad: Marcador de peso molecular para proteínas *Broad range precision marker*, membrana de PVDF, equipos de corrida y transferencia para WB.

Calbiochem: N-ethylmaleimida (NEM).

Life Technologies Invitrogen: DMEM baja y alta glucosa, DMEM sin rojo fenol, Opti-MEM, Penicilina-estreptomicina, Geneticina (G418), Tripsina, PBS estéril, Lipofectamina (lipoFECTAMINE Reagent[®]), Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), agarosa, marcador peso molecular para ácidos nucleicos.

Merck: Azur-eosina-azul de metileno según Giemsa en solución.

Pierce: kit de quimioluminiscencia Super Signal West Dura.

Polysciences Inc: Polyethylenimine [MW 25,000] (PEI).

PJK: Luciferase system Beetle-Juice.

Promega: X-gal, Reporter Lysis buffer para luciferasa.

QIAGEN: columnas QIAGEN® de afinidad para purificación de ADN plasmídico, resina de níquel Ni-NTA.

Roche: cóctel inhibidor de proteasas, Wst-1.

Santa Cruz Biotechnology: proteína A/Gplus agarosa.

Sigma-Aldrich: BSA 99% de pureza, L-Glutamina, Membrana de nitrocelulosa de 0.45 o 0.2 µm de poro, PMSF, Ortovanadato, Timidina, Nocodazole, Butirato de sodio, Hoescht, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), Proteína A-sefarosa, Ampicilina, Rojo Ponceau, Igepal (NP-40), Tritón X-100, Colchicina.

Para el cultivo de células se utilizaron materiales descartables como botellas de cultivo, placas de Petri, tubos cónicos de centrifuga, criotubos y pipetas de las marcas TTP, GBO, Eppendorf, Axygen y Corning.

III.3. Cultivo celular

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares COS-7 (riñón de mono verde africano), AtT-20 (corticotrofas tumorales de adenoma de ratón) y GH4 (lactosomatotrofas tumorales de adenoma de rata), y células MEF (cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón). También se generaron clones estables a partir de la línea AtT-20, que expresan un plásmido codificante para un ARN de interferencia específico para RSUME (AtT-20 shRSUME) o inespecífico (AtT-20 shSCRAMBLE).

Las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium pH 7.3 (DMEM glucosa 4.5 mg/ml para COS-7, DMEM glucosa 1 mg/ml para AtT-20 y GH4) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) previamente decomplementado por calor (30min a 56°C), NaHCO₃ 2.2 g/l, 10mM de HEPES, 4mM de L-glutamina, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 mg/ml. Cada 72-96hs o cuando llegaban a un 80% de confluencia, fueron repicadas. Para el mantenimiento y para el

plaqueo de experimento, las células fueron lavadas con PBS 1X a fin de eliminar restos de suero que puedan interferir con la actividad enzimática de la tripsina, e incubadas con tripsina 1min a 37°C. La tripsina se neutralizó con medio y se las sometió a disgregación mecánica con pipeta. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Las células MEF se mantuvieron en medio DMEM alta glucosa suplementado con 20% SFB de complementado, NaHCO₃ 2.2 g/l, 10mM de HEPES, 4mM de L-glutamina, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml y aminoácidos no esenciales. Para el pasaje de estas células se utilizó PBS 1X sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, tripsina con EDTA, y una dilución de 1:3 o 1:5.

Para los experimentos de hipoxia, las células COS-7 o AtT-20 fueron incubadas por 16h en medio con 2% SFB a 37°C, 5% CO₂ y 1% O₂ balanceado con 94% N₂ usando una cámara de hipoxia. Para inducir químicamente la hipoxia, las células COS-7 fueron incubadas por 3h en medio con 2% SFB y CoCl₂ 150 µM.

Para la obtención de células COS-7 o GH4 sincronizadas en la fase G₀ del ciclo celular las células fueron incubadas en medio sin SFB por 24h. Para la sincronización en la fase G₁ las células fueron incubadas en medio con 10% SFB y butirato de sodio 6 mM por 16h. Para la fase S se realizó un bloqueo con timidina 2.5 mM por 16h, recuperación por 8h en medio con 10% SFB, nuevo bloqueo con timidina 2.5 mM por 16h, y cosecha 4h después del segundo bloqueo con timidina. Para G₂ se repitió el procedimiento realizado para la fase S pero se cosecharon las células 8h después del segundo bloqueo. Para la fase M las células fueron incubadas en medio con 10% SFB y nocodazole 5 µM por 16h.

Para la sincronización de células MEF en interfase las células fueron incubadas en medio sin SFB por 24h. Para la sincronización en metafase, se las incubó en medio con 10% SFB y colchicina 5 µg/ml por al menos 6h.

III.3.A. Generación de clones AtT-20 shRSUME y AtT-20 shSCRAMBLE

Para obtener los clones AtT-20 shRSUME y AtT-20 shSCRAMBLE, las células AtT-20 fueron transfectadas con un plásmido comercial de expresión de un ARN de interferencia específico contra RSUME (secuencia GGAGAAGTGGGCTTCAGATTT) o inespecífico (secuencia GGAATCTCATTTCGATGCATAC) (SABiosciences). 48h horas post-transfección se adicionó el antibiótico G418 600µg/ml al medio para seleccionar las células transfectadas, y se mantuvieron así hasta obtener clones celulares. Se trabajó con el pool de clones, sin realizar separación de los mismos, y se los mantuvo en medio con G418 300µg/ml. El silenciamiento de RSUME en los clones se verificó por Western blot con anticuerpos específicos.

III.3.B. Cultivo primario de MEF

Se utilizaron hembras preñadas de ratón de la cepa CF-1 con 13.5 días de gestación adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos en cajas en un número no mayor a 5 ratones, en sistemas de racks ventilados, con filtración de aire constante y manipulados bajo campana de flujo laminar, libre de patógenos, en condiciones estándar de luz y temperatura (luz blanca entre las 6.00 y las 18.00h de cada día, a una temperatura constante de 22-23°C), con comida y agua acidificada administrada ad libitum. Los ensayos experimentales con animales fueron aprobados por la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEN-UBA.

Las hembras preñadas de ratón con 13.5 días de gestación (se consideró como 0.5 el día en el que se observó el tapón vaginal en la hembra) fueron sacrificadas por dislocación cervical, se les disectó el útero conteniendo los sacos embrionarios y se colocó el mismo en PBS 1X sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} estéril. Los embriones se separaron de las placentas y de la membrana fetal, y se les removió la cabeza y vísceras bajo lupa. Por no más de 5-10min los embriones se procesaron con bisturí hasta obtener pedacitos del tamaño de granos, se

agregó tripsina con EDTA, y se continuó disgregando con bisturí por unos pocos minutos más. La mezcla disgregada se incubó a 37°C por 20-30min en agitación, la tripsina se neutralizó con medio de cultivo y se centrifugó a 1000rpm por 5min. El pellet de células fibroblásticas embrionarias de ratón se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en placas (para calcular el número de placas se utilizó la fórmula #embriones/3). Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

III.4. Adenomas de hipófisis humanos

Pacientes con adenomas de hipófisis y síntomas clínicos de acromegalia, enfermedad de Cushing, prolactinoma o tumores clínicamente no-funcionantes fueron diagnosticados mediante la determinación de los niveles de hormonas de hipófisis en plasma e imágenes de resonancia magnética nuclear como fue descrito previamente (Arzt et al., 1992; Paez Pereda et al., 1996; Páez Pereda et al., 2000), en colaboración con la Dra. Silvia Berne de la sección de neurocirugía del Hospital Santa Lucía. El tejido tumoral se obtuvo mediante cirugía transfenoidal. La pureza de las muestras fue analizada por inmunohistoquímica para diferentes hormonas de la hipófisis.

Los tumores de adenoma de hipófisis de origen humano se cortaron a modo de explantes. Para la detección de proteínas por Western Blot, los explantes fueron centrifugados levemente a 2000 rpm durante 5 min a 4°C, lavados con PBS 1X frío, centrifugados nuevamente y el pellet se lisó con 500µl de *cracking buffer* (Laemmli buffer: 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10% glicerol, 5% v/v β-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol). Para completar la disgregación del explante se procesó con ULTRA-TURRAX por 30s a máxima potencia.

III.5. Plásmidos

III.5.A. Plásmidos utilizados

En este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos:

- HA-PTTG: vector conteniendo la región codificante del gen de PTTG1 humano río abajo del tag HA, en el plásmido pCEFL (clonado en el laboratorio).
- V5-RSUME: vector conteniendo la región codificante del gen de RSUME195 humano río abajo del tag V5, en el plásmido pCEFL (clonado en el laboratorio).
- Senp-1: vector conteniendo 1.93kb de la región codificante de Senp-1 humano río abajo del tag Flag, en el plásmido pFLAG (cedido por Dr. E. Yeh).
- Gam1 wt: vector conteniendo la región codificante de Gam1 del virus CELO río abajo del tag Myc, en el plásmido pSG9m (cedido por Dra. S. Chiocca).
- Gam1 mut: vector conteniendo la región codificante de Gam1 mutante L258,265A del virus CELO río abajo del tag Myc, en el plásmido pSG9m (cedido por Dra. S. Chiocca).
- HA-SUMO-1: vector conteniendo 291pb de la región codificante de SUMO-1 humano río abajo del tag HA, en el plásmido pcDNA3 (cedido por Dr. R. Hay).
- HA-SUMO-2: vector conteniendo 276pb de la región codificante de SUMO-2 humano río abajo del tag HA, en el plásmido pcDNA3 (cedido por Dr. R. Hay).
- HA-SUMO-3: vector conteniendo 282pb de la región codificante de SUMO-3 humano río abajo del tag HA, en el plásmido pcDNA3 (cedido por Dr. M. Tatham).
- 6His-SUMO-1: vector conteniendo la región codificante de SUMO-1 humano río abajo del tag 6xHis, en el plásmido pcDNA3 (cedido por Dr. M. Treier).
- 6His-Ubiquitina: vector de expresión de la región codificante del gen de Ubiquitina humano río abajo del tag 6xHis (cedido por Dr. M. Treier).
- c-myc-LUC: construcción reportera que contiene la región promotora comprendida entre el -2329/+510 del gen de c-Myc humano río arriba del gen de la luciferasa, contenida en el plásmido pGL3-Basic (cedido por Dr. K. Mitsuyasu).

- cycD3-LUC: construcción reportera que contiene la región promotora del gen de ciclina D3 humano río arriba del gen de la luciferasa, contenida en el plásmido pGL2-Basic (cedido por Dr. K. Ohtani).
- p21-LUC: construcción reportera que contiene la región promotora del gen de p21 humano río arriba del gen de la luciferasa (cedido por Dr. B. Vogelstein).
- CMV-βgal: vector de expresión de β-galactosidasa (cedido por Dr. D. Spengler).

III.5.B. Preparación de Bacterias Competentes

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook y Russell, 2006). Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5α fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar, libres de antibiótico y suficientemente diluidas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16h. Una colonia fue tomada y crecida durante 16h en 5ml de medio LB en agitación (200rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10min a 3000rpm y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 100ml de CaCl₂ 100nM pre-enfriado en hielo. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10min a 3000rpm. El *pellet* fue resuspendido en 5ml de CaCl₂ 100 nM e incubado en hielo por 30min. Posteriormente, 200 μl de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos eppendorf con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15%. Finalmente, las bacterias fueron conservadas a -80°C.

III.5.C. Transformación Bacteriana

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook y Russell, 2006). 50μl de bacterias competentes DH5α de eficiencia al menos 1.10⁶ colonias/μg, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo. Luego se agregaron entre

50ng y 100ng de plásmido, y se las incubó 30min en hielo. Rápidamente, se les aplicó un shock térmico de 90s a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo. Luego, se agregaron 900µl de medio LB sin antibiótico durante 45-60min a 37°C. Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500µl), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquearon en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

III.5.D. Preparación de plásmidos a pequeña escala o mini-preparaciones

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). Tubos de vidrio conteniendo 3ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés, aisladas como se describió previamente en placas de LB agar. Los cultivos fueron mantenidos por 20h aproximadamente a 37°C en agitación a 180rpm. Luego, 1.5ml de cultivo fueron trasvasados a tubos tipo eppendorf y centrifugados a 2000rpm por 5min. El *pellet* celular fue resuspendido en 300µl de P1 (Tris-HCl 50mM pH 7.5, EDTA 10mM) conteniendo ARNasa A (50µg/ml). Luego, 300µl de P2 (NaOH 0.2N, SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300µl de P3 (KAcO 3M pH 5.2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20min y se centrifugó a 10000rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700µl del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el *pellet* se lavó con 1ml de etanol 70%. El *pellet* finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20µl de H₂O.

III.5.E. Análisis de plásmidos por enzimas de restricción

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron analizados mediante mapeos por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos. Para ello varias mini-preparaciones de ADN plasmídico fueron verificadas simultáneamente. 2-3 µl de

ADN plasmídico proveniente de mini-preparaciones fueron sometidos a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3 μ l de ADN plasmídico, 2 μ l de *buffer* de restricción, 0.5U de la enzima de restricción escogida y H₂O hasta completar 20 μ l de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2h a 37°C. Luego las bandas obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0,6-2% en *buffer* TBE (Tris-HCl 25mM, Ácido Bórico 100mM; EDTA 10mM, pH 8.0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente, las bandas fueron puestas de manifiesto mediante exposición a luz UV y documentadas fotográficamente en papel térmico.

III.5.F. Preparación de plásmidos a gran escala o maxi-preparaciones

Los plásmidos chequeados fueron sujetos a amplificaciones a gran escala con el objeto de obtener una masa suficiente como para llevar adelante los experimentos de transfecciones. Para ello, las maxi-preparaciones fueron llevadas a cabo mediante el uso de columnas de afinidad. Brevemente, 350ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado, fueron inoculados con una alícuota de suspensión de bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés, aisladas como se describió previamente en placas de LB agar. Los cultivos fueron mantenidos por 20h aproximadamente a 37°C en agitación a 180rpm. Los cultivos, en fase logarítmica de crecimiento, fueron trasvasados a botellas de policarbonato de 500ml y centrifugados a 6000g por 15min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue resuspendido en 10ml de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM) conteniendo ARNasa A (50 μ g/ml). Luego, 10ml de P2 (NaOH 0.2N, SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 10ml de P3 (KAcO 3M pH 5.2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20min y se centrifugó a 20000g durante 10min a 4°C. Mientras tanto, las columnas se equilibraron con *buffer* QBT. El sobrenadante fue filtrado en un embudo con gasa y volcado en una columna QIAGEN-tip 500 (para maxi-

preparaciones). La columna fue vaciada por gravedad y lavada dos veces con 30ml de *buffer* de lavado QC. Finalmente, el ADN retenido en la columna fue eluído con 15ml de *buffer* de elución QF. El ADN del eluído fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000g. El ADN precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% y el *pellet* fue secado al aire durante 20min y resuspendido en H₂O miliQ. La calidad del ADN plasmídico se verificó en geles de agarosa y la concentración final se midió con Nanodrop.

III.6. Transfecciones

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 160000 células por pocillo para COS-7, 300000 células por pocillo para AtT-20 y GH4, y 150000 células por pocillo para MEF. Se dejaron adherir O.N. en estufa a 37°C y 5% CO₂, y al día siguiente se realizó la transfección.

III.6.A. Transfección con PEI

El medio de cultivo de las células COS-7 sembradas fue reemplazado por OPTIMEM y las células fueron transfectadas con el reactivo Poli-Etilenimina (PEI). Para ello en cada pocillo se combinaron 2µg de ADN plasmídico total, y/o con 20µM de siRNAs, con 10µl de PEI en 50µl de OPTIMEM. Luego de 10min la mezcla se diluyó con 450µl de OPTIMEM y se incubó a las células con la misma por 6h a 37°C. Pasada la incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas O.N. en DMEM con 10% SFB a 37°C y 5% CO₂.

III.6.B. Transfección con Lipofectamina

El medio de cultivo de las células AtT-20 sembradas fue reemplazado por DMEM sin suplementos y las células fueron transfectadas con Lipofectamina según las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de poliestireno se colocaron 2µg de ADN plasmídico total y 100µl de DMEM, y en otro, 8µl de Lipofectamina y 100µl de DMEM, por pocillo.

Transcurridos 5min, se transfirió todo el contenido del tubo con Lipofectamina al tubo con ADN, se mezcló vigorosamente y se incubó por 45min a temperatura ambiente para que se formaran los complejos entre el poli-cation y el ADN. Luego, se agregó la mezcla al pocillo y se incubó a las células durante 6h a 37°C. Pasada la incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas O.N. en DMEM con 10% SFB a 37°C y 5% CO₂.

III.6.C. Transfección con Lipofectamina 2000

El medio de cultivo de las células GH4 sembradas fue reemplazado por DMEM sin suplementos y las células fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 según las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un tubo de poliestireno se colocaron 2µg de ADN plasmídico total y 250µl de DMEM, y en otro, 8µl de Lipofectamina 2000 y 250µl de DMEM, por pocillo. Se combinaron ambas soluciones, se mezcló por inversión y se incubó por 20min a temperatura ambiente para que se formaran los complejos entre el poli-cation y el ADN. Luego, se agregó la mezcla al pocillo y se incubó a las células durante 6h a 37°C. Pasada la incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas O.N. en DMEM con 10% SFB a 37°C y 5% CO₂.

III.6.D. Transfección con fosfato de calcio

El medio de cultivo de las células MEF sembradas fue reemplazado por DMEM con 10% SFB. 2-4h después, las células fueron transfectadas con fosfato de calcio. Brevemente, en un tubo se colocaron 3µg de ADN plasmídico total, 9µl de CaCl₂ 2.5M y H₂O hasta un volumen final de 85µl. El tubo se mezcló vigorosamente y se incubó por 10min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se agregó la mezcla de ADN por goteo a un tubo conteniendo 85µl de HEPES-PO₄ 2X mantenido en burbujeo continuo. Se incubó por 30min a temperatura ambiente y se agregó la mezcla al pocillo por goteo. Se incubó a las células O.N. a 37°C. Pasada la incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas en DMEM con 20% SFB a 37°C y 5% CO₂.

III.7. Western Blot

Transcurridas 48h de la transfección, las células fueron lavadas con PBS 1X. Se lisaron directamente con 100µl de *cracking buffer* (Laemmli buffer: 62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% m/v SDS, 10% glicerol, 5% v/v β-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol). Los extractos fueron levantados en tubos eppendorf con ayuda de un *rubber* y calentados a 95°C por 5min.

Las muestras preparadas en *cracking buffer* fueron resueltas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes en *buffer* Tris-Glicina-SDS (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, 0.1% SDS). Para la identificación de los tamaños moleculares, se utilizó el marcador de peso molecular *Broad Range Precision Marker*. Se realizó la corrida electroforética hasta que cayó el frente de corrida. Una vez finalizada, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0.2 o 0.45µm de poro a 100V durante 1h en *buffer* de transferencia (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, 0.05% SDS, 20% metanol). Luego, se tiñeron transitoriamente las membranas con Rojo Ponceau para chequear el proceso hasta ese paso y comparar aproximadamente las masas sembradas en cada calle. Se incubaron las membranas durante 1h en agitación con solución de bloqueo TBS-Tween (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, 0.1% SDS, 0.05% Tween-20) con 5% m/v de leche descremada para bloquear los sitios inespecíficos. La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C en agitación. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en la misma solución de bloqueo. Las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10min con TBS-Tween. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a peroxidasa de rabanita en una dilución 1:3000 en solución de bloqueo por 1h a temperatura ambiente en agitación. Después de tres lavados sucesivos con TBS-Tween y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada mediante el kit de quimioluminiscencia *Super Signal West Dura* utilizando el equipo digital LAS-1000 Imaging System (Fuji) u Odyssey Fc.

III.8. Inmunoprecipitación y purificación con resina de níquel

Transcurridas 48h de la transfección, las células COS-7 fueron lavadas con PBS 1X frío y levantadas con el *buffer* RIPA modificado (Para IP α HA: 50mM Tris pH 7.4, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40; Para IP α His: 20mM Tris pH 7.4, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Tritón X-100) al que se le agregó el cóctel de inhibidores de proteasas 1:25, ortovanadato de sodio 8mM y PMSF 1mM. Los extractos fueron congelados a -80°C para favorecer la rotura de las células y lisados durante 45min a 4°C en rotor giratorio. Se utilizó una placa de 10cm de diámetro por condición. Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron a 4°C durante toda la noche utilizando 1 μ g de anticuerpo anti-HA o anti-His. Los inmunoprecipitados fueron recuperados con bolitas de sefarosa conjugadas a proteína A para IP α HA, o con bolitas de agarosa conjugadas a proteína A/G plus para IP α His. Los inmunoprecipitados fueron lavados dos veces con el *buffer* RIPA modificado y una última vez con PBS frío. Luego fueron resuspendidos en *cracking buffer*. Después de calentar a 95°C por 5 min, las muestras fueron centrifugadas a baja velocidad y los sobrenadantes fueron sometidos a Western Blot.

Para la purificación con resina de níquel Ni-NTA, las células COS-7 fueron levantadas en PBS 1X, centrifugadas a 3000rpm por 5min y resuspendidas en *buffer* de extracción (Guanidinio-HCl 6M, Tris-HCl 10mM pH 8, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM). El lisado resultante se sonicó por 10s a una potencia del 25% para disminuir la viscosidad, se agregaron 75 μ l de resina Ni-NTA por condición y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación. Se utilizó una placa de 10cm de diámetro por condición. Al día siguiente se realizaron centrifugaciones, resuspensiones e incubaciones sucesivas de 5min en agitación con *buffer* de extracción, *buffer* Urea I pH 8 (Urea 8M, Tris-HCl 10mM pH 8, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM), *buffer* Urea II pH 6.3 (Urea 8M, Tris-HCl 10mM pH 6.3, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Tritón X-100 0.2%, Imidazol 5mM y Iodoacetamida 10mM) y *buffer* Urea III pH 6.3 (Urea 8M, Tris-HCl 10mM pH 6.3, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100mM, Tritón X-100 0.1%, Imidazol 5mM y

iodoacetamida 10mM). Finalmente se eluyeron las proteínas unidas a la resina de níquel incubando con *buffer* de elusión (Tris-HCl 125mM pH 6.7, 5% SDS, 30% glicerol, β -mercaptoetanol 720mM e Imidazol 200mM) por 20min en agitación. Los eluidos se resuspendieron en *cracking buffer*. Después de calentar a 95°C por 5 min, las muestras fueron centrifugadas a baja velocidad y los sobrenadantes fueron sometidos a Western Blot.

III.9. Ensayos de actividad de Luciferasa

Transcurridas 24h de la transfección, las células GH4 fueron lavadas con PBS 1X y lisadas con 100 μ l de *Reporter Lysis buffer* en hielo. Se precipitaron el debris celular y la fracción rica en membranas por centrifugación 5min a 13000rpm y los sobrenadantes se guardaron a -80°C para favorecer la lisis.

Para determinar la actividad luciferasa, 20 μ l del extracto celular se incubaron con 100 μ l del reactivo comercial Luciferase Beetle-Juice, evitando la luz directa, e inmediatamente se cuantificó la actividad de la luciferasa de luciérnaga en un luminómetro durante 30s como unidades relativas de luciferasa (RLUs).

Para normalizar los valores de RLUs, a modo de corregir las diferencias en la eficiencia de transfección o el número total de células cosechadas entre pocillos, se determinó la actividad de β -galactosidasa codificada por un plásmido control (con el gen de la β -galactosidasa bacteriana bajo el promotor constitutivo viral CMV) co-transfectado en los experimentos. En placas de 96 pocillos fondo plano se colocaron por pocillo 80 μ l de *buffer* β -gal 1X diluido con H₂O (*Buffer 2X*: NaPO₄ 0.2M pH 7.4, MgCl₂ 2mM, β -mercaptoetanol 0.1M, Orto-nitro-fenil-galactopiranosido 1.33 mg/ml) y 20 μ l de lisado celular. Como blanco se utilizó *buffer* de lisis en lugar de lisado celular. Se incubó a 37°C por 30min o hasta aparición de color amarillo. Finalmente, se midió la absorbancia a 415nm.

III.10. Inmunofluorescencia y microscopía

Las células MEF sembradas en cubreobjetos de vidrio fueron transfectadas y 48h después se lavaron con PBS 1X frío y se fijaron con paraformaldehído en PBS 4% m/v. A continuación, las células se permeabilizaron con Triton X-100/PBS 0.01%. Después de un lavado con PBS de 5min, se incubó con SFB en PBS 1% v/v durante 1h a temperatura ambiente para disminuir la unión no específica. Los anticuerpos primarios se diluyeron 1:200 y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después de lavar con PBS, las células se incubaron con una dilución 1:200 de anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488, 555 o 647 durante 45min a temperatura ambiente. Cuando se realizó una doble tinción, los anticuerpos primarios y secundarios se incubaron juntos. En cada experimento se realizaron los controles pertinentes de autofluorescencia y sin anticuerpo primario. Luego, los cubreobjetos se lavaron con PBS, se incubaron con DAPI 1µg/ml o Hoescht 0.5 µg/ml por 15min y se montaron en medio de montaje *FluorSave Reagent* (Calbiochem). Las muestras se analizaron en el microscopio de fluorescencia AxioObserver Z1 LED Colibrí (Carl Zeiss) o en el microscopio de fluorescencia confocal LSM 710 AxioObserver (Carl Zeiss) según el experimento utilizando los láseres y filtros apropiados. Las imágenes se adquirieron con el Software ZEN 2011. No se observó fluorescencia en los controles negativos realizados sin anticuerpo primario y en el control de autofluorescencia. Todas las imágenes fueron adquiridas con los mismos ajustes del microscopio para asegurar su correcta interpretación.

III.11. Extendidos cromosómicos

Luego de la transfección y la sincronización en interfase o metafase, las células MEF fueron levantadas por tripsinización, centrifugadas a 1000rpm por 5min, y el *pellet* fue resuspendido en una solución KCl 0.075M para hipotonía. Se incubó durante 15min a 37°C y transcurrido este tiempo, se frenó la hipotonía con 3 gotas de solución Metanol/Ácido acético 3:1. Se centrifugó a 1000rpm por 5 min y se resuspendió el *pellet* en solución Metanol/Ácido acético 3:1 para fijar. Este último paso de fijación se repitió dos veces. Por el

método de portas fríos e ignición se reventaron las células sobre portaobjetos obteniendo extendidos celulares. Los mismos fueron teñidos con Giemsa 5% por 10min y destañados con agua. Se dejaron secar y se montaron con medio de montaje no acuoso Pathoclear®.

III.12. Proliferación celular

III.12.A. Método de Wst-1

La proliferación celular de los clones AtT-20 se determinó mediante la utilización del reactivo Wst-1, como fuera descrito (Páez Pereda et al., 2000). Brevemente, las células AtT-20 se sembraron a razón de 5000 células/pocillo en medio de cultivo DMEM con 10% SFB. 24h después las células fueron lavadas con PBS 1X y se cambió el medio por DMEM con 0, 2, 5 o 10% SFB. Resultados similares se obtuvieron entre las 24h, 48h y 72h de proliferación. El compuesto Wst-1 es clivado por la cadena respiratoria mitocondrial y el producto coloreado correlaciona directamente con el número de células viables en el cultivo. El producto de la reacción fue determinado mediante la utilización de un lector de ELISA a 450 nm. El compuesto se adiciona al cultivo en una dilución 1/10 respecto del volumen del pocillo con medio DMEM sin rojo fenol, y la lectura en el lector de ELISA se realiza después de 2h de su agregado.

III.12.B. Citometría de flujo

Al momento de siembra, los clones AtT-20 fueron resuspendidos en 1 ml de 5% v/v de SFB en PBS, incubados con CFSE 5 μ M durante 5min, lavados 3 veces con 5% v/v de SFB en PBS y finalmente resuspendidos en medio DMEM 10% SFB en placas de 6 pocillos. 24h después, las células fueron levantadas por tripsinización, resuspendidas en 5% v/v de SFB en PBS y analizadas mediante citometría de flujo cuantificando la dilución de CFSE. Como controles se hicieron pocillos sin marcar con CFSE (autofluorescencia) o incubados con CFSE media hora antes del análisis por citometría de flujo (máxima intensidad de CFSE).

III.13. Tratamiento estadístico de los datos

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces de forma independiente. Los resultados son presentados como la media \pm EMS de cada condición experimental. Se probó la homogeneidad de los datos y las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas, mediante un ANOVA de un factor (GraphPad Prism versión 5 for Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA) , seguido de una prueba post hoc de Scheffé cuando más de 2 medias fueron comparadas (StatView, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

IV. RESULTADOS



IV.1. Regulación de los niveles proteicos de PTTG

IV.1.A. Expresión de PTTG bajo condiciones de estrés

Como se mencionó en la *Introducción*, la proteína PTTG actúa principalmente como securina controlando la correcta separación de las cromátidas hermanas de los cromosomas en metafase. Es por ello que sus niveles de expresión están finamente regulados a lo largo del ciclo celular, pero existen diferentes condiciones que pueden inducir un aumento o disminución de los mismos. Basándonos en esto, decidimos estudiar qué sucede con los niveles proteicos de PTTG en condiciones de estrés celular. En paralelo estudiamos la expresión de RSUME basados en el conocimiento que se sobreexpresa bajo estrés. En células COS-7 que no expresan PTTG, transfectadas transientemente con PTTG1 se encontró que esta expresión aumenta en hipoxia o al ser estimuladas con cloruro de cobalto, un inductor químico de hipoxia que inhibe a las prolin-hidroxilasas del factor de transcripción HIF-1 (**Figura 8A**). PTTG1 a veces migra como un doblete debido a que sufre fosforilación dependiente del ciclo celular; en este caso se observó el doblete correspondiente a PTTG fosforilado y no fosforilado. El mismo efecto del estrés se observó para la proteína PTTG endógena de células AtT-20 (corticotrofos de ratón) sometidas a hipoxia, pero no se detectó un doblete (**Figura 8B**). En todos los casos, se corroboró que RSUME se induce en los distintos tipos de estrés estudiados (**Figura 8**).

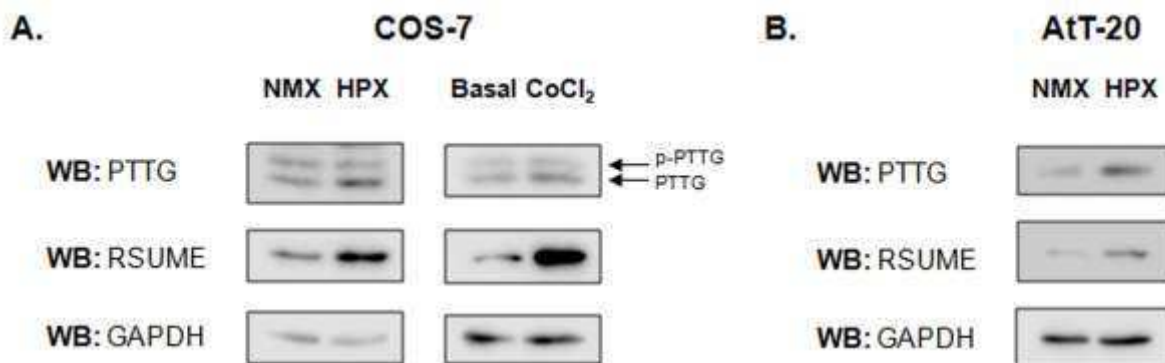


Figura 8. PTTG se induce bajo condiciones de estrés. **A.** Células COS-7 fueron transfectadas con PTTG1 y 24h después fueron incubadas en hipoxia por 16h (O₂ 1%, CO₂ 5%, N₂ 94%, 37°C), o cloruro de cobalto 150μM por 3h. Los extractos proteicos resultantes fueron analizados por Western Blot (WB). **B.** Células AtT-20 fueron incubadas en hipoxia por 16h (O₂ 1%, 37°C) y los extractos resultantes se sometieron a Western Blot. GAPDH se usó como control de carga. NMX, normoxia; HPX, hipoxia; CoCl₂, cloruro de cobalto. En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

IV.1.B. Acción de RSUME sobre los niveles proteicos de PTTG

Sabiendo que RSUME aumenta su expresión en condiciones de estrés y habiendo determinado que PTTG también se induce bajo estrés, nos propusimos estudiar el efecto de la presencia de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG. Por Western Blot en células COS-7, el nivel de expresión de PTTG1 fue mayor cuando sobreexpresamos RSUME. Este aumento se observó tanto en la forma fosforilada como no fosforilada de PTTG (**Figura 9**).

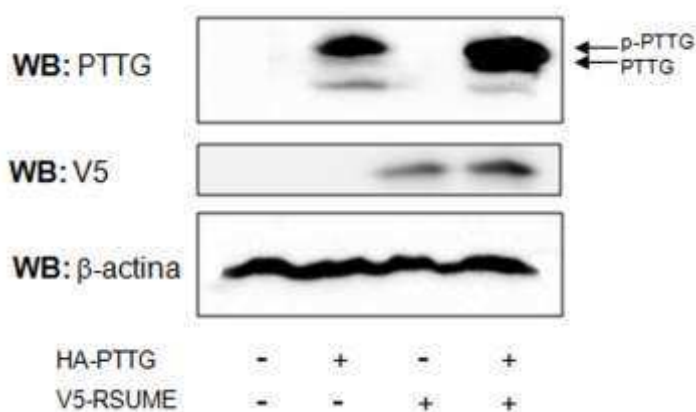


Figura 9. RSUME induce un aumento de la estabilidad proteica de PTTG1. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1, RSUME, y/o el correspondiente vector vacío. 48h después, los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB). β-actina se usó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de cuatro con resultados similares.

En células de las líneas tumorales hipofisarias GH4 (somatotrofos de rata) y AtT-20, que expresan PTTG de forma endógena, se determinó por Western Blot que la presencia de RSUME produce un aumento de los niveles de expresión endógenos de PTTG (**Figura 10**). Al igual que en células AtT-20, en la línea celular GH4 no se detectó un doblete para la banda de la proteína PTTG como se había observado en las células COS-7.

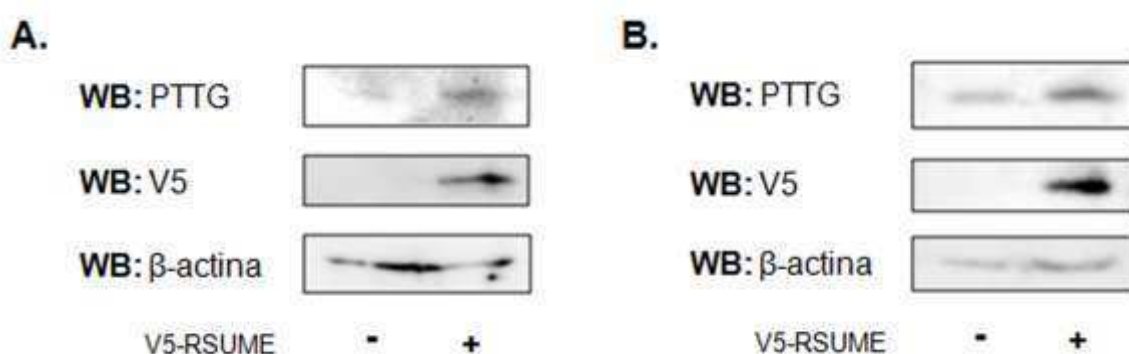


Figura 10. RSUME induce un aumento de la estabilidad proteica de PTTG endógeno. Células GH4 (**A**) o AtT-20 (**B**) fueron transfectadas con RSUME o vector vacío. 48h después, los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB). En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

En línea con estos resultados, se observó que al silenciar RSUME con ARN pequeño de interferencia (siRNA) específico, disminuyen los niveles proteicos de PTTG en comparación con la condición basal o con la condición en la que se utilizó un siRNA inespecífico, tanto en células COS-7 transfectadas con PTTG1 (**Figura 11A**) como en células GH4 que expresan PTTG (**Figura 11B**).

Notamos que en las células GH4 se produjo un aumento de la expresión de PTTG cuando utilizamos un siRNA inespecífico, respecto de la condición basal. Creemos que este aumento puede deberse al estrés generado en las células por el hecho de introducir un ARN pequeño de interferencia.

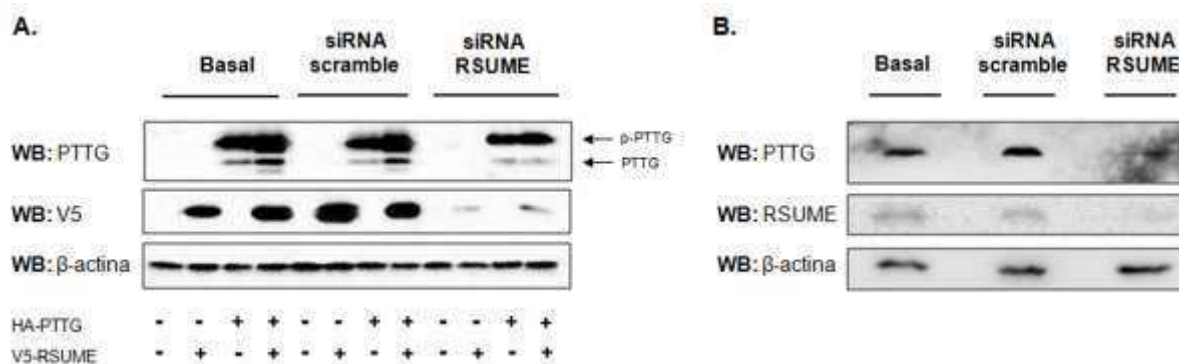


Figura 11. El silenciamiento de RSUME produce una disminución de la expresión de PTTG. A. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1, RSUME, y/o el correspondiente vector vacío, y co-transfectadas con ARN pequeño de interferencia específico para RSUME (siRNA RSUME) o inespecífico (siRNA scramble). 48h después, los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB). β -actina se usó como control de carga. **B.** Células GH4 fueron transfectadas con siRNA específico para RSUME o siRNA inespecífico. 48h después, los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB). En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

IV.1.C. Estabilidad proteica de PTTG en las fases del ciclo celular

Teniendo en cuenta que la expresión de PTTG varía a lo largo del ciclo celular, se analizaron los niveles de expresión de PTTG en las distintas fases del ciclo celular y el efecto de RSUME sobre los mismos. En células COS-7 transfectadas transientemente con PTTG1, se comprobó que PTTG tiene un patrón de expresión dependiente del ciclo celular, mostrando un aumento de sus niveles proteicos en las fases G1 y M (**Figura 12A**). En presencia de RSUME, PTTG aumenta su expresión en las fases G1 y M. Como control de las distintas fases se utilizaron marcadores específicos de cada una de ellas (ciclina D para G1, ciclina A para S, ciclina B1 para G2-M, y fosfo-Serina 10 de la histona H3 para M).

En células GH4 se observó una inducción de PTTG en presencia de RSUME en todas las fases del ciclo celular, pero sin una predominancia por alguna de ellas (**Figura 12B**).

En conjunto podemos concluir que existe una inducción de PTTG y RSUME en condiciones de estrés, y un aumento de la expresión de PTTG inducido por RSUME, tanto sobre la proteína endógena como transfectada. Este aumento ocurre principalmente en las fases G1 y M del ciclo celular.

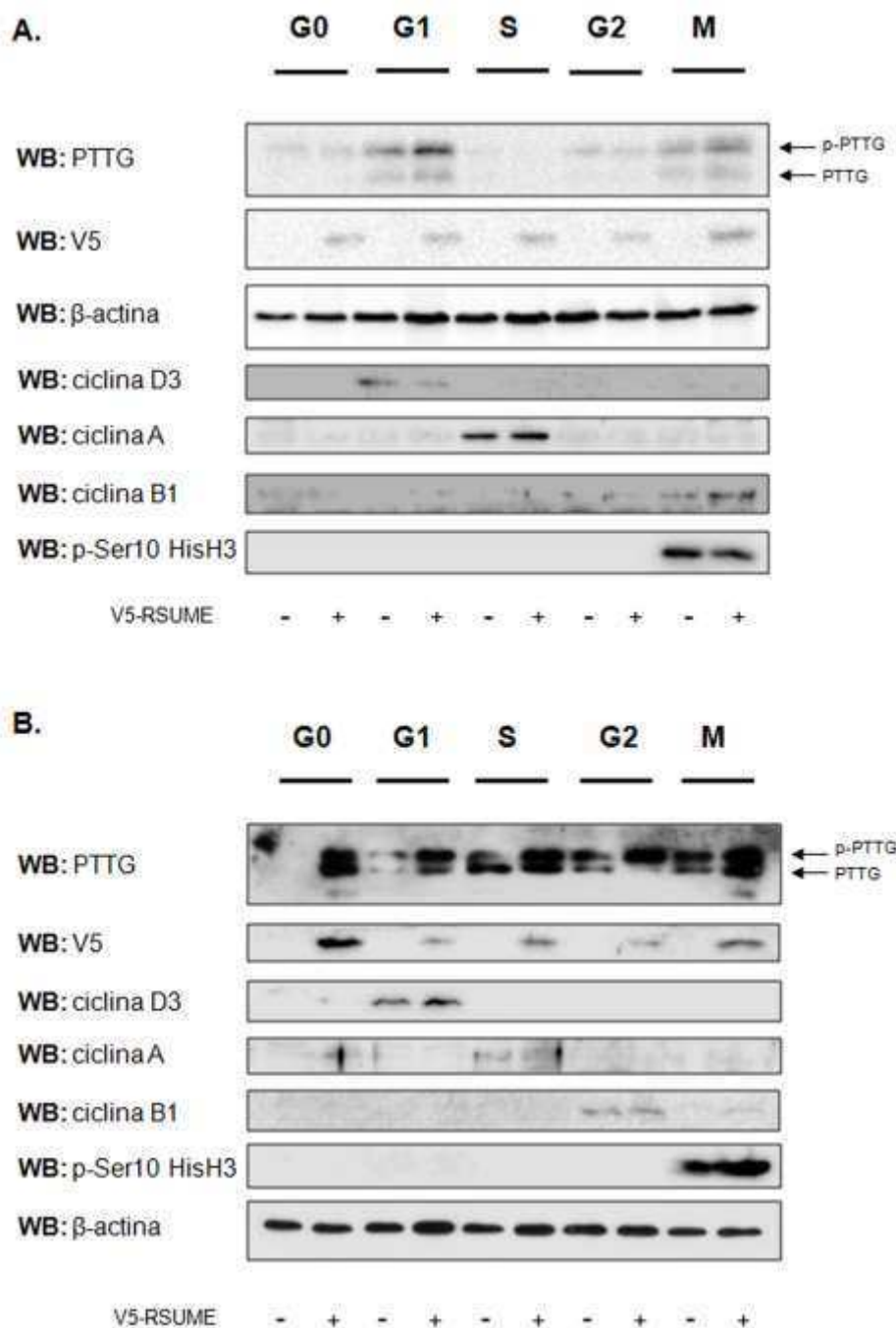


Figura 12. RSUME induce un aumento de los niveles de expresión de PTTG dependiente del ciclo celular. **A.** Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1, RSUME, y/o el correspondiente vector vacío. Los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB), previa sincronización de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0: privación de suero por 24h; G1: incubación con butirato de sodio 6 mM por 16h; S: bloqueo con timidina 2.5 mM por 16h, recuperación por 8h, nuevo bloqueo con timidina 2.5 mM por 16h, y cosecha a las 4h; G2: idem. S pero cosecha a las 8h; M: incubación con nocodazole 5 μ M por 16h). Ciclina D3 se usó como marcador de la fase G1, Ciclina A como marcador de S, Ciclina B1 como marcador de G2-M, y fosfo-Serina 10 de la histona H3 como marcador de M. **B.** Células GH4 fueron transfectadas transientemente con RSUME o vector vacío. Los extractos proteicos fueron sometidos a WB, previa sincronización de las células en las distintas fases del ciclo celular según se indica en **A.** β -actina se usó como control de carga. En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

IV.2. Sumoilación de PTTG e interacción con ubiquitinación

Dado que RSUME induce un aumento de los niveles de expresión de PTTG y a su vez es un enhancer de sumoilación, hipotetizamos que PTTG podría estar siendo modificada por SUMO.

Para verificar esta hipótesis, en primer lugar se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de PTTG1 humano con los software SUMOplot™ Analysis Program y SUMOsp 2.0. El programa SUMOplot predice la presencia de sitios de sumoilación en una proteína y otorga un puntaje a cada posible sitio de sumoilación en base a la probabilidad que tiene esa secuencia consenso de acoplarse a SUMO (score entre 0 y 1). El software SUMOsp 2.0 predice la presencia de potenciales sitios de sumoilación con mayor especificidad que SUMOplot, y los clasifica en Tipo I (secuencia Ψ KXE) o Tipo II (no consenso).

El análisis de la secuencia de la proteína PTTG1 humana con el software SUMOplot predijo con alta probabilidad la existencia de dos sitios consenso de sumoilación en las lisinas de posición 168 (K168) y 25 (K25). Además, existirían otros cinco sitios de sumoilación más débiles, en las lisinas 21 (K21), 84 (K84), 48 (K48), 157 (K157) y 116 (K116) (**Figura 13A**). Al realizar el mismo estudio con el Software SUMOsp 2.0, todos los sitios de sumoilación predichos serían no consenso (Tipo II). Al igual que con SUMOplot, el sitio K168 aparece como el de mayor score. Después le siguen en puntuación los sitios K82 y K99, cuando se reduce la puntuación de corte (cut off) de 2.64 a 2.26. Sin restricciones, hay otras 17 lisinas que podrían sufrir conjugación a SUMO (**Figura 13B**).

Unificando los resultados de ambos software, PTTG1 tendría un sitio de sumoilación más probable en la posición K168.

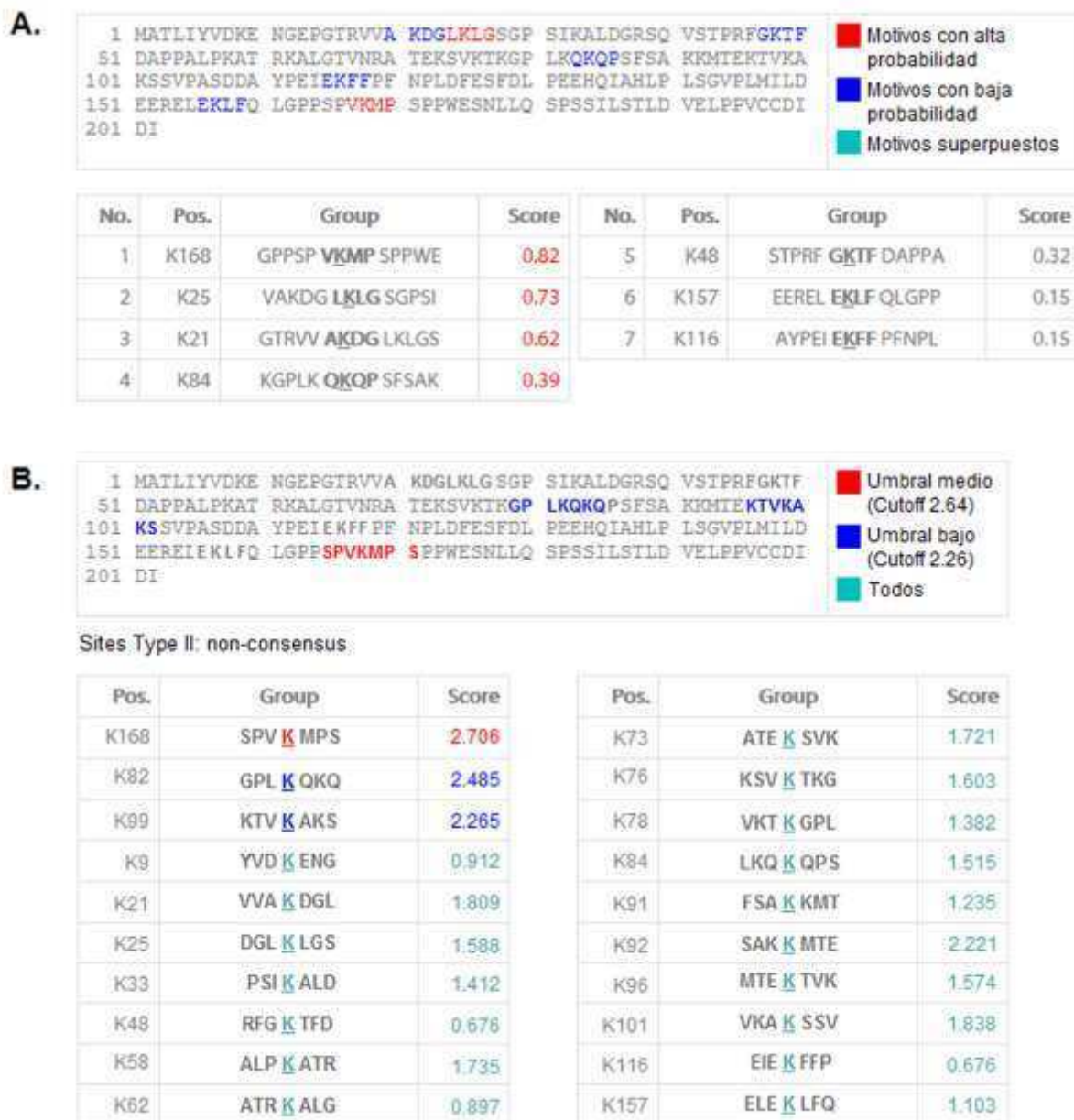


Figura 13. Predicción de sitios de sumoilación en la proteína PTTG1 humana. A. Predicción con el software SUMOplot. La proteína PTTG1 presenta dos sitios de sumoilación con alta probabilidad de ocurrencia en las lisinas K168 y K25 (indicados en rojo), y cinco sitios con baja probabilidad de ocurrencia en las lisinas K21, K84, K48, K157 y K116 (indicados en azul). En la tabla se indica la puntuación obtenida en la predicción por cada sitio de sumoilación (score) y la secuencia proteica que rodea a cada lisina sumoilable. **B.** Predicción con el software SUMOsp 2.0. Con una puntuación de corte de 2.64, la proteína PTTG1 presenta un probable sitio de sumoilación en la lisina K168 (indicado en rojo). Los sitios K82 y K99 tienen un score menor (indicados en azul) y además se predicen 17 sitios adicionales (indicados en turquesa). En la tabla se indica la puntuación obtenida en la predicción por cada sitio de sumoilación (score) y la secuencia proteica que rodea a cada lisina sumoilable.

Como evidencia experimental, decidimos primero estudiar qué sucede con los niveles de expresión de PTTG en presencia de Senp-1 (la enzima SUMO hidrolasa que elimina SUMO de las proteínas sumoiladas), Gam1 (proteína adenoviral que inhibe la sumoilación por inactivación de la enzima SAE1/SAE2 e inducción de la degradación de las enzimas SAE1/SAE2 y Ubc9), o RSUME. En células COS-7 transfectadas transientemente con PTTG1, se produce una disminución de los niveles de expresión de la proteína PTTG en presencia de Senp-1, respecto de la condición basal (**Figura 14A**). Por su parte RSUME aumenta la estabilidad proteica de PTTG. La reducción por Senp-1 ocurre incluso cuando co-transfectamos RSUME, lo que nos indica que el aumento de estabilidad de la proteína PTTG por RSUME es por sumoilación. Cuando analizamos el efecto de Gam1 wild type, se observó también una disminución de la estabilidad proteica de PTTG1. Dicho efecto se revierte al co-transfectar un dominante negativo de Gam1 (Gam1 mutante), que presenta un pseudo efecto “estresor” per se (**Figura 14B**). La acción de Gam1 sobre PTTG confirma que RSUME actúa como enhancer de la sumoilación de PTTG.

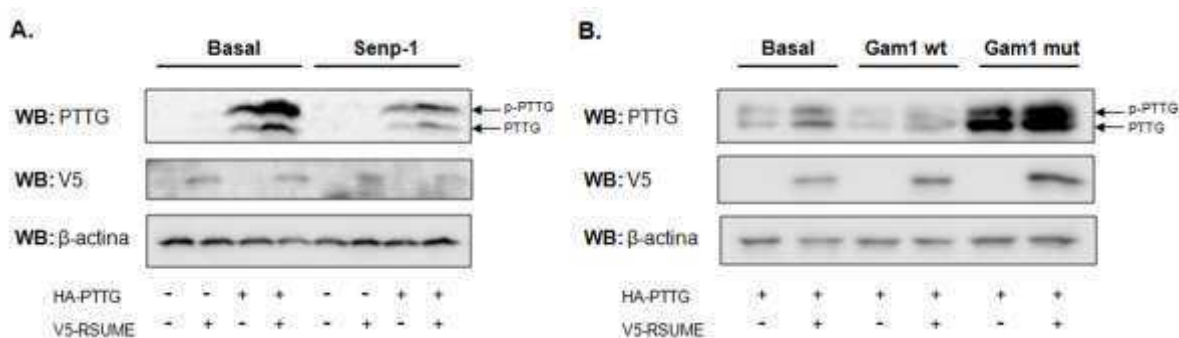


Figura 14. Senp-1 y Gam1 producen una disminución de la estabilidad proteica de PTTG1. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1, RSUME, y/o vector vacío, y co-transfectadas con Senp-1 (**A**), Gam1 wild type (Gam1 wt) o Gam1 dominante negativo (Gam1 mut) (**B**). 48h después, los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB). GAPDH se usó como control de carga. En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con similares resultados.

Teniendo en consideración el análisis *in silico* y el resultado anterior, nos propusimos detectar a la proteína PTTG en su forma sumoilada. Para ello, células de la línea COS-7 se transfectaron con SUMO-1, con cantidades crecientes de PTTG1 y con RSUME o su vector

vacío. En el Western Blot correspondiente se detectaron formas específicas de PTTG de menor movilidad electroforética que las formas fosforilada y no fosforilada, que corresponderían a PTTG conjugado a SUMO-1 (**Figura 15A**). La forma mayoritaria de PTTG sumoilado se revela a 37kDa, mientras que las formas de PTTG fosforilado y no fosforilado aparecen a 25 kDa. Este resultado está de acuerdo con la adición a la proteína PTTG de una única molécula de SUMO-1 (~11kDa), por lo que se trataría de mono-sumoilación.

Los mismos ensayos se repitieron con SUMO-2 y SUMO-3, y en ambos casos se observaron formas de menor movilidad electroforética, con predominancia a 37kDa (**Figuras 15B y C**). Es decir, PTTG1 sería conjugado a una única molécula de SUMO para SUMO-1, 2 o 3. Este hecho no implica que el sitio de conjugación a SUMO sea único, pero sí podría ser que PTTG1 tenga un sitio de sumoilación predominante.

Consistente con su rol como enhancer de SUMO, la presencia de RSUME potencia la sumoilación de PTTG1 por SUMO-1, 2 y 3 (**Figura 15**).

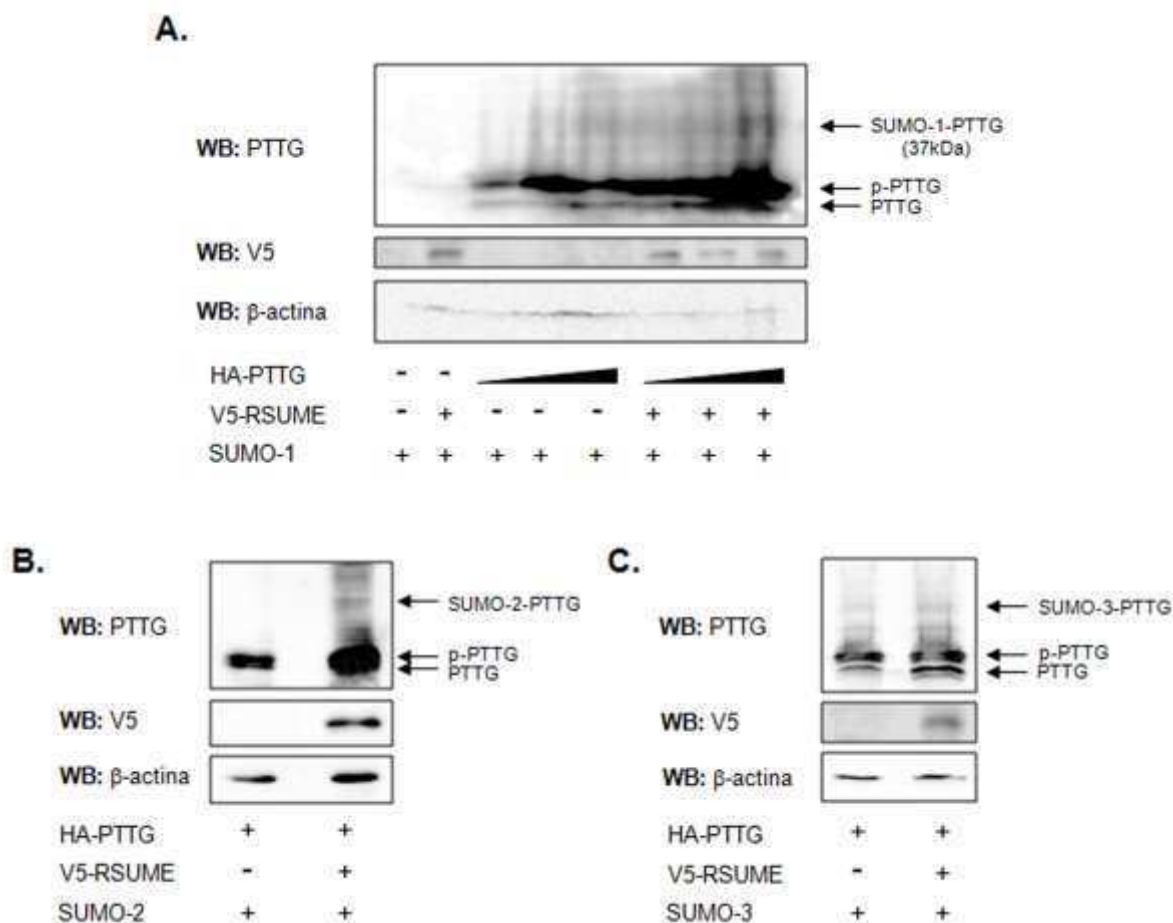


Figura 15. Sumoilación de PTTG1 por SUMO-1, 2 y 3. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1, RSUME, y/o vector vacío, y co-transfectadas con SUMO-1 (**A**), SUMO-2 (**B**), o SUMO-3 (**C**). 48h después, los extractos proteicos fueron sometidos a Western Blot (WB). β-actina se usó como control de carga. En todos los casos se indica la forma sumoilada de PTTG (SUMO-PTTG) de aproximadamente 37KDa. En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

Para confirmar que PTTG se sumoila, decidimos hacer una purificación que permita identificar inequívocamente la/s forma/s de PTTG conjugado a SUMO. En el mismo sistema experimental que usamos anteriormente pero con un SUMO-1 taggeado con His, los extractos proteicos resultantes se inmunoprecipitaron con anticuerpo específico para el tag HA (que está unido a PTTG1). El Western Blot de los inmunoprecipitados se reveló con anticuerpo específico para PTTG (para verificar la precipitación) y con anticuerpo específico para SUMO-1 (para determinar si alguna de las formas reveladas de PTTG esta conjugada a SUMO-1). Como resultado se detectó la presencia de dos formas mayoritarias de PTTG

acoplado a SUMO-1 de 37kDa y ~50kDa (**Figura 16A**). La banda de 37kDa coincide con la observada en los experimentos de la **Figura 8A** y corresponde a PTTG1 conjugado a una molécula de SUMO-1. La banda de ~50kDa es minoritaria y por su peso molecular corresponde a PTTG1 acoplado a dos moléculas de SUMO-1. Respecto al efecto de RSUME sobre PTTG, se observó que la presencia de RSUME induce un aumento de las dos formas de PTTG sumoilado, además de aumentar la expresión de PTTG no conjugado a SUMO (**Figura 16A**, calle 4 respecto a 3 y calle 2 respecto a 1).

Para terminar de confirmar este resultado y descartar posibles artefactos experimentales, se realizó la inmunoprecipitación recíproca. En este caso se inmunoprecipitó con anticuerpo específico para el tag His (que está unido a SUMO-1) y se reveló el Western Blot con anticuerpo específico para SUMO-1 (para verificar la precipitación) y con anticuerpo específico para PTTG (para detectar PTTG acoplado a SUMO-1). Como resultado se obtuvo la misma forma de PTTG conjugado a SUMO-1 de 37kDa que se observa en las **Figuras 8A y 9A**, y una banda de PTTG sumoilado de entre 37 y 50kDa (**Figura 16B**). Se puede notar que en el panel revelado con anticuerpo específico para PTTG también aparece una banda de ~50kDa, además de las otras dos bandas mencionadas anteriormente. Este resultado coincide con lo observado en la **Figura 16A**. En este caso, nuevamente se confirma que RSUME induce un aumento de las formas sumoiladas de PTTG (**Figura 16B**).

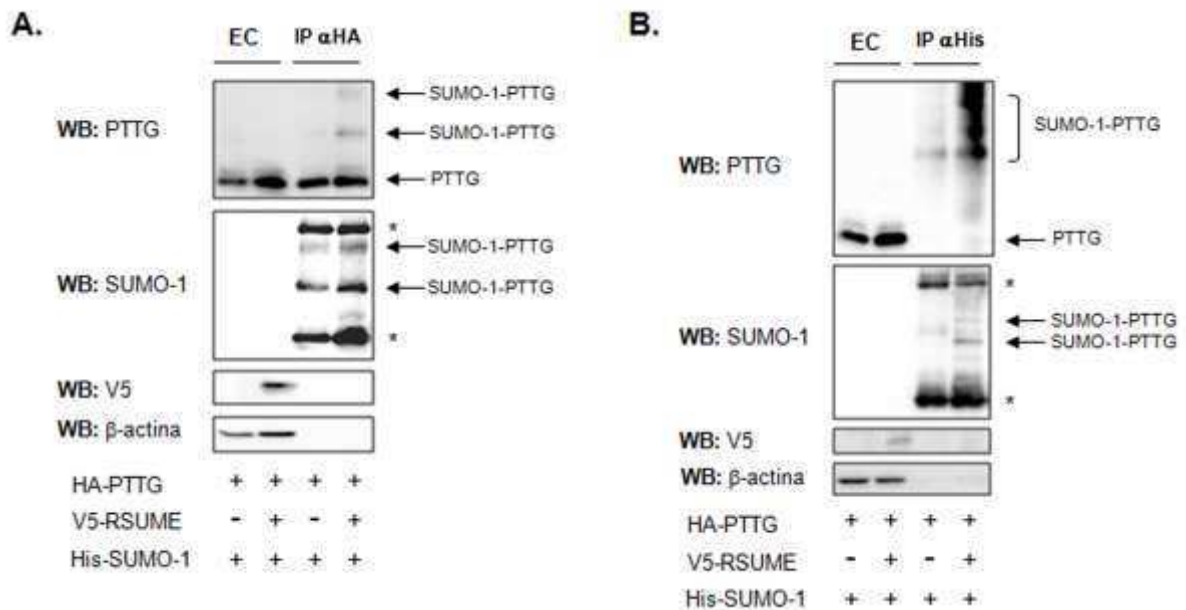


Figura 16. Inmunoprecipitación para detectar sumoilación de PTTG1 por SUMO-1. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con HA-PTTG1, RSUME o vector vacío, y His-SUMO-1. 48h después, los extractos proteicos en RIPA fueron sometidos a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo específico para el tag HA (A) o el tag His (B), y posterior Western Blot (WB) con anticuerpos específicos para PTTG y SUMO-1. β-actina se usó como control de carga de los extractos crudos (EC). Con flechas o corchete se indican las formas sumoiladas de PTTG (SUMO-1-PTTG). *IgG correspondientes a los anticuerpos utilizados en la inmunoprecipitación. En todos los casos se muestra un experimento representativo de cuatro con resultados similares.

En este punto demostramos que RSUME aumenta la estabilidad proteica de PTTG mediante su modificación post-traducciona por SUMO. Como ya se dijo en la *Introducción*, PTTG es una proteína que va a degradación por la vía de Ubiquitina. Entonces nos preguntamos si el efecto de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG podía estar afectando la ubiquitinación de PTTG. Como se indicó, existen numerosos ejemplos de proteínas en las cuales el simple hecho de ser conjugadas a SUMO impide que puedan ser acopladas a Ubiquitina porque ambas modificaciones ocurren en la misma lisina o en lisinas cercanas. Para estudiar esta hipótesis se hicieron experimentos de inmunoprecipitación en células COS-7 con anticuerpo específico para el tag His (que está unido a Ubiquitina) y posterior Western Blot (WB) con anticuerpo para PTTG. De esta forma se inmunoprecipitan todas las proteínas ubiquitinadas y se detecta por WB solamente a PTTG unido a

Ubiquitina. En presencia de RSUME se produce una disminución de los niveles de PTTG ubiquitinado (**Figura 17**, calle 4 respecto de 3), además del aumento de la expresión de PTTG ya descrito (**Figura 17**, calle 2 respecto de 1). Como se ve en la **Figura 17** y ya fue reportado, existe más de una forma de PTTG acoplado a Ubiquitina.

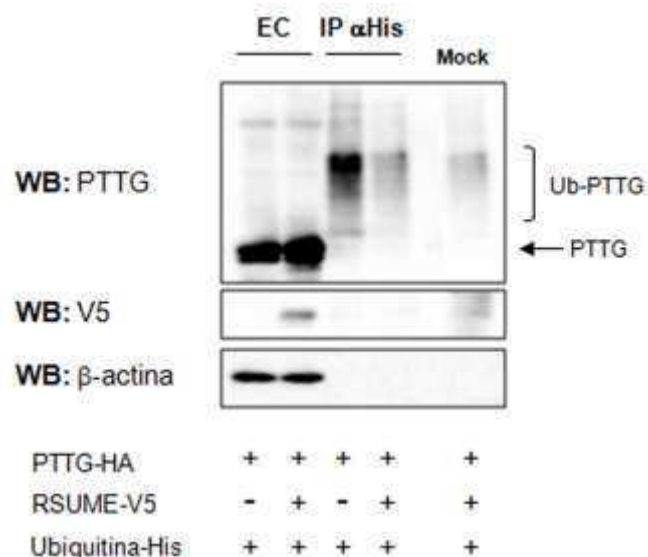


Figura 17. RSUME inhibe la ubiquitinación de PTTG1. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1, RSUME o vector vacío, y His-Ubiquitina. 48h después, los extractos proteicos en RIPA fueron sometidos a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo específico para el tag His, y posterior Western Blot (WB) con anticuerpo específico para PTTG. β -actina se usó como control de carga de los extractos crudos (EC). Con corchete se indican las formas ubiquitinadas de PTTG (Ub-PTTG). Mock, extracto inmunoprecipitado con IgG inespecífica del mismo isotipo que el anticuerpo anti-His utilizado en la inmunoprecipitación específica. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

Este resultado indica que RSUME no solo aumenta la estabilidad proteica de PTTG por favorecer su conjugación a SUMO, sino también por inhibir su conjugación a Ubiquitina. Para determinar si ambos procesos podrían estar vinculados se analizó si la presencia de la proteína inhibidora de la sumoilación Gam1 produce alguna alteración en la ubiquitinación de PTTG y en el efecto de RSUME sobre dicha modificación post-traducciona. Para ello, en el mismo sistema de COS-7 transfectadas transientemente se realizó una purificación de proteínas ubiquitinadas por afinidad del tag His (que está acoplado a Ubiquitina) a una resina de níquel, y posterior Western blot con anticuerpo específico para PTTG. Se detectó que la inhibición de la sumoilación impide que RSUME pueda inducir una disminución de la

conjugación de PTTG a ubiquitina, de manera que en presencia de Gam1 aumentan los niveles de PTTG ubiquitinado (**Figura 18**). De este experimento podemos concluir que la estabilidad proteica de PTTG depende de la competencia entre los procesos de sumoilación y ubiquitinación (cuando el proceso de sumoilación está inhibido por Gam1, aumenta la conjugación de PTTG a Ubiquitina) y que RSUME tiene su efecto sobre PTTG principalmente vía SUMO (cuando la sumoilación está inhibida por Gam1, RSUME no puede inducir una disminución de la ubiquitinación de PTTG).

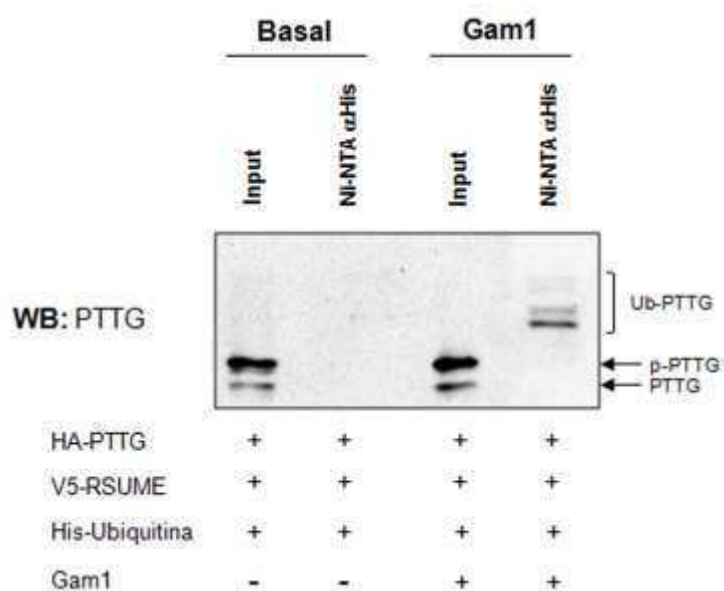


Figura 18. Interacción de la sumoilación y la ubiquitinación de PTTG1. Células COS-7 fueron transfectadas transientemente con PTTG1 y RSUME, His-Ubiquitina y Gam1. 48h después, los extractos proteicos en RIPA fueron sometidos a purificación en resina de níquel (Ni-NTA) con afinidad por el tag His, y posterior Western Blot (WB) con anticuerpo específico para PTTG. Con corchete se indican las formas ubiquitinadas de PTTG (Ub-PTTG). Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

IV.3. Localización celular de RSUME, PTTG y SUMO-1

Dado que RSUME regula a PTTG, analizamos si las proteínas PTTG y RSUME presentan alguna localización espacial relacionada con esta regulación a nivel proteico. Incluimos en el análisis a SUMO-1 por los resultados obtenidos en el capítulo anterior. En fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) transfectados transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1, V5-RSUME o vector vacío se hizo inmunohistoquímica con anticuerpo específico para el tag V5 (RSUME), el tag HA (PTTG) o SUMO-1. Los preparados se visualizaron al microscopio confocal. La localización de RSUME fue tanto citoplasmática como nuclear, tal como estaba reportado (**Figura 19**, Verde). PTTG1 se localizó también en el núcleo y en el citoplasma celular, pero con una predominancia por ciertas zonas del citoplasma cercanas al núcleo (**Figura 19**, Rojo). SUMO-1 endógeno se encontró principalmente en el núcleo celular, como era de esperarse, o rodeando al mismo (**Figura 19**, Amarillo).

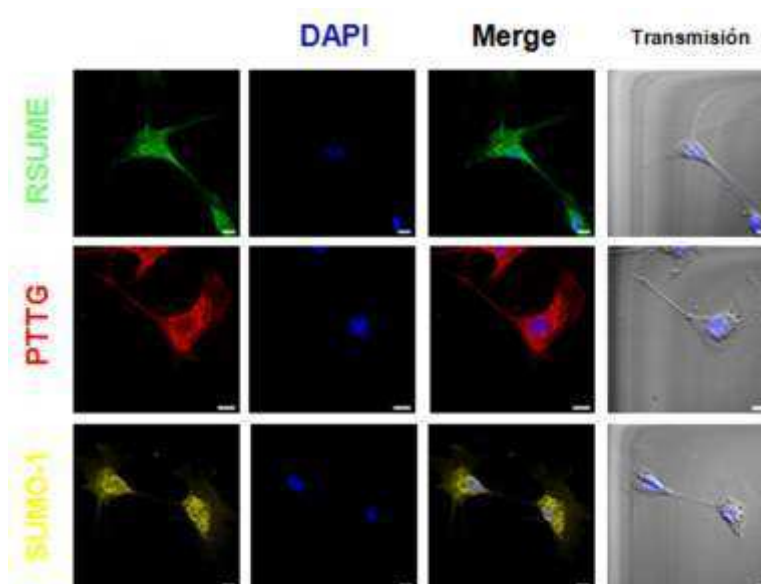


Figura 19. Distribución subcelular de RSUME, PTTG y SUMO-1. Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de V5-RSUME, HA-PTTG1, o vector vacío. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra el tag V5 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa488 (Verde)), el tag HA (anticuerpo secundario acoplado a Alexa647 (Rojo)) o SUMO-1 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa555 (Amarillo)), junto con tinción nuclear con DAPI 1µg/ml (Azul). Los preparados se visualizaron al microscopio confocal y se usó transmisión con la técnica DIC. Se muestran imágenes representativas de un experimento, de tres con resultados similares. La línea blanca representa 10000nm.

Posteriormente se realizaron ensayos de colocalización en células MEF transfectadas transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1 y V5-RSUME. En todos los campos analizados se observó colocalización de las proteínas PTTG1 y RSUME tanto en núcleo como en citoplasma (**Figura 20**, “Merge” amarillo). En el primer grupo de imágenes mostradas en la **Figura 20** puede verse una célula MEF en división (ver Ampliación), y allí la localización tanto de PTTG1 como de RSUME se visualiza en los microtúbulos, pero no en la zona donde se encuentra el material nuclear. En este caso que PTTG1 y RSUME están co-transfectadas, notamos que PTTG1 se localiza de forma pareja en núcleo y citoplasma, y no mayormente en citoplasma como en las imágenes de la **Figura 19**.

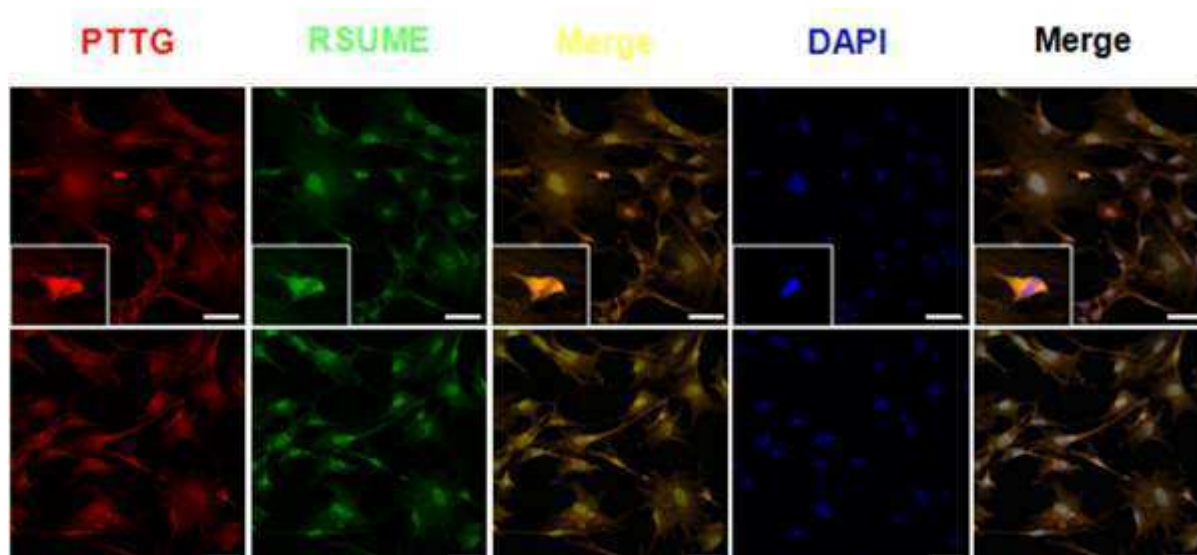


Figura 20. PTTG1 y RSUME colocalizan en núcleo y citoplasma. Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1 y V5-RSUME. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra los tags HA (anticuerpo secundario acoplado a Alexa647 (Rojo)) y V5 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa488 (Verde)), junto con tinción nuclear con DAPI 1µg/ml (Azul). Los preparados se visualizaron al microscopio y de cada preparado se fotografiaron 15 campos elegidos al azar. Se muestran imágenes representativas de un experimento, de tres con resultados similares. En la imagen superior se muestra una ampliación de una célula en división. La línea blanca representa 50000nm.

En ensayos similares pero transfectando únicamente PTTG1 o RSUME, se observó que ambas proteínas colocalizan con SUMO-1 endógeno de las células MEF (**Figura 21**). En el caso de PTTG1, se vuelve a observar un patrón de localización mayormente citoplasmático en la zona que rodea al núcleo, como se observó en la **Figura 19**. SUMO-1, en presencia

de PTTG1 o RSUME adquiere una localización predominantemente citoplasmática, a diferencia de la **Figura 19** donde se observaba casi completamente nuclear.

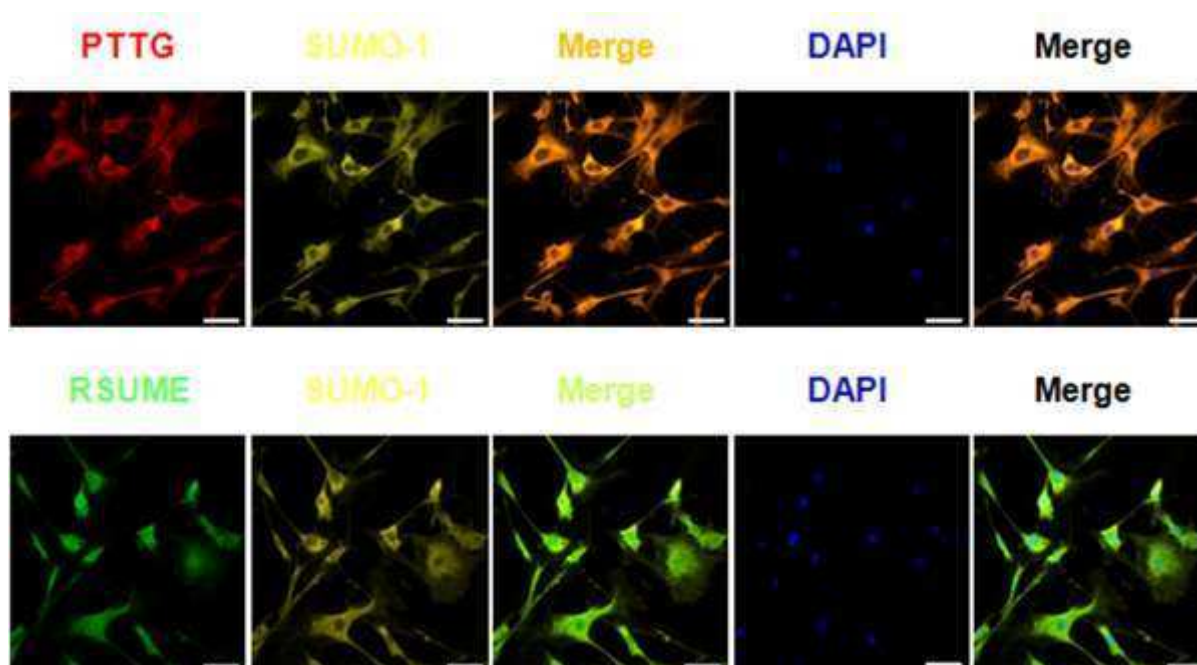


Figura 21. PTTG1 y RSUME colocalizan con SUMO-1. Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1 o V5-RSUME. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra los tags HA (anticuerpo secundario acoplado a Alexa647 (Rojo)) o V5 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa488 (Verde)), y contra SUMO-1 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa555 (Amarillo)), junto con tinción nuclear con DAPI 1 μ g/ml (Azul). Los preparados se visualizaron al microscopio y de cada preparado se fotografiaron 15 campos elegidos al azar. Se muestran imágenes representativas de un experimento, de tres con resultados similares. La línea blanca representa 50000nm.

Para determinar si existe una correlación (asociación de intensidades) y/o un solapamiento (coincidencia espacial) de las señales de fluorescencia de RSUME, PTTG y SUMO-1 se cuantificó la colocalización con el Software ImageJ/Fiji por métodos basados en la intensidad de los píxeles dado que el marcaje de las tres proteínas analizadas fue de tipo difuso y no punteado/discreto. En todos los casos se definió el umbral de intensidad de la imagen con la función “Threshold automático de Costes” del plugin JACoP. El análisis se hizo de a pares, en tres imágenes seleccionadas al azar correspondientes a tres experimentos independientes (**Figuras 22A, 23A y 24A**). Se trabajó con cuatro plugins

diferentes (Colocalization colormap, Just Another Colocalization Plugin o JACoP, Intensity Correlation Analysis o ICA, y Coloc 2) ya que no todos los plugins aplican las fórmulas de los coeficientes de colocalización de la misma manera. Se calcularon los coeficientes de colocalización de Pearson (valor entre -1 y +1, indica correlación), de Manders M1 y M2 (valor entre 0 y 1, indica solapamiento) e ICQ (valor entre -0.5 y +0.5, indica correlación) (**Figuras 22B, 23B y 24B**). Para cada plugin se muestran las representaciones gráficas de la imagen con mayor colocalización (**Figuras 22C, 23C y 24C**): el cytofluograma o colourscatterplot representa pixel a pixel la intensidad del canal 1 (Ch1) frente a la intensidad del canal 2 (Ch2), cuanto más cercano a la recta identidad que pasa por el origen, mayor colocalización; el ICAplot representa los valores de PDM (*Product of the Differences of the Mean*) de cada canal y muestra mayor colocalización cuando los valores están más centrados en la mitad derecha del gráfico; el histograma Li es similar al ICAplot pero los valores están más pegados al eje a mayor colocalización.

Al estudiar la colocalización cuantitativa de PTTG1 y RSUME con el plugin Colocalization colormap todas las imágenes analizadas presentaron un índice de correlación de intensidades (Icorr) cercano a 1, como se muestra en la tabla de la **Figura 22B**, lo que nos indica que existe una asociación entre las intensidades de PTTG1 y RSUME. En la gráfica arrojada para la Imagen 3 se observan zonas de baja correlación (tonos fríos) en el núcleo y los alrededores, y zonas de alta correlación (tonos cálidos) en el citoplasma (**Figura 22C**, Colocalization colormap). Para los otros plugins, el coeficiente de Pearson de las tres imágenes es cercano a 1 y el coeficiente ICQ es cercano a 0.5, lo que nos dice que las intensidades de PTTG1 y RSUME correlacionan (solo en el plugin ICA los coeficientes ICQ obtenidos para las imágenes 2 y 3 resultaron más bajos) (**Figura 22B**). Los coeficientes de Manders resultaron cercanos a 1 para todas las imágenes analizadas con los plugins JACoP y Coloc 2, pero en el plugin ICA se obtuvieron valores más bajos de M1 y M2. Es decir, además hay una coincidencia espacial de intensidades de PTTG1 y RSUME. Respecto de las gráficas, la Imagen 3 tiene una alta correlación de intensidades de PTTG1

y RSUME porque en los cytofluograma/coloursctterplot los valores se ubican cercanos a la diagonal, en los ICAplots los valores aparecen en la mitad derecha de gráfico, y en el histograma Li los valores están pegados al eje (**Figura 22C**). Todas estas gráficas indican que hay colocalización total entre PTTG1 y RSUME pero ambas proteínas tienen distinta intensidad de marcaje.

Para determinar si esta colocalización de PTTG1 y RSUME es real o se produjo por la coincidencia azarosa de las tinciones, se realizaron test de colocalización que analizan el grado de correlación entre la imagen A original y numerosas imágenes B modificadas, calculando los coeficientes y comparándolos con el valor obtenido para la pareja original de imágenes. De esta forma, arrojan un valor de probabilidad del resultado de colocalización (se considera colocalización real a una probabilidad mayor al 95%). Hay varias maneras de generar las imágenes B modificadas. En este caso, utilizamos los métodos de Costes Randomization (fragmenta la imagen B en bloques y los desplaza al azar) y Van Steensel (traslada pixeles una cierta distancia). La grafica de Van Steensel representa la función CCF mostrando el valor de Pearson obtenido en función del desplazamiento en x, y se basa en que si la colocalización es verdadera, el valor del coeficiente de Pearson disminuirá a medida que aumente el desplazamiento en x.

Para las tres imágenes estudiadas la colocalización es real ya que el P-value obtenido es del 100%, pero la Imagen 3 es la única que presentó el valor mayor del coeficiente de Pearson para la pareja de imágenes originales (desplazamiento en $x=0$), como puede verse en su gráfica de Van Steensel (**Figura 22D**).

Al analizar la colocalización cuantitativa de PTTG1 y SUMO-1, nuevamente obtuvimos coeficientes de Icorr cercanos a 1, coeficientes de Pearson cercanos a 1, coeficientes ICQ cercanos a 0.5 (con excepción de la Imagen 3) y coeficientes de Manders cercanos a 1 (salvo con el plugin ICA) (**Figura 23B**). En cuanto a las representaciones gráficas, todas se corresponden con la existencia de colocalización total entre PTTG1 y SUMO-1 (notar que los valores graficados están más agrupados que en las gráficas obtenidas para PTTG1 y

RSUME), e indican que las zonas de mayor colocalización se ubican en el citoplasma celular, según se aprecia en la gráfica de Colocalization colormap (**Figura 23C**). Los test de colocalización indican que la colocalización es real. Con estos resultados concluimos que existe correlación y coincidencia espacial de las intensidades de las señales de PTTG1 y SUMO-1, por lo que ambas proteínas colocalizan y dicha colocalización no es azarosa.

En el caso de RSUME y SUMO-1 se repiten las observaciones obtenidas anteriormente, aunque los valores de los coeficientes fueron más bajos (**Figura 24B**). Según las representaciones gráficas, la colocalización es total con distinta intensidad de marcaje para RSUME y SUMO-1, ocurre principalmente en ciertas regiones del citoplasma (**Figura 24C**) y es real (**Figura 24D**). Nuevamente, concluimos que existe colocalización entre RSUME y SUMO-1.

De estos resultados podemos inferir que PTTG y RSUME colocalizan tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, hecho que va en línea con los efectos de RSUME sobre PTTG descritos anteriormente. Además, ambas proteínas colocalizan con SUMO-1 principalmente en el citoplasma.

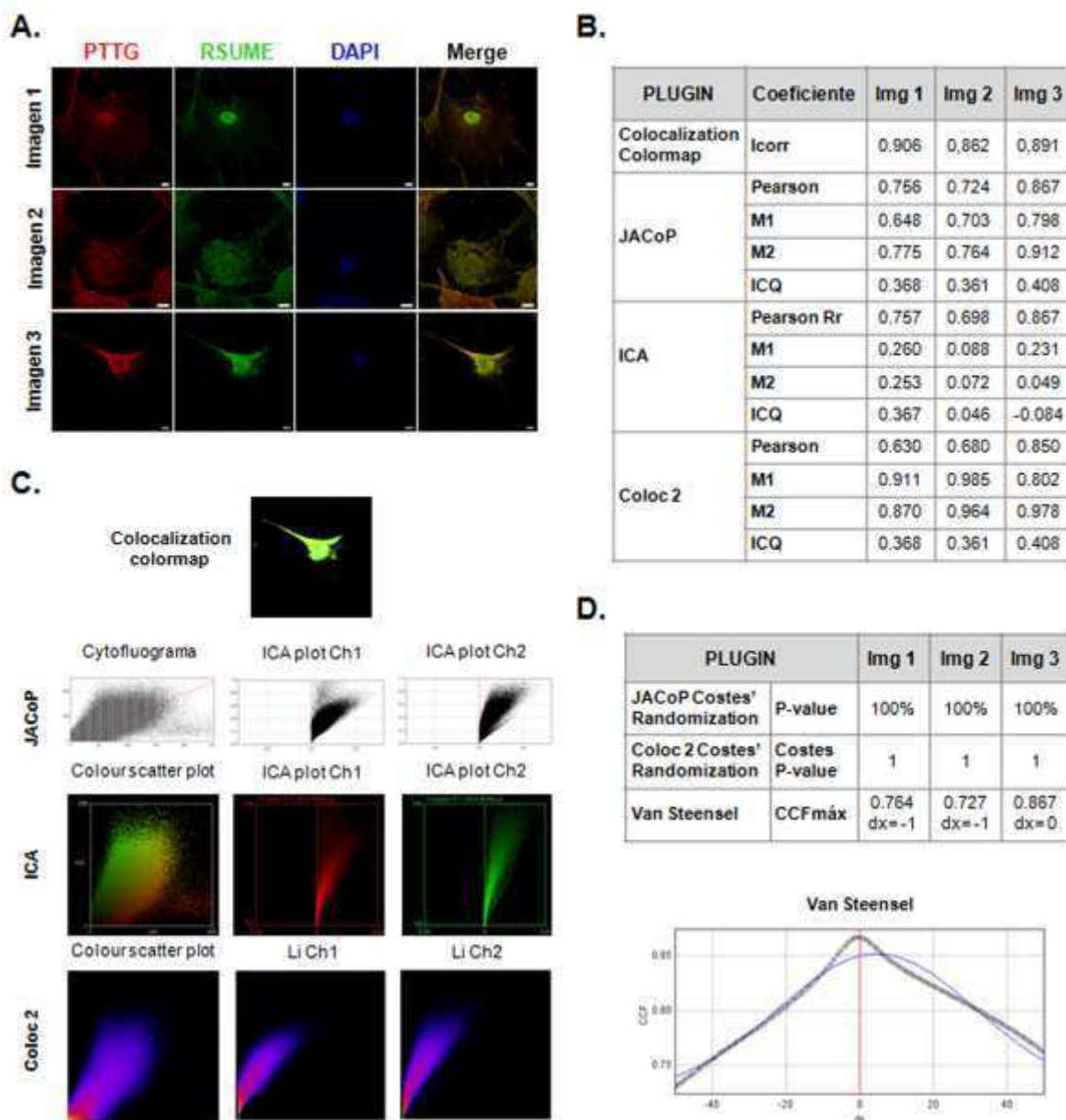


Figura 22. Colocalización cuantitativa de PTTG1 y RSUME. Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1 y V5-RSUME. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra los tags HA (anticuerpo secundario acoplado a Alexa647 (Rojo)) y V5 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa488 (Verde)), junto con tinción nuclear con DAPI 1µg/ml (Azul). **A.** Imágenes de microscopía confocal elegidas al azar para cuantificar la colocalización de PTTG1 con RSUME. La línea blanca representa 10000nm. **B.** Tabla donde se indican, para las tres imágenes mostradas en A., los valores de los coeficientes de colocalización de los plugins Colocalization colormap, JACoP, ICA y Coloc2 del Software ImageJ/Fiji. **C.** Representaciones gráficas obtenidas con los plugins Colocalization colormap, JACoP, ICA y Coloc2 del Software ImageJ/Fiji para la Imagen 3. **D.** Tabla donde se indican los valores de los test JACoP Costes'Randomization, Coloc2 Costes'Randomization y Van Steensel para determinar si la colocalización de PTTG con RSUME es real o azarosa. También se muestra la representación gráfica obtenida del test Van Steensel para la Imagen 3.

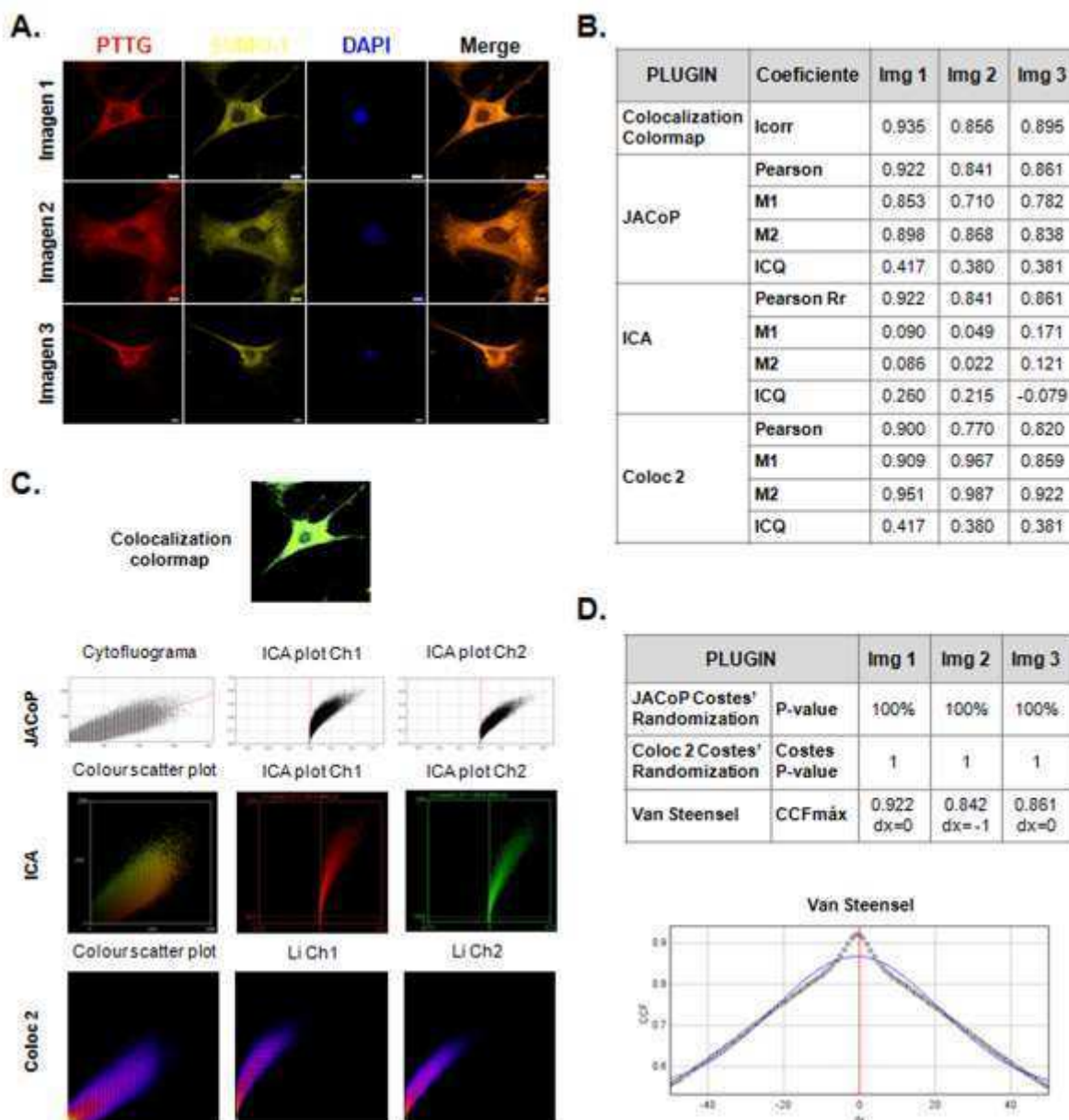


Figura 23. Colocalización cuantitativa de PTTG1 y SUMO-1. Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1 y V5-RSUME. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra el tag HA (anticuerpo secundario acoplado a Alexa647 (Rojo)) y SUMO-1 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa555 (Amarillo)), junto con tinción nuclear con DAPI 1µg/ml (Azul). **A.** Imágenes de microscopía confocal elegidas al azar para cuantificar la colocalización de PTTG1 con SUMO-1. La línea blanca representa 10000nm. **B.** Tabla donde se indican, para las tres imágenes mostradas en A., los valores de los coeficientes de colocalización de los plugins Colocalization colormap, JACoP, ICA y Coloc2 del Software ImageJ/Fiji. **C.** Representaciones gráficas obtenidas con los plugins Colocalization colormap, JACoP, ICA y Coloc2 del Software ImageJ/Fiji para la Imagen 1. **D.** Tabla donde se indican los valores de los test JACoP Costes'Randomization, Coloc2 Costes'Randomization y Van Steensel para determinar si la colocalización de PTTG1 con SUMO-1 es real o azarosa. También se muestra la representación gráfica obtenida del test Van Steensel para la Imagen 1.

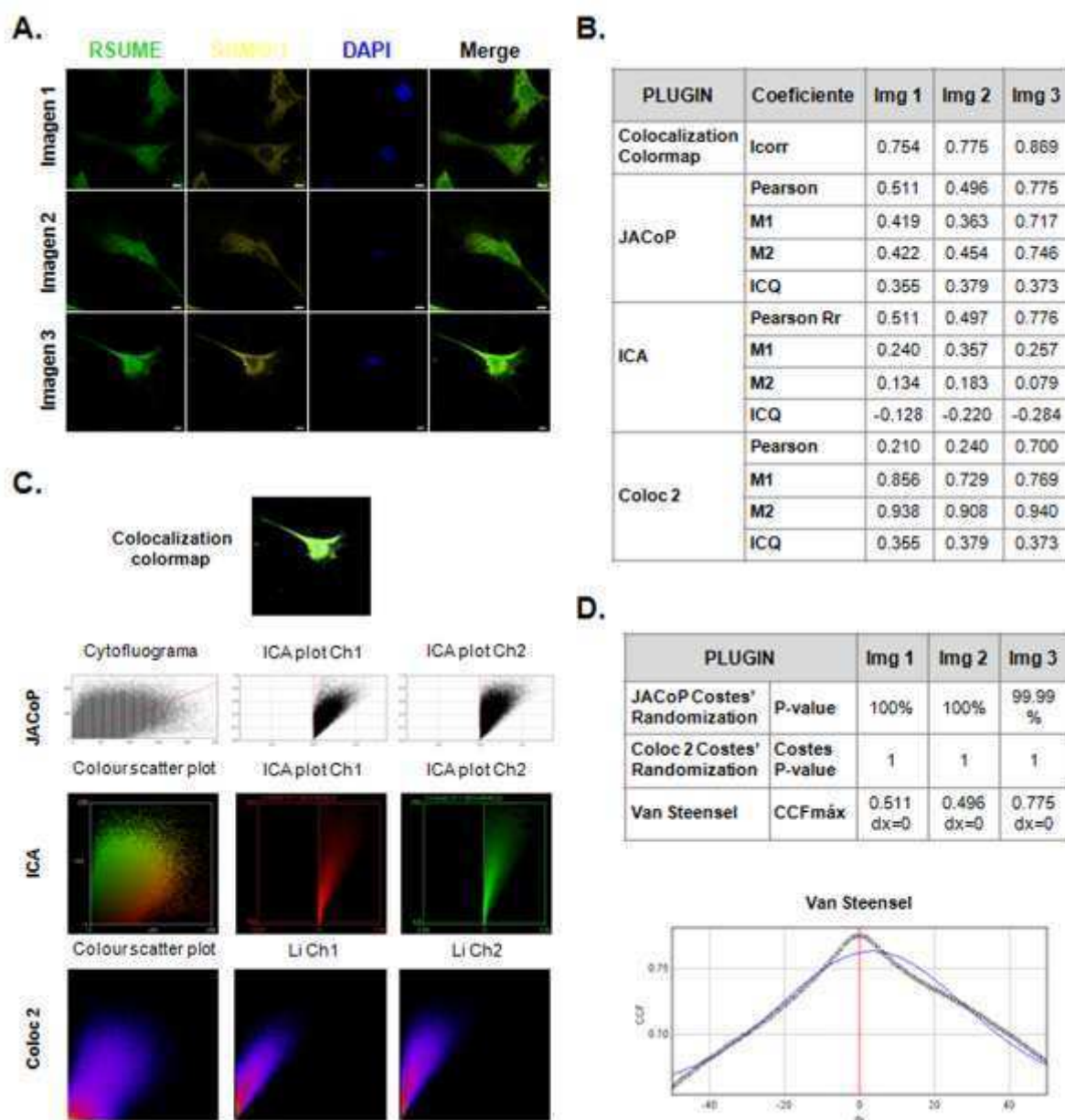


Figura 24. Colocalización cuantitativa de RSUME y SUMO-1. Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de HA-PTTG1 y V5-RSUME. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra el tag V5 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa488 (Verde)) y SUMO-1 (anticuerpo secundario acoplado a Alexa555 (Amarillo)), junto con tinción nuclear con DAPI 1µg/ml (Azul). **A.** Imágenes de microscopía confocal elegidas al azar para cuantificar la colocalización de RSUME con SUMO-1. La línea blanca representa 10000nm. **B.** Tabla donde se indican, para las tres imágenes mostradas en A., los valores de los coeficientes de colocalización de los plugins Colocalization colormap, JACoP, ICA y Coloc2 del Software ImageJ/Fiji. **C.** Representaciones gráficas obtenidas con los plugins Colocalization colormap, JACoP, ICA y Coloc2 del Software ImageJ/Fiji para la Imagen 3. **D.** Tabla donde se indican los valores de los test JACoP Costes'Randomization, Coloc2 Costes'Randomization y Van Steensel para determinar si la colocalización de RSUME con SUMO-1 es real o azarosa. También se muestra la representación gráfica obtenida del test Van Steensel para la Imagen 3.

IV.4. Consecuencias funcionales del efecto de RSUME sobre PTTG

Sabiendo que RSUME produce un aumento de la estabilidad proteica de PTTG y conociendo que la desregulación de los niveles fisiológicos de PTTG puede conducir al desarrollo tumoral, decidimos estudiar las consecuencias funcionales del efecto de RSUME sobre PTTG de forma general, y de forma particular en un modelo tumoral hipofisario.

IV.4.A. Acción de RSUME sobre proteínas del ciclo celular reguladas por PTTG

Como se detalló en la *Introducción*, PTTG tiene actividad como factor de transcripción. En la línea tumoral somatotrofa hipofisaria de rata, GH4, a partir de la cual se clonó a PTTG, se estudió la actividad transcripcional de PTTG sobre los promotores de c-myc, ciclina D3, y p21. Se eligieron estos promotores blanco de PTTG porque cubren todas las fases del ciclo celular donde actúa dicho proto-oncogen.

Las células GH4 expresan PTTG endógenamente. Estas células fueron transfectadas transientemente con cantidades crecientes de vector de expresión de RSUME o vector vacío, con cantidades crecientes de vector de expresión de PTTG1 o vector vacío, y con la construcción reportera del promotor de c-myc fusionada al gen de Luciferasa. En los extractos celulares resultantes se determinó la actividad luciferasa, indicativo de la activación del promotor de c-myc (**Figura 25A**), y los niveles proteicos de PTTG por Western Blot (**Figura 25B**). Se observó que al aumentar la cantidad de RSUME aumenta la activación transcripcional del promotor de c-myc, respecto de la condición basal (transfectada con los vectores vacíos). En paralelo aumentan los niveles proteicos endógenos de PTTG. Al utilizar cantidades crecientes de PTTG1 transfectado se observó un aumento de la activación transcripcional de c-myc hasta alcanzar un máximo de actividad luciferasa en la condición transfectada con 5ng de vector de expresión de PTTG1. Para cantidades mayores de expresión de PTTG, que se pueden corroborar en el Western Blot asociado, la activación de c-myc decrece. Cuando se co-transfectaron RSUME y

cantidades crecientes de PTTG1, se observó el mismo efecto mencionado anteriormente, pero en este caso la máxima activación de c-myc se obtuvo en la condición con 3ng de vector de expresión de PTTG1. Esta anticipación de la actividad máxima podría deberse a que los niveles proteicos de PTTG fueron mayores en presencia de RSUME. Notar que este efecto no puede explicarse por una limitante de sustrato de la enzima luciferasa ya que a partir de la condición con 5ng de vector de expresión de PTTG1 no se observa una actividad luciferasa constante sino decreciente (**Figura 25A**).

Para estudiar la activación del promotor de ciclina D3 por PTTG se utilizó el mismo sistema mencionado anteriormente para c-myc. En este caso, se observó un efecto similar al visto para c-myc, pero la actividad luciferasa máxima se alcanzó en la condición transfectada transientemente con 7ng de vector de expresión de PTTG1, para la curva sin RSUME transfectado, y en la condición con 5ng de vector de expresión de PTTG1, para la curva con RSUME transfectado (**Figura 26A**). Esta diferencia en la activación transcripcional de ciclina D3 en comparación con los resultados obtenidos para c-myc, estaría indicando una menor potencia de PTTG para activar la transcripción de ciclina D3 respecto de c-myc.

Respecto de los niveles proteicos de PTTG, se repite el patrón de aumento de la expresión de PTTG a cantidades crecientes de RSUME transfectado, y aumento de los niveles de PTTG en presencia de RSUME a cantidades crecientes de PTTG1 transfectado (**Figura 26B**).

Con el mismo esquema experimental, se observó que en células GH4 transfectadas transientemente con cantidades crecientes de vector de expresión de RSUME, se produce una inhibición de la transcripción del promotor de p21 respecto de la condición basal, decreciente a mayor masa de vector transfectado. Cuando se transfectan transientemente cantidades crecientes de vector de PTTG1, también hay un decrecimiento en la actividad luciferasa a mayor masa de vector transfectado, hasta alcanzar un mínimo de actividad

luciferasa en la condición transfectada con 5ng de vector de expresión de PTTG1. En el caso de co-transfección de RSUME y cantidades crecientes de PTTG1, se alcanza la actividad luciferasa mínima antes, en la condición transfectada con 3ng de vector de expresión de PTTG1 (**Figura 27A**). Respecto a la expresión proteica de PTTG en las distintas condiciones experimentales estudiadas, se repite lo visto para c-myc y ciclina D3 (**Figura 27B**).

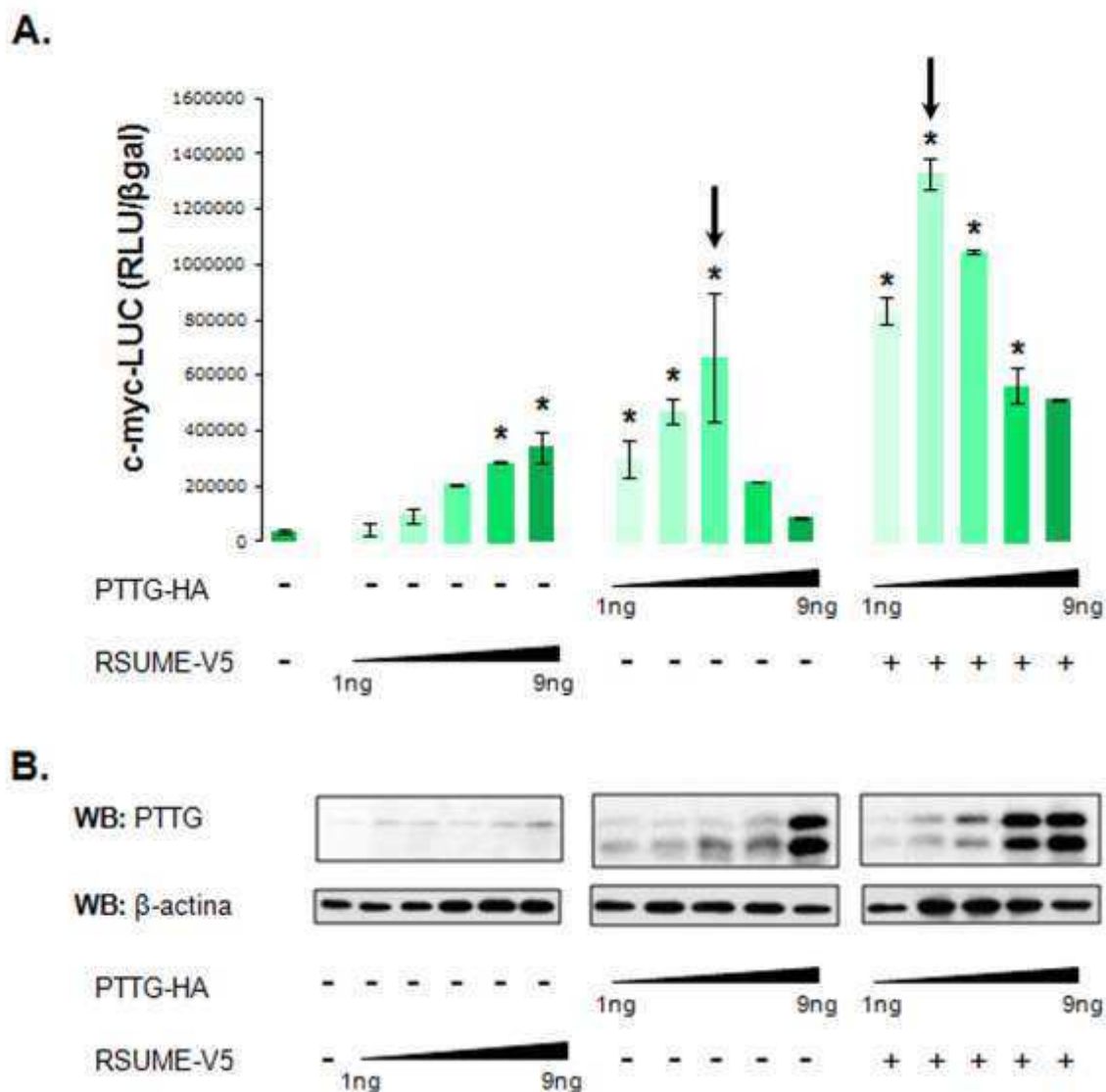


Figura 25. RSUME induce un aumento de la actividad transcripcional de PTTG sobre el promotor de c-myc. **A.** Células GH4 fueron transfectadas transientemente con cantidades crecientes de vector de expresión de RSUME o vector vacío, cantidades crecientes de vector de expresión de PTTG1 o vector vacío, vector reportero c-myc-LUC y vector control CMV-βgal. 24h después, se midió la actividad luciferasa en los extractos celulares resultantes (RLU) y la actividad de β-galactosidasa (βgal). Cada valor de RLU fue normalizado al valor de βgal. Los resultados se expresan como media ± error estándar de triplicados de un experimento representativo de 3 con similares resultados. *, $p < 0.05$ respecto de la condición transfectada con vectores vacíos (ANOVA con test de Scheffé); ↓, máxima actividad luciferasa para cada conjunto de condiciones; +, transfección con 5ng de vector de expresión de RSUME. **B.** Los extractos celulares de **A** fueron pooleados para cada condición experimental y diluidos con cracking buffer para Western Blot (WB). Luego fueron analizados por WB. β-actina se usó como control de carga.

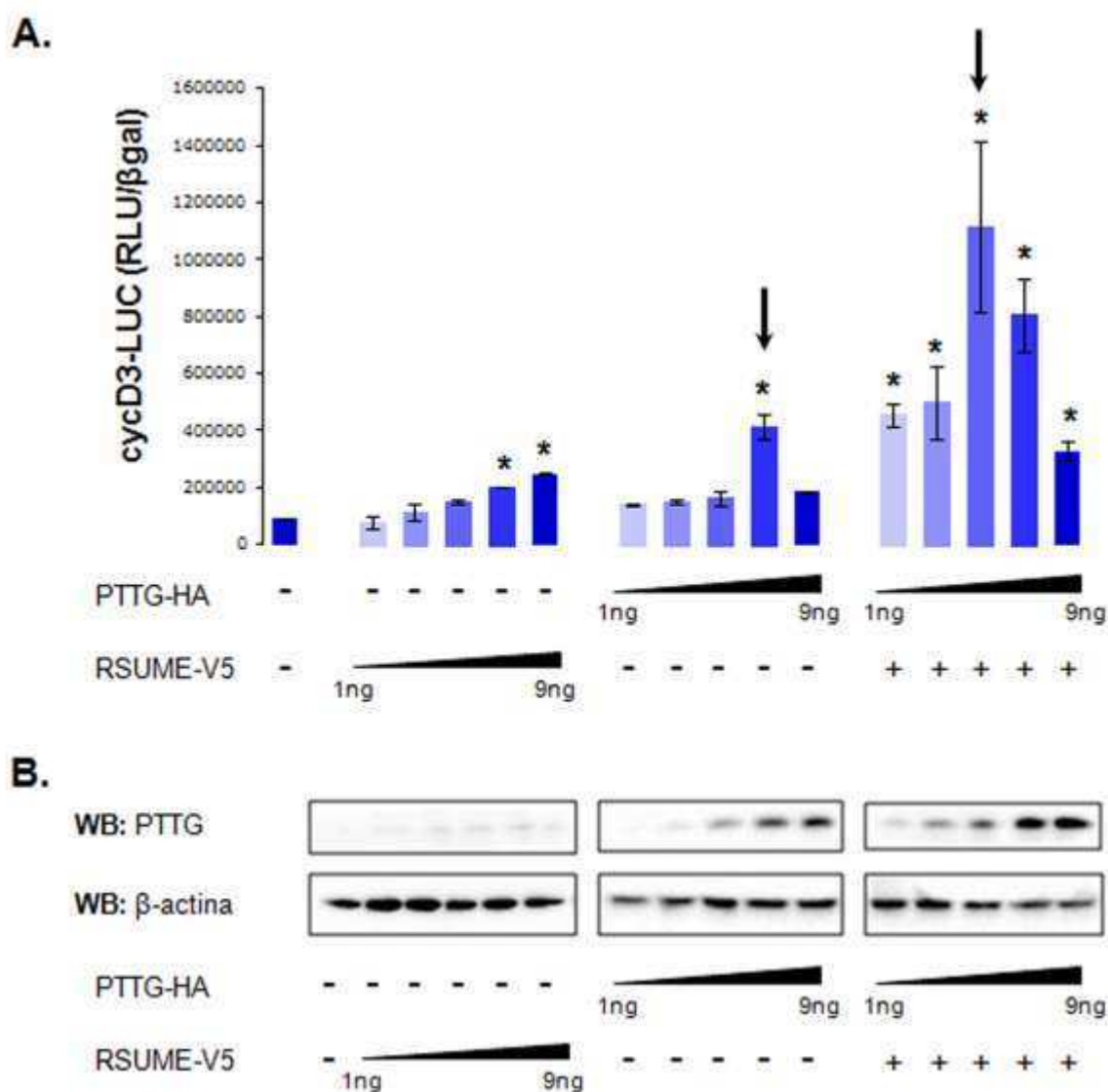


Figura 26. RSUME induce un aumento de la actividad transcripcional de PTTG sobre el promotor de ciclina D3. **A.** Células GH4 fueron transfectadas transientemente con cantidades crecientes de vector de expresión de RSUME o vector vacío, cantidades crecientes de vector de expresión de PTTG1 o vector vacío, vector reportero ciclina D3-LUC y vector control CMV-βgal. 24h después, se midió la actividad luciferasa en los extractos celulares resultantes (RLU) y la actividad de β-galactosidasa (βgal). Cada valor de RLU fue normalizado al valor de βgal. Los resultados se expresan como media ± error estándar de triplicados de un experimento representativo de 3 con similares resultados. *, $p < 0.05$ respecto de la condición transfectada con vectores vacíos (ANOVA con test de Scheffé); ↓, máxima actividad luciferasa para cada conjunto de condiciones; +, transfección con 5ng de vector de expresión de RSUME. **B.** Los extractos celulares de **A** fueron pooleados para cada condición experimental y diluidos con cracking buffer para Western Blot (WB). Luego fueron analizados por WB. β-actina se usó como control de carga.

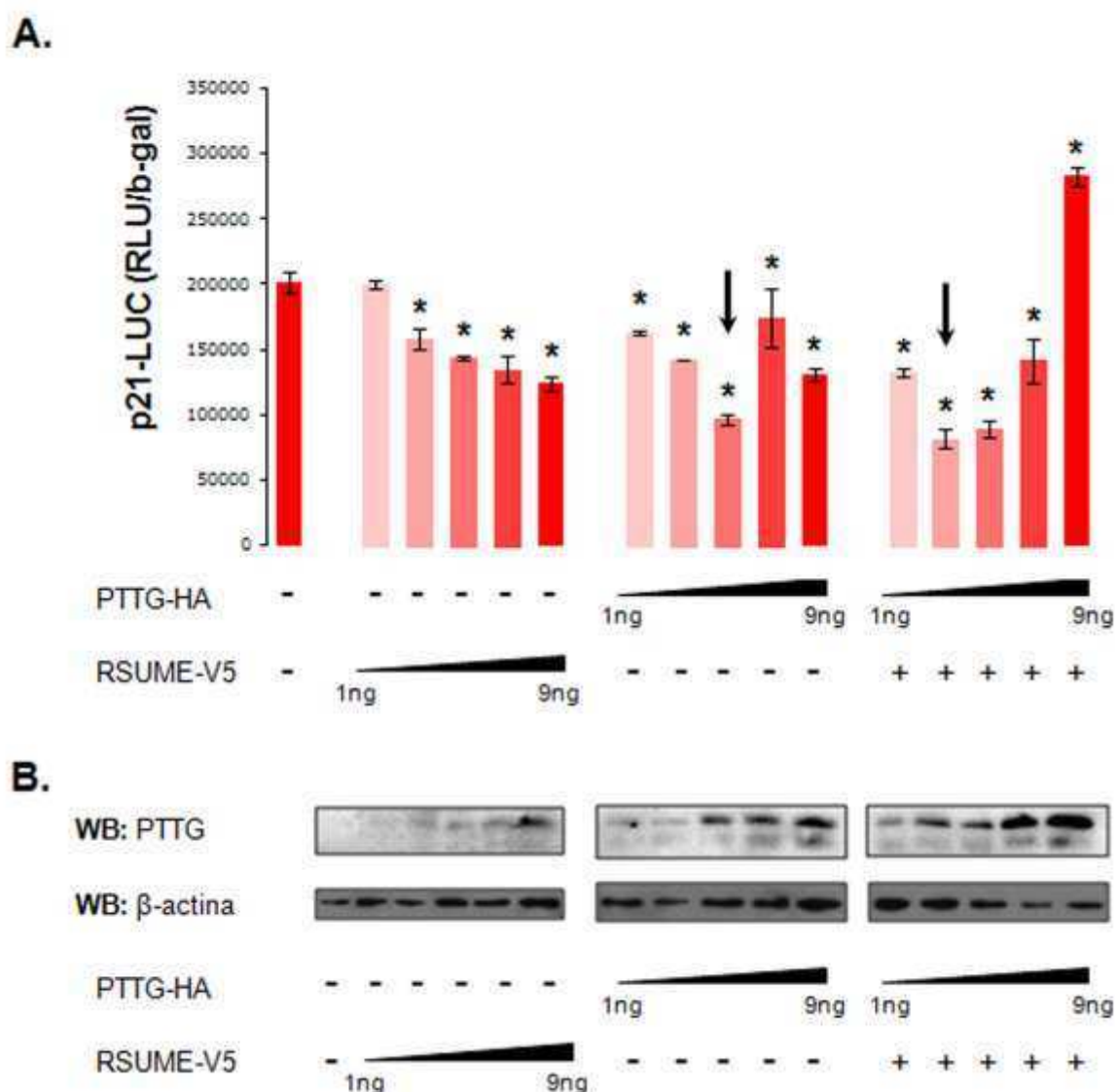


Figura 27. RSUME induce una inhibición de la actividad transcripcional de PTTG sobre el promotor de p21. **A.** Células GH4 fueron transfectadas transientemente con cantidades crecientes de vector de expresión de RSUME o vector vacío, cantidades crecientes de vector de expresión de PTTG1 o vector vacío, vector reportero p21-LUC y vector control CMV- β gal. 24h después, se midió la actividad luciferasa en los extractos celulares resultantes (RLU) y la actividad de β -galactosidasa (β gal). Cada valor de RLU fue normalizado al valor de β gal. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de triplicados de un experimento representativo de 3 con resultados similares. *, $p < 0.05$ respecto de la condición transfectada con vectores vacíos (ANOVA con test de Scheffé); \downarrow , máxima actividad luciferasa para cada conjunto de condiciones; +, transfección con 5ng de vector de expresión de RSUME. **B.** Los extractos celulares de **A** fueron pooleados para cada condición experimental y diluidos con cracking buffer para Western Blot (WB). Luego fueron analizados por WB. β -actina se usó como control de carga.

Como paso siguiente, nos propusimos estudiar si existe una modificación en la actividad transcripcional de PTTG al silenciar la expresión de RSUME, con el concepto de confirmar que el efecto de RSUME sobre los niveles de expresión de PTTG es el responsable de la modulación transcripcional observada en los experimentos anteriores. Para ello, se utilizó el mismo esquema experimental descrito anteriormente y se efectuó el silenciamiento de RSUME mediante ARN pequeño de interferencia (siRNA) específico.

Para c-myc, se observó que al silenciar RSUME con siRNA específico disminuye significativamente la activación del promotor de c-myc, respecto de la condición basal o con siRNA inespecífico (**Figura 28A**). La misma inhibición significativa de la actividad luciferasa al silenciar RSUME, se observó para el promotor de ciclina D3 (**Figura 28B**); solo que en este caso se produce un aumento de la activación transcripcional de ciclina D3 al utilizar un siRNA inespecífico. Este efecto adicional puede deberse al estrés generado en las células por la simple introducción de un siRNA (el estrés produce un aumento de la expresión de PTTG y este aumento genera una activación del promotor de ciclina D3). Para corroborar esta hipótesis, se repitió el experimento pero co-transfectando el vector de expresión de PTTG1, y se obtuvo que las condiciones basal y con siRNA inespecífico ahora son similares en cuanto a actividad luciferasa. Con esto se comprueba que al introducir un siRNA inespecífico en las células GH4 se produce un aumento de la expresión proteica de PTTG, y una consiguiente activación transcripcional del promotor de ciclina D3. Para p21, no se obtuvo una activación del promotor cuando se silencia RSUME, como hubiéramos esperado (**Figura 28C**).

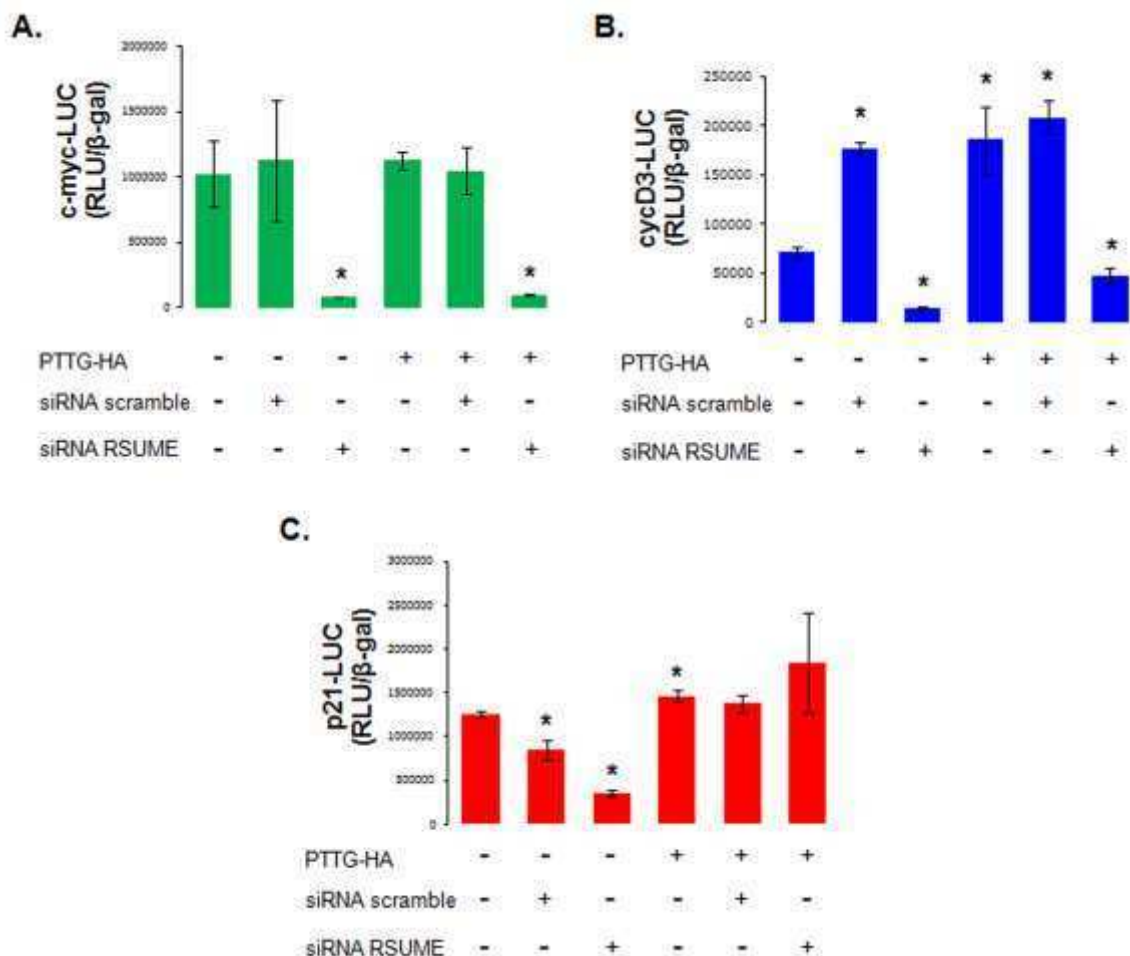


Figura 28. El silenciamiento de RSUME induce una inhibición de la actividad transcripcional de PTTG sobre los promotores de c-myc y ciclina D3, pero no tiene efecto sobre el promotor de p21. A., B. y C. Células GH4 fueron transfectadas transientemente vector reportero c-myc-LUC (A), cycD3-LUC (B) o p21-LUC (C), vector control CMV- β gal, y/o vector de expresión de PTTG1 o vector vacío, y co-transfectadas con ARN pequeño de interferencia específico para RSUME (siRNA RSUME) o inespecífico (siRNA scramble). 36h después, se midió la actividad luciferasa en los extractos celulares resultantes (RLU) y la actividad de β -galactosidasa (β gal). Cada valor de RLU fue normalizado al valor de β gal. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de duplicados de un experimento representativo de tres con similares resultados. *, $p < 0.05$ respecto de la condición transfectada con vector vacío y sin siRNA (ANOVA con test de Scheffé).

De estos resultados podemos concluir que la acción de PTTG sobre los niveles de c-myc, ciclina D3 y p21 es regulada por RSUME.

IV.4.B. Regulación de la actividad de PTTG en mitosis

En base a los antecedentes mencionados en la *Introducción* que muestran que la desregulación de los niveles de expresión de PTTG a lo largo del ciclo celular ocasiona células aneuploides y/o con anomalías cromosómicas, nos propusimos estudiar la influencia de RSUME sobre el desarrollo de aneuploidías y/o anomalías cromosómicas mediado por PTTG.

En este caso trabajamos con fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de la cepa CF-1, que no presentan aneuploidías ni aberraciones cromosómicas, dada la imposibilidad de analizar variaciones cromosómicas en líneas celulares. Las células MEF de pasaje 3 (para asegurar la ocurrencia de varios ciclos de división en el transcurso del experimento) fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de PTTG1, RSUME o sus correspondientes vectores vacíos. Luego de la transfección, se sincronizaron en interfase o metafase, y pasado el tiempo de sincronización las células fueron levantadas, sometidas a hipotonía y fijadas. Se prepararon extendidos celulares y se incubaron con Giemsa o DAPI para teñir el material nuclear. En el caso de la visualización de puentes mitóticos, se hizo inmunofluorescencia con anticuerpo específico contra α -Tubulina. Los preparados se visualizaron al microscopio y se fotografiaron 50 campos elegidos al azar, por condición experimental y por experimento, para contar el número cromosómico y detectar anomalías cromosómicas tales como puente mitótico, micronúcleos, roturas o fusiones cromosómicas, o cromosomas rezagados.

En las células MEF en condición basal (transfectadas con los vectores vacíos) se contabilizaron 40 cromosomas por célula en metafase y los núcleos presentaron un aspecto normal en interfase (**Figura 29A**, Vectores). En presencia de PTTG1 y RSUME se identificaron anomalías cromosómicas con una frecuencia significativamente aumentada. Más de la mitad de las células analizadas en esta condición experimental (55,6%) fueron aneuploides, contabilizando en su mayoría el doble de la dotación cromosómica normal de ratón (**Figura 29B**). La aparición de micronúcleos en interfase

(corresponden a cromosomas rezagados que no migran correctamente en mitosis y luego de la división quedan encerrados como corpúsculos nucleares más densos), de puentes mitóticos en células en división y de cromosomas fusionados en los extendidos metafásicos se hace más notoria (**Figura 29A**, se muestran los resultados de PTTG+RSUME). Cuando las células MEF solo fueron transfectadas con PTTG1 o RSUME, se observaron células aneuploides o con algunas anomalías cromosómicas con una frecuencia de aparición de estos defectos significativamente menor que en células con PTTG1 y RSUME, del 20% para RSUME y 12,5% para PTTG (**Figura 29B**).

De estos resultados se puede concluir que RSUME, mediante su inducción de la estabilidad proteica de PTTG, genera una desregulación de la expresión de PTTG provocando un aumento de inestabilidad genómica en células normales.

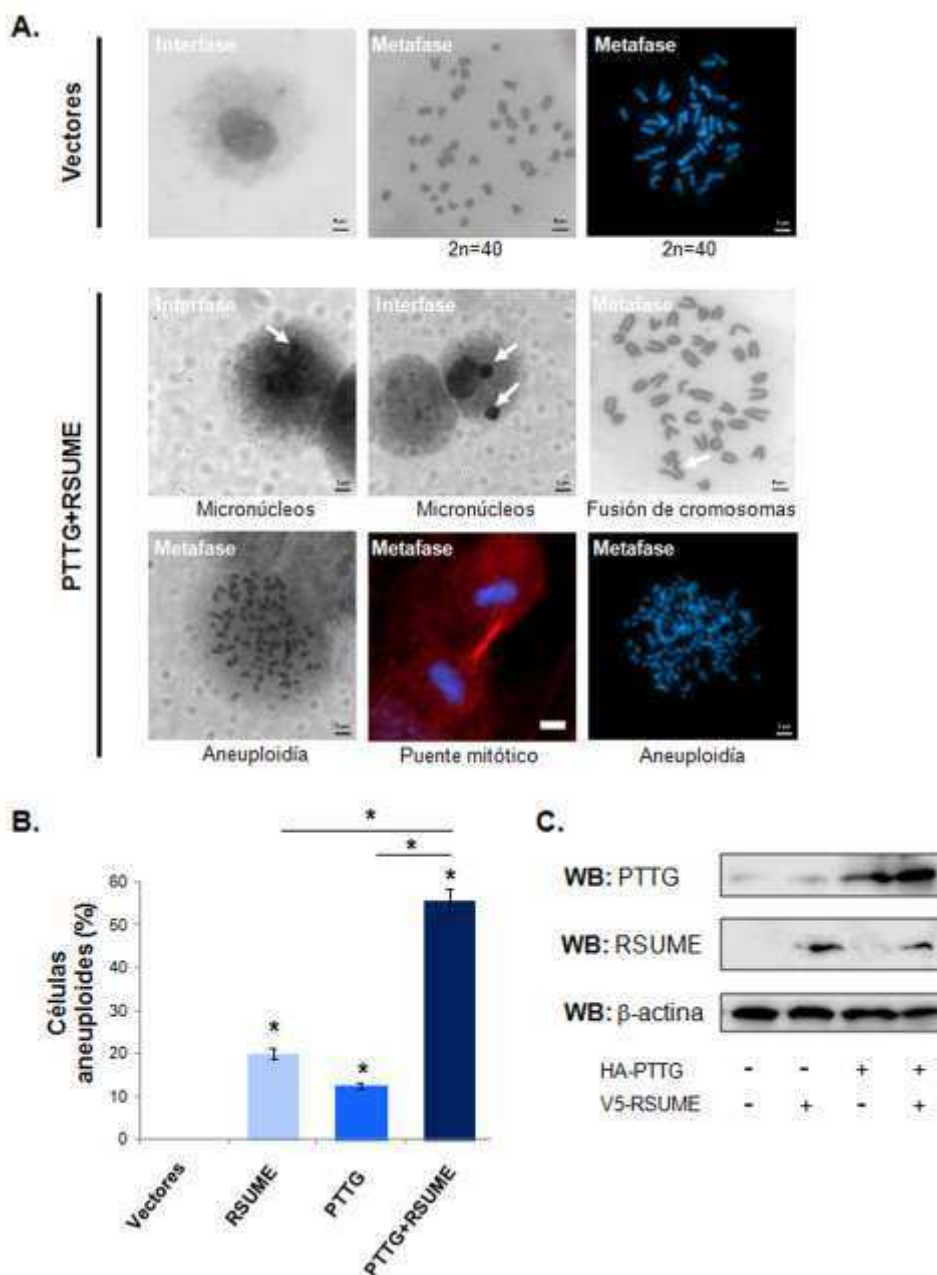


Figura 29. RSUME incrementa el número de células aneuploides y la aparición de anomalías cromosómicas, vía su efecto sobre PTTG. **A.** Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de PTTG1, RSUME o sus correspondientes vectores vacíos. 24h post-transfección las células fueron sincronizadas en Interfase (deprivación de suero por 24h) o Metafase (incubación con colchicina 5 μ g/ml por 6h). Transcurrido el tiempo de sincronización, las células fueron levantadas por tripsinización, incubadas en KCl 0,075M (hipotonía) y fijadas con metanol-ácido acético 3:1 frío. Se prepararon extendidos celulares por el método de portaobjetos fríos e ignición y los extendidos se incubaron con Giemsa 5% o DAPI 1 μ g/ml por 15min. Los preparados se visualizaron al microscopio y de cada extendido se fotografiaron 50 células (campos) elegidas al azar. Para la visualización de puentes mitóticos se utilizó anticuerpo primario anti α -tubulina y anticuerpo secundario Alexa 647, junto con tinción con DAPI 1 μ g/ml. Se muestran imágenes representativas. Con flechas blancas se indican las anomalías cromosómicas encontradas. Las líneas blanca o negra representan 5 μ m **B.** Cuantificación del número de células aneuploides ($2n \neq 40$) respecto del número total de células analizadas, para cada condición experimental. *, $p < 0.05$ respecto de la condición transfectada con vector vacío (ANOVA con test de Scheffé).

Numerosas rondas de división celular sin citoquinesis se manifiestan en la aparición de células con más de un núcleo. Esta reportado que PTTG induce la aparición de células multinucleadas en condiciones anormales. Por esta razón nos propusimos estudiar el efecto de RSUME sobre la frecuencia de aparición de células multinucleadas. En este caso también trabajamos con MEF de la cepa CF-1 de pasaje 3 para asegurar la ocurrencia de varios ciclos de división en el transcurso del experimento. Las células MEF fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de PTTG1, RSUME o sus correspondientes vectores vacíos. Después de la transfección, se hizo inmunofluorescencia con anticuerpo específico para vimentina (proteína del citoesqueleto celular que permite visualizar el citoplasma celular) y tinción nuclear con Hoescht. Los preparados se visualizaron al microscopio y se fotografiaron 15 campos elegidos al azar, por condición experimental y por experimento, para contar el número de células multinucleadas y el número de células totales por campo. Como resultado se obtuvo que en presencia de PTTG1 y RSUME la mayoría de los campos analizados presentaban células con más de un núcleo, mientras que en la condición basal (transfectada con los vectores vacíos) fue raro encontrar células MEF con más de un núcleo (**Figura 30A**). Para las células transfectadas solo con RSUME o PTTG1 se repite lo observado en la condición basal. En la mayoría de los casos donde se observaron células multinucleadas, las mismas presentaban dos núcleos (células binucleadas).

En la **Figura 30B** se muestra la frecuencia de aparición de células binucleadas por campo y por condición experimental. Solo la condición con PTTG1 y RSUME muestra diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de aparición de células binucleadas respecto de la condición basal. Si bien la condición con PTTG aumenta la misma, esta se ve significativamente aumentada por la presencia de RSUME. Notar que la condición con RSUME solo, no es significativamente diferente a la condición basal, lo que nos está indicando que RSUME por sí mismo no genera la aparición de células multinucleadas, sino que lo hace vía PTTG.

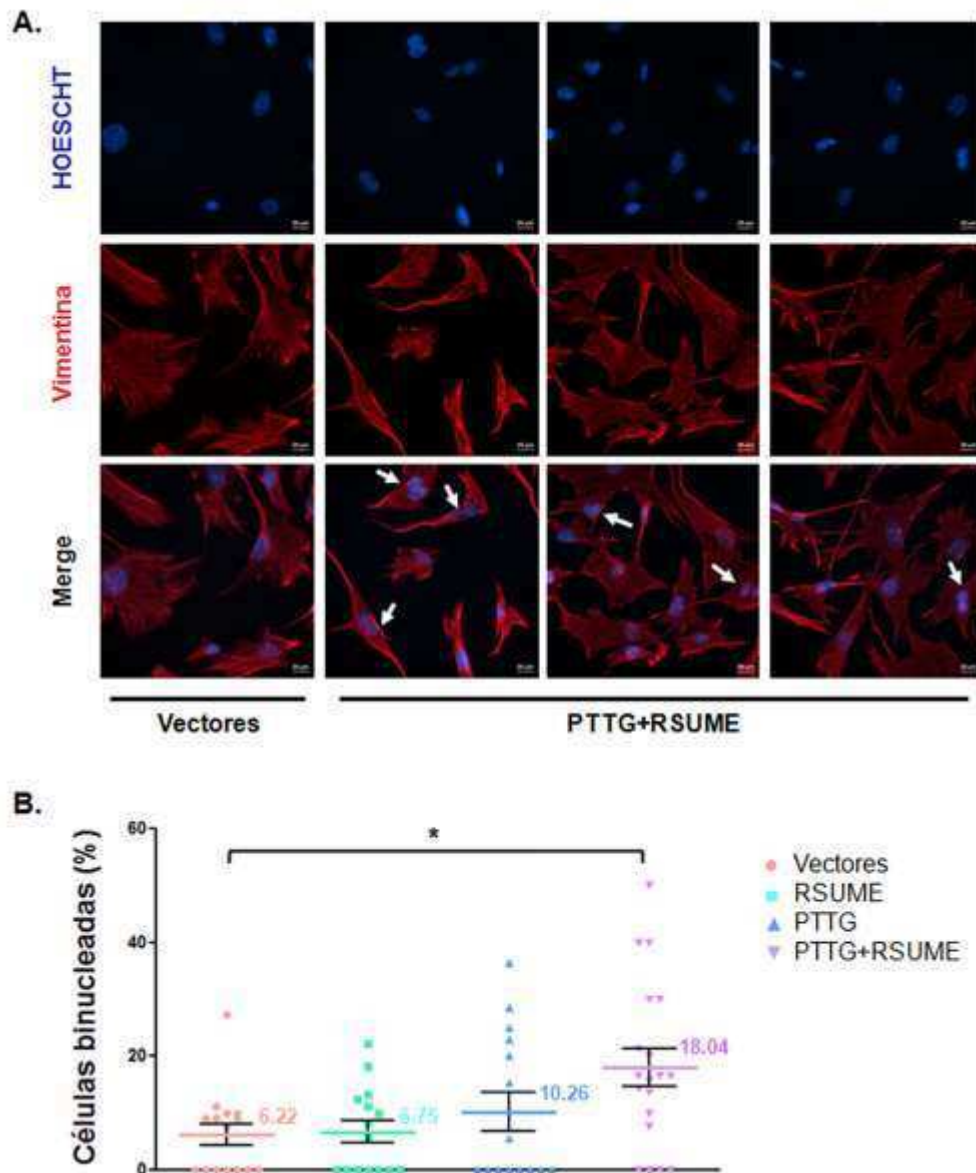


Figura 30. RSUME aumenta la frecuencia de aparición de células binucleadas, vía su efecto sobre PTTG. **A.** Células MEF de pasaje 3 fueron transfectadas transientemente con vectores de expresión de PTTG1, RSUME o sus correspondientes vectores vacíos. 48h post-transfección se hizo inmunohistoquímica con anticuerpo específico contra Vimentina y anticuerpo secundario acoplado a Alexa 647 (rojo), junto con tinción nuclear con Hoescht (azul). Los preparados se visualizaron al microscopio y de cada preparado se fotografiaron 15 campos elegidos al azar. Se muestran imágenes representativas de un experimento, de tres con similares resultados. Con flechas blancas se indican las células binucleadas; La línea blanca representa 20µm. **B.** Cuantificación del número de células binucleadas respecto del número total de células por campo, para cada condición experimental. Cada punto en el gráfico representa un campo. Se muestra la media \pm error estándar. *, $p < 0.05$ respecto de la condición transfectada con vectores vacíos (ANOVA con test de Scheffé).

IV.4.C. Capacidad tumorigénica de RSUME

Para continuar estudiando la influencia de RSUME sobre las propiedades tumorigénicas de PTTG en hipófisis, generamos clones de la línea tumoral corticotrofa hipofisaria de ratón AtT-20 que expresan establemente un plásmido codificante para un ARN de interferencia específico para RSUME (shRSUME) o inespecífico (shSCRAMBLE). En los mismos se analizó la expresión de RSUME y PTTG por Western Blot, confirmando el silenciamiento de RSUME y la consecuente disminución de los niveles de expresión de la proteína PTTG (**Figura 31A**). Analizando la proliferación celular por el método de Wst-1, se observó que el clon AtT-20 shRSUME presenta una inhibición significativa de la proliferación celular respecto de las células AtT-20 parentales y del clon AtT-20 shSCRAMBLE (**Figura 31B**). El clon AtT-20 shSCRAMBLE también presenta una reducción de la proliferación respecto de las células parentales, que puede deberse (como ya obtuvimos para otros clones estables) al hecho de expresar establemente un ADN exógeno o al tratamiento con antibiótico de selección.

Para confirmar este resultado se estudió la proliferación de ambos clones por citometría de flujo con CFSE, y se observó una reducción de la proliferación celular en los clones AtT-20 shRSUME (**Figura 31C**).

De estos resultados podemos inferir que el silenciamiento de RSUME de forma estable no solo reduce los niveles de expresión de PTTG endógenos, sino que también afecta negativamente la proliferación celular.

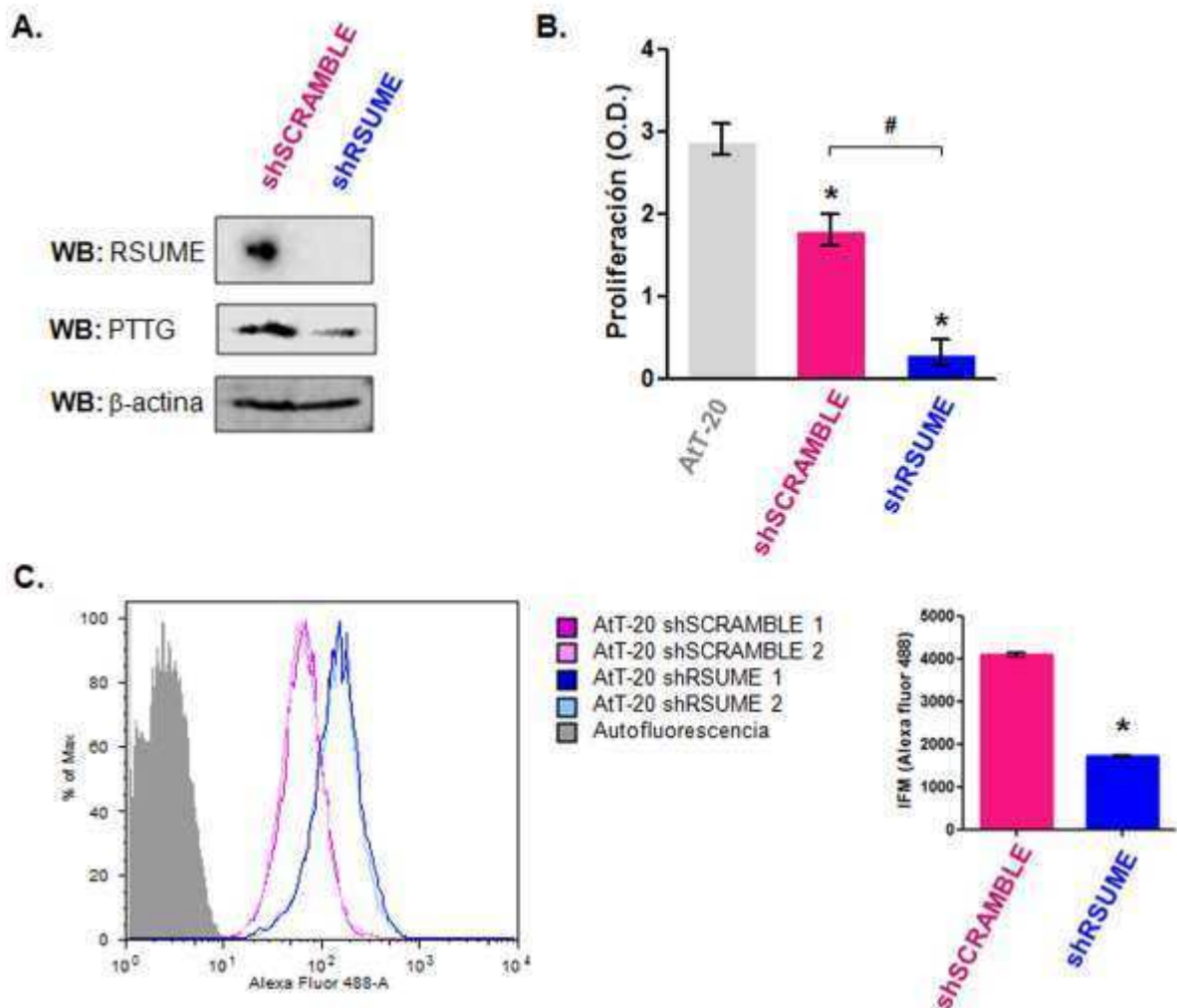


Figura 31. El silenciamiento estable de RSUME en células AtT-20 disminuye la expresión de PTTG e inhibe la proliferación celular. **A.** Western Blot (WB) de los extractos proteicos de clones AtT-20 shSCRAMBLE o AtT-20 shRSUME, revelado con anticuerpos específicos para RSUME y PTTG. β-actina se usó como control de carga. **B.** Proliferación celular determinada por el método de Wst-1 en células AtT-20, AtT-20 shSCRAMBLE o AtT-20 shRSUME luego de 24h de ser sembradas (triplicados). Resultados similares se obtuvieron a las 48h y 72h para todas las condiciones de suero probadas (0, 2, 5 y 10%). *, $p < 0.05$ respecto de las células AtT-20 parentales (ANOVA de un factor con test de Scheffé). #, $p < 0.05$ respecto de las células AtT-20 shSCRAMBLE (ANOVA de un factor con test de Scheffé). **C.** Proliferación celular determinada por citometría de flujo. Células AtT-20 shSCRAMBLE o AtT-20 shRSUME fueron teñidas con CFSE-Alexa488 y plaquedas. Después de 24h fueron levantadas, resuspendidas en PBS-SFB5% y analizadas por citometría de flujo. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia media (IFM) en duplicados. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de duplicados de un experimento representativo. *, $p < 0.05$ respecto de las células AtT-20 parentales (ANOVA con test de Scheffé). En todos los casos se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares.

Por último, se estudió la expresión de las proteínas PTTG y RSUME en explantes de distintos tipos de tumores de hipófisis humanos (1 adenoma mixto, 4 somatotrofinomas, 6 corticotrofinomas, 6 adenomas no funcionantes y 3 prolactinomas). En todos los tumores analizados se detectó co-expresión de las proteínas PTTG y RSUME (**Figura 32A**). En algunos adenomas se observó un doblete para PTTG correspondiente a sus formas fosforilada y no fosforilada. Por análisis de correlación de Pearson se determinó que la expresión de las proteínas PTTG y RSUME correlaciona de forma significativa en adenomas hipofisarios humanos (coeficiente de Pearson $r = 0.8388$, $R^2 = 0.7036$, $p < 0.0001$) (**Figura 32B**).

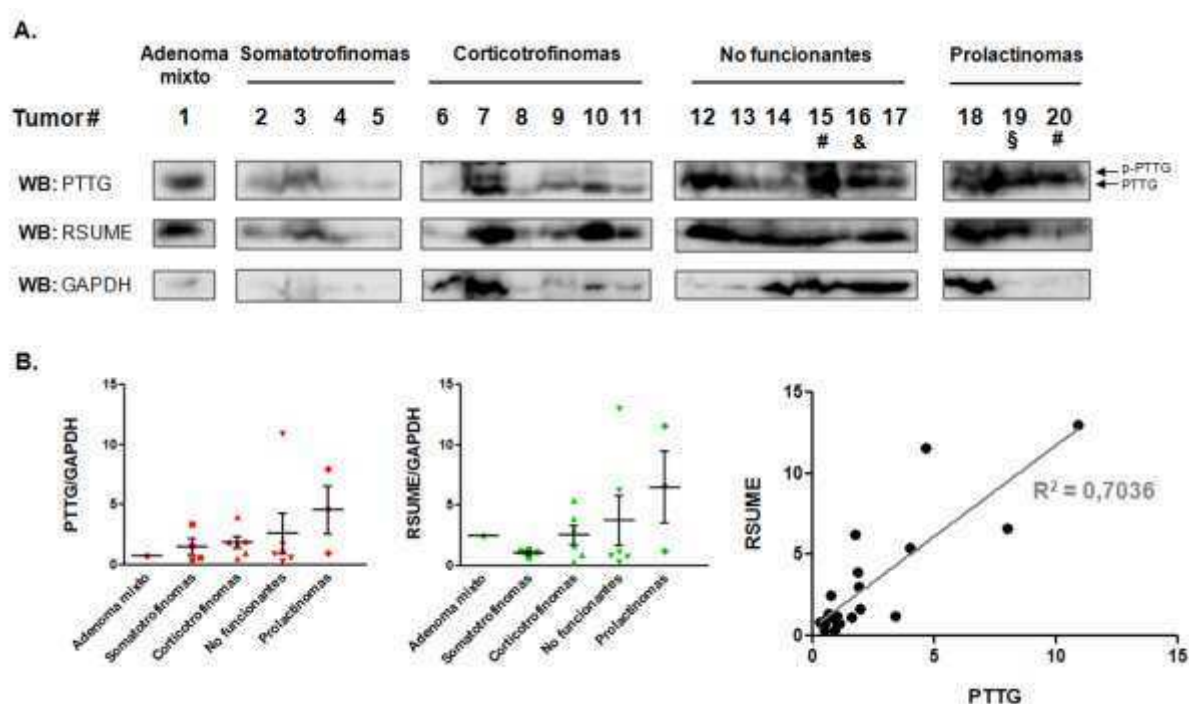


Figura 32. La expresión de PTTG y RSUME correlaciona en adenomas hipofisarios humanos.
A. Western Blot (WB) con anticuerpos específicos contra PTTG y RSUME de 20 adenomas de hipófisis humanos (1 adenoma mixto, 4 somatotrofinomas, 6 corticotrofinomas, 6 adenomas no funcionantes y 3 prolactinomas). #, recidiva; &, macroadenoma; §, adenoma agresivo. GAPDH se usó como control de carga. **B.** Gráficos con la relación de intensidades (OD) entre PTTG y GAPDH, o entre RSUME y GAPDH, medida con el Software ImageJ/Fiji, para los distintos adenomas hipofisarios estudiados; se grafica además la media \pm SEM. Gráfico con la relación de intensidades entre PTTG y GAPDH versus RSUME y GAPDH; cada punto en el gráfico representa un tumor de hipófisis. Análisis de correlación de Pearson con $R^2 = 0,7036$.

V. DISCUSIÓN



Se ha demostrado que la inactivación o sobreexpresión de reguladores del ciclo celular es capaz de iniciar el desarrollo tumoral hipofisario (Abbud et al., 2005; Jacks et al., 1992; Kiyokawa et al., 1996), aunque se desconoce la razón de esta inactivación/sobreexpresión y raramente se encuentran mutaciones en los oncogenes clásicos en tumores de hipófisis (Dworakowska y Grossman, 2012; Ewing et al., 2007; Melmed, 2011a; Mete et al., 2012; Sav et al., 2012). Desde la descripción del proto-oncogen PTTG en células tumorales adenohipofisarias (Pei y Melmed, 1997), se lo ha involucrado en los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de los adenomas de hipófisis, así como de otras neoplasias (Salehi et al., 2008; Zhang et al., 1999a), y se ha buscado, sin éxito, el evento primario que desregula su expresión y que desencadena su sobreexpresión. La mayoría de los estudios en adenomas hipofisarios se han focalizado en el ARN mensajero de PTTG, pero pocos analizan lo que ocurre con la proteína, y allí radica la falencia principal para hallar la causa de la desregulación de su expresión. Más recientemente se ha avanzado en dilucidar los mecanismos de tumorigénesis de PTTG en adenomas hipofisarios y otras neoplasias, centrándose en lo que pasa a nivel de la proteína PTTG, pero en ningún caso se encontró una mutación activante o un factor que induzca la sobreexpresión de PTTG o una interacción de este proto-oncogen con otros oncogenes. Únicamente un estudio realizado *in vitro* reportó que la mutación del residuo treonina de posición 60 de PTTG1 resulta en una proteína con propiedades oncogénicas exacerbadas (Mora-Santos et al., 2013), pero esta proteína PTTG mutante no fue identificada en pacientes, lo que reduce la relevancia de este hallazgo hecho *in vitro*.

En este trabajo identificamos y describimos por primera vez un mecanismo de desregulación de los niveles de expresión de la proteína PTTG, que podría explicar la aparición de propiedades oncogénicas y el inicio de la tumorigénesis en todos los modelos tumorales donde este oncogen cumple un rol, y en hipófisis en particular. Nuestros resultados demuestran que una posible causa de aumento de los niveles de expresión de

PTTG, es su modificación post-traducciona por SUMO que conlleva a la estabilidad de dicha proteína y a una disminución de su degradación por ubiquitinación mediante el proteasoma. El principal factor que aparece como desencadenante de este proceso es RSUME que se expresa en tumores hipofisarios y, como enhancer de sumoilación, aumenta la conjugación de PTTG a SUMO y genera su estabilización y acumulación.

V.1. Regulación de la estabilidad proteica y modificaciones post-traduccionales de PTTG

En primer lugar, demostramos que RSUME aumenta los niveles de expresión de la proteína PTTG tanto en células que expresan PTTG de manera endógena (GH4 y AtT-20) como en células que sobreexpresan transitoriamente PTTG1 (COS-7). Este aumento se produce principalmente en las fases G1 y M del ciclo celular en las células sobreexpresoras de PTTG1, y en todas las fases del ciclo celular en células con PTTG endógeno. El efecto de RSUME de aumento de la expresión de PTTG en las fases G1 y M coincide con los reportes previos que indican que los niveles de PTTG varían a lo largo del ciclo celular alcanzando su máximo principalmente en mitosis, pero también en la fase G1 (Tong et al., 2007; Yu et al., 2000b; Zou et al., 1999). Sin embargo, el efecto de RSUME obtenido en células GH4 resulta inesperado. Dado que la sobreexpresión transitoria de RSUME estaría desregulando los niveles de expresión endógena de PTTG, no solo en las fases donde se expresa normalmente sino también en otras fases del ciclo celular donde no debería estar aumentado, creemos que este resultado es una evidencia adicional de que la expresión descontrolada de PTTG conduce a consecuencias patológicas por afectar los mecanismos regulados por PTTG como podrían ser la incorrecta separación de las cromátidas hermanas o hiperactivación del ciclo celular. De manera consistente, al disminuir los niveles de RSUME, por silenciamiento mediante ARN pequeño de interferencia, se produce una reversión de la inducción proteica de PTTG en las mismas líneas celulares descritas anteriormente.

Adicionalmente al ya descrito aumento de RSUME bajo condiciones de estrés (Carbia-Nagashima et al., 2007; Druker et al., 2013; Gerez et al., 2013; Shan et al., 2012), demostramos que existe una inducción de la expresión de PTTG en estrés, como hipoxia, tanto en células que sobreexpresan PTTG transitoriamente como en células que expresan PTTG de forma endógena. Esto permite suponer que ambas proteínas estarían cumpliendo un rol concomitante en situaciones de estrés celular. Los tumores de hipófisis tienen una menor densidad de vasos en comparación con la hipófisis normal altamente vascularizada, y las condiciones hipóxicas intratumorales pueden activar la vía RSUME-HIF1-VEGF conduciendo a un aumento de vasos o a una geometría microvascular más ordenada para sostener el crecimiento tumoral (Fowkes y Vlotides, 2012; Shan et al., 2012). Estas condiciones hipóxicas tempranas estarían induciendo la sobreexpresión de RSUME y consecuentemente la desregulación de PTTG, y podrían conducir al inicio del proceso de desarrollo tumoral. Además del rol de RSUME en el inicio de la neovascularización de tumores de hipófisis a través de la vía de señalización de HIF-1 y VEGF-A (Shan et al., 2012), en este trabajo proponemos una vía adicional de acción de RSUME sobre la angiogénesis hipofisaria. La misma involucra la inducción de la sobreexpresión de PTTG y la consecuente estimulación de la angiogénesis mediada por sus blancos reportados como FGF-2 y VEGF (Heaney et al., 1999; McCabe et al., 2002). Ambos factores angiogénicos, VEGF-A y FGF-2, confluían en la estructuración de un sistema de vasos intacto y sostenible para el suministro de nutrientes dentro del tumor hipofisario. Este sistema aseguraría, como se ha postulado (Melmed, 1994), que la secreción hormonal en los tumores de hipófisis continúe teniendo control trófico (supresión dopaminérgica de la secreción de PRL en prolactinomas y supresión mediada por dexametasona de la secreción de ACTH en enfermedad de Cushing).

RSUME fue identificado por expresión diferencial en células lactosomatotrofas de hipófisis GH3 sobreexpresoras de gp130, el transductor de señales de las citoquinas de la familia de IL-6 (Carbia-Nagashima et al., 2007; Castro et al., 2003), mientras que PTTG fue aislado de

células GH4 (Pei y Melmed, 1997). La activación de la vía de señalización de citoquinas durante inflamación o en condiciones hipóxicas, podría conducir a un aumento en la expresión y/o actividad de RSUME, resultando en desregulación de los niveles proteicos de PTTG, e involucraría fosforilación de RSUME por las quinasas JAK/STAT (Fowkes y Vlotides, 2012).

Se ha reportado que PTTG es modificado post-traduccionalmente mediante fosforilación por CDK1, MAPK, DNA-PK y PI3K (Chamaon et al., 2005; Ramos-Morales et al., 2000; Romero et al., 2001), y mediante ubiquitinación por APC/C (Nakayama y Nakayama, 2006; Zou et al., 1999; Zur y Brandeis, 2001). También se ha predicho la fosforilación de PTTG por PKA, PKC, PKG y CK2, entre otras quinasas, ya que posee 32 residuos potencialmente fosforilables (Smith et al., 2010). Por análisis *in silico* de la secuencia de PTTG1 humano detectamos la presencia de varios posibles sitios de sumoilación, siendo el más probable el que contiene a la lisina de posición 168 (secuencia -VKMP-). Demostramos que PTTG es blanco de conjugación a las proteínas pequeñas SUMO-1, SUMO-2 y SUMO-3 y que RSUME potencia dicha sumoilación. En todos los casos, la forma sumoilada de PTTG migró a ~37kDa lo cual coincide con la adición de una única molécula de SUMO (~11kDa) a la proteína PTTG (~25kDa). En algunos experimentos, detectamos además una forma de PTTG acoplado a SUMO-1 que migró a ~50kDa. Por su peso molecular corresponde a PTTG acoplado a dos moléculas de SUMO-1, que tienen que estar unidas covalentemente a dos lisinas distintas de la proteína PTTG porque SUMO-1 es incapaz de formar cadenas de poli-SUMO debido a que no posee sitio de sumoilación interno. Este resultado nos está indicando que el sitio de sumoilación de PTTG no es único. Es posible que la sumoilación de PTTG ocurra en un sitio predominante, pero al desaparecer este sitio por mutación o al haber un exceso de SUMO-1 puede/n aparecer otro/s sitio/s de acoplamiento a SUMO. PTTG no es una proteína blanco de sumoilación tradicional porque no contiene la secuencia consenso Ψ KXD/E y tampoco posee una secuencia de localización nuclear. Sin embargo,

PTTG se localiza en el núcleo celular y su motivo de sumoilación más probable está seguido por una serina que podría ser fosforilada y una prolina (secuencia –VKMPpSP-), de forma similar al motivo PDSM presente en proteínas donde la sumoilación depende de la fosforilación (Hietakangas et al., 2006). En caso de que dicha serina sea fosforilada, la carga negativa del grupo fosfato podría estimular la interacción entre Ubc9 y PTTG favoreciendo su sumoilación (Mohideen et al., 2009). No se ha reportado fosforilación de la serina de posición 171, pero la predicción *in silico* con el Software GPS2.1.1 indica a este sitio como parte de la secuencia consenso de fosforilación de varias quinasas como CDK1, MAPK, CDK5, GSK, IKK y VRK. Adicionalmente, PTTG tiene un motivo de aminoácidos cargados negativamente hacia el extremo amino terminal de la lisina aceptora de posición 168 (secuencia –DEERELE-), lo que aportaría una región ácida adicional cerca de la secuencia mínima de sumoilación para favorecer la interacción de PTTG con la región básica de Ubc9 (Mohideen et al., 2009; Yang et al., 2006).

Asimismo, mostramos que los factores Senp-1 (que remueve SUMO de las proteínas sumoiladas) o Gam1 (que inhibe la sumoilación) producen una disminución de los niveles de expresión de PTTG, incluso en condiciones de sobreexpresión de RSUME, por lo que concluimos que el aumento de estabilidad proteica de PTTG por RSUME es vía sumoilación. Al inhibirse la conjugación a SUMO, RSUME no puede inducir la sobreexpresión de PTTG.

Por otro lado, RSUME produce una disminución de la conjugación de PTTG a ubiquitina. Este efecto representa un mecanismo adicional de RSUME para aumentar la estabilidad proteica de PTTG. Los motivos de degradación de PTTG, KEN-box y D-box, se encuentran lejos de la secuencia más probable de unión a SUMO. Sin embargo, hipotetizamos que la sumoilación de PTTG podría estar generando un impedimento estérico para la interacción con la maquinaria de ubiquitinación, principalmente con la enzima APC/C. O podría ocurrir que el nivel de expresión de PTTG alcanzado en presencia de RSUME sea tan alto que la maquinaria celular de degradación no llegue a marcar a todas las proteínas circulantes. De

cualquier modo, el hecho de que RSUME induzca una disminución de la ubiquitinación de PTTG contribuye a aumentar la estabilidad proteica de PTTG. Como evidencia adicional, demostramos que al inhibir la sumoilación mediante la proteína viral Gam1 se produce un aumento de la conjugación de PTTG a ubiquitina. Este resultado contribuye a concluir que las modificaciones post-traduccionales de PTTG por SUMO y Ub están compitiendo o interactuando de modo que el balance entre ellas determina la estabilidad de la proteína PTTG y la posibilidad de interacción con las proteínas que componen las respectivas maquinarias de modificación. Al tratarse de una proteína nativamente desestructurada en solución, PTTG tiene la posibilidad de interactuar con numerosos factores y adquirir diferentes plegamientos (Sanchez-Puig et al., 2005). Nuestros resultados indican que las posibilidades de PTTG de plegarse de un modo determinado para interactuar con un dado factor, están limitadas por las modificaciones post-traduccionales preexistentes. En este caso, el hecho de que se sumoile reduce la posibilidad de ubiquitinarse; y a la inversa, el hecho de que no pueda sumoilarse aumenta la conjugación a ubiquitina.

Creemos que el efecto de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG no se produce por interacción física de PTTG y RSUME debido a que, mediante ensayos de inmunoprecipitación, no hemos detectado interacción física directa de estas proteínas (resultados no mostrados).

V.2. Distribución subcelular de PTTG, RSUME y SUMO-1

RSUME se detectó distribuido homogéneamente en núcleo y citoplasma de células MEF. Este patrón de distribución subcelular coincide con los reportes previos (Carbia-Nagashima et al., 2007). PTTG1 se localizó principalmente en el citoplasma celular, con predominancia en la región citoplasmática perinuclear. Solo una baja proporción se distribuyó en el núcleo. Por su parte, SUMO-1 se distribuyó en el núcleo celular y en la zona citoplasmática perinuclear, tal como estaba reportado (Saitoh y Hinchey, 2000).

Cuando analizamos la distribución subcelular de las tres proteínas en células MEF sobreexpresoras de RSUME y PTTG1, se manifestó una variación en la localización de SUMO-1. En presencia de RSUME y PTTG1, SUMO-1 se distribuyó principalmente en el citoplasma y colocalizó con RSUME y PTTG1. La colocalización de RSUME con SUMO-1 es consistente con su función como enhancer de sumoilación. En el caso de PTTG1 con SUMO-1, hipotetizamos que ambas proteínas están colocalizando porque PTTG1 es blanco de modificación por SUMO-1, por lo que estaríamos visualizando a PTTG1 sumoilado.

También se detectó colocalización de RSUME y PTTG1 tanto en núcleo como en citoplasma, lo cual apoya los resultados anteriores obtenidos a nivel de proteína respecto a un efecto de RSUME sobre la estabilidad proteica de PTTG.

Adicionalmente, RSUME y PTTG1 colocalizaron en los microtúbulos del huso mitótico, excluidos del material nuclear, de una célula en división. Este hecho nos dice que, durante la división celular, ambas proteínas no están actuando sobre el ADN celular.

V.3. Consecuencias funcionales de la desregulación de PTTG

PTTG es una proteína multifuncional involucrada en la regulación de una gran cantidad de procesos fisiológicos ya que actúa como securina, como factor de transcripción e interactúa con factores implicados en apoptosis y reparación del ADN (Vlotides et al., 2007). En este trabajo, demostramos que la desregulación de los niveles de expresión de la proteína PTTG tiene consecuencias funcionales importantes que podrían ser responsables del desarrollo tumoral en general, y de la tumorigénesis hipofisaria en particular.

Por un lado, RSUME indujo una activación de la función de PTTG como factor de transcripción sobre sus genes blanco. En particular, demostramos que la sobreexpresión de cantidades crecientes de RSUME en células GH4 genera un aumento de los niveles de expresión de la proteína PTTG endógena y sobreexpresada de forma transiente, y consecuentemente un aumento de la actividad de PTTG como factor de transcripción

aumentando la activación de los promotores de c-myc y ciclina D3, y disminuyendo la transcripción del promotor de p21. De esta forma, la sobreexpresión de PTTG causada por RSUME está conduciendo a la activación del ciclo celular por al menos tres vías: inducción de la entrada al ciclo mediante c-myc, progresión por la transición G1/S mediante ciclina D3, y bloqueo de la entrada a S mediante p21. También mostramos que, cuando los niveles de expresión de PTTG alcanzan un cierto valor umbral, decrece su capacidad de activar la transcripción de c-myc y ciclina D3, y de inhibir la transcripción de p21. Esto podría explicarse con la existencia de algún efecto protector de las células que impida que se desencadene una activación descontrolada del ciclo celular (proliferación descontrolada) cuando se produce una desregulación proteica de PTTG. Se reportó que la capacidad de transactivación de PTTG correlaciona con sus propiedades de transformación celular (Wang y Melmed, 2000). Es por ello que en ocasiones donde fallen esos mecanismos de control propios de la célula o el efecto de RSUME sobre PTTG sea persistente, podría darse inicio a la malignización celular y al consiguiente desarrollo tumoral.

Consistentemente, al silenciar la expresión de RSUME con ARN pequeño de interferencia específico disminuye la actividad transcripcional de PTTG sobre los promotores de c-myc y ciclina D3. Para p21, no se obtuvo una activación del promotor cuando se silencia RSUME. La inhibición transcripcional del promotor de p21 por PTTG no depende solo de la presencia de PTTG sino que también involucra al factor de transcripción Sp1 (Tong et al., 2007). Ambos factores de transcripción interactúan sobre el promotor de p21 impidiendo su transcripción. Es decir, no alcanza con la sola regulación de los niveles de expresión de PTTG por RSUME para revertir la inhibición de la transcripción de p21. Adicionalmente, se podría silenciar al factor Sp1 para probar esta hipótesis.

Con estos resultados respecto de la actividad transcripcional de PTTG sobre los promotores de c-myc, ciclina D3 y p21 podríamos explicar lo que ocurre al ir aumentando progresivamente los niveles de expresión de PTTG. Estos efectos en conjunto serían el paso inicial hacia un estado de proliferación exagerada fuera de regulación.

Por otro lado, demostramos que RSUME produce un aumento de inestabilidad genómica en células MEF al provocar la sobreexpresión de PTTG. Este efecto incluyó tanto el aumento de la frecuencia de aparición de células aneuploides como la detección de anomalías cromosómicas (micronúcleos, fusiones cromosómicas, puente mitótico) y el aumento de la frecuencia de aparición de células binucleadas. Dicho resultado puede explicarse porque la sobreexpresión de PTTG inducida por RSUME, no solo estaría activando la proliferación celular por los mecanismos mencionados anteriormente, sino que también estaría exacerbando la actividad de PTTG como securina, lo que deriva en divisiones recurrentes y desiguales (sin la correcta separación de las cromátidas hermanas) sin citoquinesis.

Células hipofisarias AtT-20 que tienen silenciado RSUME de manera estable presentaron menores niveles de expresión de PTTG que las células control, además de mostrar una inhibición significativa de la proliferación celular respecto de las células parentales y los clones control. Este resultado reafirma el efecto de RSUME sobre los niveles de expresión de PTTG en un sistema estable, y demuestra el rol de RSUME en el control de la proliferación de las células hipofisarias. No podemos descartar que, además de PTTG, otros factores afectados por el silenciamiento de RSUME estén también jugando un rol. Estas células constituyen un excelente modelo para estudios futuros en ratones *nude*. Asimismo, la determinación de la existencia de correlación positiva entre los niveles de expresión de las proteínas PTTG y RSUME en distintos tipos de tumores de hipófisis humanos indica que la relación funcional de ambas proteínas puede ocurrir en los mismos, favoreciendo el desarrollo de los adenomas hipofisarios, y confirma la vinculación de sus niveles de expresión proteicos.

V.4. Modelo integrador

Nuestros resultados, en conjunto, permiten inferir que RSUME es un inductor de la sobreexpresión de la proteína PTTG, y representan el descubrimiento original de una causa de desregulación de la expresión de PTTG. El mecanismo de tumorigénesis de PTTG en hipófisis involucraría varias etapas secuenciales. El modelo que proponemos, basados en los resultados de esta tesis, se detalla a continuación y se esquematiza en la **Figura 33**:

- a) Activación inicial de RSUME por factores pro-tumorales.
- b) Aumento de la sumoilación en general por RSUME, y de la sumoilación de PTTG en particular.
- c) Estabilización de la proteína PTTG e inhibición de su degradación. Sobreexpresión de PTTG.
- d) Hiperactivación de la división celular mediante c-myc, ciclina D3 y p21, y aparición de aberraciones cromosómicas; proliferación descontrolada, hiperplasia y generación del tumor.

Al no haberse encontrado mutaciones en el proto-oncogen PTTG o factores que induzcan su sobreexpresión, el efecto de RSUME sobre PTTG aparece como un mecanismo interesante desencadenante del aumento de la expresión de PTTG.

Este modelo propuesto podría generalizarse a otras neoplasias donde se haya reportado la sobreexpresión de PTTG y donde se determine que se produce la activación de RSUME por citoquinas, hormonas u otros factores regulatorios inducidos por estrés celular o inflamación.

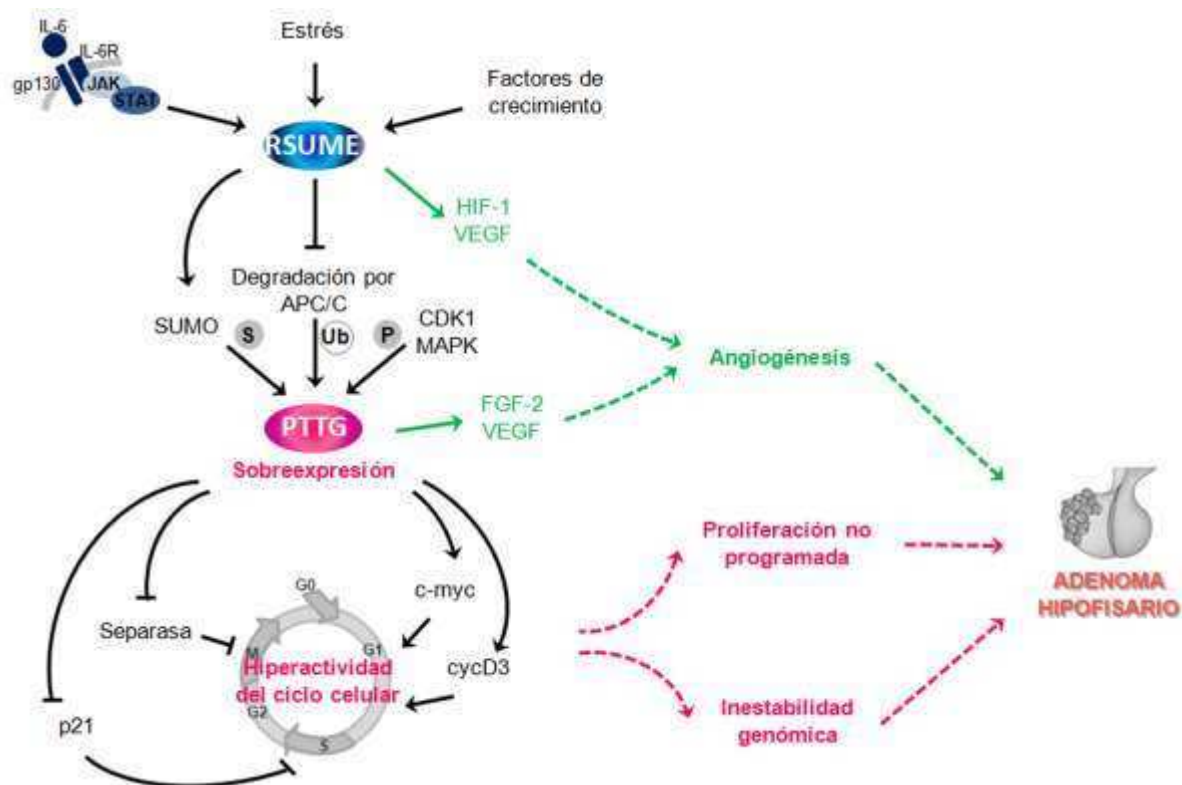


Figura 33. Modelo hipotético de sobreexpresión de PTTG en tumores de hipófisis. La activación de RSUME por citoquinas, factores de crecimiento o bajo estrés produce un aumento de la sumoilación de PTTG, una disminución de su conjugación a ubiquitina y conduce a su sobreexpresión. La desregulación de PTTG genera una hiperactividad de la división celular mediante c-myc, ciclina D3 y p21, junto con mitosis asimétricas, aneuploidías y anormalidades cromosómicas. Se termina produciendo un estado de proliferación recurrente no programada e inestabilidad genómica. Además hipotetizamos, basados en otros estudios que demuestran la regulación de estas vías por PTTG y RSUME, que podrían activarse las vías de angiogénesis de FGF-2 y VEGF. Como resultado final de esta compleja interacción se produce el desarrollo de hiperplasia hipofisaria y adenoma de hipófisis.

VI. CONCLUSIONES



En este trabajo demostramos que:

- PTTG aumenta su expresión en condiciones de estrés.
- RSUME aumenta los niveles de expresión de PTTG.
- El silenciamiento de RSUME produce una disminución de la expresión de PTTG.
- RSUME aumenta la estabilidad proteica de PTTG en las fases G1 y M del ciclo celular.
- PTTG es modificado por SUMO-1, 2 y 3, y RSUME aumenta dicha sumoilación.
- Senp-1 y Gam1 inducen una disminución de la expresión de PTTG.
- RSUME disminuye la ubiquitinación de PTTG.
- Las modificaciones de PTTG por sumoilación y ubiquitinación interactúan porque al impedir la sumoilación, aumenta la ubiquitinación.
- PTTG, RSUME y SUMO-1 colocalizan en citoplasma y núcleo.
- RSUME induce un aumento de la actividad transcripcional de PTTG sobre los promotores de c-myc y ciclina D3, y una disminución de la actividad transcripcional de PTTG sobre el promotor de p21.
- El silenciamiento de RSUME induce una inhibición de la actividad transcripcional de PTTG sobre los promotores de c-myc y ciclina D3.
- RSUME aumenta el número de células aneuploides y la aparición de anomalías cromosómicas, vía su efecto sobre PTTG.
- RSUME aumenta la frecuencia de aparición de células binucleadas, vía su efecto sobre PTTG.
- El silenciamiento estable de RSUME en células hipofisarias AtT-20 reduce los niveles de expresión de PTTG e inhibe la proliferación celular.
- La expresión de las proteínas PTTG y RSUME correlaciona positivamente en adenomas de hipófisis humanos.

VII. BIBLIOGRAFÍA



- Abbud R. A., Takumi I., Barker E. M., Ren S. G., Chen D. Y., Wawrowsky K. and Melmed S. (2005). *Early multipotential pituitary focal hyperplasia in the alpha-subunit of glycoprotein hormone-driven pituitary tumor-transforming gene transgenic mice*. Mol Endocrinol 19, 1383-1391.
- Akino K., Akita S., Mizuguchi T., Takumi I., Yu R., Wang X. Y., Rozga J., Demetriou A. A., Melmed S., Ohtsuru A. and Yamashita S. (2005). *A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration*. J Surg Res 129, 142-146.
- Alexander J. M., Biller B. M., Bikkal H., Zervas N. T., Arnold A. and Klibanski A. (1990). *Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin*. J Clin Invest 86, 336-340.
- Alvaro V., Touraine P., Raisman Vozari R., Bai-Grenier F., Birman P. and Joubert D. (1992). *Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries*. Int J Cancer 50, 724-730.
- Allaerts W., Carmeliet P. and Denef C. (1990). *New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells*. Mol Cell Endocrinol 71, 73-81.
- Anckar J. and Sistonen L. (2007). *SUMO: getting it on*. Biochem Soc Trans 35, 1409-1413.
- Andersen J. S., Matic I. and Vertegaal A. C. (2009). *Identification of SUMO target proteins by quantitative proteomics*. Methods Mol Biol 497, 19-31.
- Arzt E., Buric R., Stelzer G., Stalla J., Sauer J., Renner U. and Stalla G. K. (1993). *Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6*. Endocrinology 132, 459-467.
- Arzt E., Pereda M. P., Castro C. P., Pagotto U., Renner U. and Stalla G. K. (1999). *Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland*. Front Neuroendocrinol 20, 71-95.
- Arzt E., Stelzer G., Renner U., Lange M., Muller O. A. and Stalla G. K. (1992). *Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures*. J Clin Invest 90, 1944-1951.
- Asa S. L. and Ezzat S. (1998). *The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas*. Endocr Rev 19, 798-827.
- Auernhammer C. J. and Melmed S. (2000). *Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function*. Endocr Rev 21, 313-345.
- Bamberger C. M., Fehn M., Bamberger A. M., Ludecke D. K., Beil F. U., Saeger W. and Schulte H. M. (1999). *Reduced expression levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in human pituitary adenomas*. Eur J Endocrinol 140, 250-255.
- Bayer P., Arndt A., Metzger S., Mahajan R., Melchior F., Jaenicke R. and Becker J. (1998). *Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1*. J Mol Biol 280, 275-286.
- Bernal J. A., Luna R., Espina A., Lazaro I., Ramos-Morales F., Romero F., Arias C., Silva A., Tortolero M. and Pintor-Toro J. A. (2002). *Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis*. Nat Genet 32, 306-311.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res 7, 1513-1523.
- Blomster H. A., Hietakangas V., Wu J., Kouvonen P., Hautaniemi S. and Sistonen L. (2009). *Novel proteomics strategy brings insight into the prevalence of SUMO-2 target sites*. Mol Cell Proteomics 8, 1382-1390.
- Boelaert K., McCabe C. J., Tannahill L. A., Gittoes N. J., Holder R. L., Watkinson J. C., Bradwell A. R., Sheppard M. C. and Franklyn J. A. (2003). *Pituitary tumor transforming gene*

and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2341-2347.

Boelaert K., Yu R., Tannahill L. A., Stratford A. L., Khanim F. L., Eggo M. C., Moore J. S., Young L. S., Gittoes N. J., Franklyn J. A., Melmed S. and McCabe C. J. (2004). *PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro*. *J Mol Endocrinol* 33, 663-677.

Boggild M. D., Jenkinson S., Pistorello M., Boscaro M., Scanarini M., McTernan P., Perrett C. W., Thakker R. V. and Clayton R. N. (1994). *Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors*. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 387-392.

Boggio R., Colombo R., Hay R. T., Draetta G. F. and Chiocca S. (2004). *A mechanism for inhibiting the SUMO pathway*. *Mol Cell* 16, 549-561.

Bohren K. M., Gabbay K. H. and Owerbach D. (2007). *Affinity chromatography of native SUMO proteins using His-tagged recombinant UBC9 bound to Co²⁺-charged talon resin*. *Protein Expr Purif* 54, 289-294.

Candolfi M., Zaldivar V., Jaita G. and Seilicovich A. (2006). *Anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle*. *Front Horm Res* 35, 9-21.

Capili A. D. and Lima C. D. (2007). *Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction*. *J Mol Biol* 369, 608-618.

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

Castro C. P., Giacomini D., Nagashima A. C., Onofri C., Graciarena M., Kobayashi K., Paez-Pereda M., Renner U., Stalla G. K. and Arzt E. (2003). *Reduced expression of the cytokine transducer gp130 inhibits hormone secretion, cell growth, and tumor development of pituitary lactosomatotrophic GH3 cells*. *Endocrinology* 144, 693-700.

Ciechanover A. (1994). *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*. *Cell* 79, 13-21.

Clayton R. N. and Farrell W. E. (2001). *Clonality of pituitary tumours: more complicated than initially envisaged?* *Brain Pathol* 11, 313-327.

Cristina C., Diaz-Torga G. S., Goya R. G., Kakar S. S., Perez-Millan M. I., Passos V. Q., Giannella-Neto D., Bronstein M. D. and Becu-Villalobos D. (2007). *PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes*. *Mol Cancer* 6, 4.

Cryns V. L., Alexander J. M., Klibanski A. and Arnold A. (1993). *The retinoblastoma gene in human pituitary tumors*. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 644-646.

Chamaon K., Kanakis D., Mawrin C., Dietzmann K. and Kirches E. (2010). *Transcripts of PTTG and growth factors bFGF and IGF-1 are correlated in pituitary adenomas*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118, 121-126.

Chamaon K., Kirches E., Kanakis D., Braeuninger S., Dietzmann K. and Mawrin C. (2005). *Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-1 and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes*. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 86-92.

Chen L., Puri R., Lefkowitz E. J. and Kakar S. S. (2000). *Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization*. *Gene* 248, 41-50.

- Chesnokova V., Zonis S., Kovacs K., Ben-Shlomo A., Wawrowsky K., Bannykh S. and Melmed S. (2008). *p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 17498-17503.
- Chesnokova V., Zonis S., Rubinek T., Yu R., Ben-Shlomo A., Kovacs K., Wawrowsky K. and Melmed S. (2007). *Senescence mediates pituitary hypoplasia and restrains pituitary tumor growth*. Cancer Res 67, 10564-10572.
- Chien W. and Pei L. (2000). *A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product*. J Biol Chem 275, 19422-19427.
- Cho-Rok J., Yoo J., Jang Y. J., Kim S., Chu I. S., Yeom Y. I., Choi J. Y. and Im D. S. (2006). *Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PTTG1 inhibits liver cancer cell growth in vitro and in vivo*. Hepatology 43, 1042-1052.
- Deshaiies R. J. and Joazeiro C. A. (2009). *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem 78, 399-434.
- Desterro J. M., Rodriguez M. S. and Hay R. T. (1998). *SUMO-1 modification of IkkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation*. Mol Cell 2, 233-239.
- Desterro J. M., Rodriguez M. S., Kemp G. D. and Hay R. T. (1999). *Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1*. J Biol Chem 274, 10618-10624.
- Desterro J. M., Thomson J. and Hay R. T. (1997). *Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin*. FEBS Lett 417, 297-300.
- Doerks T., Copley R. R., Schultz J., Ponting C. P. and Bork P. (2002). *Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions*. Genome Res 12, 47-56.
- Dominguez A., Ramos-Morales F., Romero F., Rios R. M., Dreyfus F., Tortolero M. and Pintor-Toro J. A. (1998). *hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG*. Oncogene 17, 2187-2193.
- Dorval V. and Fraser P. E. (2007). *SUMO on the road to neurodegeneration*. Biochim Biophys Acta 1773, 694-706.
- Drag M. and Salvesen G. S. (2008). *DeSUMOylating enzymes--SENPs*. IUBMB Life 60, 734-742.
- Druker J., Liberman A. C., Antunica-Noguerol M., Gerez J., Paez-Pereda M., Rein T., Iniguez-Lluhi J. A., Holsboer F. and Arzt E. (2013). *RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity*. Mol Cell Biol 33, 2116-2127.
- Dworakowska D. and Grossman A. B. (2012). *The molecular pathogenesis of pituitary tumors: implications for clinical management*. Minerva Endocrinol 37, 157-172.
- Ewing I., Pedder-Smith S., Franchi G., Ruscica M., Emery M., Vax V., Garcia E., Czirjak S., Hanzely Z., Kola B., Korbonits M. and Grossman A. B. (2007). *A mutation and expression analysis of the oncogene BRAF in pituitary adenomas*. Clin Endocrinol (Oxf) 66, 348-352.
- Ezzat S. and Asa S. L. (2006). *Mechanisms of disease: The pathogenesis of pituitary tumors*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2, 220-230.
- Filippella M., Galland F., Kujas M., Young J., Faggiano A., Lombardi G., Colao A., Meduri G. and Chanson P. (2006). *Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study*. Clin Endocrinol (Oxf) 65, 536-543.

- Fowkes R. C. and Vlotides G. (2012). *Hypoxia-induced VEGF production 'RSUMEs' in pituitary adenomas*. *Endocr Relat Cancer* 19, C1-5.
- Fujimoto N., Maruyama S. and Ito A. (1999). *Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2*. *Endocr J* 46, 389-396.
- Gartel A. L. and Radhakrishnan S. K. (2005). *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. *Cancer Res* 65, 3980-3985.
- Geiss-Friedlander R. and Melchior F. (2007). *Concepts in sumoylation: a decade on*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.
- Gerez J., Fuertes M., Tedesco L., Silberstein S., Sevlever G., Paez-Pereda M., Holsboer F., Turjanski A. G. and Arzt E. (2013). *In silico structural and functional characterization of the RSUME splice variants*. *PLoS One* 8, e57795.
- Gill G. (2004). *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* *Genes Dev* 18, 2046-2059.
- Gillies J. and Hochstrasser M. (2012). *A new class of SUMO proteases*. *EMBO Rep* 13, 284-285.
- Gong L., Li B., Millas S. and Yeh E. T. (1999). *Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex*. *FEBS Lett* 448, 185-189.
- Gutierrez G. J. and Ronai Z. (2006). *Ubiquitin and SUMO systems in the regulation of mitotic checkpoints*. *Trends Biochem Sci* 31, 324-332.
- Hamid T. and Kakar S. S. (2004). *PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function*. *Mol Cancer* 3, 18.
- Hammer E., Heilbronn R. and Weger S. (2007). *The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA topoisomerase I in vitro and in vivo*. *FEBS Lett* 581, 5418-5424.
- Hauf S., Roitinger E., Koch B., Dittrich C. M., Mechtler K. and Peters J. M. (2005). *Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2*. *PLoS Biol* 3, e69.
- Hay R. T. (2005). *SUMO: a history of modification*. *Mol Cell* 18, 1-12.
- Hayashi T., Seki M., Maeda D., Wang W., Kawabe Y., Seki T., Saitoh H., Fukagawa T., Yagi H. and Enomoto T. (2002). *Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells*. *Exp Cell Res* 280, 212-221.
- Heaney A. P., Fernando M. and Melmed S. (2002). *Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis*. *J Clin Invest* 109, 277-283.
- Heaney A. P., Horwitz G. A., Wang Z., Singson R. and Melmed S. (1999). *Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis*. *Nat Med* 5, 1317-1321.
- Heaney A. P., Singson R., McCabe C. J., Nelson V., Nakashima M. and Melmed S. (2000). *Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours*. *Lancet* 355, 716-719.
- Heideker J., Perry J. J. and Boddy M. N. (2009). *Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases*. *DNA Repair (Amst)* 8, 517-524.
- Herman V., Drazin N. Z., Gonsky R. and Melmed S. (1993). *Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements*. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 50-55.

- Herman V., Fagin J., Gonsky R., Kovacs K. and Melmed S. (1990). *Clonal origin of pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab 71, 1427-1433.
- Hershko A. and Ciechanover A. (1982). *Mechanisms of intracellular protein breakdown*. Annu Rev Biochem 51, 335-364.
- Hietakangas V., Anckar J., Blomster H. A., Fujimoto M., Palvimo J. J., Nakai A. and Sistonen L. (2006). *PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 45-50.
- Hlubek F., Pfeiffer S., Budczies J., Spaderna S., Jung A., Kirchner T. and Brabletz T. (2006). *Securin (hPTTG1) expression is regulated by beta-catenin/TCF in human colorectal carcinoma*. Br J Cancer 94, 1672-1677.
- Hochstrasser M. (2000). *Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems*. Nat Cell Biol 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.
- Horwitz G. A., Miklovsy I., Heaney A. P., Ren S. G. and Melmed S. (2003). *Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression*. Mol Endocrinol 17, 600-609.
- Hu N., Gutschmann A., Herbert D. C., Bradley A., Lee W. H. and Lee E. Y. (1994). *Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance*. Oncogene 9, 1021-1027.
- Huang T. T. and D'Andrea A. D. (2006). *Regulation of DNA repair by ubiquitylation*. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 323-334.
- Hunter J. A., Skelly R. H., Aylwin S. J., Geddes J. F., Evanson J., Besser G. M., Monson J. P. and Burrin J. M. (2003). *The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas*. Eur J Endocrinol 148, 203-211.
- Ishikawa H., Heaney A. P., Yu R., Horwitz G. A. and Melmed S. (2001). *Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis*. J Clin Endocrinol Metab 86, 867-874.
- Jackman M. R. and Pines J. N. (1997). *Cyclins and the G2/M transition*. Cancer Surv 29, 47-73.
- Jacks T., Fazeli A., Schmitt E. M., Bronson R. T., Goodell M. A. and Weinberg R. A. (1992). *Effects of an Rb mutation in the mouse*. Nature 359, 295-300.
- Jallepalli P. V., Waizenegger I. C., Bunz F., Langer S., Speicher M. R., Peters J. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. and Lengauer C. (2001). *Securin is required for chromosomal stability in human cells*. Cell 105, 445-457.
- Joazeiro C. A. and Weissman A. M. (2000). *RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity*. Cell 102, 549-552.
- Johnson E. S. and Blobel G. (1997). *Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p*. J Biol Chem 272, 26799-26802.
- Johnson E. S., Schwienhorst I., Dohmen R. J. and Blobel G. (1997). *The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer*. EMBO J 16, 5509-5519.
- Jordan S., Lidhar K., Korbonits M., Lowe D. G. and Grossman A. B. (2000). *Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary*. Eur J Endocrinol 143, R1-6.

- Kagey M. H., Melhuish T. A. and Wotton D. (2003). *The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3*. Cell 113, 127-137.
- Kakar S. S. (1999). *Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG)*. Gene 240, 317-324.
- Kakar S. S. and Jennes L. (1999). *Molecular cloning and characterization of the tumor transforming gene (TUTR1): a novel gene in human tumorigenesis*. Cytogenet Cell Genet 84, 211-216.
- Kelly K. and Siebenlist U. (1985). *The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cells*. J Clin Immunol 5, 65-77.
- Kerscher O., Felberbaum R. and Hochstrasser M. (2006). *Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins*. Annu Rev Cell Dev Biol 22, 159-180.
- Kim D. S., Fong J., Read M. L. and McCabe C. J. (2007). *The emerging role of pituitary tumour transforming gene (PTTG) in endocrine tumourigenesis*. Mol Cell Endocrinol 278, 1-6.
- Kim D. S., McCabe C. J., Buchanan M. A. and Watkinson J. C. (2003). *Oncogenes in thyroid cancer*. Clin Otolaryngol Allied Sci 28, 386-395.
- Kim J. H. and Baek S. H. (2009). *Emerging roles of desumoylating enzymes*. Biochim Biophys Acta 1792, 155-162.
- Kirsh O., Seeler J. S., Pichler A., Gast A., Muller S., Miska E., Mathieu M., Harel-Bellan A., Kouzarides T., Melchior F. and Dejean A. (2002). *The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase*. EMBO J 21, 2682-2691.
- Kishimoto T., Akira S., Narazaki M. and Taga T. (1995). *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood 86, 1243-1254.
- Kiyokawa H., Kineman R. D., Manova-Todorova K. O., Soares V. C., Hoffman E. S., Ono M., Khanam D., Hayday A. C., Frohman L. A. and Koff A. (1996). *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1)*. Cell 85, 721-732.
- Korbonits M., Chahal H. S., Kaltsas G., Jordan S., Urmanova Y., Khalimova Z., Harris P. E., Farrell W. E., Claret F. X. and Grossman A. B. (2002). *Expression of phosphorylated p27(Kip1) protein and Jun activation domain-binding protein 1 in human pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab 87, 2635-2643.
- Kovacs K., Horvath E. and Vidal S. (2001). *Classification of pituitary adenomas*. J Neurooncol 54, 121-127.
- Lapenta V., Chiurazzi P., van der Spek P., Pizzuti A., Hanaoka F. and Brahe C. (1997). *SMT3A, a human homologue of the S. cerevisiae SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family*. Genomics 40, 362-366.
- Lee I. A., Seong C. and Choe I. S. (1999). *Cloning and expression of human cDNA encoding human homologue of pituitary tumor transforming gene*. Biochem Mol Biol Int 47, 891-897.
- Lee K. M. and O'Connell M. J. (2006). *A new SUMO ligase in the DNA damage response*. DNA Repair (Amst) 5, 138-141.
- Lidhar K., Korbonits M., Jordan S., Khalimova Z., Kaltsas G., Lu X., Clayton R. N., Jenkins P. J., Monson J. P., Besser G. M., Lowe D. G. and Grossman A. B. (1999). *Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab 84, 3823-3830.
- Lin D., Tatham M. H., Yu B., Kim S., Hay R. T. and Chen Y. (2002). *Identification of a substrate recognition site on Ubc9*. J Biol Chem 277, 21740-21748.

- Lyons J., Landis C. A., Harsh G., Vallar L., Grunewald K., Feichtinger H., Duh Q. Y., Clark O. H., Kawasaki E., Bourne H. R. and et al. (1990). *Two G protein oncogenes in human endocrine tumors*. Science 249, 655-659.
- Martin S., Wilkinson K. A., Nishimune A. and Henley J. M. (2007). *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. and Vertegaal A. C. (2010). *Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif*. Mol Cell 39, 641-652.
- McCabe C. J., Boelaert K., Tannahill L. A., Heaney A. P., Stratford A. L., Khaira J. S., Hussain S., Sheppard M. C., Franklyn J. A. and Gittoes N. J. (2002). *Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab 87, 4238-4244.
- McCabe C. J., Khaira J. S., Boelaert K., Heaney A. P., Tannahill L. A., Hussain S., Mitchell R., Olliff J., Sheppard M. C., Franklyn J. A. and Gittoes N. J. (2003). *Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour*. Clin Endocrinol (Oxf) 58, 141-150.
- Melchior F., Schergaut M. and Pichler A. (2003). *SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores*. Trends Biochem Sci 28, 612-618.
- Melmed S. (1994). *Pituitary neoplasia*. Endocrinol Metab Clin North Am 23, 81-92.
- Melmed S. (1999). *Pathogenesis of pituitary tumors*. Endocrinol Metab Clin North Am 28, 1-12, v.
- Melmed S. (2011a). *Pathogenesis of pituitary tumors*. Nat Rev Endocrinol 7, 257-266.
- Melmed S. (2011b). *The pituitary*. xi, 731 p.
- Mete O., Ezzat S. and Asa S. L. (2012). *Biomarkers of aggressive pituitary adenomas*. J Mol Endocrinol 49, R69-78.
- Metzger M. B., Pruneda J. N., Klevit R. E. and Weissman A. M. (2014). *RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination*. Biochim Biophys Acta 1843, 47-60.
- Minematsu T., Egashira N., Kajiyama H., Takei M., Takekoshi S., Itoh Y., Tsukamoto H., Itoh J., Sanno N., Teramoto A. and Osamura R. Y. (2007). *PTTG is a secretory protein in human pituitary adenomas and in mouse pituitary tumor cell lines*. Endocr Pathol 18, 8-15.
- Minematsu T., Suzuki M., Sanno N., Takekoshi S., Teramoto A. and Osamura R. Y. (2006). *PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas*. Endocr Pathol 17, 143-153.
- Miyazono K., Kamiya Y. and Miyazawa K. (2008). *SUMO amplifies TGF-beta signalling*. Nat Cell Biol 10, 635-637.
- Mohideen F., Capili A. D., Bilimoria P. M., Yamada T., Bonni A. and Lima C. D. (2009). *A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9*. Nat Struct Mol Biol 16, 945-952.
- Mora-Santos M., Castilla C., Herrero-Ruiz J., Giraldez S., Limon-Mortes M. C., Saez C., Japon M. A., Tortolero M. and Romero F. (2013). *A single mutation in Securin induces chromosomal instability and enhances cell invasion*. Eur J Cancer 49, 500-510.

- Morris D. G., Musat M., Czirjak S., Hanzely Z., Lillington D. M., Korbonits M. and Grossman A. B. (2005). *Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis*. Eur J Endocrinol 153, 143-151.
- Mukhopadhyay D. and Dasso M. (2007). *Modification in reverse: the SUMO proteases*. Trends Biochem Sci 32, 286-295.
- Nakabayashi H., Sunada I. and Hara M. (2001). *Immunohistochemical analyses of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas*. J Histochem Cytochem 49, 1193-1194.
- Nakayama K. I. and Nakayama K. (2006). *Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer*. Nat Rev Cancer 6, 369-381.
- Nameki N., Yoneyama M., Koshiba S., Tochio N., Inoue M., Seki E., Matsuda T., Tomo Y., Harada T., Saito K., Kobayashi N., Yabuki T., Aoki M., Nunokawa E., Matsuda N., Sakagami N., Terada T., Shirouzu M., Yoshida M., Hirota H., Osanai T., Tanaka A., Arakawa T., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Kinoshita K., Guntert P., Kigawa T. and Yokoyama S. (2004). *Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein*. Protein Sci 13, 2089-2100.
- Navascues J., Bengoechea R., Tapia O., Casafont I., Berciano M. T. and Lafarga M. (2008). *SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons*. J Struct Biol 163, 137-146.
- Ogino A., Yoshino A., Katayama Y., Watanabe T., Ota T., Komine C., Yokoyama T. and Fukushima T. (2005). *The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas*. J Neuropathol Exp Neurol 64, 398-403.
- Ouyang J. and Gill G. (2009). *SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription*. Epigenetics 4, 440-444.
- Paez Pereda M., Goldberg V., Chervin A., Carrizo G., Molina A., Andrada J., Sauer J., Renner U., Stalla G. K. and Arzt E. (1996). *Interleukin-2 (IL-2) and IL-6 regulate c-fos protooncogene expression in human pituitary adenoma explants*. Mol Cell Endocrinol 124, 33-42.
- Páez Pereda M., Lohrer P., Kovalovsky D., Perez Castro C., Goldberg V., Losa M., Chervin A., Berner S., Molina H., Stalla G. K. and Arzt E. (2000). *Interleukin-6 is inhibited by glucocorticoids and stimulates ACTH secretion and POMC expression in human corticotroph pituitary adenomas*. Exp Clin Endocr Diabetes 108, 202-207.
- Passos V. Q., Fortes M. A., Giannella-Neto D. and Bronstein M. D. (2009). *Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists*. Neuroendocrinology 89, 163-170.
- Pei L. (2000). *Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function*. J Biol Chem 275, 31191-31198.
- Pei L. (2001). *Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene*. J Biol Chem 276, 8484-8491.
- Pei L. and Melmed S. (1997). *Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG)*. Mol Endocrinol 11, 433-441.
- Pei L., Melmed S., Scheithauer B., Kovacs K., Benedict W. F. and Prager D. (1995). *Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma susceptibility gene (RB) locus in aggressive pituitary tumors: evidence for a chromosome 13 tumor suppressor gene other than RB*. Cancer Res 55, 1613-1616.
- Pei L., Melmed S., Scheithauer B., Kovacs K. and Prager D. (1994). *H-ras mutations in human pituitary carcinoma metastases*. J Clin Endocrinol Metab 78, 842-846.

- Perez-Castro C., Renner U., Haedo M. R., Stalla G. K. and Arzt E. (2012). *Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology*. *Physiol Rev* 92, 1-38.
- Perez Castro C., Carbia Nagashima A., Paez Pereda M., Goldberg V., Chervin A., Carrizo G., Molina H., Renner U., Stalla G. K. and Arzt E. (2001). *Effects of the gp130 cytokines ciliary neurotropic factor (CNTF) and interleukin-11 on pituitary cells: CNTF receptors on human pituitary adenomas and stimulation of prolactin and GH secretion in normal rat anterior pituitary aggregate cultures*. *J Endocrinol* 169, 539-547.
- Perez Castro C., Nagashima A. C., Pereda M. P., Goldberg V., Chervin A., Largen P., Renner U., Stalla G. K. and Arzt E. (2000). *The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function and growth of lactosomatotropic and folliculostellate pituitary cell lines*. *Endocrinology* 141, 1746-1753.
- Peters G. (1994). *The D-type cyclins and their role in tumorigenesis*. *J Cell Sci Suppl* 18, 89-96.
- Pichler A., Gast A., Seeler J. S., Dejean A. and Melchior F. (2002). *The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity*. *Cell* 108, 109-120.
- Pichler A., Knipscheer P., Saitoh H., Sixma T. K. and Melchior F. (2004). *The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type*. *Nat Struct Mol Biol* 11, 984-991.
- Prezant T. R., Kadioglu P. and Melmed S. (1999). *An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family*. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1149-1152.
- Puri R., Tousson A., Chen L. and Kakar S. S. (2001). *Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors*. *Cancer Lett* 163, 131-139.
- Quereda V. and Malumbres M. (2009). *Cell cycle control of pituitary development and disease*. *J Mol Endocrinol* 42, 75-86.
- Ramos-Morales F., Dominguez A., Romero F., Luna R., Multon M. C., Pintor-Toro J. A. and Tortolero M. (2000). *Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product*. *Oncogene* 19, 403-409.
- Raverot G., Castinetti F., Jouanneau E., Morange I., Figarella-Branger D., Dufour H., Trouillas J. and Brue T. (2012). *Pituitary carcinomas and aggressive pituitary tumours: merits and pitfalls of temozolomide treatment*. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76, 769-775.
- Ray D. and Melmed S. (1997). *Pituitary cytokine and growth factor expression and action*. *Endocr Rev* 18, 206-228.
- Rehfeld N., Geddert H., Atamna A., Rohrbeck A., Garcia G., Kliszewski S., Neukirchen J., Bruns I., Steidl U., Fenk R., Gabbert H. E., Kronenwett R., Haas R. and Rohr U. P. (2006). *The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer*. *J Carcinog* 5, 4.
- Renner U., Gloddek J., Arzt E., Inoue K. and Stalla G. K. (1997). *Interleukin-6 is an autocrine growth factor for folliculostellate-like TtT/GF mouse pituitary tumor cells*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105, 345-352.
- Reverter D. and Lima C. D. (2005). *Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex*. *Nature* 435, 687-692.
- Rodriguez M. S., Dargemont C. and Hay R. T. (2001). *SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting*. *J Biol Chem* 276, 12654-12659.

- Romero F., Multon M. C., Ramos-Morales F., Dominguez A., Bernal J. A., Pintor-Toro J. A. and Tortolero M. (2001). *Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase*. *Nucleic Acids Res* 29, 1300-1307.
- Rosas-Acosta G., Russell W. K., Deyrieux A., Russell D. H. and Wilson V. G. (2005). *A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers*. *Mol Cell Proteomics* 4, 56-72.
- Saeger W., Schreiber S. and Ludecke D. K. (2001). *Cyclins D1 and D3 and topoisomerase II alpha in inactive pituitary adenomas*. *Endocr Pathol* 12, 39-47.
- Saez C., Japon M. A., Ramos-Morales F., Romero F., Segura D. I., Tortolero M. and Pintor-Toro J. A. (1999). *hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias*. *Oncogene* 18, 5473-5476.
- Saitoh H. and Hinchey J. (2000). *Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3*. *J Biol Chem* 275, 6252-6258.
- Salehi F., Kovacs K., Scheithauer B. W., Lloyd R. V. and Cusimano M. (2008). *Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update*. *Endocr Relat Cancer* 15, 721-743.
- Sambrook J. and Russell D. W. (2006). *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. v, 800 p.
- Sanchez-Puig N., Veprintsev D. B. and Fersht A. R. (2005). *Human full-length Securin is a natively unfolded protein*. *Protein Sci* 14, 1410-1418.
- Sapetschnig A., Rischitor G., Braun H., Doll A., Schergaut M., Melchior F. and Suske G. (2002). *Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1*. *EMBO J* 21, 5206-5215.
- Sav A., Rotondo F., Syro L. V., Scheithauer B. W. and Kovacs K. (2012). *Biomarkers of pituitary neoplasms*. *Anticancer Res* 32, 4639-4654.
- Savare J., Bonneaud N. and 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.
- Sawada T., Koike K., Kanda Y., Ikegami H., Jikihara H., Maeda T., Osako Y., Hirota K. and Miyake A. (1995). *Interleukin-6 stimulates cell proliferation of rat pituitary clonal cell lines in vitro*. *J Endocrinol Invest* 18, 83-90.
- Schwartz D. C. and Hochstrasser M. (2003). *A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers*. *Trends Biochem Sci* 28, 321-328.
- Shan B., Gerez J., Haedo M., Fuertes M., Theodoropoulou M., Buchfelder M., Losa M., Stalla G. K., Arzt E. and Renner U. (2012). *RSUME is implicated in HIF-1-induced VEGF-A production in pituitary tumour cells*. *Endocr Relat Cancer* 19, 13-27.
- Shao R., Zhang F. P., Tian F., Anders Friberg P., Wang X., Sjolund H. and Billig H. (2004). *Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo*. *FEBS Lett* 569, 293-300.
- Shibata Y., Haruki N., Kuwabara Y., Nishiwaki T., Kato J., Shinoda N., Sato A., Kimura M., Koyama H., Toyama T., Ishiguro H., Kudo J., Terashita Y., Konishi S. and Fujii Y. (2002). *Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer*. *Jpn J Clin Oncol* 32, 233-237.
- Simpson D. J., Frost S. J., Bicknell J. E., Broome J. C., McNicol A. M., Clayton R. N. and Farrell W. E. (2001a). *Aberrant expression of G(1)/S regulators is a frequent event in sporadic pituitary adenomas*. *Carcinogenesis* 22, 1149-1154.

- Simpson D. J., Fryer A. A., Grossman A. B., Wass J. A., Pfeifer M., Kros J. M., Clayton R. N. and Farrell W. E. (2001b). *Cyclin D1 (CCND1) genotype is associated with tumour grade in sporadic pituitary adenomas*. *Carcinogenesis* 22, 1801-1807.
- Simpson D. J., Hibberts N. A., McNicol A. M., Clayton R. N. and Farrell W. E. (2000). *Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island*. *Cancer Res* 60, 1211-1216.
- Smith V. E., Franklyn J. A. and McCabe C. J. (2010). *Pituitary tumor-transforming gene and its binding factor in endocrine cancer*. *Expert Rev Mol Med* 12, e38.
- Spada A. and Vallar L. (1992). *G-protein oncogenes in acromegaly*. *Horm Res* 38, 90-93.
- Spada A., Vallar L. and Faglia G. (1992). *G protein oncogenes in pituitary tumors*. *Trends Endocrinol Metab* 3, 355-360.
- Spangelo B. L. and Gorospe W. C. (1995). *Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis*. *Front Neuroendocrinol* 16, 1-22.
- Spangelo B. L., Judd A. M., Isakson P. C. and MacLeod R. M. (1989). *Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro*. *Endocrinology* 125, 575-577.
- Stemmann O., Zou H., Gerber S. A., Gygi S. P. and Kirschner M. W. (2001). *Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase*. *Cell* 107, 715-726.
- Stratford A. L., Boelaert K., Tannahill L. A., Kim D. S., Warfield A., Eggo M. C., Gittoes N. J., Young L. S., Franklyn J. A. and McCabe C. J. (2005). *Pituitary tumor transforming gene binding factor: a novel transforming gene in thyroid tumorigenesis*. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4341-4349.
- Suhardja A., Kovacs K. and Rutka J. (2001). *Role of transcription factors in the pathogenesis of pituitary adenomas: a review*. *J Neurooncol* 55, 185-193.
- Sumara I., Vorlauffer E., Stukenberg P. T., Kelm O., Redemann N., Nigg E. A. and Peters J. M. (2002). *The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase*. *Mol Cell* 9, 515-525.
- Tanaka T., Fuchs J., Loidl J. and Nasmyth K. (2000). *Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation*. *Nat Cell Biol* 2, 492-499.
- Tatham M. H., Jaffray E., Vaughan O. A., Desterro J. M., Botting C. H., Naismith J. H. and Hay R. T. (2001). *Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9*. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.
- Tempe D., Piechaczyk M. and Bossis G. (2008). *SUMO under stress*. *Biochem Soc Trans* 36, 874-878.
- Tena-Suck M. L., Ortiz-Plata A. and de la Vega H. A. (2008). *Phosphatase and tensin homologue and pituitary tumor-transforming gene in pituitary adenomas. Clinical-pathologic and immunohistochemical analysis*. *Ann Diagn Pathol* 12, 275-282.
- Tfelt-Hansen J., Kanuparthi D. and Chattopadhyay N. (2006). *The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis*. *Clin Med Res* 4, 130-137.
- Tfelt-Hansen J., Schwarz P., Terwilliger E. F., Brown E. M. and Chattopadhyay N. (2003). *Calcium-sensing receptor induces messenger ribonucleic acid of human securin, pituitary tumor transforming gene, in rat testicular cancer*. *Endocrinology* 144, 5188-5193.
- Tfelt-Hansen J., Yano S., Bandyopadhyay S., Carroll R., Brown E. M. and Chattopadhyay N. (2004). *Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its binding protein in human astrocytes and astrocytoma cells: function and regulation of PTTG in U87 astrocytoma cells*. *Endocrinology* 145, 4222-4231.

- Thakker R. V., Pook M. A., Wooding C., Boscaro M., Scanarini M. and Clayton R. N. (1993). *Association of somatotrophinomas with loss of alleles on chromosome 11 and with gsp mutations*. J Clin Invest 91, 2815-2821.
- Thompson A. D., 3rd and Kakar S. S. (2005). *Insulin and IGF-1 regulate the expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) in breast tumor cells*. FEBS Lett 579, 3195-3200.
- Tong H., Hateboer G., Perrakis A., Bernards R. and Sixma T. K. (1997). *Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system*. J Biol Chem 272, 21381-21387.
- Tong Y. and Eigler T. (2009). *Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1*. J Mol Endocrinol 43, 179-185.
- Tong Y., Tan Y., Zhou C. and Melmed S. (2007). *Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition*. Oncogene 26, 5596-5605.
- Tordjman K., Stern N., Ouaknine G., Yossiphov Y., Razon N., Nordenskjold M. and Friedman E. (1993). *Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab 77, 765-769.
- Tsai S. J., Lin S. J., Cheng Y. M., Chen H. M. and Wing L. Y. (2005). *Expression and functional analysis of pituitary tumor transforming gene-1 [corrected] in uterine leiomyomas*. J Clin Endocrinol Metab 90, 3715-3723.
- Uhlmann F., Lottspeich F. and Nasmyth K. (1999). *Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1*. Nature 400, 37-42.
- Ulrich H. D. (2005). *Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest*. Trends Cell Biol 15, 525-532.
- Valin A. and Gill G. (2007). *Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO*. Biochem Soc Trans 35, 1393-1396.
- Vallar L., Spada A. and Giannattasio G. (1987). *Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas*. Nature 330, 566-568.
- Vergier A., Perdomo J. and 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. and 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. and Lamond A. I. (2004). *A proteomic study of SUMO-2 target proteins*. J Biol Chem 279, 33791-33798.
- Vijay-Kumar S., Bugg C. E. and Cook W. J. (1987). *Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution*. J Mol Biol 194, 531-544.
- Vlotides G., Eigler T. and Melmed S. (2007). *Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis*. Endocr Rev 28, 165-186.
- Waizenegger I., Gimenez-Abian J. F., Wernic D. and Peters J. M. (2002). *Regulation of human separase by securin binding and autocleavage*. Curr Biol 12, 1368-1378.
- Wan J., Subramonian D. and Zhang X. D. (2012). *SUMOylation in control of accurate chromosome segregation during mitosis*. Curr Protein Pept Sci 13, 467-481.
- Wang Z. and Melmed S. (2000). *Characterization of the murine pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its promoter*. Endocrinology 141, 763-771.

- Weger S., Hammer E. and Heilbronn R. (2005). *Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo*. FEBS Lett 579, 5007-5012.
- Wierinckx A., Auger C., Devauchelle P., Reynaud A., Chevallier P., Jan M., Perrin G., Fevre-Montange M., Rey C., Figarella-Branger D., Raverot G., Belin M. F., Lachuer J. and Trouillas J. (2007). *A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors*. Endocr Relat Cancer 14, 887-900.
- Wilkinson K. A., Nishimune A. and Henley J. M. (2008). *Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs*. Neurosci Lett 436, 239-244.
- Williamson E. A., Ince P. G., Harrison D., Kendall-Taylor P. and Harris P. E. (1995). *G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas*. Eur J Clin Invest 25, 128-131.
- Wirth K. G., Wutz G., Kudo N. R., Desdouets C., Zetterberg A., Taghybeeglu S., Seznec J., Ducos G. M., Ricci R., Firnberg N., Peters J. M. and Nasmyth K. (2006). *Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression*. J Cell Biol 172, 847-860.
- Woloschak M., Yu A. and Post K. D. (1997). *Frequent inactivation of the p16 gene in human pituitary tumors by gene methylation*. Mol Carcinog 19, 221-224.
- Yang S. H., Galanis A., Witty J. and Sharrocks A. D. (2006). *An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO*. EMBO J 25, 5083-5093.
- Yang S. H., Jaffray E., Hay R. T. and Sharrocks A. D. (2003). *Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity*. Mol Cell 12, 63-74.
- Yang S. H. and Sharrocks A. D. (2004). *SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression*. Mol Cell 13, 611-617.
- Yeh E. T. (2009). *SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes*. J Biol Chem 284, 8223-8227.
- Yin H., Fujimoto N., Maruyama S. and Asano K. (2001). *Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats*. Jpn J Cancer Res 92, 1034-1040.
- Yoshino A., Katayama Y., Ogino A., Watanabe T., Yachi K., Ohta T., Komine C., Yokoyama T. and Fukushima T. (2007). *Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas*. J Neurooncol 83, 153-162.
- Yu R., Cruz-Soto M., Li Calzi S., Hui H. and Melmed S. (2006). *Murine pituitary tumor-transforming gene functions as a securin protein in insulin-secreting cells*. J Endocrinol 191, 45-53.
- Yu R., Heaney A. P., Lu W., Chen J. and Melmed S. (2000a). *Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis*. J Biol Chem 275, 36502-36505.
- Yu R., Lu W., Chen J., McCabe C. J. and Melmed S. (2003). *Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells*. Endocrinology 144, 4991-4998.
- Yu R. and Melmed S. (2001). *Oncogene activation in pituitary tumors*. Brain Pathol 11, 328-341.
- Yu R., Ren S. G., Horwitz G. A., Wang Z. and Melmed S. (2000b). *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG-3 cell division and survival: evidence from live cell imaging*. Mol Endocrinol 14, 1137-1146.
- Yunus A. A. and 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. and Lima C. D. (2009). *Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA*. Mol Cell 35, 669-682.
- Zhang X., Horwitz G. A., Heaney A. P., Nakashima M., Prezant T. R., Bronstein M. D. and Melmed S. (1999a). *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab 84, 761-767.
- Zhang X., Horwitz G. A., Prezant T. R., Valentini A., Nakashima M., Bronstein M. D. and Melmed S. (1999b). *Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG)*. Mol Endocrinol 13, 156-166.
- Zhao X. and Blobel G. (2005). *A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 4777-4782.
- Zhou C., Liu S., Zhou X., Xue L., Quan L., Lu N., Zhang G., Bai J., Wang Y., Liu Z., Zhan Q., Zhu H. and Xu N. (2005). *Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin /TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer 113, 891-898.
- Zou H., McGarry T. J., Bernal T. and Kirschner M. W. (1999). *Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis*. Science 285, 418-422.
- Zur A. and Brandeis M. (2001). *Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis*. EMBO J 20, 792-801.

