

Tesis Doctoral

Participación de la SUMOilación de proteínas componentes del spliceosoma en el proceso de splicing

Pozzi, María Berta

2017-03-07

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:

Pozzi, María Berta. (2017-03-07). Participación de la SUMOilación de proteínas componentes del spliceosoma en el proceso de splicing. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pozzi, María Berta. "Participación de la SUMOilación de proteínas componentes del spliceosoma en el proceso de splicing". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

**Participación de la SUMOilación de proteínas
componentes del spliceosoma en el proceso de splicing**

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

Lic. María Berta Pozzi

Directora de tesis: Dra. Anabella Srebrow

Consejero de Estudio: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE- UBA-
CONICET); Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN-UBA

Fecha de defensa: 7 de marzo de 2017

Gratitud

Gracias aroma
azul,
fogata
encelo.

Gracias pelo
caballo
mandarino.

Gracias pudor
turquesa
embujo
vela,
llamarada
quietud
azar
delirio.

Gracias a los racimos
a la tarde,
a la sed
al fervor
a las arrugas,
al silencio
a los senos
a la noche,
a la danza
a la lumbre
a la espesura.

Muchas gracias al humo
a los microbios,
al despertar
al cuerno
a la belleza,
a la esponja
a la duda
a la semilla
a la sangre
a los toros
a la siesta.

Gracias por la ebriedad,
por la vagancia,
por el aire
la piel
las alamedas,
por el absurdo de hoy
y de mañana,
desazón
avidez
calma
alegría,
nostalgia
desamor
ceniza
llanto.

Gracias a lo que nace,
a lo que muere,
a las uñas
las alas
las hormigas,
los reflejos
el viento
la rompiente,
el olvido
los granos
la locura.

Muchas gracias gusano.
Gracias huevo.
Gracias fango,
sonido.
Gracias piedra.

Muchas gracias por todo.
Muchas gracias.

Oliverio Gironde,
agradecido.

ÍNDICE

1. Abreviaturas	8
2. Resumen	10
3. Abstract	12
4. Introducción	14
4.1 El spliceosoma y el proceso de splicing	14
4.1.1 El proceso de splicing en su naturaleza co-transcripcional	14
4.1.2 Los elementos de secuencia en el pre-ARNm	14
4.1.3 El ensamblado del spliceosoma	16
4.1.4 El spliceosoma presenta una composición proteica compleja y dinámica	20
4.1.5 Una composición proteica rica otorga flexibilidad al spliceosoma de metazoos	22
4.1.6 Las proteínas facilitan los rearrreglos estructurales en el spliceosoma	23
4.1.7 El reciclado	25
4.1.8 El splicing alternativo	27
4.1.9 Splicing y patologías humanas	28
4.1.10 Las modificaciones post-traduccionales contribuyen a la dinámica de splicing	30
4.2 Modificación post-traducciona por SUMO	32
4.2.1 Un poco de historia – La familia de proteínas del tipo ubiquitina	32
4.2.2 La familia SUMO	34
4.2.3 Mecanismo de conjugación	35

4.2.4	Secuencias blanco de SUMOilación	39
4.2.5	Proteasas específicas de SUMO	41
4.2.6	Consecuencias de la SUMOilación	42
4.2.7	SUMO y splicing	45
4.3	Aportes del grupo al estudio del campo del splicing y la SUMOilación	48
5.	Objetivos	49
6.	Materiales y métodos	50
6.1	Splicing <i>in vitro</i>	50
6.1.1	Purificación de complejos spliceosomales	50
6.1.2	Inmunoprecipitación anti-SUMO con anticuerpos inmovilizados	51
6.1.3	Espectrometría de masa	52
6.2	Líneas celulares	52
6.2.1	Transfecciones con ADN	53
6.2.2	Transfecciones con ARN	54
6.2.3	Purificación de proteínas conjugadas a His-SUMO o His-Ub	54
6.2.4	Co-Inmunoprecipitación	56
6.2.5	Inmunoprecipitación de complejos RNP (RIP)	56
6.2.6	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	56
6.3	Western blot y anticuerpos utilizados	57
6.4	Preparación de plásmidos	58
6.4.1	Transformación de bacterias	58
6.4.2	Preparación de plásmidos	58
6.4.3	Cuantificación de los plásmidos	59

6.5 Mutagénesis dirigida	59
6.6 ARN, Transcripción Reversa (RT) & PCR	60
6.6.1 Purificación de ARN	60
6.6.2 Transcripción reversa (RT)	61
6.6.3 PCR en tiempo real	62
6.7 Lista de primers utilizados	63
7. Resultados	64
7.1 La SUMOilacion afecta la eficiencia del proceso de splicing en células en cultivo	64
7.2 La SUMOilacion afecta la eficiencia de splicing de un pre-ARNm reportero <i>in vitro</i>	67
7.3 Proteínas spliceosomales son sustrato de SUMOilación	71
7.4 Las proteínas spliceosomales son SUMOiladas en células en cultivo	79
7.5 La proteína spliceosomal Prp3 se conjuga a SUMO en las lisinas 289 y 559	82
7.6 El mutante de SUMOilación de Prp3 presenta menor interacción con componentes spliceosomales	87
7.7 La falta de SUMOilación de Prp3 afecta la eficiencia de splicing en células en cultivo	88
8. Discusión	92
8.1. Resumen de los resultados obtenidos	92
8.2. SPLICING <i>IN VITRO</i> : Ventajas y desventajas	92
8.3. Proteínas SUMOiladas en el spliceosoma	93
8.4. Los sitios de SUMOilación	94
8.5. Las consecuencias de la SUMOilación	96
8.6. Ubiquitina y SUMO en el spliceosoma	97

8.7. El enigma de SUMO	98
8.8. SRSF1 como E3 ligasa de SUMO	99
8.9. Patobiología del proceso de splicing	100
9. Conclusiones	101
10. Bibliografía	102

1. ABREVIATURAS

ARNm: ARN mensajero

E1: Enzima activadora de Ub/Ubl

E2: Enzima conjugadora de Ub/Ubl

E3: Ligasa de Ub/Ubl

ESE: Exon Splicing Enhancer

ESS: Exon Splicing Silencer

FBS: Fetal Bovine Serum

ISE: Intron Splicing Enhancer

ISS: Intron Splicing Silencer

KDa: Kilo Daltons

mBBP: mammalian Branch point Binding Protein

NTC: Nineteen Complex

NDSM: Negatively charged aminoacid-Dependent SUMOylation Motif

Pc2: Polycomb group 2

PDSM: Phosphorylation-Dependent SUMOylation Motif

PIAS: Protein Inhibitor of Activated Stat

PML: Promyelocytic Leukemia

PPT: Polypyrimidine Tract

Pre-ARNm: precursor de ARN mensajero

Prp: pre-ARNm processing factor

RanBP2: Ran Binding Protein 2

RanGAP1: Ran GTPase Activating Protein 1

RES: mRNA retention and splicing

RING: Really Interesting Gene

RRM: RNA Recognition Motif

SAE: SUMO Activating Enzyme

SEN1: Sentrin/SUMO-specific protease

SF2/ASF: Splicing Factor 2/Alternative Splicing Factor

SF3A120: Splicing Factor 3, subunit A, 120 KDa

SIM: SUMO-interacting motif

siRNA: small interfering RNA

snRNA: small nuclear RNA

snRNP: small nuclear Ribonucleoprotein Particle
SRSF: SR protein Splicing Factor
SUMO: Small Ubiquitin-Related Modifier
Topors: Topo I-binding, RS domain-containing protein
U2AF: U2 Auxiliary Factor
Ub: Ubiquitina
Ubc: Ubiquitin conjugating enzyme
Ubc9~S~SUMO: Ubc9 y SUMO unidos por un enlace tioester
UBD: Ubiquitin binding domain
Ubl: Ubiquitin-like protein
USP: Ubiquitin Specific Protease

2. RESUMEN

Participación de la SUMOilación de proteínas componentes del spliceosoma en el proceso de splicing

La mayoría de los genes eucariotas transcritos por la ARN polimerasa II dan lugar a ARN mensajeros “inmaduros” o precursores (pre-ARNm) que contienen exones e intrones. El *splicing* es el proceso mediante el cual los intrones son escindidos de sus exones flanqueantes y los exones son posteriormente religados para dar lugar a ARN mensajeros maduros (ARNm). Este proceso es llevado a cabo por el spliceosoma, un mega complejo ribonucleoproteico compuesto por cinco partículas denominadas “snRNPs” (U1, U2, U4, U5 y U6) y factores proteicos asociados. Cada snRNP está formado por un ARN pequeño nuclear (snRNA), un set común de proteínas Sm o LSm y un número variable de proteínas específicas de cada partícula. El spliceosoma no existe formado como tal en el núcleo celular sino que se ensambla *de novo* a partir de sus componentes, de manera precisa y ordenada, sobre cada región del pre-ARNm que debe ser escindida reconociendo secuencias específicas que determinan los sitios de splicing. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que el factor de splicing SRSF1 es también un regulador de la vía de SUMOilación, ejerciendo una actividad de tipo E3 ligasa. Estos resultados nos condujeron a explorar una posible conexión entre las maquinarias de SUMO y splicing, hipotetizando que la conjugación a SUMO podría modular la dinámica del proceso de splicing al afectar las interacciones entre proteínas y entre éstas y el ARN.

En este trabajo, hemos hallado que el agregado de la proteasa de SUMO SENP1 disminuye la eficiencia de splicing *in vitro*. Por otra parte, el análisis por espectrometría de masa de proteínas inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-SUMO a partir de complejos spliceosomales purificados a distintos tiempos de la reacción de splicing nos permitió identificar diversas proteínas componentes del spliceosoma como sustratos de SUMOilación. Enfocándonos en una de ellas, la proteína componente del di-snRNP U4/U6 Prp3, detectamos su SUMOilación en células en cultivo y, mediante mutagénesis dirigida, hallamos que las lisinas 289 y 559 son sitios de conjugación de SUMO dentro de esta proteína. Observamos que la doble mutante Prp3 K289/559R, deficiente en SUMOilación, no interacciona con los snRNAs U2 y U5 ni con las proteínas spliceosomales SF3a1 (componente del snRNP U2) y Snu 114 (componente del U5 snRNP) a diferencia de la versión salvaje de Prp3, pero sí interacciona con proteínas y snRNAs componentes del di-snRNP. Estos

resultados sugieren que el ensamblado de esta partícula (U4/U6) es independientemente de la conjugación de SUMO a Prp3 pero que sin embargo, esta modificación post-traducciona es necesaria para la interacción de Prp3 con las partículas snRNPs de las que ella no forma parte (U2, U5). Además, la versión mutante de Prp3 no logra rescatar los niveles de eficiencia de splicing de pre-ARN mensajeros cuando es sobre-expresada en células en cultivo, en comparación a la versión salvaje (*wild type*), en un contexto de silenciamiento de la proteína endógena. Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina sugieren que esto responde a un menor reclutamiento de la versión mutante a regiones intrónicas en el ADN, comparada con la versión salvaje, durante el splicing co-transcripcional. Estos hallazgos proponen que la conjugación de SUMO juega un papel importante en el proceso de splicing y sugieren que la SUMOilación de Prp3 participa en la formación o reclutamiento del tri-snRNP durante el ensamblado del spliceosoma.

Palabras clave: SPLICEOSOMA – MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES - SUMO – SRSF1 – PRP3

3. ABSTRACT

Participation of spliceosomal protein SUMOylation in the splicing process

Most eukaryotic genes transcribed by RNA polymerase II give rise to immature messenger RNA or precursor mRNAs (pre-mRNAs) containing exons and introns. The splicing process is responsible for removing introns and joining exons generating mature mRNAs. This process is carried out by the spliceosome, a multi-mega-dalton ribonucleoprotein complex comprised by five particles termed “snRNPs” (U1, U2, U4, U5 and U6) and associated factors. Each snRNP is formed by a small nuclear RNA (snRNA), a common set of Sm or LSm proteins and a variable number of particle-specific proteins. The spliceosome does not exist as such in the cell nucleus but assembles *de novo* from its components, in a precise step-wise manner, on every region in the pre-mRNA that has to be removed by the recognition of splicing sites. Previous work from our laboratory demonstrated that the splicing factor SRSF1 is also a regulator of the SUMOylation pathway, displaying an E3 ligase-like activity. These results led us to explore a possible connexion between the SUMO and splicing machineries, hypothesizing that SUMO conjugation might modulate the dynamics of the splicing process by affecting the interactions between proteins and between these and the RNA.

In this work, we have found that addition of the SUMO protease SENP1 diminishes *in vitro* splicing efficiency. On the other hand, mass spectrometry analysis of anti-SUMO immunoprecipitated proteins from purified spliceosomal complexes at different steps of the splicing reaction allowed us to identify many spliceosomal proteins as SUMO substrates. Focusing on one of them, the protein component of the di-snRNP U4/U6 Prp3, we detected its SUMOylation in cultured cells and, by site directed mutagenesis, found that lysines 289 and 559 are SUMO conjugation sites within this protein. We further demonstrated that a Prp3 sumoylation-deficient mutant while still capable of interacting with U4/U6 snRNP components is unable to co-precipitate U2 and U5 snRNA and the spliceosomal proteins U2-SF3a120 and U5-Snu114, unlike the wild type version of this protein. These results suggest that U4/U6 snRNP assembly is independent of Prp3 SUMOylation. However, this PTM is

necessary for Prp3 interaction with those snRNPs to which it does not belong. Upon depletion of endogenous Prp3, this mutant fails to rescue the splicing efficiency of various pre-mRNAs when transfected into cultured cells. Prp3 SUMOylation deficient mutant also shows a diminished recruitment to active spliceosomes, compared to the wild type protein, assessed by chromatin immunoprecipitation analysis. These findings indicate that SUMO conjugation plays a role during the splicing process and suggest the involvement of Prp3 SUMOylation in U4/U6.U5 tri-snRNP formation and/ or recruitment.

Key words: SPLICEOSOME – POSTTRANSLATIONAL MODIFICATIONS – SUMO – SRSF1 – PRP3

4. INTRODUCCIÓN

4.1 El spliceosoma y el proceso de splicing

4.1.1 El proceso de splicing en su naturaleza co-transcripcional

La expresión génica es un proceso de múltiples pasos regulados a diversos niveles. En células eucariotas, la transcripción de genes que codifican para proteínas es llevada a cabo por la ARN polimerasa II dando lugar a precursores de ARN mensajero (pre-ARNm). Concomitantemente con la transcripción, los pre-ARNm nacientes son modificados por distintos eventos: A) conversión de su nucleótido 5' en una estructura de 7-metil-guanosina en forma de CAP o "capping"; B) splicing y; C) adición de la cola de poli(A) en su extremo 3' o "poliadenilación". Cada fase de la transcripción: iniciación, elongación y corte; se encuentra acoplada a un paso específico de procesamiento de los pre-ARNm. El capping se produce durante la iniciación, la poliadenilación se produce acoplada al corte, y el splicing durante la elongación. La mayoría de los genes eucariotas transcritos por la Pol II contienen intrones. El *splicing* es el proceso mediante el cual los intrones son escindidos de sus exones flanqueantes con la precisión de un nucleótido y los exones son posteriormente religados para dar lugar a ARNm maduros (de Almeida & Carmo-Fonseca 2014).

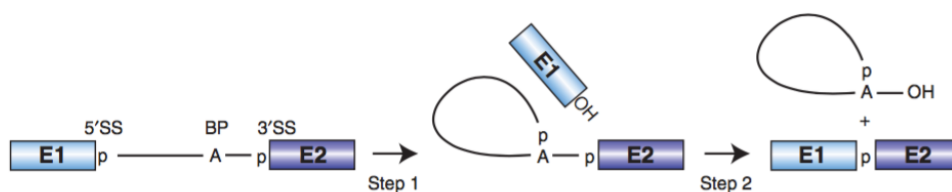
4.1.2 Los elementos de secuencia en el pre-ARNm

Dentro del pre-ARNm existe "información" que contribuye a la definición de exones e intrones para el proceso de splicing. Esta información está dada por elementos de secuencia, cortos y conservados: el sitio 5' de *splicing* (5'SS) o sitio "dador", el sitio 3' de *splicing* (3' SS) o sitio "aceptor", ambos situados en las fronteras entre exones e intrones; y el sitio de ramificación (BS, *branch site*), el cual se encuentra típicamente localizado entre 18-40 nucleótidos río arriba del sitio 3'SS y, en eucariotas superiores, está seguido de un tracto de poli-pirimidinas (PPT). Adicionalmente, existen elementos ubicados en exones e intrones denominados *splicing enhancers* o *splicing silencers* que modulan el proceso de *splicing*.

mediante el reclutamiento de proteínas de unión al ARN (principalmente de las familias de proteínas SR y hnRNP) las cuales estimulan o reprimen el ensamblado del spliceosoma en sitios de *splicing* adyacentes a dichos elementos (Will & Lührmann 2011; Wang & Burge 2008; Smith & Valcárcel 2000).

Los intrones son removidos mediante dos reacciones de trans-esterificación (Moore & Sharp 1993). Primero, el grupo 2'OH de la adenosina del sitio de ramificación lleva a cabo un ataque nucleofílico del 5'SS. Esto resulta en un clivaje en este sitio y la ligación del extremo 5' del intrón a la adenosina, formando una estructura en forma de lazo ("lariat"). Segundo, el 3'SS es atacado por el grupo 3'OH del exón 5', conduciendo a la unión de los exones 5' y 3', formando el ARNm y liberando el intrón (Fig. I1). Los intermediarios y productos del pre-ARNm son similares a aquellos generados durante de la remoción de intrones autocatalíticos de tipo II (Jacquier 1990). Esta similitud condujo a la hipótesis de que la catálisis del pre-ARNm también está basada en una naturaleza química de ARN, es decir, que su *core* catalítico involucra ribozimas y no enzimas de naturaleza proteica. Del mismo modo que para los intrones de tipo II, se ha demostrado que en las condiciones adecuadas, los pasos químicos de *splicing* nuclear son reversibles (Tseng & Cheng 2008), lo cual enfatiza las similitudes mecanísticas entre ambos sistemas. Estos enfoques subestiman la naturaleza dinámica del spliceosoma durante la fase catalítica del *splicing* dada, en parte, por su composición proteica extremadamente compleja y dinámica a lo largo de su ciclo de ensamblado.

A



B

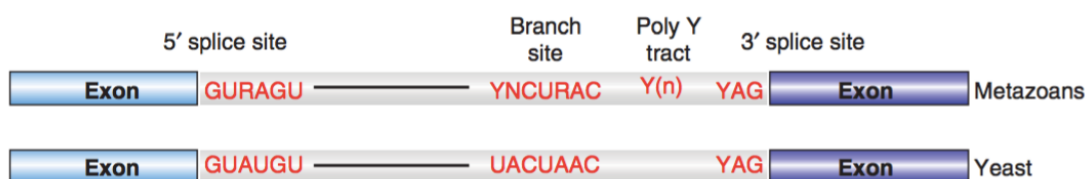


Figura I1: Elementos en el pre-ARNm: (A) Representación esquemática de los dos pasos involucrados en el proceso de splicing. Los rectángulos representan a los exones (E1, E2) mientras que las líneas a los intrones. El sitio de ramificación se indica con la letra A (Adenosina) y los grupos fosfatos con la letra p en los sitios 5' y 3' de splicing. (B) Secuencias conservadas de los sitios 5' y 3' de splicing y el sitio de ramificación en metazoos y levaduras (*S. Cerevisiae*). Y=pirimidina; R=purina. El tracto de polipirimidinas se indica con (Yn). Tomado de (Will & Lührmann 2011).

4.1.3 El ensamblado del spliceosoma

Con el fin de compensar la limitada información contenida en el sustrato de splicing, un gran número de factores actúan en *trans* e interaccionan con el pre-ARNm formando una compleja maquinaria molecular denominada “spliceosoma”, en la cual los grupos reactivos del pre-ARNm son posicionados espacialmente para la catálisis. Han sido descritos dos tipos de spliceosomas, el mayor y el menor, cada uno de los cuales está conformado por diferentes tipos de partículas ribonucleoproteicas pequeñas o snRNPs. En el caso del spliceosoma mayor, del cual trataremos aquí, cada snRNP está formado por un RNA pequeño nuclear (snRNA) (o dos en el caso de U4/U6), un set común de siete proteínas Sm (B/B', D3, D2, D1, E, F, y G) (*Sm-like* en el caso de U6) y un número variable de proteínas específicas de cada partícula (Will & Lührmann 2006; Matera & Wang 2014) (Fig. I2). La estructura secundaria más probable de los snRNAs spliceosomales se muestran en la figura I2, pero debe tenerse en cuenta que gran parte de los snRNAs sufren rearrreglos estructurales durante el proceso de splicing. Contrariamente a lo que ocurre con el ribosoma, ninguno de los snRNPs presenta un sitio activo pre-formado y varios de ellos se remodelan sustancialmente en el curso de la reacción de splicing.

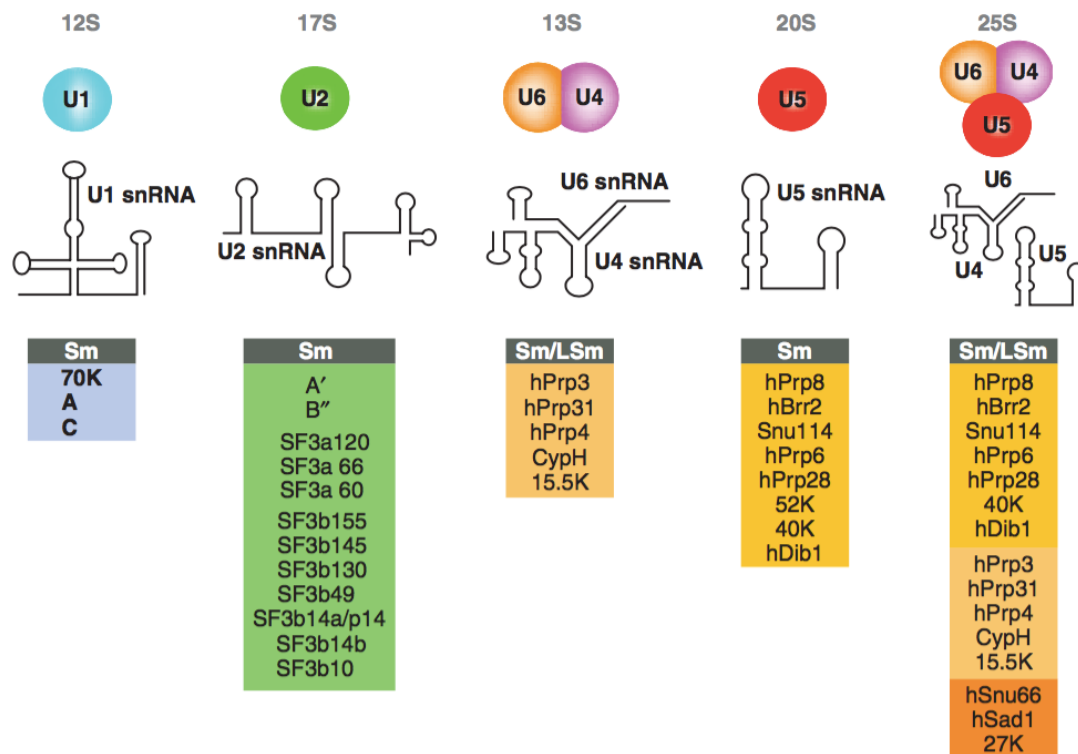


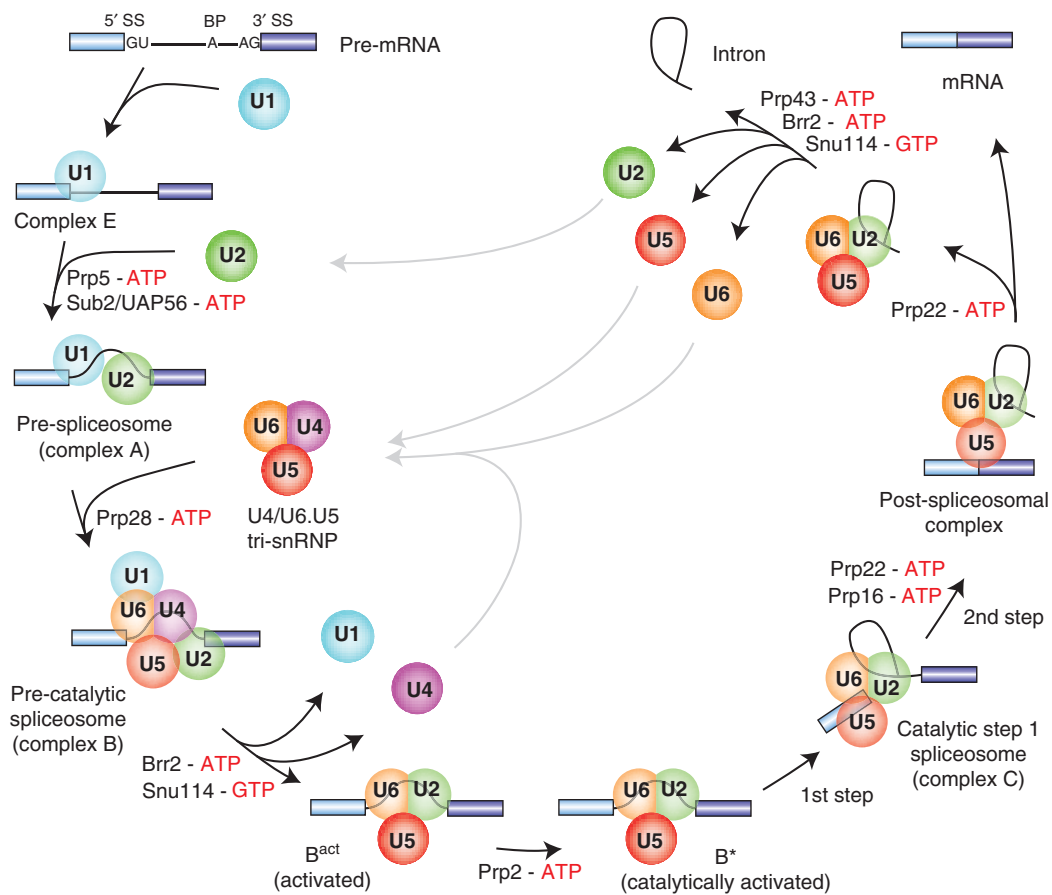
Figura I2: Composición proteica y estructura secundaria de los snRNAs de los snRNPs que conforman el spliceosoma mayor en humanos. Las siete proteínas Sm (B/B', D3, D2, D1, E, F, and G) así como las LSm se encuentran indicadas como Sm/LSm. El tri-snRNP U4/U6.U5 contiene dos sets de proteínas Sm y uno de LSm.

El ensamblado del spliceosoma ocurre por el reclutamiento ordenado de los snRNPs y numerosos factores auxiliares de splicing al pre-ARNm (Brow 2002; Matlin & Moore 2007; Staley & Woolford 2009). En el caso en que un intrón no exceda los 200-250 nucleótidos, el spliceosoma inicialmente se ensambla sobre ese intrón (Fox-Walsh *et al.* 2005) (Fig. I3A). Como primer evento, el snRNP U1 se recluta al sitio 5' de splicing y factores no snRNPs tales como SF1/mBBP y U2AF interactúan con el sitio de ramificación y el PPT, respectivamente; obteniéndose lo que se conoce como complejo E. En un paso subsiguiente, el snRNP U2 se asocia establemente con el sitio de ramificación, formando el complejo A, también conocido como pre-spliceosoma. Luego el tri-snRNP U4/U6.U5, el cual se encuentra pre-ensamblado a partir de los snRNPs U5 y U4/U6, es reclutado generando el complejo pre-catalítico B. Rearreglos importantes en las interacciones ARN-ARN y ARN-proteínas conducen a la desestabilización de los snRNPs U1 y U4 dando lugar al spliceosoma activado (complejo B^{act}). La activación catalítica de la helicasa de ARN Prp2 da lugar al complejo B*, el cual cataliza la

primera de las dos reacciones de transesterificación. Esto conduce al complejo C, que cataliza la segunda reacción. El spliceosoma luego se disocia y, tras ser remodelados, los snRNPs participan de nuevos ciclos de splicing. Alternativamente a este modo de ensamblado canónico, existen otras vías que también conducen al ensamblado de spliceosomas catalíticamente activos. Por ejemplo, un complejo conteniendo los cinco snRNPs, pero careciendo del pre-ARNm, ha sido aislado (Stevens & Abelson 2002). En presencia del pre-ARNm y factores de splicing adicionales, ese penta-snRNP puede volverse un spliceosoma activo sin necesidad de desensamblarse y volverse a ensamblar. En este sentido, la generación de splicesomas activos no requiere necesariamente de múltiples pasos previos a su activación. Otras alternativas también se dan en los pasos tempranos del ensamblado, al menos en metazoos. La mayoría de los pre-ARNm de mamíferos contienen múltiples intrones cuyas longitudes varían de varios cientos a varios miles de nucleótidos (Deutsch & Long 1999), mientras que sus exones tienen más bien una longitud fija de unos 120 nucleótidos en promedio (Sorek *et al.* 2004). Cuando el largo del intrón excede los 200-250 nt (el cual es el caso de numerosos intrones en eucariotas superiores), los complejos spliceosomales se forman primero sobre los extremos de los exones (Fox-Walsh *et al.* 2005), proceso que se conoce como “definición exónica” (Berget 1995) (Fig. 13B). Análisis recientes de la co-evolución de los sitios 5' y 3' de splicing apoyan la idea de que la definición exónica es predominante en mamíferos, y no tanto en otros metazoos (Xiao *et al.* 2007). Durante la definición exónica, el snRNP U1 se une al sitio 5' río abajo de un exón y promueve la asociación de U2AF al PPT/sitio 3' que se encuentra río arriba (Fig. 13B). Esto ocasiona el reclutamiento del snRNP U2 al sitio de ramificación río arriba del exón. Secuencias *enhancers* de splicing dentro del exón (ESEs) reclutan proteínas de la familia SR, lo cual establece una red de interacciones proteína-proteína a lo largo del exón que estabiliza el complejo de splicing (Hoffman & Grabowski 1992; Reed 2000). Mientras que los pasos químicos de la reacción ocurren sobre el intrón, en la definición exónica el sitio 3' debe ser pareado con el sitio 5' del intrón adyacente. El cambio de definición de exónica a intrónica es aún poco comprendido. Se cree que las interacciones a lo largo del exón se pierden y luego el complejo A se forma sobre el intrón, mediante interacciones entre el snRNP U2 y el snRNP U1 montado sobre el sitio 5' (Reed 2000; Smith & Valcárcel 2000). Este paso es decisivo para determinar qué exones quedarán unidos, y puede implicar que alguno de ellos sea removido y no se encuentre presente en el ARN maduro, fenómeno conocido como splicing alternativo, (House & Lynch 2006; Bonnal *et al.* 2008; Sharma *et al.* 2008), acerca del cual se ahondará más adelante. Recientemente se demostró que los complejos definidos sobre

exones contienen no sólo U1 y U2 sino también el tri-snRNP y que pueden convertirse directamente en un complejo B montado sobre un intrón (Schneider, Will, *et al.* 2010). Estos datos sugieren que pueden existir múltiples formas de transición de un tipo de definición a otra, y que si bien la selección de sitios generalmente ocurre durante la formación del complejo A (Lim & Hertel 2004), en algunas instancias podría darse más tardíamente en el ensamblado.

A



B

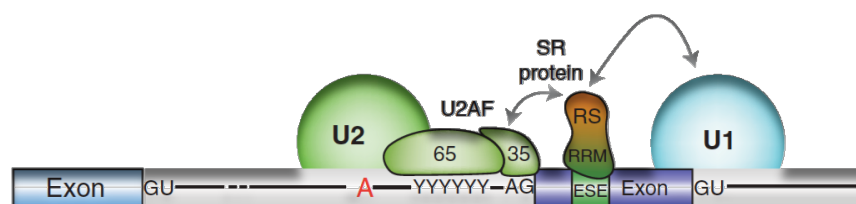


Figura I3: (A) Ciclo de ensamblado y desensamblado canónico del spliceosoma mayor sobre intrones: Se muestran las interacciones entre snRNPs. Los complejos spliceosomales se nombran de acuerdo a la nomenclatura en metazoos. Las secuencias exónicas e intrónicas se muestran con rectángulos y líneas, respectivamente. Los momentos en que actúan las helicasas/ATPasas DExH/D-box Prp5, Sub2/UAP56, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 y Prp43, así como la GTPasa Snu114, todas ellas conservadas evolutivamente, se encuentran señalados. **(B) Modelo de las Interacciones que ocurren durante la definición exónica.**

4.1.4 El spliceosoma presenta una composición proteica compleja y dinámica

Como se mencionó anteriormente, los intrones de los pre-ARNm nucleares no se remueven autocatalíticamente sino que requieren del spliceosoma. En éste, las proteínas juegan roles críticos en el reconocimiento y la ubicación de los sitios de splicing, facilitan la dinámica de las interacciones ARN-ARN, ARN-proteína y proteína-proteína y aseguran que los sitios reactivos del pre-ARNm se posicionen adecuadamente para la catálisis. El análisis proteómico de spliceosomas humanos purificados indica que más de 170 proteínas se asocian en algún punto durante el proceso de splicing, con intermediarios de ensamblado (complejos B y C) conteniendo un número de proteínas significativamente menor (110) (Jurica & Moore 2003; Wahl *et al.* 2009). En este sentido, el spliceosoma es una ribonucleopartícula (RNP) rica en proteínas, siendo éstas últimas más de dos tercios de su masa total en humanos en el caso de spliceosomas ensamblados sobre intrones cortos. Las interacciones entre proteínas y entre proteínas y ARN son prevalentes y juegan un rol funcional muy importante. Como consecuencia de su complejidad, el ensamblado del spliceosoma representa un desafío cinético afrontado, en parte, por el pre-empaquetado de diversas proteínas en los snRNPs o por el establecimiento de complejos heteroméricos estables. En realidad, 45 proteínas son reclutadas al spliceosoma humano como parte de los snRNPs mientras que proteínas no contenidas dentro de los snRNPs constituyen el resto. La composición del spliceosoma es altamente dinámica con un intercambio notable de proteínas de un estadio a otro. Estos cambios son acompañados por un remodelado considerable de los snRNPs en el contexto del spliceosoma. Por su parte, análisis proteómicos del spliceosoma de *S. Cerevisiae* revelaron que los complejos B, B^{act} y C contienen un menor número de proteínas que los mismos complejos en metazoos. Por ejemplo, el complejo B de levaduras contiene sólo 60 proteínas en comparación con 110 en humanos y moscas, incluyendo esencialmente todas

las proteínas del U1, U2 y tri-snRNP, así como también las proteínas de los complejos NTC (del inglés *Nineteen complex*) y RES (del inglés *mRNA retention and splicing*). Del mismo modo, el complejo C de levaduras contiene sólo 50 proteínas en comparación con las 110 en metazoos. De las 90 proteínas identificadas en levaduras, casi todas tienen homólogos en eucariotas superiores (Fabrizio *et al.* 2009). Así, el spliceosoma de levaduras contiene probablemente el set *core* de proteínas conservado evolutivamente requerido para el splicing constitutivo. La mayoría de las restantes 80 proteínas de humanos y moscas, sin homólogos en levaduras, se encuentran involucradas en splicing alternativo, proceso esencialmente ausente en levaduras (Fabrizio *et al.* 2009) del cual nos ocuparemos más adelante. Las proteínas involucradas en la transición del complejo B al C son homólogas en metazoos y levaduras (Deckert *et al.* 2006; Bessonov *et al.* 2008; Fabrizio *et al.* 2009; Herold *et al.* 2009), indicando que los cambios de composición constituyen un principio evolutivamente conservado del ensamblado del spliceosoma. En levaduras, el intercambio proteico más significativo se produce durante la transición del complejo pre-catalítico B al complejo activado B^{act} (Fabrizio *et al.* 2009). Durante esta transición, 35 proteínas se disocian, incluyendo entre otras todas las del snRNP U1 y del di-snRNP U4/U6, mientras que otras 12 son reclutadas. Así, el tri-snRNP U4/U6.U5 sufre una gran remodelación durante la activación, con disociación de todas las proteínas del U4/U6, algunas del U5 y el snRNA U4. No está claro si estas proteínas se disocian conjunta o separadamente. En realidad, no se conoce cuántos eventos discretos de remodelación ocurren durante el splicing. Numerosos spliceosomas estructuralmente distintos existen, probablemente, con cada rearrreglo potencialmente sujeto a regulación. Si bien en levaduras el snRNA U6 parece haber perdido la mayoría de sus *partners* de preactivación, no sólo se encuentra involucrado en apareamientos de bases con el snRNA U2 sino también con proteínas (Wahl *et al.* 2009), entre ellas proteínas del complejo NTC (Prp19/CDC5 en humanos) y proteínas relacionadas, así como también miembros de la familia de proteínas SR (Chan *et al.* 2003). En humanos, existe evidencia de que el snRNP U5 también se remodela durante la activación, 15 proteínas, incluidas las del complejo NTC, se asocian establemente con el U5 dando lugar a la forma 35S del snRNP U5 (Makarov *et al.* 2002).

La transición del complejo B^{act} al C también está acompañada por cambios de composición, pero en menor grado. En levaduras, sólo dos proteínas se disocian y nueve se incorporan. Debido al bajo número de proteínas reclutadas en este momento, ha sido posible investigar el rol de algunos de los factores durante los pasos catalíticos en base a la purificación de complejos de composición definida y agregado de factores recombinantes (Warkocki *et al.*

2009), obteniéndose información valiosa acerca del rol de las helicasas de ARN en los eventos de remodelado de las RNPs que acompañan los pasos catalíticos del splicing. De modo interesante, el snRNP U2 también parece ser remodelado sustancialmente justo antes o durante la formación del complejo C tanto en levaduras como en humanos, con una aparente desestabilización/pérdida de las proteínas SF3a y Sf3b (Bessonov et al. 2008; Fabrizio et al. 2009). Esto sugiere que, si bien son requeridas para la interacción del U2 y el sitio de ramificación durante los estadios tempranos del splicing, las proteínas SF3a/b no serían requeridas posteriormente. Esto es también consistente con la disrupción propuesta entre el U2 y el sitio de ramificación luego del primer paso del ensamblado (Smith et al. 2007). Han sido purificados complejos spliceosomales C humanos capaces de catalizar la ligación de exones (Bessonov et al. 2008). El tratamiento con alta sal de estos complejos dio lugar a un *core* o núcleo de 35 proteínas, en el cual las interacciones ARN-ARN se mantenían intactas. Los componentes principales de esta RNP son las proteínas del complejo Prp19/CDC5 y proteínas relacionadas, además de las proteínas del snRNP U5 tales como Prp8, las cuales jugarían un rol sustancial en la estructura catalíticamente activa.

4.1.5 Una composición proteica rica otorga flexibilidad al spliceosoma de metazoos

Un gran número de las proteínas asociadas al spliceosoma juegan roles regulatorios y en algunos casos relacionados con el acoplamiento del splicing a otros procesos nucleares tales como la transcripción y poliadenilación. Además, varias proteínas se encuentran débilmente asociadas al spliceosoma o tienen funciones redundantes (por ejemplo, las proteínas SR) y, por lo tanto, no son probablemente requeridas para el splicing de todos los pre-ARNm (Wahl et al. 2009). De hecho, observaciones recientes sugieren que los sustratos de pre-ARNm difieren incluso en los requerimientos para componentes *core* del spliceosoma, posiblemente por diferencias de afinidad entre dichos componentes y los pre-ARNm o la naturaleza redundante de las señales de splicing (Clark et al. 2002; Park et al. 2004; Pleiss et al. 2007). Así, la complejidad composicional del spliceosoma de metazoos es quizá un reflejo de la gran variedad de pre-ARNm que existe y la ocurrencia de eventos de splicing altamente regulados. El extenso repertorio de proteínas asociadas al spliceosoma también otorga flexibilidad a la maquinaria de splicing para responder a cambio rápidos en el entorno celular.

4.1.6 Las proteínas facilitan los rearrreglos estructurales en el spliceosoma

Los rearrreglos secuenciales en las interacciones ARN-ARN y ARN-proteínas son orquestados en la mayoría de los casos por miembros de la familia de helicasas de ARN DExD/H-box, la cual incluye a Prp5, Sub2/UAP56, Prp28, U5-200K/Brr2, Prp2, Prp16, Prp22, y Prp43 (Staley & Guthrie 1998). La energía de la hidrólisis de ATP realizada por estas enzimas se encuentra acoplada a rearrreglos estructurales/composicionales en varios pasos de la reacción de splicing (Fig. 13A). Aunque los blancos precisos de muchas de estas proteínas aún no se conocen, en ciertos casos los mecanismos de acción y regulación empiezan a emerger. La actividad de estas enzimas debe ser altamente coordinada, tarea llevada a cabo en parte por otras proteínas spliceosomales y en algunos casos por modificaciones post-traduccionales. Varias proteínas de la familia DExD/H-box también juegan un rol central en asegurar la fidelidad del proceso de splicing al facilitar el descarte de intermediarios y productos aberrantes y/o no productivos (McGlinchy & Smith 2008).

Las proteínas Prp5 y Sub2/UAP65 son requeridas para la formación del pre-spliceosoma. Se cree que UAP65/Sub2p facilita el reclutamiento del snRNP U2 al desplazar a Mud2p (el homólogo en levaduras de U2AF) y/o BBP del sitio de ramificación (Kistler & Guthrie 2001). Así, algunas proteínas de la familia DExD/H-box catalizarían directamente rearrreglos ARN-proteínas en lugar de abrir regiones doble cadena de ARN, como se pensó inicialmente. Estudios en células humanas sugieren que Sub2/UAP56 también actúa en un estadio más tardío, contactando los snRNAs U4 y U6 y potencialmente contribuyendo a su desenrollado (Shen et al. 2008). Prp5p usaría la hidrólisis de ATP para remodelar el snRNP U2, facilitando la unión del snRNA U2 al sitio de ramificación. Estudios más recientes indican que Prp5 también juega un rol en el control de calidad y estabilidad del dúplex U2/BS (Xu & Query 2007).

La helicasa DEAD-box Prp28 cataliza el intercambio de U1 por U6 en el sitio 5'SS durante la transición del complejo B a B^{act} (Staley & Guthrie 1999). Prp28 desarma activamente la interacción ARN-proteína que estabiliza el apareamiento de bases entre el U1-C y el 5'SS (Chen et al. 2001). En células humanas, la fosforilación de Prp28 es requerida para su

asociación con el tri-snRNP y para la subsiguiente integración estable del tri-snRNP durante la formación del complejo B (Mathew et al. 2008).

La proteína DExD/H-box Brr2 cataliza un paso crucial en la activación del spliceosoma, el desenrollado de los snRNAs U4 y U6. La mayoría de las helicasas se unen al spliceosoma de modo transitorio en el momento en que son requeridas. En contraste, Brr2 es un componente integral cuya actividad debe ser estrictamente regulada para prevenir el desenrollado prematuro de U4 y U6. Evidencias recientes indican que al menos dos proteínas, Prp8 y la GTPasa Snu114, regulan la actividad de Brr2 durante la activación del spliceosoma. Se ha reportado que el extremo carboxi-terminal de Prp8 interacciona con Brr2 y estimula su actividad helicasa (Maeder et al. 2009). Como esta región de Prp8 se conjuga a ubiquitina (Bellare et al. 2006) y Prp8 es ubiquitinado en el tri-snRNP, ha sido sugerido que esta modificación post-traducciona juega un rol central en la regulación de Brr2 (Bellare et al. 2008) (Ver sección 4.1.10). El desenrollado del U4/U6 durante la activación también requiere la GTPasa asociada al U5, Snu114 (Bartels et al. 2002; Brenner & Guthrie 2005), la cual es homóloga al factor de elongación ribosomal EF-2 que cataliza rearrreglos estructurales en el ribosoma durante la translocación. Estudios recientes indican que la actividad de Brr2 es bloqueada por Snu114 cuando se une a GDP, pero no a GTP (Small et al. 2006). Snu114 interacciona con la misma región en Prp8 que Brr2, sugiriendo que esta región carboxi-terminal coordina la regulación de Brr2 por Snu114. Otras proteínas que participan en los rearrreglos que acompañan a la activación catalítica del spliceosoma son los miembros del complejo Prp19/CDC5, el cual actúa subsiguientemente a la disociación del U4, aparentemente estabilizando la asociación del U5 y el U6 con el spliceosoma activado (Chan et al. 2003). Datos más recientes indican que este complejo juega un rol central en especificar la interacción correcta entre el U5 y el U6 con el sustrato de pre-ARNm antes del paso 1 (Chen et al. 2006).

La proteína DExH/D-box Prp2 es requerida antes del paso 1 de splicing (Fig I1) y promueve un evento de remodelado, pobremente entendido hasta el momento, que convierte al complejo B^{act} en el complejo catalíticamente activo B*. Estudios con spliceosomas de levaduras purificados conteniendo Prp2 inactivado por calor revelaron un rearrreglo conformacional mayor, analizado por sedimentación en gradiente y microscopía electrónica, al complementar con Prp2 en presencia de ATP (Warkocki et al. 2009). Este cambio conformacional conduce a una desestabilización de las proteínas SF3a y SF3b posiblemente exponiendo el sitio de ramificación antes del primer paso (Warkocki et al. 2009).

La ATPasa DExD/H-box Prp16 promueve un rearrreglo conformacional requerido para el paso 2 (Figura 11) y también regula la fidelidad del reconocimiento del sitio de ramificación, promoviendo el descarte de intermediarios intrónicos aberrantes (Burgess & Guthrie 1993a). Estos estudios condujeron a plantear un modelo de *proof reading* (basado en otro modelo planteado inicialmente para traducción) en el cual la tasa de hidrólisis de ATP por Prp16 (o en general por otra ATPasa) actuaría como un temporizador para regular el resultado de dos eventos competitivos, en este caso el descarte de un intermediario aberrante o su participación en el siguiente paso de splicing (Burgess & Guthrie 1993b). Prp18, Slu7 y Prp22, las cuales actúan luego de Prp16, también promueven el segundo paso, aparentemente al asistir el alineamiento de los grupos reactivos responsables (Umen & Guthrie 1995). Por ejemplo, estudios recientes sugieren que la interacción del loop 1 del U5 con ambos exones es estabilizada por Prp18 (Crotti et al. 2007).

La proteína DExD/H-box Prp22 no sólo funciona subsecuentemente a Prp16 durante el paso 2, sino que también es requerida para la liberación del producto de ARNm maduro del spliceosoma. Prp22 se deposita sobre el ARNm río abajo de la unión exon-exon, concomitantemente con un rearrreglo de la RNP durante el paso 2 (Schwer 2008). Luego se cree que desplazaría al U5 del ARNm al disrumpir la interacción de Prp8 y el snRNA U5 con nucleótidos exónicos, conduciendo a la liberación del ARNm (Aronova et al. 2007; Schwer 2008). Prp22 también está involucrada en la fidelidad de la ligación de exones al reprimir el splicing aberrante (Mayas et al. 2006).

4.1.7 El reciclado

Los componentes spliceosomales deben funcionar en múltiples ciclos de splicing, por lo que el secuestro de factores en complejos post-catalíticos o defectivos sería detrimental. La liberación del intrón escindido del complejo post-splicing, la cual es acompañada por la liberación de U2, U5 y U6, es catalizada por Prp43. En levaduras, Ntr1 y Ntr2 (las cuales forman un complejo estable) también son requeridas para el desensamblado del spliceosoma y reclutamiento de Prp43 (Tsai et al. 2005; Tsai et al. 2007). Ntr1 actúa como un factor accesorio que con la unión de Prp43 estimula su actividad helicasa (Tanaka et al. 2007). Ambas proteínas también han sido implicadas en el *turnover* de spliceosomas defectivos (Pandit et al. 2006). Brr2 y Snu114 también son requeridas para esto,

posiblemente facilitando el desenrollado de los duplexes de U4 y U6 en los complejos post-splicing (Small et al. 2006).

Para participar en nuevos ciclos de splicing, el tri-snRNP debe ser reensamblado por dimerización de los snRNPs U4 y U6, seguido de asociación del snRNP U5 (Staněk & Neugebauer 2006). Lo primero ocurre en parte mediado por el apareamiento de bases entre los respectivos snRNAs, los cuales forman dos hélices intermoleculares (*stem* I y II) separadas por el 5'-*stem-loop* del U4 (Figura I2). El apareamiento es mutuamente excluyente con la conformación del snRNA U6 en el spliceosoma activado, por lo que requiere de la chaperona Prp24 en levaduras (Raghunathan & Guthrie 1998) o su homólogo SART3 en humanos (Bell et al. 2002), la cual se une transitoriamente al snRNA U6 así como también a las proteínas LSm (Achsel et al. 1999; Rader & Guthrie 2002; Verdone et al. 2004) unidas en el extremo 3' del U6 (Beggs 2005; Zhou et al. 2014). Además, la proteína específica del snRNP U4 Prp3 es requerida para la formación del di y el tri-snRNP, pero los mecanismos moleculares son aún poco conocidos.

Prp3 forma un complejo con Prp4 (Ayadi et al. 1998; Gonzalez-Santos et al. 2002) y, experimentalmente, puede ser unida en forma covalente con el snRNA U6 del dúplex U4/U6 y precipitar dicho dúplex a partir de un extracto nuclear (Nottrott et al. 2002; Gonzalez-Santos et al. 2002), lo cual apunta a interacciones directas entre Prp3 y el mencionado snRNA. hPrp3 también interacciona con las proteínas del U5, hPrp6 y hSnu66 (Liu et al. 2006).

Exceptuando su extremo N-terminal, Prp3 se encuentra altamente conservada desde levaduras hasta humanos y contiene un dominio C-terminal de función desconocida (DUF1115; PFAM ID PF06544), acerca de lo cual se ampliará en la sección de Resultados. Estudios recientes de modelado por homología predicen un plegamiento del tipo de la ferredoxina (Korneta et al. 2012). Ha sido postulado que la región C-terminal une el di-snRNA U4/U6. Mediante mutaciones puntuales que afectan esa interacción, se observó menos viabilidad celular y menos eficiencia de splicing en levaduras. En este sentido, Prp3 funciona como un puente entre U4/U6 y U5 en el contexto del tri-snRNP, a partir de sus interacciones con el snRNA y con proteínas, y podría estar involucrado en el pasaje del factor de reciclado Prp24 desde el snRNA U6 al snRNP U4 durante el re-ensamblado del tri-snRNP (Liu et al. 2015).

4.1.8 El splicing alternativo

La presencia de sitios de splicing que se alejan del consenso y por ende se presentan como sitios “débiles” frente al spliceosoma, sumado a la disponibilidad de una gran variedad de factores auxiliares y a estructuras secundarias adoptadas por el pre-ARNm que pueden favorecer o impedir el reconocimiento de un dado sitio de splicing, da lugar a variaciones en el proceso de splicing. Este fenómeno se conoce como **splicing alternativo**, ocurre en más del 95% de los genes humanos que codifican para proteínas y posibilita la formación de distintas isoformas de ARNm a partir de un mismo pre-ARNm. Se conocen distintos tipos de splicing alternativo: “exones cassette” que pueden incluirse o excluirse totalmente; “exones mutuamente excluyentes” que son dos o más exones que nunca son incluidos simultáneamente; “sitios 5’Ss alternativos” o “sitios 3’Ss alternativos” que resultan en la exclusión o inclusión total o parcial de un dado exón y por último la retención de regiones intrónicas dentro del ARNm. En su conjunto, todas estas variantes del proceso de splicing son capaces de generar diferentes isoformas proteicas que pueden ejercer funciones distintas e incluso opuestas a partir de un mismo gen (Figura I4) (Smith & Valcárcel 2000; Matlin et al. 2005; Chen & Manley 2009).

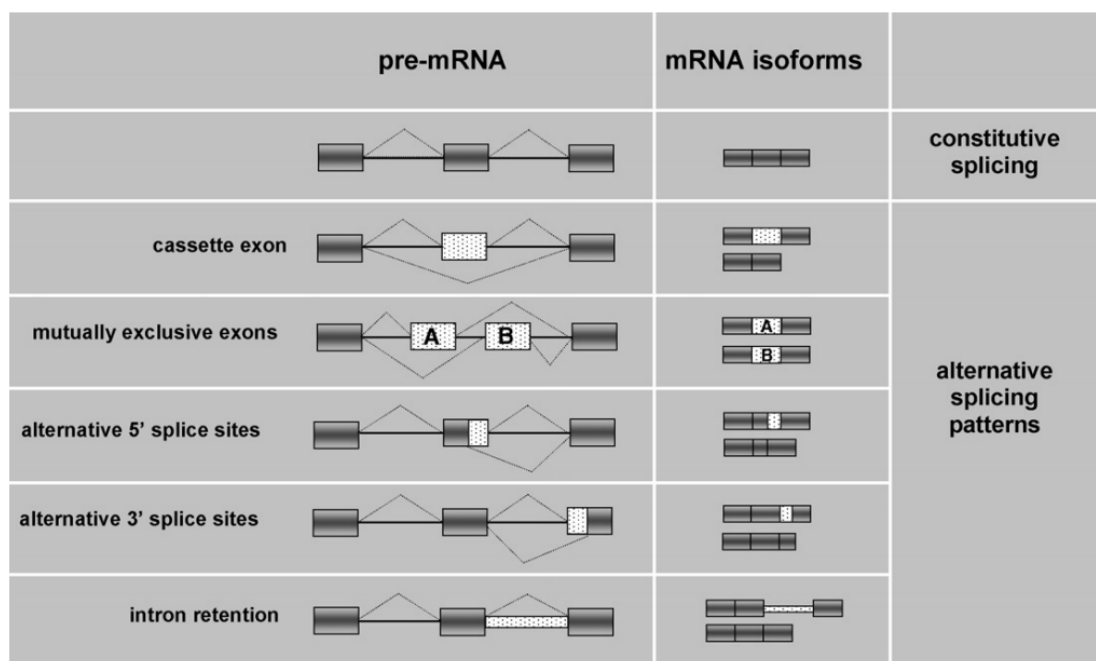


Figura I4: Eventos de splicing alternativo. Tomado de (Blaustein et al. 2007)

4.1.9 Splicing y patologías humanas

El tipo de mutación más común que altera el splicing es aquel que se localiza en *cis* dentro del pre-ARNm en alguna de las secuencias consenso de splicing (5'SS, 3'SS y BS) y en aquellas secuencias regulatorias exónicas o intrónicas (ESE, ESS, ISE, ISS) a las que se unen factores auxiliares, modulando el reclutamiento del spliceosoma. Este tipo de mutaciones ha sido documentado en diversas patologías y, en algunos casos, se han identificado compuestos terapéuticos cuyo blanco de acción es un factor de splicing o un componente spliceosomal (Tazi et al. 2009; Wang & Cooper 2007). Sin embargo, también existen casos en los cuales las mutaciones se producen en los propios componentes del spliceosoma, como ocurre en la distintas formas de retinitis pigmentosa (RP) o incluso en algunos tipos de cáncer (Scotti & Swanson 2016).

En el caso de la RP, múltiples mutaciones autosómicas dominantes causan la afección. Dentro de los genes mutados descritos hasta el momento, seis de ellos codifican para componentes del tri-snRNP o factores asociados (Prp3, Prp4, Prp6, Prp8, Prp31 y Brr2). La retina humana expresa los niveles más altos de algunos genes *housekeeping* y snRNAs y presenta una alta actividad de splicing. De aquí que mutaciones en los factores mencionados que afectan el splicing de modo global se manifiesten en la retina. Estudios realizados en linfoblastos de pacientes con mutaciones en los genes PRPF3, PRPF8 y PRPF31 evidencian que estas células presentan defectos en el splicing constitutivo y alternativo junto a cambios en la estequiometría de snRNAs y composición del tri-snRNP. La expresión diferencial y/o la penetrancia incompleta también ha sido reportada para mutaciones asociadas a RP. En el caso de PRP31, la penetrancia incompleta en algunas familias con RP autosómica dominante resulta de la expresión aumentada del alelo salvaje en portadores asintomáticos debido a una expresión reducida del represor CNOT3 (CCR4-NOT transcription complex, subunidad 3). Estos resultados sostienen un modelo de haploinsuficiencia para la RP autosómica dominante asociada al spliceosoma y resalta la importancia de la funcionalidad óptima del tri-snRNP en la retina.

Sin embargo, modelos de patogenicidad por ganancia de función también han sido propuestos. Por ejemplo, algunas mutaciones de Prp3 conducen a la formación de grandes agregados proteicos y apoptosis en fotorreceptores, pero no en líneas celulares epiteliales o fibroblastos, sugiriendo que estos agregados podrían interferir directamente con el normal funcionamiento de aquel tipo celular. Las mutaciones con pérdida de función también

ocurren en la RP, como es el caso de aquellas situadas en el extremo C-terminal de Prp8 y que causan una forma temprana y severa de RP. El análisis estructural de esta región evidencia que se inserta en el túnel de unión a ARN de la helicasa Brr2. Este evento bloquea la actividad helicasa con lo que en un escenario mutante, la actividad helicasa prematura de Brr2 conduciría a una des-regulación del desenrollado de U4/U6. Diferentes mutaciones en un solo gen también pueden resultar en haploinsuficiencia y efectos dominante-negativos. Las variantes heterocigotas de nucleótido único y variantes de delección en las regiones codificante y promotora de PRP4, respectivamente, han sido reportadas. El gen PRP4 codifica para una proteína de 60 kDa importante para la estabilidad del di-snRNP U4/U6. Mientras que la delección en el promotor causa una expresión reducida en fibroblastos de pacientes, la mutación en la región codificante resulta en su sobre-expresión junto a la de otros componentes spliceosomales (Prp3, Prp6, Prp8 y Prp31) y otros factores de splicing (SRSF1 y SRSF2). Además, la sobre-expresión de la versión mutante en pez cebra causa alteraciones morfológicas en la larva. Aunque la pregunta central acerca de por qué el tri-snRNP es particularmente importante para el desarrollo de la función retinal sigue sin ser respondida, existen pistas en torno al desarrollo de la RP. Los eventos iniciales incluyen pérdida de fotorreceptores *rod*, las células responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad, y del epitelio pigmentario responsable de la fagocitosis de los segmentos más externos de fotorreceptores. Dado que este epitelio tiene una carga metabólica intensa se sospecha que podría constituir el primer tipo celular afectado por mutaciones de los factores spliceosomales. Se ha observado que la función fagocítica se encuentra reducida en ratones *knock in* de mutantes de los genes PRP3 y PRP8 así como también en líneas celulares hemicigotas para PRP31. Investigar cómo estas mutaciones afectan los patrones de splicing permitirá indagar más acerca de las implicancias del tri-snRNP en el desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, se ha observado que mutaciones somáticas que afectan la expresión de componentes spliceosomales tienen un rol importante en la progresión del cáncer. Por ejemplo, la proteína Prp6, que media la interacción entre el snRNP U5 y el di-snRNP U4/U6 en la formación del tri-snRNP, se encuentra sobre-expresada en carcinoma colorrectal debido a inestabilidad cromosómica. La expresión aumentada de Prp6 correlaciona con un evento de splicing alternativo que genera una forma oncogénica de la quinasa activada por stress ZAK. En contraste con Prp6, la expresión reducida de Prp8 correlaciona con una proliferación celular aumentada mientras que las mutaciones heterocigóticas y las

deleciones hemigóticas resultan en defectos de splicing alternativo por inducir la activación de sitios de splicing subóptimos.

Estudios de secuenciación masiva revelaron mutaciones somáticas frecuentes en factores asociados al spliceosoma, incluyendo SF3B1, U2AF1 y U2AF2, en diversos tipos de neoplasmas mieloides. Mutaciones en U2AF1 alteran la hematopoyesis y causan cambios en el reconocimiento de sitios de splicing 3'SS, resultando en splicing aberrante de múltiples transcriptos.

Las mutaciones en factores de splicing también ocurren frecuentemente en síndromes mielodisplásicos y leucemia mielomonocítica crónica. Un ejemplo es SRSF2, cuyas mutaciones alteran su unión al ARN ocasionando cambios exhaustivos en los patrones de splicing e impidiendo el desarrollo hematopoyético. Diversas drogas antitumorales dirigidas contra componentes del spliceosoma han sido descritas, incluso para cánceres caracterizados por la sobre-expresión del oncogen MYC y por niveles aumentados de transcriptos nacientes (Scotti & Swanson 2016).

4.1.10 Las modificaciones post-traduccionales contribuyen a la dinámica de splicing

Las modificaciones post-traduccionales de proteínas (MPTs) también promueven rearrreglos críticos en las ribonucleopartículas esenciales para el splicing. El estudio del rol de las fosforilaciones continúa creciendo a la vez que nuevas evidencias apuntan a la importancia de otras MPTs. El rol esencial de la fosforilación/desfosforilación de las proteínas SR en el splicing ha sido ampliamente reportado (Misteli et al. 1998; Soret et al. 2003; Ngo et al. 2005; H. Y. Wang et al. 1998), como modulador de las interacciones proteína-proteína y ARN-proteína (Xiao & Manley 1997; Shin et al. 2004). Por su parte, la desfosforilación de diversas proteínas spliceosomales es requerida para pasos catalíticos del splicing, con las fosfatasa PP1/PP2A como protagonistas. Por ejemplo, la desfosforilación de U1-70K (Tazi et al. 1993) y de la proteína SRSF1 (Cao et al. 1997) son requeridas para el paso 1 en mamíferos. La proteína U2-SF3b155 es hiperfosforilada justo antes, o durante, el paso 1 (Wang et al. 1998). SF3b155 y U5-hSnu114 son desfosforiladas por PP1/PP2A concomitantemente con el paso 2 (Shi et al. 2006). Ha sido propuesto que la desfosforilación

de estas proteínas facilita rearrreglos estructurales esenciales durante la transición del paso 1 al 2 (Shi et al. 2006).

Ha sido propuesto que la fosforilación de varias proteínas del tri-snRNP contribuye a su integración estable durante la formación del complejo B. Específicamente, la proteína hPrp28 es fosforilada por la quinasa de proteínas SR, SRPK2, y en ausencia de esta modificación, este paso es bloqueado (Mathew et al. 2008). Además, Prp6 y Prp31, ambas del tri-snRNP, son fosforiladas durante la formación del complejo B por la quinasa Ppr4 (Schneider, Hsiao, et al. 2010). Esta quinasa es requerida para la asociación estable del tri-snRNP durante la formación del complejo B. En eucariotas superiores, numerosas fosforilaciones contribuyen al ensamblado del spliceosoma; dando cuenta de una mayor flexibilidad de las interacciones y mayor susceptibilidad a una regulación fina.

Más allá de la fosforilación, otras MPTs han sido vinculadas con el splicing. Análisis proteómicos revelaron que numerosas proteínas spliceosomales son acetiladas (Choudhary et al. 2009), e inhibidores de la acetilación bloquean el ensamblado del spliceosoma *in vitro* en diferentes pasos (Kuhn et al. 2009), sugiriendo un rol para la acetilación durante el proceso de splicing. De hecho, y en base al carácter co-transcripcional del proceso de splicing, ha sido demostrado que la acetil-transferasa de histonas Gcn5 es requerida para asociación del snRNP U2 al sitio de ramificación y que su delección es letal cuando se combina con la de algunos componentes de dicho snRNP (Gunderson et al. 2011). Estos estudios sugieren que los rearrreglos ocurridos en el ensamblado co-transcripcional del spliceosoma se encuentran asociados a cambios dinámicos en el estado de acetilación de histonas.

Finalmente, existen evidencias de que la ubiquitinación juega un rol importante en el splicing (Bellare et al. 2008). Específicamente, se ha demostrado que esta MPT es requerida para mantener los niveles de tri-snRNP, aparentemente inhibiendo el desenrollamiento prematuro de U4/U6 (Bellare et al. 2006). Estos estudios también revelaron que Prp8 es ubiquitinado en el contexto del tri-snRNP. Dado el rol reconocido de Prp8 en la actividad de Brr2, se ha postulado que la ubiquitinación/deubiquitinación de Prp8 juega probablemente un rol indirecto en el desenrollamiento de U4/U6 durante la activación catalítica del spliceosoma (Bellare et al. 2008).

Por otra parte, se ha propuesto que el complejo Prp19 promueve la ubiquitinación de Prp3 aumentando su afinidad con Prp8 y estabilizando el tri-snRNP (Song et al. 2010), siendo luego de-ubiquitinado para el reciclado por el dímero Usp4/Sart3. Esto debilitaría la

interacción con Prp8, facilitando la disociación del snRNP U4 del spliceosoma. En este sentido, la ubiquitinación reversible de Prp3 modularía las interacciones entre distintos complejos de snRNPs durante el ciclo catalítico del spliceosoma (Fig I5).

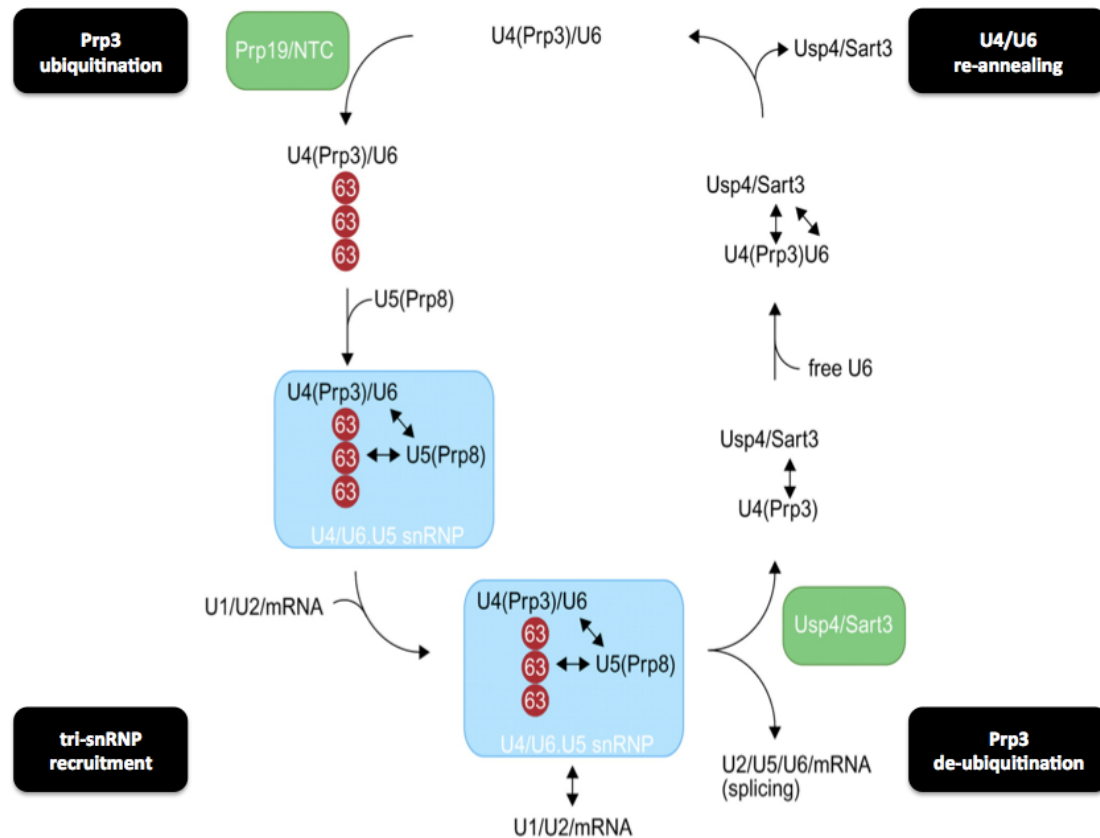


Figura I5: Modelo de la regulación del tri-snRNP U4/U6.U5 por ubiquitinación. El complejo Prp19 promueve la modificación de Prp3, componente del U4, con cadenas de ubiquitina conjugada en la lisina 63 (círculos). Prp3 en su forma ubiquitinada puede ser reconocida por Prp8, componente del U5, dando lugar a la estabilización del tri-snRNP. Al ser éste reclutado al spliceosoma, los snRNPs U1 y U4 así como también proteínas del U6 se disocian. Este modelo sugiere que la deubiquitinación de Prp3 por Usp4/Sart3 disminuye su afinidad por Prp8 facilitando la disociación. Sart3 también promueve el re-apareamiento de U4 y U6 para un nuevo ciclo de splicing. Adaptado de (Song et al. 2010).

4.2 Modificación post-traducciona por SUMO

4.2.1 Un poco de historia – La familia de proteínas del tipo ubiquitina

La proteína ubiquitina (Ub) (Ciechanover 1994; Schwartz & Ciechanover 2009; Hershko & Ciechanover 1992) y los miembros de su familia – las proteínas del tipo Ub [Ubls, del inglés *ubiquitin-like proteins* (van der Veen & Ploegh 2012)] son conjugadas a proteínas blanco, alterando las propiedades de estas últimas y aumentando enormemente la complejidad del proteoma en células eucariotas (Hay 2005). En humanos se han identificado varias Ubls (Tabla I6), destacándose NEDD8 (Xirodimas 2008), ISG15 (Andersen & Hassel 2006; Pitha-Rowe & Pitha 2007; Ritchie & Zhang 2004), FAT10 (Groettrup et al. 2008), Atg8 y Atg12 (Geng & Klionsky 2008), y SUMO (Hochstrasser 2009).

Ub/Ubls	Saccharomyces cerevisiae	ID	Ct	E1	E2	E3	Protease	M/P	Substrate	Function/Comments
Ubiquitin	Ubiquitin	100%	Yes	Ube1/Uba6	> 37	> 600	~ 80	M/P	Thousands	Many, dependent on linkage
Nedd8	Rub1	58	Yes	NAE1-Uba3	Ubc12 (Ube2M), Ube2F	~10	CSN5, NEDP1	M/P?	Cullins, tumor suppressors, oncoproteins	Regulate Ub conjugation via cullinRING E3 ligases, cell cycle
MNSFβ (Fub1, Fau)	-	36	Yes						TCRα-like protein, Bcl-G, Endophilin II	Immunoregulatory role?
ISG15 (UCRP)	-	28/37	Yes	Ube1L	UbcH8, UbcH6	Herc5	UBP43	M	Viral and host proteins	Antiviral immunity, IFN-inducible
FAT10	-	27/36	No	Uba6	Use2				Use2	Ub-independent proteasomal degradation, immunoregulatory role?
Ufm1	-	23	Yes	Uba5	Ufc1	Ufl1	UfSP1, UfSP2		C20orf116	Erythroid and megakaryocyte development
SUMO1	Smt3	14	Yes	SAE1-SAE2	Ubc9	~15	SEN1,2	M	Hundreds	Alter interactions, localization, conformation
SUMO2	-	13	Yes	SAE1-SAE2	Ubc9	~15	SEN1,3,5,7	M/P		
SUMO3	-	13	Yes	SAE1-SAE2	Ubc9	~15	SEN1,3,5,7	M/P		
SUMO4	-	12							IκBα?	NFκB signaling?, may be pseudogene or not processed
SUMO5										Nuclear bodies formation. Primates. Tissue-specific
Atg12	Atg12	12	No	Atg7	Atg10	-	-	M	Atg5, Atg3	Autophagy, mitochondrial homeostasis

Figura I6 | **Lista de Ubls conocidas.** Se detallan las proteínas Ubl junto con su % de identidad de secuencia aminoacídica y las enzimas E1, E2 y E3 específicas para la conjugación de cada Ubl. «Los porcentajes de identidad corresponden a los dos dominios de tipo Ub con respecto a ubiquitina humana madura. Ct se refiere al procesamiento C-terminal y M/P a la conjugación en forma de monómeros o polímeros (ver “Mecanismo de conjugación” más abajo). Los espacios en blanco indican funciones o enzimas aún no asignadas y en negritas aquellas con funcionalidad dual para ubiquitina y la Ubl correspondiente. Tomado de (van der Veen & Ploegh 2012).

Cada vez son más las proteínas detectadas que son modificadas por la adición o conjugación de SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*). El proceso conocido como SUMOilación es una rápida y reversible modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de la proteína denominada SUMO a una proteína blanco, en forma similar a la conjugación de Ub

(Jentsch & Psakhye 2013). El gen de SUMO (Smt3 en levaduras) fue inicialmente identificado en *Saccharomyces cerevisiae* en un estudio cuyo objetivo era la búsqueda de supresores de la proteína centromérica Mif2 (Meluh & Koshland 1995). La caracterización inicial de la proteína proviene de tres estudios que reportaron a SUMO como proteína capaz de interaccionar con RAD51 y RAD52, proteínas involucradas en la reparación del daño al ADN en levaduras (Shen et al. 1996); FAS, miembro de la vía de señalización apoptótica (Okura et al. 1996) y PML, del inglés *Promyelocytic leukemia protein* (Boddy et al. 1996). Finalmente se demostró la unión covalente entre SUMO y RanGAP1 (del inglés *Ran GTPase-activating protein 1*), unos de los protagonistas del transporte nucleo-citoplasmático (Mahajan et al. 1997; Matunis et al. 1996; Ritterhoff et al. 2016). En vertebrados, una fracción importante de RanGAP1 reside en el poro nuclear, donde forma un complejo estable con la nucleoporina Nup58, la cual ha sido implicada en numerosas vías de transporte, como por ejemplo importina α/β o transportina 1 y 3. Pero además, contribuye al progreso mitótico y se desempeña como E3 ligasa de SUMO, acerca de lo cual se profundizará más adelante.

4.2.2 La familia SUMO

Algunos organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, tienen un solo gen de SUMO. Otros organismos como plantas y vertebrados poseen varios genes de SUMO (Melchior 2000). Existen cinco isoformas de SUMO en mamíferos descritas hasta la fecha: SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4 y SUMO5. Las proteínas SUMO tienen un peso molecular de ~10 KDa y se asemejan en estructura tridimensional a la Ub (Bayer et al. 1998; Mossessova & Lima 2000). Todas las proteínas SUMO contienen una seguidilla de 10-25 aminoácidos no estructurados en su N-terminal que no se encuentra en otras proteínas Ubl y se expresan en una proforma inmadura, conteniendo un segmento carboxilo terminal de longitud variable (2-11 aminoácidos) luego del dipéptido glicina-glicina que es invariable y marca el extremo C-terminal de la proteína madura (ver más abajo “Proteasas específicas de SUMO”). Las formas maduras de SUMO2 y SUMO3 comparten 97% de identidad de secuencia aminoacídica y ambas comparten sólo un 50% de identidad con SUMO1. SUMO 5 fue recientemente descrito y es altamente homólogo a SUMO1, aunque difieren en varios aspectos. En primer lugar, SUMO5 se encuentra conservado en primates pero parece no expresarse en ratones. Segundo, es transcripcionalmente activo sólo en algunos tejidos, con

alta expresión en testículos y células sanguíneas (Liang et al. 2016). Con respecto a SUMO 4, no está claro aún si se procesa siquiera, aunque una mutación en su secuencia (sustitución M55V) ha sido asociada a diabetes tipo 1. Se ha demostrado que SUMO4 interacciona con I κ B α e inhibe la actividad transcripcional de NF κ B. La sustitución M55V impediría la SUMOilación de I κ B α , conduciendo a la activación de NF κ B y la transcripción de genes implicados en el desarrollo de diabetes tipo 1. Sin embargo, los efectos de la SUMOilación sobre células inmunes aún resultan poco comprendidos (Guo et al. 2004).

Se cree que SUMO1 y SUMO2/3 cumplen funciones distintas *in vivo* porque son conjugadas a diferentes proteínas blanco (Rosas-Acosta et al. 2005; Vertegaal et al. 2006). Como la ubiquitinación, la SUMOilación resulta en la formación de una unión isopeptídica entre la glicina C-terminal de SUMO y el grupo amino ϵ de una lisina en la proteína blanco (Geissfriedlander & Melchior 2007). Si bien la SUMOilación requiere una cascada enzimática similar a la ubiquitinación, no hay superposición entre las enzimas utilizadas en cada cascada (Figura 16).

4.2.3 Mecanismo de conjugación

Las UbIs se conjugan a sus proteínas blanco por una cascada enzimática que involucra una enzima activadora de Ubl (E1), una enzima conjugadora de Ubl (E2) y, típicamente, una enzima ligasa de Ubl (E3) (Hochstrasser 2000; Hochstrasser 2009; Kerscher et al. 2006; Schwartz & Hochstrasser 2003). En cuanto a la SUMOilación específicamente, el primer paso consiste en la maduración de SUMO por una proteasa específica que expone un motivo de di-glicina en el extremo C-terminal del péptido. El paso siguiente es la activación por la enzima activadora E1 específica de SUMO, un heterodímero de las proteínas SAE1-SAE2 en mamíferos (Uba2-Aos1 en levaduras) (Desterro et al. 1999; Gong et al. 1999; Johnson et al. 1997). Esta reacción utiliza ATP para la formación de un intermediario SUMO-adenilato, en el que el extremo C-terminal de SUMO está covalentemente unido a AMP. La ruptura de la unión SUMO-AMP es seguida de la formación de un enlace tioéster entre el grupo carboxilo del C-terminal de SUMO y el grupo -SH de la cisteína catalítica en SAE2 (C173). En el segundo paso de la reacción, SUMO es transferido desde SAE2 a la enzima conjugadora E2, Ubc9, formando un nuevo enlace tioéster, esta vez entre la cisteína catalítica de Ubc9 (C93) y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de SUMO (Desterro et al. 1997; Johnson & Blobel

1997). Una característica que diferencia a Ubc9 de las enzimas E2 del resto de las Ubls es su capacidad de reconocer al sustrato proteico directamente. De esta manera, el complejo entre SUMO y Ubc9 unidos mediante un enlace tioester (Ubc9~S~SUMO) cataliza la formación de la unión isopeptídica entre SUMO y el sustrato (Capili & Lima 2007; Desterro et al. 1997; Su & Li 2002; Reverter & Lima 2005; Yunus & Lima 2006). SUMO puede ser removido del sustrato por una proteasa específica (ver “Proteasas específicas de SUMO”), dando cuenta de la reversibilidad de esta modificación. Esta serie de pasos enzimáticos se resumen, en forma de esquema, en la Figura 17.

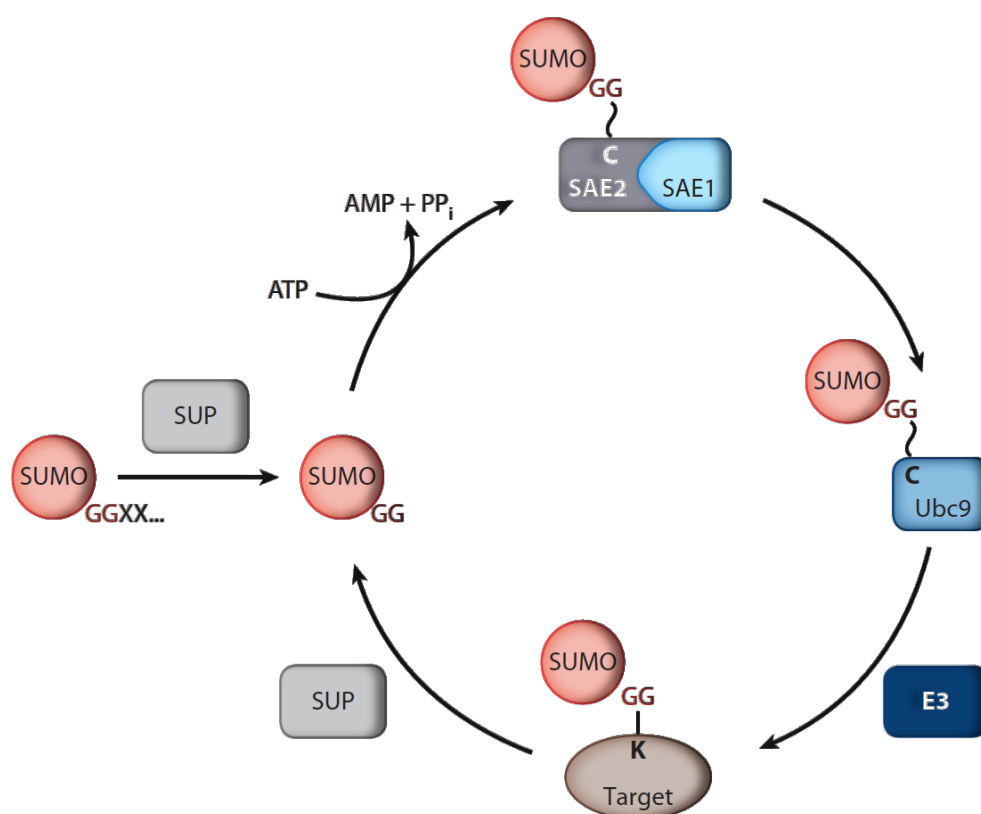


Figura 17 | **Visión esquemática de los pasos involucrados en la conjugación de SUMO.** Se esquematizan los pasos implicados en la conjugación de SUMO a proteínas blanco. SUP: SUMO proteasa, SAE1-SAE2: E1 activadora de SUMO, Ubc9: E2 conjugadora, E3 ligasa y Target: blanco. C: cisteína catalítica y K: lisina blanco de conjugación. Tomado de (Flotho & Melchior 2013).

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). La actividad de E3 ligasa ha sido claramente demostrada para dos tipos de proteínas, Siz/PIAS (SP) y la nucleoporina RanBP2

(Pichler et al. 2002; Pichler et al. 2004; Yunus & Lima 2009). El mecanismo sugerido propone que las E3 ligasas estabilizan la interacción del blanco con la enzima E2 cargada, y posicionan el enlace tioéster Ubl-E2 favorablemente para el ataque nucleofílico por parte de la lisina blanco (Deshaies & Joazeiro 2009). La familia más grande de E3 ligasas de SUMO es el grupo de proteínas SP-RING. En humanos, se han identificado seis miembros: PIAS1 (del inglés *protein inhibitor of activated STAT*), PIAS α y PIAS β , PIAS3, PIASy y Nse2/Mms21 (Kotaja et al. 2002; Palvimo 2007; Rytinki et al. 2009). En levaduras, la familia SP comprende a las proteínas Siz1, Siz2, Mms21 y potencialmente a Zip3. Las proteínas Siz identificadas en levaduras poseen actividad de E3 ligasas de SUMO *in vitro* y la depleción de los genes Siz1 y Siz2 elimina casi toda la conjugación de SUMO *in vivo* (Johnson & Gupta 2001; Takahashi, Kahyo, et al. 2001; Takahashi, Toh-e, et al. 2001). Por su parte, RanBP2 tiene una región E3 ligasa específica de vertebrados, nativamente desplegada, que no muestra homología con otras proteínas (Kirsh et al. 2002; Pichler et al. 2002). Su actividad *in vitro* sólo requiere de una región de aminoácidos que une Ubc9 y SUMO. Sin embargo, *in vivo* Ran BP2, RanGAP1 SUMOilada y una forma de Ubc9 catalíticamente inaccesible forman un complejo estable que da lugar a la E3 ligasa funcional (Ritterhoff et al. 2016). De modo intrigante, este complejo reconoce diversos blancos dado que contiene sitios de unión para numerosos receptores de transporte nuclear y la GTPasa Ran. Estos factores de transporte y las moléculas que cargan podrían ser blancos de SUMOilación durante el transporte nucleocitoplasmático o la mitosis, momento en el cual la actividad E3 ligasa de RanBP2 parece ser relevante.

Otras proteínas también han sido caracterizadas por su capacidad de aumentar la SUMOilación. Entre ellas, la proteína humana Pc2/CBX4 (del inglés *Polycomb group 2*) estimula la SUMOilación de CtBP1 *in vitro* e *in vivo* y contribuye a la SUMOilación de factores reclutados a sitios de daño al ADN (Geiss-friedlander & Melchior 2007). Otros estimuladores incluyen a Topors (*topoisomerase I-binding RING finger protein*) (Hammer et al. 2007; Weger et al. 2005), la cual también es capaz de promover la ubiquitinación. Llamativamente, esta proteína contiene un dominio RING y un dominio RS. Al igual que Pc2, se desconoce el mecanismo mediante el cual Topors aumenta la SUMOilación. También se ha visto esta capacidad en el factor supresor de tumores p14Arf (Rizos et al. 2005) y la recientemente identificada familia de proteínas ZNF451, responsables de la SUMOilación de PML y otros componentes de los cuerpos PML en los cuales se localizan (Koidl et al. 2016). Como ya mencionamos, nuestro laboratorio ha reportado la capacidad de la proteína SRSF1 de estimular la SUMOilación de múltiples blancos (Pelisch et al. 2010), probablemente dada su

asociación a la ampliamente descrita E3 ligasa PIAS1 *in vivo*. Sin embargo, SRSF1 es capaz de aumentar la SUMOilación también *in vitro*, en ausencia de cualquier otra E3 ligasa conocida.

A pesar del gran avance reciente en el campo de la SUMOilación de proteínas, la regulación de este proceso es aún escasamente conocida. Es difícil concebir que un número tan limitado de componentes identificados hasta la fecha puedan dar cuenta de la compleja regulación de este proceso (Figura I8) (Geiss-friedlander & Melchior 2007; Jentsch & Psakhye 2013). En este aspecto, ha sido reportado que la proteína RSUME, la cual contiene un motivo RWD, es capaz de estimular la SUMOilación mediante la promoción de la interacción entre las enzimas E1 y E2, la formación del enlace tioester entre SUMO y Ubc9, la interacción no covalente entre SUMO y Ubc9 y la transferencia de SUMO a proteínas blanco específicas (Carbia-Nagashima et al. 2007). Estos resultados contribuyen a la idea de que la lista de reguladores de la vía de SUMOilación es aún incompleta y que no estaría restringida a las clásicas enzimas E1, E2 y E3. Es concebible que proteínas accesorias (por ejemplo co-factores) participen en la regulación de este proceso tal como ocurre con los complejos proteicos que funcionan como E3 ligasas de Ub (Joazeiro y Weissman, 2000). En este sentido, se ha descrito un gran complejo de varias sub-unidades con actividad de E3 ligasa de SUMO en *S. pombe* (Andrews et al. 2005) y, como se mencionó anteriormente, el complejo RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 en células humanas (Ritterhoff et al. 2016).

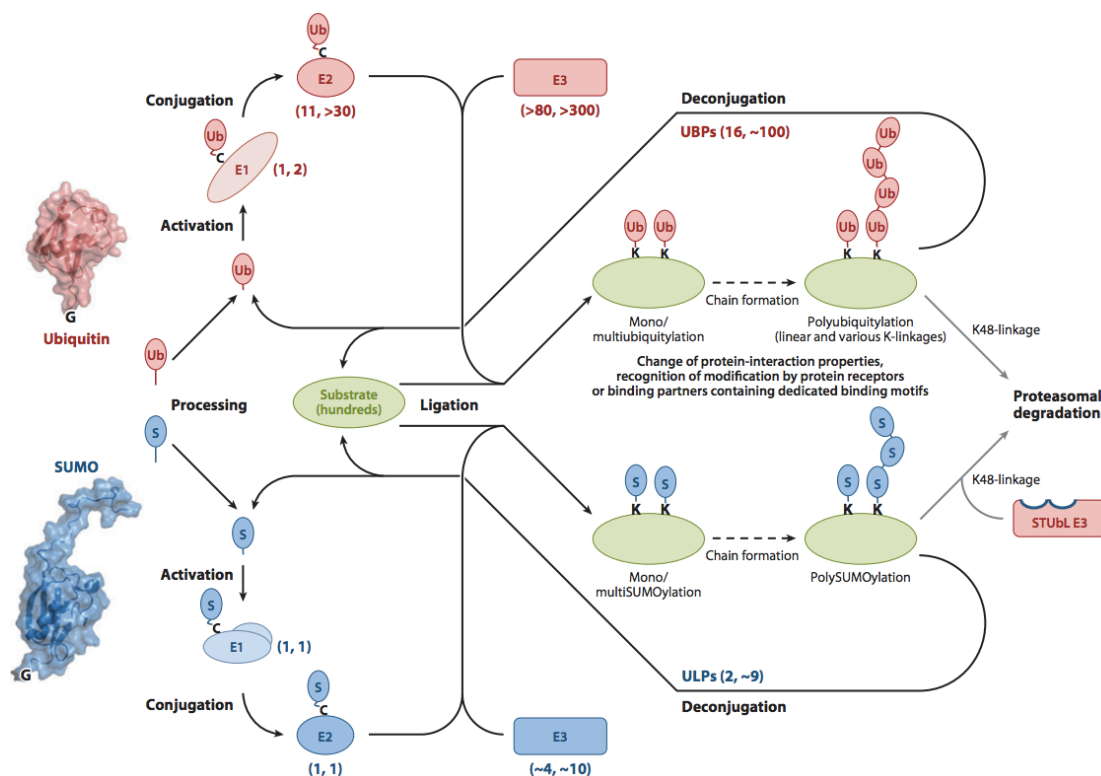


Figura 18: Comparación entre las vías de conjugación de ubiquitina (Ub) y SUMO (S): Ambas maquinarias tienen cientos de blancos conocidos y otros tantos aún sin identificar, a pesar de las sorprendentes diferencias en el número de enzimas involucradas (E1 activadora, E2 conjugadora y E3 ligasa). El número de enzimas en *S. cerevisiae* y humanos se encuentra entre paréntesis. Los pequeños péptidos pueden unirse a una o varias lisinas en el sustrato (mono/multiubiquitinación/SUMOilación) o formar cadenas sobre uno mismo residuo (poliubiquitinación/SUMOilación). Luego, las modificaciones pueden ser reconocidas por proteínas con dominio de unión a ubiquitina o SUMO e incluso por enzimas de-conjugasas que las remuevan de los sustratos. Existen ligasas de ubiquitina que reconocen sustratos SUMOilados (STUbLs, del inglés SUMO-targeted ubiquitin ligases). Tomado de (Jentsch & Psakhye 2013).

4.2.4 Secuencias blanco de SUMOilación

Originalmente se consideraba que la proteína blanco de SUMOilación tenía que cumplir dos requisitos para que ocurra esta modificación: i) contener una secuencia consenso para la conjugación de SUMO definida como Ψ KXD/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, ácido aspártico; y ii) contener una señal de localización nuclear (Rodríguez et

al. 2001). Sin embargo, el número de proteínas SUMOiladas reportadas que se desvían de la secuencia consenso o que no poseen tal secuencia está en continuo crecimiento (Andersen et al. 2009; Vertegaal et al. 2006; Vertegaal et al. 2004), de modo que actualmente no existen métodos confiables de predicción de secuencias blanco de SUMOilación. En cuanto al requerimiento de localización nuclear, se ha descartado como generalidad dado que depende de cada caso específico y de las redes de interacciones de cada proteína (Geissfriedlander & Melchior 2007).

Dos extensiones del consenso han sido identificadas: la primera es un sitio de SUMOilación dependiente de fosforilación, PDSM (del inglés *Phosphorylation-Dependent SUMOylation Motif*) (Hietakangas et al. 2006). Este motivo consiste en el motivo convencional mencionado anteriormente seguido de un número variable de entre 2 y 5 aminoácidos cualquiera, seguidos de una serina fosforilada y una prolina (Ψ KXD/EX₂₋₅pSP) (Hietakangas et al. 2006). Se especula que la carga negativa del grupo fosfato podría estimular la interacción entre Ubc9 y el sustrato (Mohideen et al. 2009). En términos más generales, un rol importante para residuos cargados negativamente en posiciones hacia el extremo carboxilo de la lisina aceptora ha sido revelado por el análisis de secuencias de muchos sustratos de SUMOilación (Blomster et al. 2009). Esto llevó a la identificación de un segundo motivo extendido, NDSM (del inglés *Negatively charged amino-acid-Dependent SUMOylation Motif*). Ambos motivos tienen en común el hecho de que una carga negativa cerca del sitio consenso mínimo estimula la SUMOilación. Esto se debe a que una región básica de la enzima Ubc9 debe interaccionar con una región ácida de la proteína blanco (Mohideen et al. 2009; Yang et al. 2006). Más aún, con el uso de nuevas técnicas, en particular con la contribución de trabajos a gran escala que utilizaron la identificación sitio específica de lisinas SUMOiladas por espectrometría de masa, se pudo observar que el porcentaje de sitios de SUMOilación que no respetan la secuencia consenso canónica es más alto de lo que se creía (Hendriks & Vertegaal 2016). Así se identificaron nuevos sitios consenso como lo son el ICM (del inglés *Inverted Consensus Motif*) o el HCSM (del inglés *Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif*) (Da Silva-Ferrada et al. 2012; Matic et al. 2010) Ver figura I9.

A

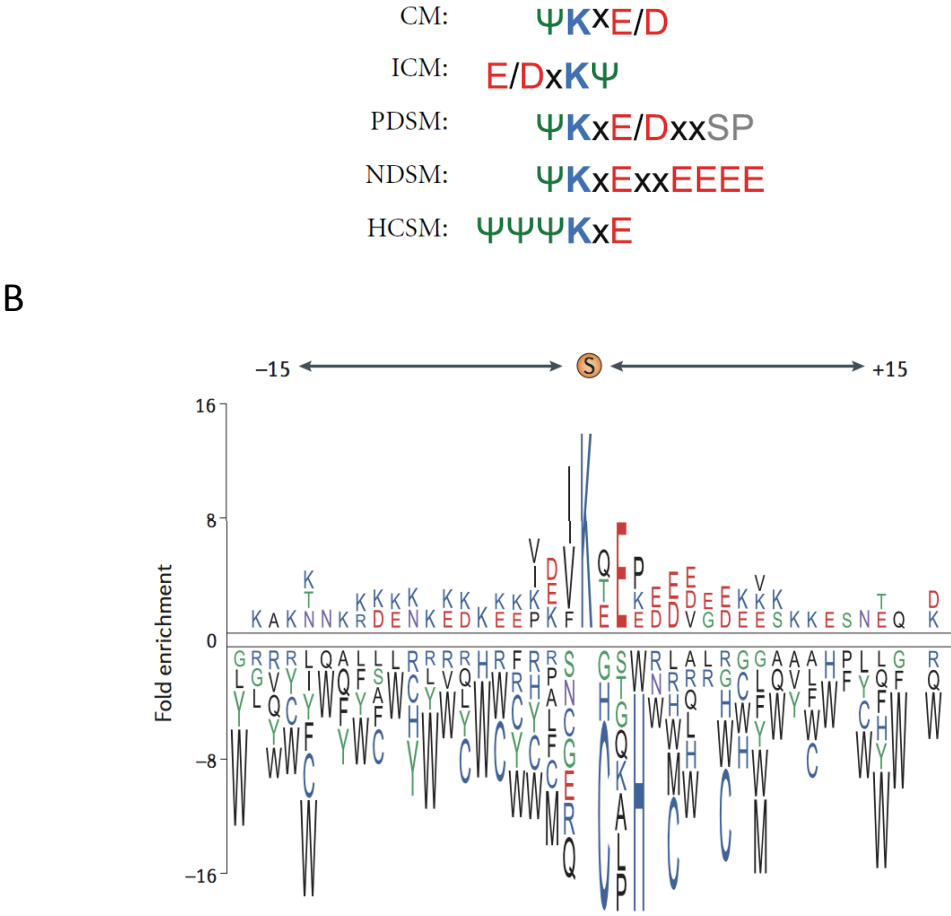


Figura 19 | **Motivos consenso de SUMOilación.** (A) Se muestran las secuencias aminoacídicas de los distintos motivos consenso de SUMOilación CM, ICM, PDSM, NDSM y HCSM. En la secuencia se representa Ψ como un aminoácido grande e hidrofóbico, K es la lisina blanco de la reacción, X es cualquier aminoácido, D es ácido glutámico, E es ácido aspártico, S es serina, P es prolina. Figura adaptada de (Da Silva-Ferrada et al. 2012). (B) Recapitulación de las secuencias aledañas a los sitios de conjugación de SUMO detectados en tres o más estudios proteómicos con especificidad de sitio, lo cual hace un total de 641 sitios. Los aminoácidos sobre el eje x corresponden a aquellos enriquecidos mientras que aquellos por debajo del eje a los depletados en torno a los sitios de SUMOilación. La altura de la letra corresponde al grado de enriquecimiento o depleción. Tomado de (Hendriks & Vertegaal 2016).

4.2.5 Proteasas específicas de SUMO

Las proteasas de SUMO son requeridas para dos tareas: la maduración de SUMO (actividad hidrolasa C-terminal) y la remoción de SUMO de sus blancos (actividad isopeptidasa). Si bien la maduración es esencial, no hay evidencia clara de que sea un paso limitante o regulado. Por el contrario, la de-SUMOilación es crucial para el estado estacionario de los niveles de SUMOilación de un determinado blanco. Un número sorpresivamente pequeño de isopeptidasas de SUMO ha sido identificado, de las cuales todas son cisteín-proteasas. La primera identificada en levaduras fue Ulp1 (Takahashi et al. 2000) y le siguieron en mamíferos las llamadas SENPs (del inglés *senrin-specific proteases*) en base a la similitud de secuencia (Drag & Salvesen 2008). La familia Ulp/SENP comprende a dos proteínas en levaduras (Ulp1, esencial, y Ulp2) y seis en mamíferos (SEN1, -2, -3, -5, -6 y -7), las cuales difieren entre sí en la actividad relativa y la preferencia por la isoforma de SUMO (Mukhopadhyay & Dasso 2007). Sin embargo, sus dominios catalíticos no parecen distinguir entre blancos individuales. Un determinante para ello *in vivo* es la región N-terminal, el cual promueve la interacción con distintos blancos y regula la localización subcelular.

La segunda familia de proteasas de SUMO comprende a dos proteínas, DeSI-1 y 2 (del inglés deSUMOylating isopeptidase) (Yeh 2009), las cuales parecen exhibir mayor especificidad de sustrato que las de la familia SENP, de modo consistente con que su depleción no provoca cambios notorios en los niveles de SUMOilación global (Suh et al. 2012). La incorporación más reciente a la lista de isopeptidasas de SUMO es la de USPL1. Esta proteína pertenece a la familia de USPs (*Ubiquitin specific proteases*) pero cliva SUMO en lugar de ubiquitina (Schulz et al. 2012). Se encuentra presente en baja abundancia y localizada en los llamados cuerpos de Cajal. Mientras que su homólogo en pez cebra es esencial para el desarrollo (Hutten et al. 2014), su silenciamiento en células de mamíferos no parece afectar los patrones de SUMOilación global y su función para la proliferación celular e integridad de los cuerpos de Cajal no parece depender de su actividad catalítica.

4.2.6 Consecuencias de la SUMOilación

Las consecuencias de la SUMOilación son variadas y dependientes del sustrato o proteína blanco. Esta modificación puede alterar la localización sub-celular, la actividad y/o la estabilidad de la proteína blanco. A nivel molecular, es importante destacar que la estructura tridimensional de la Ub y de las Ubls, en particular, la de SUMO está altamente

conservada (Bayer et al. 1998; S Vijay-Kumar et al. 1987; S. Vijay-Kumar et al. 1987) (Figura I10).

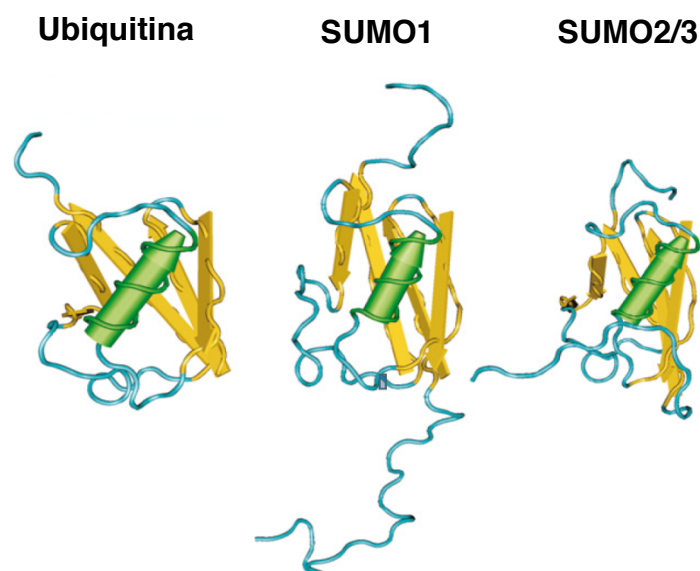


Figura I10 | Estructura tridimensional de Ub y SUMO. Esquema comparativo de las estructuras tridimensionales de Ub, SUMO1 y SUMO3. Tomado de (Martin et al. 2007).

En los últimos años, se ha establecido un rol para Ub en la regulación de interacciones proteína-proteína más allá del etiquetado para la degradación, debido principalmente a la existencia de distintos motivos o dominios proteicos capaces de reconocer la Ub o cadenas de la misma (Hurley et al. 2006). En este sentido, vale la pena volver a mencionar el trabajo citado anteriormente, en el que demuestran que la monoubiquitinación de la proteína spliceosomal Prp8 es indispensable para el ensamblado del spliceosoma (Bellare et al. 2008). De manera análoga, la SUMOilación modifica superficies proteicas o estructuras tridimensionales, pudiendo alterar interacciones con otras macromoléculas (Geissfriedlander & Melchior 2007). Ha sido identificado un motivo aminoacídico corto y de naturaleza hidrofóbica en proteínas que interaccionan con SUMO en forma no-covalente. Este motivo se denomina SIM (del inglés *non-covalent SUMO-Interaction Motif*) (Perry et al. 2008; Seu & Chen 2009). Se ha establecido un rol para los motivos SIM en el mecanismo básico de SUMOilación. Ubc9 es sustrato de SUMOilación y se ha demostrado que esto aumenta su afinidad –y por ende, su capacidad de conjugar SUMO– por un conjunto de sustratos, los cuales poseen dominios SIM (Knipscheer et al. 2008). De este modo, dichos sustratos se independizarían de la actividad de E3 ligasas, cuya función sería reemplazada por la interacción SIM-SUMO-Ubc9 (Knipscheer et al. 2008). También se ha demostrado que la actividad E3 ligasa de la proteína Pc2 depende de motivos SIM (Merrill et al. 2010). A nivel funcional, las consecuencias de la conjugación de SUMO pueden ser variadas (Geissfriedlander & Melchior 2007). A diferencia de la conjugación de Ub que, en la mayoría de los

casos, lleva a degradación por el proteasoma, la SUMOilación no lleva a sus proteínas blanco a un destino específico ni a la degradación. La conjugación de SUMO altera la superficie de una proteína de manera tal que la misma puede perder o ganar interacciones (Figura I11).

A su vez, la conjugación de SUMO puede competir con otras modificaciones post-traduccionales que tengan como blanco al aminoácido lisina, como lo son la ubiquitinación y la acetilación. Si bien queda mucho por aprender acerca del mecanismo mediante el cual la conjugación de SUMO altera la función proteica, está claro que la SUMOilación regula la actividad y/o localización sub-celular de proteínas modificando, principalmente, interacciones proteína-proteína (Gill 2004).

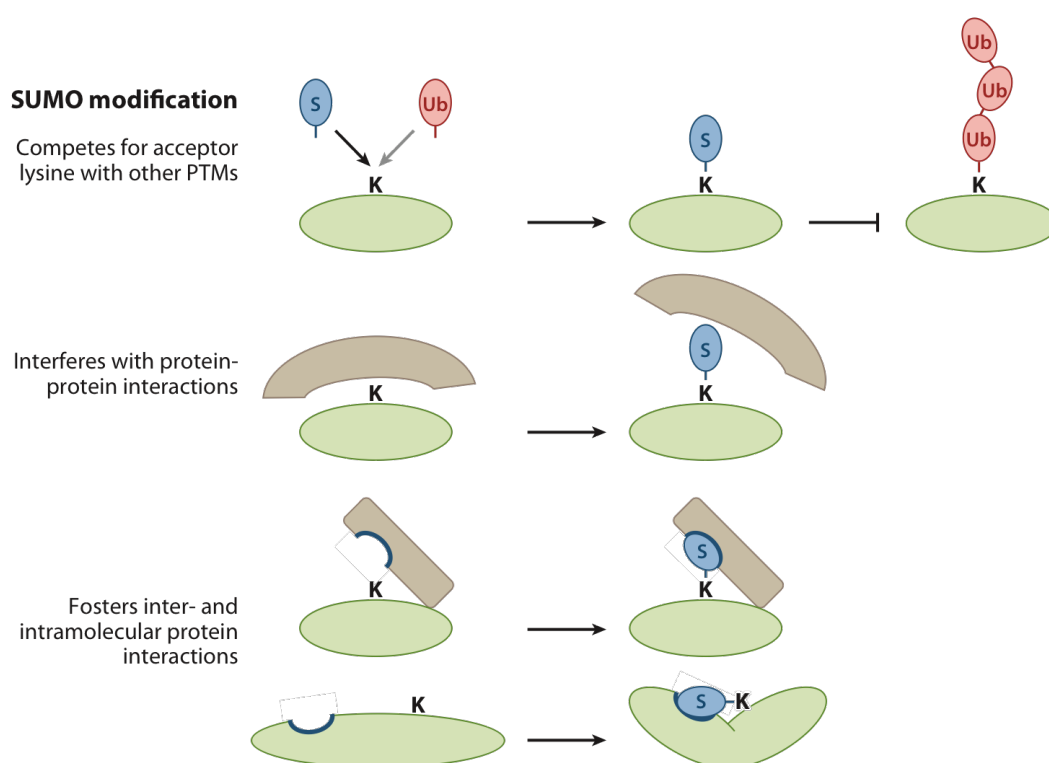


Figura I11 | **Consecuencias moleculares de la conjugación de SUMO.** Al SUMOilarse, la proteína blanco puede cambiar el repertorio de modificaciones postraduccionales que sufre, ya sea ocurridas o no en el mismo residuo lisina, perder o ganar interacciones y/o cambiar su conformación y, eventualmente, su función. Tomado de (Jentsch & Psakhye 2013).

El número de procesos celulares reportados que son regulados por SUMOilación está en aumento e incluyen: transcripción (Sapetschnig et al. 2002; Savare et al. 2005; Valin & Gill 2007; Verger et al. 2003; Yang & Sharrocks 2004), estructura de la cromatina (Ouyang & Gill 2009; Rouvière et al. 2013), reparación del ADN y estabilidad genómica (Heideker et al. 2009; Lee & O'Connell 2006; Zhao & Blobel 2005; Jentsch & Psakhye 2013), transducción de

señales intracelulares (Miyazono et al. 2008; Yang et al. 2003) y función neuronal (Koidl et al. 2016). Además, un análisis exhaustivo de los diversos estudios proteómicos realizados hasta el momento reveló que muchos de los sustratos de SUMOilación se encuentran funcionalmente interconectados, reforzando el concepto de “SUMOilación en grupo”, el cual sugiere que múltiples blancos podrían estar siendo conjugados/de-conjugados simultáneamente al participar en la misma vía metabólica y bajo la misma regulación SUMOilatoria. Varios de los procesos asociados a la funcionalidad de SUMO se encuentran ilustrados en la figura I12.

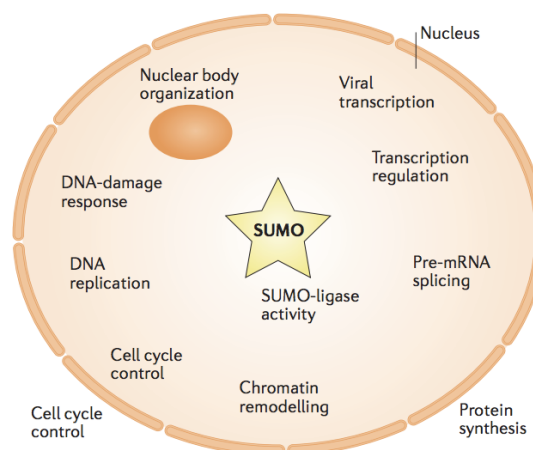


Figura I12: SUMO involucrado en procesos nucleares: SUMO se encuentra enriquecido en cuerpos nucleares, en la cromatina y en numerosos complejos proteicos nucleares. Siendo la SUMOilación altamente dinámica y asociada a procesos relacionados con el ADN, tales como replicación, reparación y ciclo celular, SUMO podría ser considerado el guardián del núcleo. Tomado de (Hendriks & Vertegaal 2016).

4.2.7 SUMO y splicing

Con relación al proceso de *splicing*, coexisten dentro del spliceosoma tanto sustratos de ubiquitilación como componentes de la vía de ubiquitilación/de-ubiquitilación. En particular, como ya ha sido mencionado, la ubiquitilación no-proteolítica de la proteína Prp3 promovida por el complejo Prp19 es necesaria para la estabilización del tri- snRNP U4-U5/U6, mientras que la de-ubiquitilación de Prp3 mediada por Usp4/Sart3 es requerida para la disociación del snRNP U4 y su reciclado para posteriores eventos de *splicing* (Song et al. 2010). Por otra parte, estudios proteómicos han revelado a las proteínas de unión al ARN como el grupo

predominante dentro de los sustratos de SUMOilación, incluyendo muchas proteínas reguladoras del *splicing* (proteínas hnRNP y SR) y componentes del spliceosoma (Nilsen & Graveley 2010; Golebiowski et al. 2009; Hendriks & Vertegaal 2016) (Figura I13). Entre este último grupo se puede mencionar a las proteínas componentes del tri-sNRP U4/U6-U5 116 KDa, SART1 y Prp8; las proteínas del snRNP U2 SF3B4 (SAP49), SF3A2 (SAP62) y A', y la proteína "core" de los snRNPs, D2 (Golebiowski et al. 2009; Becker et al. 2013; Tammsalu et al. 2015). En el marco del concepto de "SUMOilación en grupo" mencionado anteriormente, el spliceosoma, dada la naturaleza altamente dinámica y ordenada de su ensamblado, constituye un blanco atractivo para la regulación por SUMOilación de las múltiples proteínas que lo conforman.

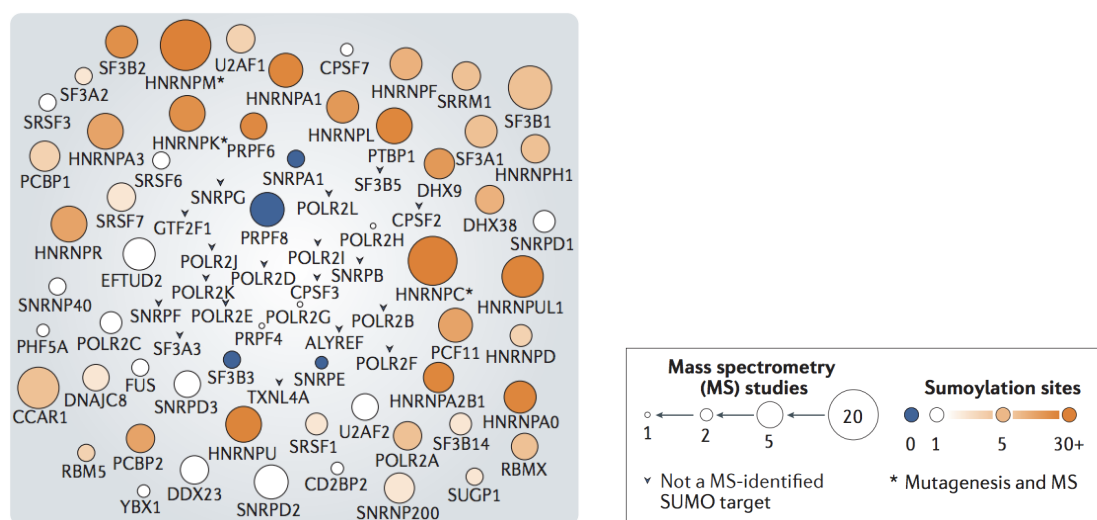


Figura I13: Muchas de las proteínas involucradas en el proceso de splicing son blancos de SUMOilación: El análisis exhaustivo de diversos estudios proteómicos y la bibliografía arroja que muchas de las proteínas involucradas en el proceso de splicing son conjugadas a SUMO en uno o mas residuos lisina. Se muestra el cluster de proteínas interconectadas por su participación en el proceso de splicing. El tamaño del círculo asignado a cada proteína da cuenta del número de estudios proteómicos en el que su SUMOilación fue reportada. Por su parte, el color del círculo refiere al número de sitios de conjugación identificados. Aquellas proteínas cuya SUMOilación fue descrita mediante técnicas distintas de la proteómica se señalan con una punta de flecha negra. Tomado de (Hendriks & Vertegaal 2016).

Por otra parte, ha sido reportado que algunas etapas de la biogénesis y el metabolismo del ARN como el procesamiento del extremo 3' de mensajeros y el *editing* son reguladas por conjugación de SUMO, mediante la alteración de la función de las proteínas poli(A) polimerasa (PAP), simplekin y CPSF-73 en el primer caso, y de la proteínas ADAR1 en el último (Vethantham et al. 2007; Desterro et al. 2005). Ha sido demostrado que la proteína

PAP se conjuga a SUMO en seis de sus residuos lisina y que su mutación a residuos arginina conduce a una menor concentración nuclear de PAP y otras proteínas del complejo de procesamiento del extremo 3' del ARNm. Por su parte, la inhibición de la SUMOilación de CPSF y Simplekina afectó el ensamblado y la estabilidad de dicho complejo y fue letal para la viabilidad celular. En cuanto a ADAR1, se ha observado que colocaliza con SUMO1 en una región subnucleolar y que es modificada por SUMO en la lisina 418. Si bien el reemplazo por arginina inhibe la SUMOilación, no afecta la localización a la vez que estimula la actividad enzimática de ADAR1 *in vivo* e *in vitro*. Por el contrario, el aumento de la SUMOilación reduce su actividad.

4.3 Aportes del grupo al estudio del campo del *splicing* y la SUMOilación

Nuestro laboratorio ha realizado contribuciones importantes dentro del campo de la regulación del *splicing* por señales extracelulares y sus correspondientes caminos de transducción de señales (Blaustein et al. 2007; Risso et al. 2013). Si bien este campo ha crecido muchísimo durante la última década, ha estado enfocado principalmente hacia la fosforilación de proteínas. Dentro de este contexto, el interés de nuestro laboratorio por otras MPTs, en particular la conjugación de péptidos de la familia de ubiquitina, resulta altamente relevante ya que la relación cruzada entre diferentes modificaciones post-traduccionales se presenta como un tema emergente en la biología celular eucariota (Hunter 2007). Por otra parte, hemos hecho también contribuciones significativas en la búsqueda de factores capaces de regular diferentes etapas de la expresión genética en forma concertada (Blaustein et al. 2005). Así, hemos demostrado que una de las proteínas de la familia SR, “SRSF1” (anteriormente llamada SF2/ASF), estimula la SUMOilación tanto *in vitro* como en células en cultivo (Pelisch et al. 2010). Observamos que SRSF1 interacciona con la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 y estimula la transferencia de SUMO-1 y SUMO-2/3 a sustratos específicos tales como: topoisomerasa-1, p53, la proteína de unión al ARN Sam68, entre otros. Utilizando mutantes de delección de SRSF1 pudimos determinar que estos efectos dependen de uno de los dominios modulares de esta proteína, su segundo dominio de unión al ARN o “RRM2”, y que dicho dominio es suficiente para el rol estimulador de la SUMOilación ejercido por SRSF1. SRSF1 no sólo presenta ciertas características de E3 ligasa de SUMO sino que además interacciona física y funcionalmente con una E3 ligasa ya caracterizada, la enzima PIAS1, llevando a un aumento sinérgico de los niveles globales de SUMOilación en células de mamífero. Más aún, el aumento en la conjugación de SUMO y el cambio en la localización sub-nuclear de sustratos de SUMO mediado por el estrés hipertérmico parecen ser procesos regulados por SRSF1, quien podría ser un factor molecular capaz de relacionar las maquinarias de SUMOilación y del metabolismo del ARN (Pelisch et al 2010, Pelisch et al 2013, Rouvière et al. 2013).

5. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es estudiar la participación de la conjugación de SUMO en la regulación del splicing del pre-ARNm, para lo cual analizaremos la conjugación de SUMO a proteínas componentes del spliceosoma, tanto *in vitro* como en células en cultivo. Nuestra hipótesis es que dicha MPT podría influir sobre el ciclo de ensamblado y desensamblado del spliceosoma, mediante la regulación de las interacciones entre sus componentes, afectando la actividad catalítica del spliceosoma y consecuentemente el proceso de splicing.

Para abordar este objetivo general y poner a prueba la hipótesis planteada, proponemos los siguientes objetivos específicos:

1) Evaluar la SUMOilación de proteínas componentes de los snRNPs (partículas ribonucleoproteicas que conforman el spliceosoma) y su regulación

1.a- Evaluar la SUMOilación de proteínas componentes de los snRNPs a lo largo de las diferentes etapas de la reacción de splicing.

1.b- Evaluar la SUMOilación de proteínas componentes de los snRNPs en células en cultivo.

1.c- Evaluar la relevancia de la actividad regulatoria de la SUMOilación de SRSF1 en la SUMOilación de proteínas componentes de los snRNPs.

2) Analizar el posible rol de la SUMOilación en el ensamblado del spliceosoma y en la actividad catalítica del mismo

2.a- Analizar si la conjugación de SUMO regula las interacciones proteína-proteína y proteína-snRNA y consecuentemente la estabilidad de los snRNPs

2.b- Evaluar el efecto del impedimento de la SUMOilación de proteínas componentes de snRNPs sobre la cinética y/o la progresión del proceso de splicing.

3) Evaluar la influencia de la SUMOilación sobre el reclutamiento de factores de splicing a la cromatina y la eficiencia del proceso de splicing en células en cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Splicing *in vitro*

El pre-ARNm de MINX (Zillmann et al. 1988), utilizado como sustrato de la reacción, fue transcrito *in vitro* usando polimerasa T7 (Ambion). Las reacciones de splicing se compusieron por 40% (v/v) de extracto nuclear en buffer D (Carey et al. 2009) [20 mM HEPES-KOH at pH 7,9, 100 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF], 20 mM creatina fosfato y 2 mM ATP, y concentraciones finales de KCl y MgCl₂ ajustadas a 65 mM y 3 mM, respectivamente. Dichas reacciones fueron incubadas a 30°C por los tiempos indicados. El ARN fue extraído usando Trizol (Invitrogen) y analizado en un gel de poliacrilamida con 14% de urea, seguido de autoradiografía. En los casos indicados, las enzimas recombinantes SENP1 y Ubc9 (comercializadas por ENZO Life Sciences) fueron agregadas a los extractos nucleares a una concentración final de 1 mM con posterior incubación en condiciones de splicing durante 10 minutos a 30°C antes de la adición del pre-ARNm MINX. La radiactividad en las bandas de ARN fue cuantificada por PhosphorImager (Molecular Dynamics). La eficiencia de splicing fue calculada como la relación entre los productos (ARNm + intrón escindido en forma de lazo) y la suma de precursor, intermediarios y productos. Para analizar la formación de los complejos spliceosomales, 10 µl de la reacción de splicing fueron combinados con 2,5 µl de buffer de siembra [1X TBE, 30% (v/v) glicerol, 1,25 mg/mL heparina] a los tiempos indicados, y luego colocados en hielo. Los complejos spliceosomales fueron resueltos en un gel de agarosa 2% (w/v)

6.1.1 Purificación de complejos spliceosomales

La proteína recombinante MS2 fusionada a la proteína de unión de maltosa (MS2-MBP) fue incubada con el pre-ARNm de MINX radiactivo que presenta sitios de unión a MS2 en su extremo 3' y luego ambos incorporados a reacciones de splicing de 1 ml de volumen final, conformadas como se describió anteriormente. Los complejos spliceosomales se ensamblaron a 30°C durante los tiempos indicados y una alícuota fue analizada para evaluar su formación en un gel de agarosa 2%. La reacción fue complementada con 10 mM N-ethyl

maleimide (NEM), 10 mM iodoacetamide (IAA) y 125 mM NaCl, y luego cargada en una columna de resina de amilosa (New England Biolabs), equilibrada con buffer G (20 mM HEPES-KOH a pH 7,9, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂). Luego de lavar con buffer G, los complejos spliceosomales fueron eluidos de a gotas con buffer de elución (Buffer G con 12 mM de maltosa). El ARN fue extraído de los eluatos mediante tratamiento con proteinasa K, extracción con fenol y posterior precipitación con etanol; y luego resuelto en un gel desnaturante de poliacrilamida al 10% con 8,3 M de urea, visualizado con tinción con plata para los snRNAs o autoradiografía para los sustratos, intermediarios y productos de la reacción de splicing.

6.1.2 Inmunoprecipitación anti-SUMO con anticuerpos inmovilizados

El anticuerpo monoclonal anti-SUMO2 8A2 (provisto por el laboratorio de N. Brose) o IgG de ratón (Invitrogen) fueron incorporados a 1 ml de proteína G-sefarosa equilibrada en 20 mM NaPO₄, pH 7,0. Para unir covalentemente (*cross-linker*) los anticuerpos a la proteína G, 50 mM de buffer borato, pH 9,0, conteniendo 20mM de DMP (dimetil pimelimidato, Thermo Scientific) fue agregado directamente a la resina. Luego de 1 hora de incubación, el *crosslinker* fue neutralizado con 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Antes de ser usada, la resina de proteína G-sefarosa fue lavada una vez con 200 mM de ácido acético, pH 2,7 y 500 mM de NaCl, y dos veces con 20 mM NaPO₄, pH 7,0. Para la inmunoprecipitación de proteínas SUMOiladas en los complejos spliceosomales, éstos fueron incubados en buffer conteniendo 20 mM NaPO₄, pH 7,4, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sodio, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM NEM, e inhibidor de proteasas (Complete, Roche) con el fin de desarmar las interacciones proteína-proteína y proteína-ARN, como así también de inactivar las proteasas de SUMO (Becker et al. 2013). Un volumen de 50 µl de resina acoplada a anticuerpo fue incorporado y la mezcla incubada durante toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados con buffer de IP (20 mM NaPO₄, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sodio, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM NEM e inhibidor de proteasas Complete, Roche) y un lavado final con tres volúmenes de buffer de IP con alta sal (500 mM NaCl) durante 30 min a 37°C en un rotador. La elución se realizó con *cracking buffer* (Figura M1).

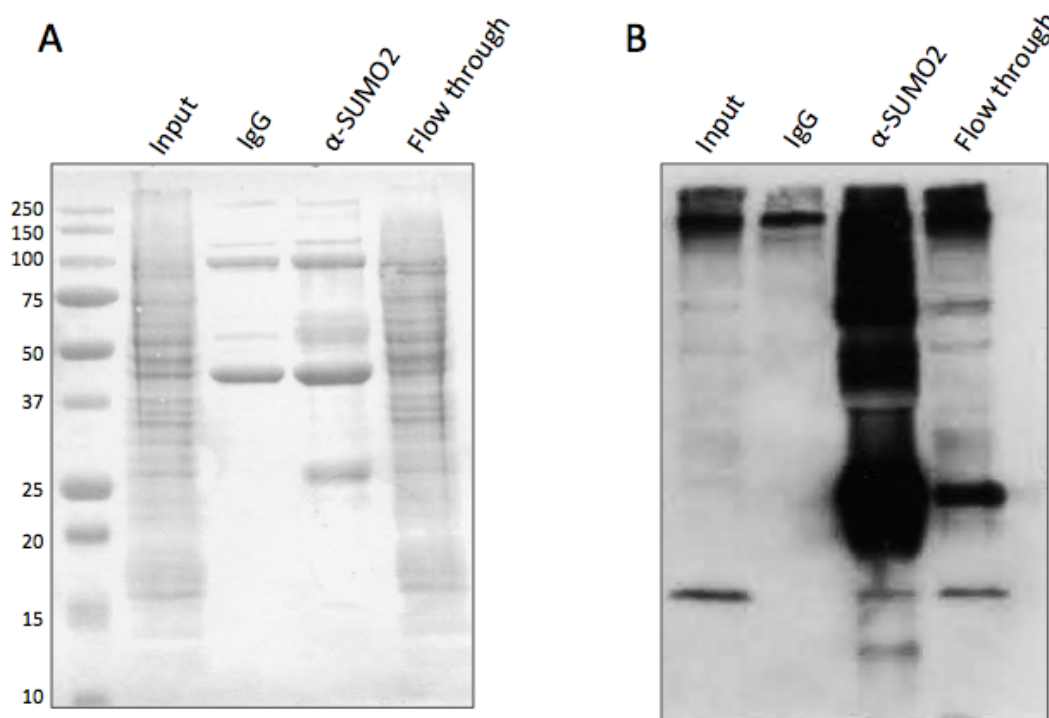


Figura M1: Enriquecimiento de proteínas SUMOiladas con un anticuerpo anti-SUMO 2:
(A) Tinción con coomasie **(B)** Western blot anti-SUMO 2

6.1.3 Espectrometría de masa

Las proteínas precipitadas con anticuerpo anti-SUMO2 o IgG (control) fueron resueltas en SDS-PAGE seguido de tinción con azul de coomasie. Cada calle fue cortada en porciones iguales antes de ser sometida a digestión por tripsina. Los péptidos fueron analizados por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa (LC-MS) bajo condiciones estándar en un equipo LTQ orbitrap XI (ThermoFisherScientific). Las proteínas fueron identificadas asignando los espectros contra la base de datos Unipro usando Mascot como motor de búsqueda. Este protocolo fue realizado en el Instituto Max Planck (Gottingen, Alemania) con la colaboración del Dr Hening Urlaub.

6.2 Líneas celulares

Las células HEK 293T (ATCC #CRL-11268) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 4,5 g/L glucosa, 110 mg/L piruvato de sodio y antibióticos (100 U/ml final de penicilina y 100 µg/ml final de estreptomina). Ocasionalmente, para utilizar el medio completo con posterioridad a las dos semanas de preparación, se agregó también L-glutamina en una concentración final de 2,9 g/L. Antes de que las células alcancen la confluencia total, se aspiró el medio de cultivo y se colocó 1 ml de tripsina 2,5 % p/v. Luego de incubar a 37°C unos dos o tres minutos, se detuvo la reacción con 9 ml de medio completo, se re-plaqueó entre 1/5 y 1/20 del volumen a una nueva placa de plástico de 10 cm y se llevó a 12 ml de volumen final con medio completo. Cuando fue necesario, las células fueron congeladas en N₂ líquido y descongeladas siguiendo protocolos convencionales. Las células HeLa (ATCC #CCL-2) fueron mantenidas de la misma manera pero en medio carente de piruvato de sodio.

6.2.1 Transfecciones con ADN

Las células HEK 293T (5×10^5) o HeLa ($2,5 \times 10^5$) fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con 6 ml de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 2 µg de ADN total, o bien en placas de 24 pocillos con 1,2 ml de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 400 ng de ADN total por pocillo. A continuación se describe brevemente el protocolo de transfección con lipofectamina utilizado en nuestro laboratorio, ejemplificando con las cantidades de los reactivos adecuadas para pocillos de 35mm:

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

Se colocan 6 µl de lipofectamina 2000 en un tubo polipropileno de 5 ml con tapa que contiene 250 µl de Opti-MEM y se incuba por 5 min.

Se transfiere el contenido del tubo *ependorf* al tubo con lipofectamina 2000 y se mezcla vigorosamente.

Se incuba 20 minutos para que se formen los complejos entre el poli-cation y el ADN.

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

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

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

Luego se aspira el medio para eliminar la lipofectamina 2000, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.

6.2.2 Transfecciones con ARN

Para los experimentos de ARN de interferencia, las células HEK 293T (5×10^5) o HeLa ($2,5 \times 10^5$) fueron transfectadas en placas de cultivo de 35 mm con 3 ml Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y 10-25 nM siRNA. El procedimiento es el mismo que el detallado para la transfección con ADN.

6.2.3 Purificación de proteínas conjugadas a His-SUMO o His-Ub

Células HEK 293T (1×10^6) fueron plaquedas en placas de 35mm y 24 h más tarde transfectadas de acuerdo con el protocolo arriba indicado con vectores de expresión para SUMO1, SUMO2 o Ubiquitina fusionadas a una hexada de Histidina (His) . Alternativamente, se usaron células HeLa transfectadas establemente para dichas construcciones. Luego de 48 h, las células fueron lavadas con PBS y se tomó el 5% como alícuota *input* (correspondiente a lisado total) y se le agregó directamente *cracking buffer* 2X. El resto se lisó en 1 ml de *buffer* de extracción. Los lisados fueron sonicados brevemente para disminuirles la viscosidad y se les agregó 40 ml de la resina Ni^{2+} -NTA (QIAGEN). Luego de incubar con rotación durante 4 h, los tubos fueron centrifugados a 5.000 g por 5 min y se descartó el sobrenadante. La resina obtenida en el precipitado fue resuspendida en 0,75 ml de *buffer* de extracción y el contenido fue transferido a un tubo *ependorf*. Luego de 5 min de incubación con rotación, las muestras fueron centrifugadas por 10 seg a 13.000 g y se descartó el sobrenadante. Luego, se repitió este procedimiento de lavado utilizando secuencialmente los *buffers* Urea I,

Urea II y Urea III. Posteriormente, se eluyeron las proteínas unidas a la resina incubando por 20 min con 40 µl de *buffer* de elución (Figura M3).

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

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

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

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

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

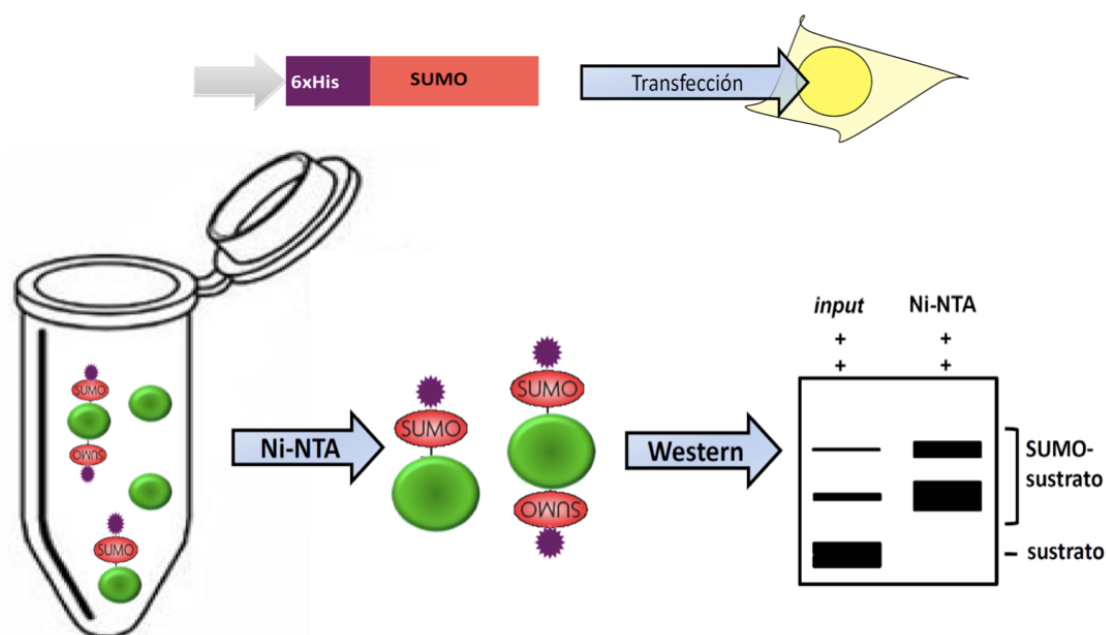


Figura M3: Esquema del método utilizado para la detección de proteínas SUMOiladas.

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

6.2.4 Co-Inmunoprecipitación

Células HEK 293T (3×10^6) fueron cosechadas en PBS frío 24-36 horas luego de ser transfectadas. Fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, β -glicerofosfato 5 mM, KF 5 mM, glicerol 10%, e inhibidores de proteasas [Complete, Roche]). Luego de una incubación de 30 minutos a 4°C, las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes (lisados celulares) fueron utilizados para los ensayos de co-inmunoprecipitación según se detalla a continuación. Se utilizaron 2 μ g de anti-T7 (Novagen) más 30 μ l de Proteína G acoplada a *Dynabeads* (Invitrogen). Luego de incubar 1-2 horas a 4°C, el *pellet* fue lavado 4 veces con *buffer* de lisis. Los inmunoprecipitados fueron resuspendidos en *Laemmli sample buffer* 2X.

6.2.5 Inmunoprecipitación de complejos RNP (RIP)

Las células fueron lisadas en *buffer* RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% (v/v) NP-40, 0.5% (w/v) deoxicolato de sodio, 0.05% (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, inhibidor de proteasas (Complete, Roche) y RNasin (Promega). Los extractos fueron sonicados con un equipo *Bioruptor* a amplitud alta durante 3 pulsos de 30 seg y el material insoluble fue precipitado por centrifugación. El sobrenadante fue *pre-clareado* con proteína G-sefarosa durante 30 min a 4°C antes de agregar anticuerpo anti-T7 para incubación *overnight*. Al día siguiente, los complejos fueron incubados con proteína G-sefarosa durante 4 horas seguido de 3 lavados con *buffer* RIPA. La mitad del volumen de cada precipitado fue analizada por western blot con anticuerpo anti-T7 y el resto sometido a extracción de ARN y RT-qPCR. Los oligonucleótidos (*primers*) dirigidos contra los snRNAs se encuentran en la lista de oligonucleótidos utilizados. Para cada ARN analizado, se obtuvo la relación promedio entre el ARN precipitado y el input para tres experimentos independientes.

6.2.6 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Las células fueron *crosslinkeadas* con 1% de formaldehído (v/v), lavadas dos veces con PBS frío y recolectadas. Los precipitados fueron resuspendidos en 2 ml de buffer de lisis (1% w/v SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,1) conteniendo inhibidor de proteasas (Complete, Roche) e incubados durante 10 min en hielo. Los extractos fueron sonicados con un sonicador *Branson W-450* a una amplitud del 30% con 5 pulsos de 10 sec, resultando en fragmentos de cromatina de aproximadamente 500 pb, y posteriormente centrifugados a 12.000 g por 10 min. Una alícuota de 50 µl fue reservada para *input* y el resto fue diluido 1/10 en buffer de ChIP (0,01% w/v SDS, 1,1% v/v Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HC pH 8,1, 167 mM NaCl e inhibidor de proteasas -Complete, Roche-). La solución de cromatina fue *pre-clareada* a 4°C con Protein G Dynabeads® (Invitrogen) durante 1 hora antes de incubarla *overnight* a 4°C en presencia de anticuerpo anti-T7. Al día siguiente, los complejos fueron incubados con Protein G Dynabeads® (Invitrogen) durante 1 hora a 4°C y luego las *beads* fueron lavadas en rotador a 4°C, una vez con cada uno de los siguientes buffers: Buffer de lavado de baja sal (0,1% w/v SDS, 1% v/v Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, 150 mM NaCl), buffer de lavado de alta sal (igual al de baja sal pero con 500 mM NaCl) y buffer de lavado con LiCl (0,25 M LiCl, 1% v/v NP-40, 1% w/v deoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1), y luego dos veces con buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Los complejos fueron eluidos en 1% (p/v) de SDS y 50 mM NaHCO₃ y el *crosslinking* fue revertido mediante incubación a 65°C durante 6 horas. Las muestras fueron digeridas con proteinasa K durante 1 hora a 45°C y el ADN fue extraído con el kit de purificación de PCR de Qiagen. El ADN obtenido fue cuantificado por qPCR con los *primers* indicados en la lista y normalizado a los valores de *input* para tres experimentos independientes.

6.3 Western blot y anticuerpos utilizados

Las muestras proteicas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y posteriormente transferidas a membranas de polivinilidenofluoruro (PVDF, GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas por una hora en una solución que contenía 5% leche descremada en TBS más 0,1% tween-20 (TTBS). Posteriormente, se agregó la dilución apropiada del anticuerpo primario, en la misma solución de bloqueo, y se incubó 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios

correspondientes, acoplados a peroxidasa (Biorad) en solución de bloqueo. Luego de 4 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS, las membranas fueron incubadas con el reactivo *ECL plus* y expuestas a films *Hyperfilm ECL* (GE Healthcare). En algunos casos se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos y el revelado se llevó a cabo con un scanner de fluorescencia LI-COR Odyssey® CLx. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron: anti-SUMO2 8A2 (provisto por el laboratorio de N. Brose), anti-T7 (Novagen), anti-60K/Prp4, anti-SF3a120, y anti-Snu114 (provistos por el laboratorio de R. Lührmann).

6.4 Preparación de plásmidos

6.4.1 Transformación de bacterias

Para preparar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl₂ y otras sales. Con este protocolo, se obtienen bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10⁶ UFC/ μ g. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan (Hanahan 1983).

Alternativamente, se prepararon bacterias electrocompetentes en los casos en que se necesitó una mayor eficiencia de transformación (1.10⁷-1.10⁹ UFC/mg ADN).

6.4.2 Preparación de plásmidos

Preparación de plásmidos a pequeña escala o minipreps

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

Preparación de plásmidos a gran escala o maxipreps

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

6.4.3 Cuantificación de los plásmidos

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

6.5 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

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

<i>Buffer</i> PCR para Pfu ADN Polimerasa	5 µl
Plásmido templado	50 ng
Primer Fw	125 ng
Primer Rev	125 ng
dNTPs 10 mM	1 µl
<i>PfuTurbo</i> ADN polimerasa (2.5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	c.s.p. 50 µl

La reacción de PCR consistió en:

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	30 seg
18	94	30 seg
	55	60 seg
	72	60 seg/kb de templado
1	72	10 min

Para la digestión, 1 µl de la enzima de restricción Dpn I (NEB) fue agregada a cada reacción de amplificación e incubada durante 3 horas a 37°C. Bacterias competentes químicas de la cepa DH5α de *Escherichia coli* fueron transformadas con 5 µl de la reacción de digestión. Finalmente la mutagénesis fue corroborada por secuenciación de algunos de los clones obtenidos (Macrogen Inc.) (Figura M4).

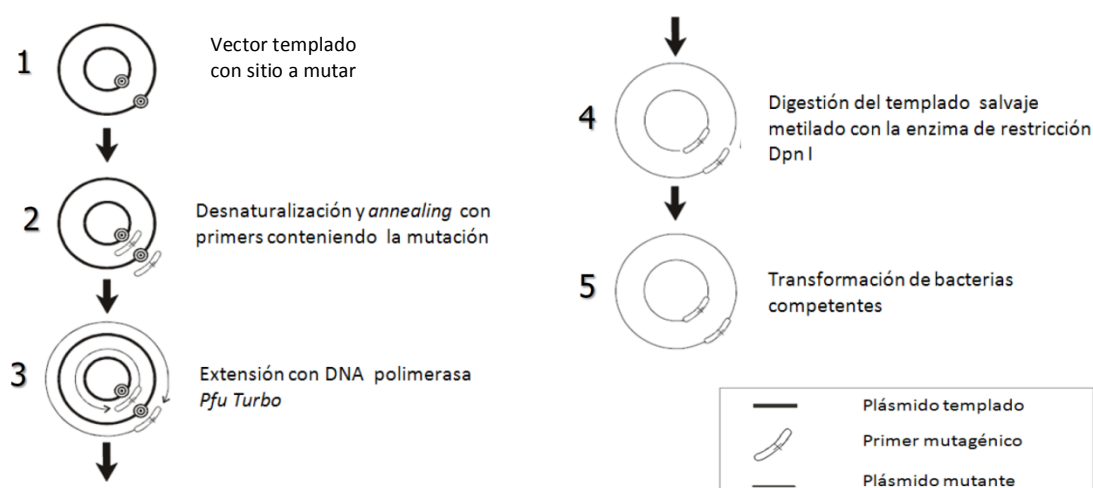


Figura M4: Esquema experimental del método de mutagénesis mediada por Dpn I. Adaptado de *Pfu DNA polymerase Agilent Technologies*.

6.6 ARN, Transcripción Reversa (RT) & PCR

6.6.1 Purificación de ARN

Para obtener ARN total de las células transfectadas, se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen) o TRI Reagent (MRC), siguiendo los protocolos provistos por cada fabricante. Cabe aclarar que

todos los reactivos utilizados deben estar libres de RNasas. El medio de las células es aspirado completamente para que no queden restos de líquido, para luego agregar 500 µl de Trizol a cada pocillo con células. A continuación, el lisado de células es levantado con pipeta y transferido a un tubo *ependorf* al que se le agrega 100 µl de cloroformo y se agita con un vortex. Luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga 15 min a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C. La fase acuosa (superior) es transferida a un nuevo tubo *ependorf* y mezclada con un volumen (500 µl) de isopropanol por agitación con vortex para su posterior precipitación. Luego de incubar al menos 2 hs a -20°C, se centrifuga 30 min a 10.000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante es descartado por volcado y el precipitado es lavado con 500 µl de etanol 80% v/v. Luego de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifuga 20 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente para disminuir la cantidad de sales precipitadas. El sobrenadante se descarta por volcado y se aspiran por completo los restos de etanol. Se deja secar el *pellet* al aire, se le agrega 20 µl de agua y se congela a -20°C. Para resuspender el RNA, se descongela en un baño de agua a 50°C durante 5 min y se agita vigorosamente con un vortex. Se puede controlar la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje relativamente alto y por poco tiempo, para evitar la degradación durante la corrida. En una preparación adecuada de ARN total, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA.

6.6.2 Transcripción reversa (RT)

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

Se desnaturalizan 5 µl de RNA colocándolo 5 min a 65°C.

Se transfiere el tubo inmediatamente a hielo para impedir la re-naturalización.

Se agregan 15 µl de mezcla de reacción a cada tubo.

La mezcla de reacción está compuesta de la siguiente manera:

4 µl de *buffer* de RT 5X

2 µl de DTT 100 mM.

0,25 µl de dNTPs 25 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

0,5 µl de inhibidor de RNasas 40 U/µl.

0,5 µl de oligo dT 100 µM (oligo de 12-18 nucleótidos).

1,5 µl de enzima M-MLV RT 200 U/µl.

H₂O c.s.p. 15 µl.

Se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo(dT) pueda aparearse a las colas de poli(A) de los ARN mensajeros poli-adenilados.

Se incuba 1 h a 35°C para que ocurra la reacción.

Se detiene la reacción incubando 5 min a 95°C.

6.6.3 PCR en tiempo real

2,5 µl de una dilución 1:20 de la reacción de RT que contiene el ADNc son utilizados como molde para la reacción de PCR. La curva estándar es realizada mediante 8 diluciones seriadas al medio partiendo de una dilución 1/4 de un *pool* de las muestras. A cada tubo de ADNc se le agrega 22,5 µl de *mix* que estará compuesta de la siguiente manera:

Buffer PCR	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µl
Primer Fw 20 µM	0,5 µl
Primer Rev 20 µM	0,5 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Taq ADN polimerasa (5 U/µl)	0,15 µl
Sybr Green	0,025 µl
H ₂ O c.s.p.	20 µl

La reacción de PCR consistió en:

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	92	2 min
40	94	15 seg
	60	15 seg
	72	20 seg
1	72	5 min

6.7 Lista de primers utilizados

		FW	REV
MUTAGENESIS	K244R	GCATTGCTCCCCGAGGGTGGAGTTAAAAG	CTTTTAACTCCACCCTCGGGGAGCAATGC
	K289R	GCCAATATTCGTGCTGTGAGGAGGAACAATTCAAGC	GCTTGAATTGTTCCCTCCTCACAGCACGAATATTGGC
	K376R	CCCTCATTGCTCCTAGGAAGGAGCTAAAGG	CCTTTAGCTCCTCCTAGGAGCAATGAGGG
	K559R	CCCAGCCAAGAAGTTCAGGATTGAAGCCAATGC	GCATTGGCTTCAATCCTGAACCTCTTGGCTGGG
	90E291A	CGTGCTGTGAAGAGGGCACAATTCAAGCAAC	GTTGCTTGAATTGTGCCCTCTTCACAGCACG
	90E561A	CAAGAAGTTCAAGATTGCAGCCAATGCTGGGC	GCCCAGCATTGGCTGCAATCTTGAACCTCTTG
SPLICING EFFICIENCY AND CHIP	MINX pre-mRNA	CCCGTCGGCCTCCGAACGGT	GGGTACGCCATGGGCTAGC
	MINX mRNA	CCGTCGGCCTCCGAACGCTC	GGGTACGCCATGGGCTAGC
	HSPCB pre-mRNA	GGTACTTGGTGTGGCAAGGA	AGGAACTGCAGCATTGGGTT
	HSPCB mRNA	AACCGCCCTGCTATCTTCTG	AACTGCAGCATTGGGTTCTC
	Intron 11		
	HPRT1 pre-mRNA	GGTACTTGGTGTGGCAAGGA	AGGAACTGCAGCATTGGGTT
	HPRT1 mRNA	AACCGCCCTGCTATCTTCTG	AACTGCAGCATTGGGTTCTC
	Intron 3		
	RPS9 pre-mRNA	ACGGCGTCTGTTTGAAGGTG	TGGAACAGAGGCAACAGAAAGG
	RPS9 mRNA	CTCCGGAACAAACGTGAGGT	CATCTTGCCCTCATCCAGCA
	Intron 3		
	Akt1 pre-mRNA	TGTCGCTGGCCCTAAGAAAC	CTTGAGGAGGAAGTAGCGTGG
	Akt1 mRNA	TTGTGAAGGAGGGTTGGCTG	CTCACGTTGGTCCACATCCT
	Intron 2		
	TBP pre-mRNA	ACATGTGGTGTATGCAATCCT	CGTGGTTCGTGGCTCTCTTA
	TBP mRNA	AGACCATTGCACTTCGTGCC	AAATCAGTGCCGTGGTTCTGT
	Intron 5		
	ACTB pre-mRNA	AGCACAAATGAAGATCAAGGT	GAAGGGGACAGGCAGTGAGG
	ACTB mRNA	AGCACAAATGAAGATCAAGAT	ATTGCGGTGGACGATGGAG
	Intron 5		
RNP IP	GAPDH pre-mRNA	ATCGTGGAAGGACTCATGGT	CCCTCCCCACCTTGAAAGGA
	GAPDH mRNA	ATCGTGGAAGGACTCATGAC	GCAGGGATGATGTTCTGGAG
	Intron 7		
	RPS26 pre-mRNA	AAGCGAGCGTCTTCGATGGT	GGAAATTGCCTGAGAGGCTC
	RPS26 mRNA	AAGCGAGCGTCTTCGATGCC	GCAGGTCTAAATCGGGTGG
	Intron 2		
siRNA	U2 snRNA	TTCTCGGCCTTTTGGCTAAG	CTCCCTGCTCCAAAAATCCA
	U4 snRNA	GCCAATGAGGTTTATCCGAGG	TCAAAAATTGCCAATGCCG
	U5 snRNA	GGTTTCTCTTCAGATCGTATAAATC	CTCAAAAATTGGTTTAAGACTCAGA
	U6 snRNA	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTGCGT
		sense	antisense
siRNA	siPrp3 #1	UGAGUCAGCCUGGUGUUGCCUUUA	UAAAGGGCAACACCAGGCUGACUCA
	siPrp3 #2	CCCACUUGUUUGUGUGAUCUCAGAA	UUCUGAGAUACACAAACAAGUGGG
	siPrp3 #3	CACUGGGACAAAGGGAGAAUAUCUU	AAGAUUUUCUCCUUUGUCCAGUG

7. RESULTADOS

Análisis proteómicos realizados más de una década atrás, identificaron a PIAS1, una E3 ligasa de SUMO, entre las proteínas que co-purifican con el spliceosoma, sugiriendo una posible conexión entre la maquinaria de SUMO y el proceso de splicing. Además, fue reportado que la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 está presente en sub-compartmentos o cuerpos nucleares enriquecidos en factores de *splicing* denominados *speckles* en ovocitos murinos, y la proteasa de SUMO USPL1 se localiza en cuerpos de Cajal, una localización compartida con el péptido SUMO1 en neuronas. Tal como se menciona en otras secciones, nuestro laboratorio describió una nueva función del factor de *splicing* SRSF1 como regulador de la conjugación de SUMO en células de mamífero. En conjunto, estos datos nos llevaron a postular que SRSF1 podría actuar como un co-regulador de la cascada de SUMO para modificar la especificidad y eficiencia de la conjugación de SUMO a proteínas involucradas en el proceso de splicing.

7.1 La SUMOilacion afecta la eficiencia del proceso de splicing en células en cultivo

Teniendo en cuenta las múltiples evidencias bibliográficas que apuntan a una posible conexión entre las maquinarias de SUMO y splicing, nos propusimos medir la eficiencia de splicing en células en cultivo luego del silenciamiento de la enzima E2 conjugadora Ubc9 o, alternativamente, de la sobre-expresión de la proteasa de SUMO SENP1. La eficiencia de splicing fue determinada mediante la medición de los pre-ARNm y ARNm de diversos genes *house-keeping* por PCR en tiempo de real (Figura R1A). Elegimos diversos genes de expresión constitutiva, entre ellos RPS9 que codifica para la proteína ribosomal S9 (*Ribosomal Protein S9*). Ambos tratamientos incrementan la eficiencia de splicing del pre-ARNm de RPS9 (Figura R1B y R1C), consistente con la idea de que la SUMOilación modula de alguna manera la eficiencia de *splicing*. En la figura 1E, se observa claramente cómo los niveles de SUMOilación globales en el lisado celular disminuyen con el silenciamiento de Ubc9. Sin embargo, podemos suponer que estas condiciones afectan a una gran cantidad de blancos dentro de la célula, y por ende podría tratarse de efectos indirectos sobre el proceso de

splicing. En base a esto, decidimos utilizar un sistema de *splicing in vitro* para enfocarnos específicamente en la SUMOilación de proteínas spliceosomales.

Cabe destacar que hemos analizado los niveles de SUMOilación de los lisados celulares con un anticuerpo anti-SUMO2. En un primer momento nos propusimos indagar acerca de los niveles de conjugación de las isoformas de SUMO 1, 2 y 3. Sin embargo, en repetidas ocasiones hallamos un patrón de SUMOilación más intenso utilizando SUMO2, y a veces casi indetectable con SUMO1, lo cual nos llevó a postular que SUMO2 se expresaba aproximadamente 40 veces más que SUMO1 y que las diferencias de niveles de SUMOilación con los distintos SUMOs podrían deberse a esta causa y no a una afinidad diferencial de las proteínas por las distintas isoformas de SUMO. En base a esto y con el fin de facilitar la detección, optamos por emplear SUMO2 tanto para detección endógena como para los ensayos de sobre-expresión que se sucederán más adelante en esta tesis, sin que esto signifique que resultados similares puedan o no reproducirse con alguna de las restantes isoformas.

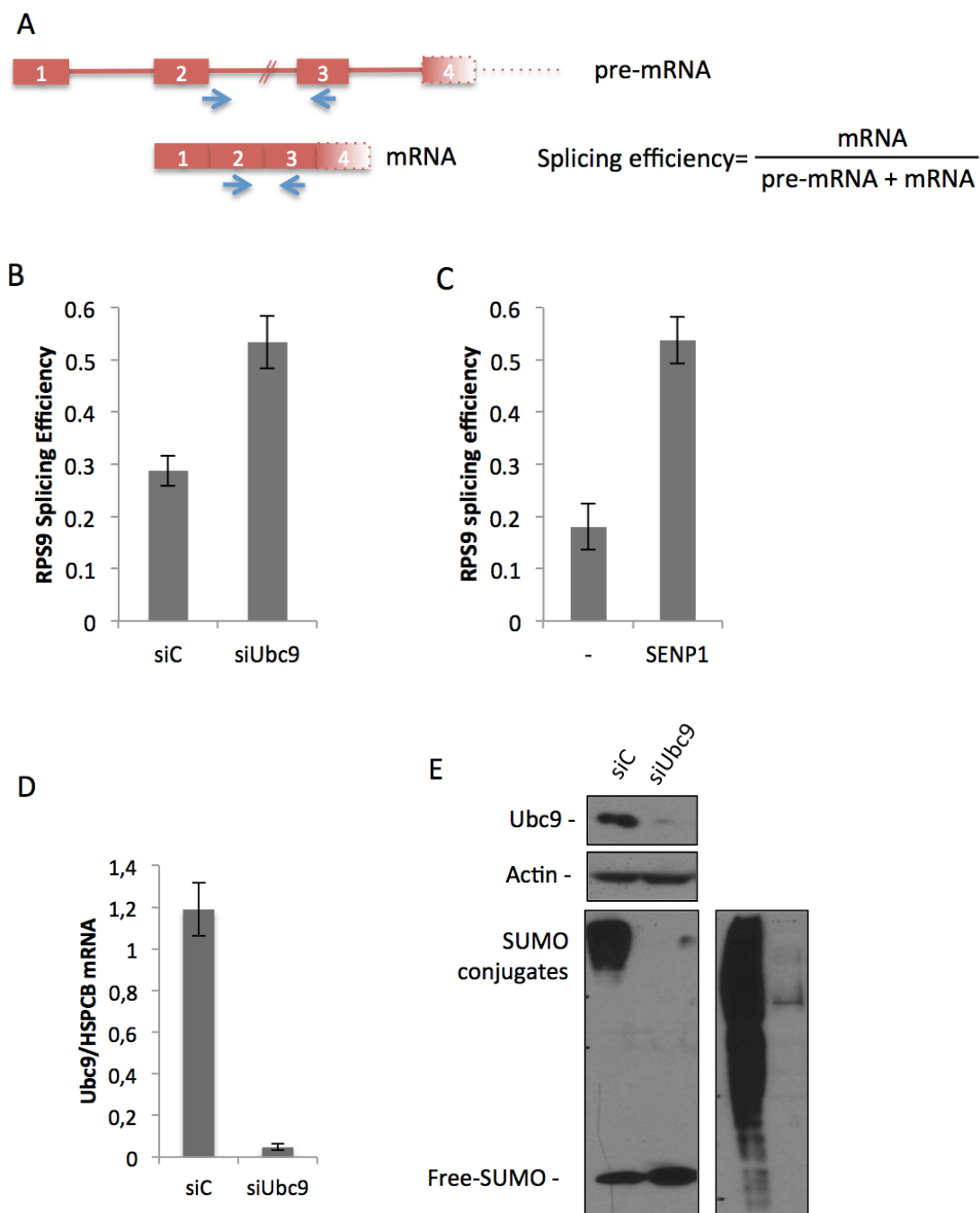


Figura R1: Eficiencia de splicing en el contexto del silenciamiento de la enzima E2 conjugadora de SUMO Ubc9 o la sobre-expresión de la proteasa de SUMO SENP1 en células en cultivo: Células HeLa fueron transfectadas con un siRNA dirigido contra Ubc9 (o su control) o un vector de expresión de SENP1 y luego de 72 horas se extrajo el ARN total y se lo sometió a RT-qPCR (**B y C**). Los primers utilizados para distinguir pre-ARNm de ARNm en el gen de RPS9 se encuentran indicados en el esquema superior, calculando la eficiencia de splicing de acuerdo a la formula indicada (**A**). El silenciamiento de Ubc9 fue monitoreado por RT-qPCR (**D**) y WB (**E**). En este último caso, los niveles de SUMOilación fueron analizados con un anticuerpo anti-SUMO2, utilizando diferentes porcentajes de SDS-PAGE, 12% y 6% (panel izquierdo y panel derecho, respectivamente).

7.2 La SUMOilacion afecta la eficiencia de splicing de un pre-ARNm reportero *in vitro*

Para estudiar el efecto de la SUMOilación de proteínas spliceosomales en el proceso de splicing, realizamos reacciones de splicing *in vitro* con extractos nucleares de células HeLa y un pre-ARNm sustrato ("MINX pre-mRNA") marcado radiactivamente con ^{32}P , que consiste en dos exones separados por un intrón con sitios de splicing canónicos. En la figura R2A se observa la progresión de la reacción de splicing. Antes de comenzar la incubación a 30°C (tiempo 0 de reacción), la única especie observada en la autoradiografía es el pre-ARNm y sigue siendo del mismo modo transcurridos 2 minutos. A los 7 minutos se comienzan a ver el intermediario de reacción que consiste en intrón aún unido al segundo exón mientras que a los 15 minutos ya son claramente apreciable los productos: los dos exones unidos y el intrón escindido en forma de lazo. Por su parte, en el panel B se aprecia el ensamblado de los complejos spliceosomales. En un primer momento, es mayoritario el complejo H, el cual consiste en el pre-ARNm desnudo con unas pocas proteínas asociadas. A los 2 minutos ya es detectable el complejo A, formado por los snRNPS U1 y U2, mientras que a los 7 minutos también se encuentra presente el complejo B. Nótese que la aparición del complejo C correlaciona con la aparición de producto a los 15 minutos, dando cuenta de su carácter catalíticamente activo. La caracterización de la cinética de la reacción de splicing es fundamental para asignar la identidad de los complejos a cada tiempo de reacción, puesto que cada preparación de extracto nuclear puede presentar una cinética distinta.

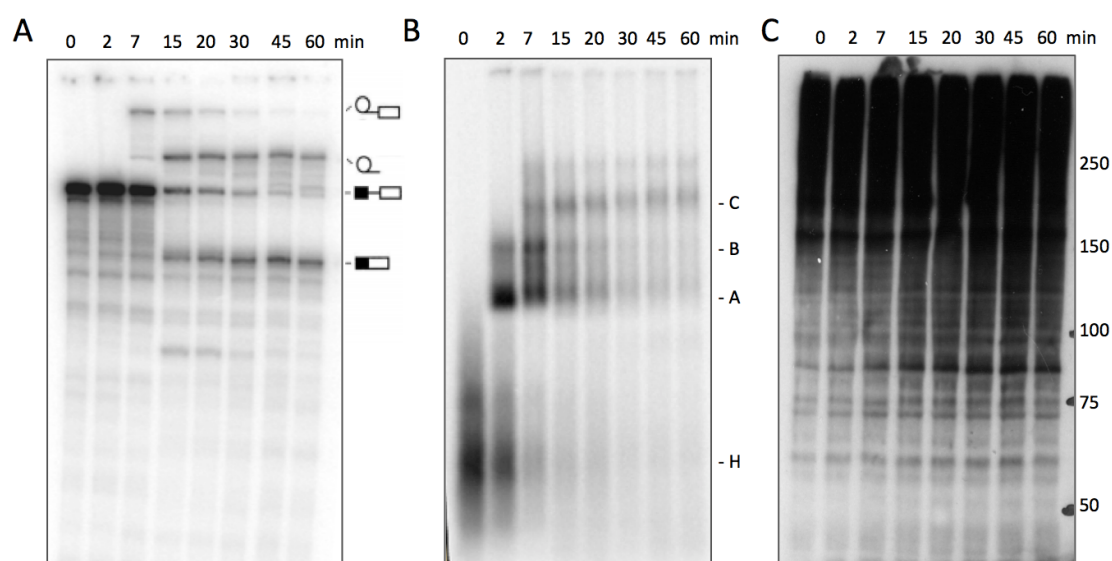


Figura R2. SUMOilación en la reacción de splicing: Extractos nucleares de células HeLa fueron incubados con el pre-ARNm de MINX marcado radiactivamente durante 60 minutos. Los intermediarios y los productos a los distintos tiempos de la reacción de splicing fueron analizados en un gel desnaturizante de poliacrilamida **(A)**, y los complejos spliceosomales mediante un gel de agarosa nativo **(B)**. El pre-ARNm, el intermediario intron-exón 3' y los productos ARNm e intrón; así como también los complejos H, A, B y C se indican a la derecha del panel correspondiente. La SUMOilación de las proteínas nucleares a diferentes tiempos de la reacción de splicing (0-60 minutos) fue analizado por western blot con un anticuerpo anti- SUMO2 **(C)**.

El análisis de la SUMOilación global por western blot evidenció un incremento con el tiempo, sugiriendo que los extractos nucleares presentan actividad SUMOilatoria (Figura R2C) y que las proteínas spliceosomales podrían estar siendo SUMOiladas durante la reacción. Con esto en cuenta, procedimos a alterar los niveles de conjugación de SUMO agregando la proteasa de SUMO SENP1 o la enzima E2 conjugadora Ubc9 a la reacción y evaluamos el efecto de dicha alteración sobre el splicing (Figura R3). Observamos que cuando la conjugación a SUMO era reducida sustancialmente con el agregado de SENP1 (Figura R3C), había una clara disminución de la eficiencia de splicing, evidenciada por una menor generación de los productos de la reacción (ARNm e intrón escindido en forma de lazo) a cada tiempo de la reacción analizado, en comparación con el control (Figura R3A y B). Además, en presencia de SENP1, el intermediario de la reacción empieza a acumularse más tardíamente. Por el contrario, cuando la conjugación a SUMO era favorecida por la adición de Ubc9 (Figura R3C), no se observaron cambios significativos en los niveles de eficiencia de splicing (Figura R3A y B). Estos resultados sugieren un efecto opuesto de la SUMOilación sobre la maquinaria de splicing a aquellos observados en células en cultivo, lo cual evidencia que en cada modelo se pone de manifiesto la consecuencia de efectos ejercidos sobre mecanismos o procesos celulares distintos. Como se mencionó anteriormente, es posible que en cultivo estemos afectando la SUMOilación global de la célula sin poder separar los correspondientes efectos indirectos debido a cambios en la SUMOilación de una gran variedad de proteínas celulares sobre la actividad que queremos testear. Es posible, por ejemplo, que estemos afectando la biogénesis de la maquinaria de splicing, hipótesis que podrá ser testeada a su debida forma. El sistema *in vitro* nos permitió enfocarnos en el proceso de splicing, pero no por ello debemos olvidar las limitaciones del mismo, como lo es el hecho de que el splicing *in vitro* es post-transcripcional y con ello podría estar perdiéndose toda regulación del splicing asociada a la transcripción y en la cual la SUMOilación podría estar también involucrada. Más adelante retomaremos esta discusión. Por el momento, cabe destacar que el hecho de que

la adición de SENP1 inhiba el splicing *in vitro* nos permitió postular un rol para la SUMOilación durante dicho proceso.

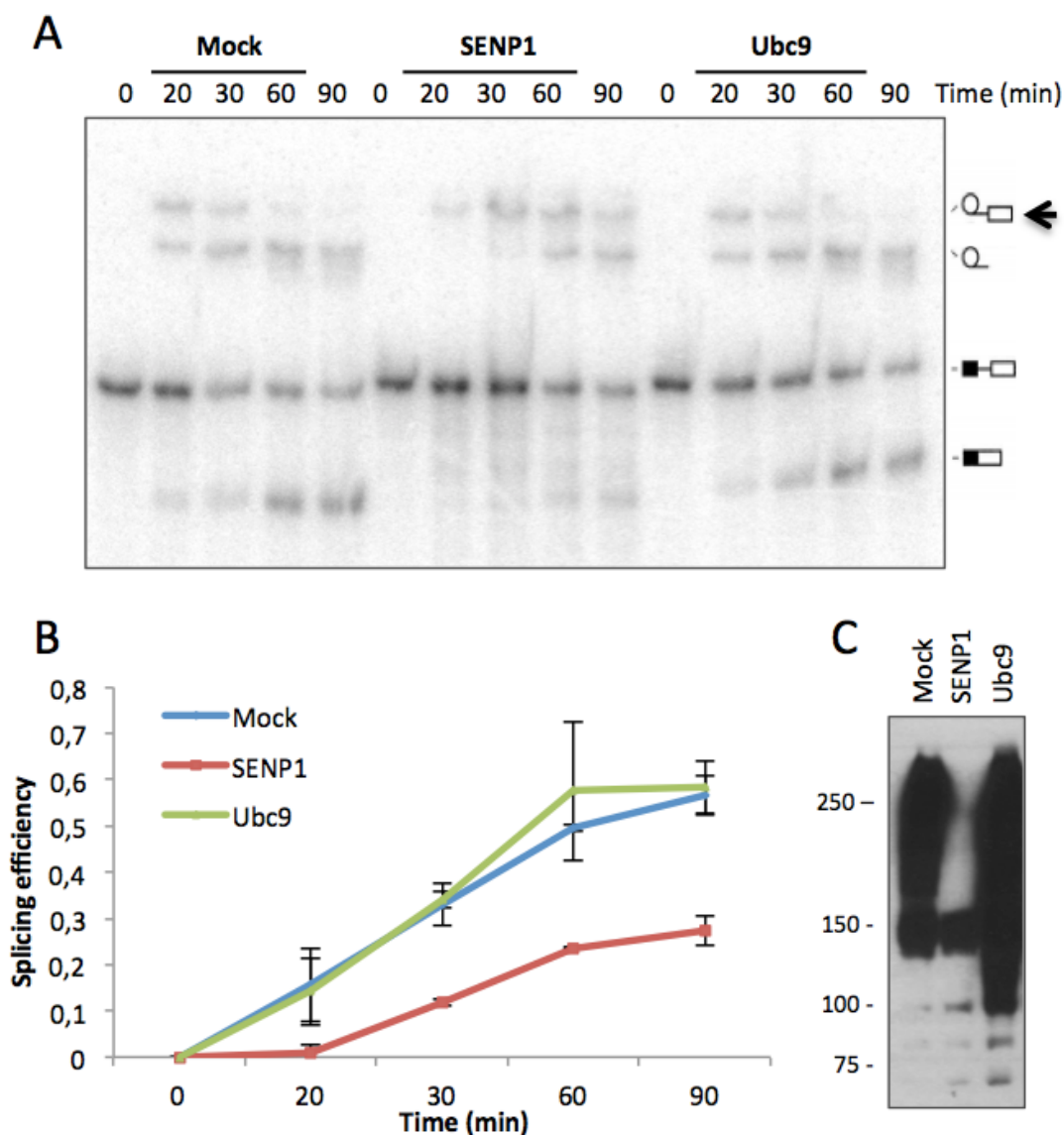


Figura R3. La adición de SENP1 inhibe el splicing *in vitro*: Las reacciones de splicing fueron pre-incubadas con SENP1 o Ubc9 por 10 minutos antes de agregar el pre-ARNm. La flecha negra señala el intermediario intrón-exón 3' acumulándose más tardamente en el tratamiento con SENP1 (**A**). La eficiencia de splicing fue calculada como: productos/(sustrato+intermediarios+productos), en base a la cuantificación de las bandas correspondientes a los tiempos indicados. Las barras de error fueron calculadas a partir de dos experimentos independientes (**B**). El western blot exhibe los niveles de conjugación a SUMO en los extractos nucleares luego de 10 minutos de incubación con SENP1 o Ubc9, antes de la adición del pre-ARNm en el tiempo cero de la reacción de splicing (**C**).

Con el objetivo de indagar un poco más acerca del efecto de los pre-tratamientos del extracto nuclear en la reacción de splicing, cuantificamos el ARNm producido y el pre-ARNm consumido mediante transcripción reversa y posterior PCR en tiempo real y estimamos el parámetro de eficiencia de splicing como función de $\text{ARNm}/(\text{pre-ARNm}+\text{ARNm})$. En la figura R4A, se observa como la eficiencia de splicing aumenta a medida que avanza el tiempo de incubación, con lo que comprobamos la validez de este método para monitorear la reacción de splicing *in vitro* y analizar el efecto de diversos tratamientos. Nuevamente, observamos que la pre-incubación del extracto nuclear a 30°C no tiene efecto, mientras que si se realiza a 42°C la eficiencia del proceso de splicing resulta severamente disminuida. Por otra parte, con respecto a la adición de las enzimas de la vía de SUMOilación, la proteasa SENP1 inhibe en gran medida la eficiencia de splicing (Figura R4B), lo cual no ocurre si dicha proteasa es previamente inactivada por calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Esto da cuenta de que la actividad catalítica de SENP1 es responsable del efecto observado sobre el proceso de splicing. En cuanto a Ubc9, si bien podría decirse que el efecto es ligeramente estimulador, no resulta apreciable, probablemente porque los niveles de SUMOilación basales son suficientes para lograr una elevada eficiencia de splicing, como se observa en el western blot de la figura 3C.

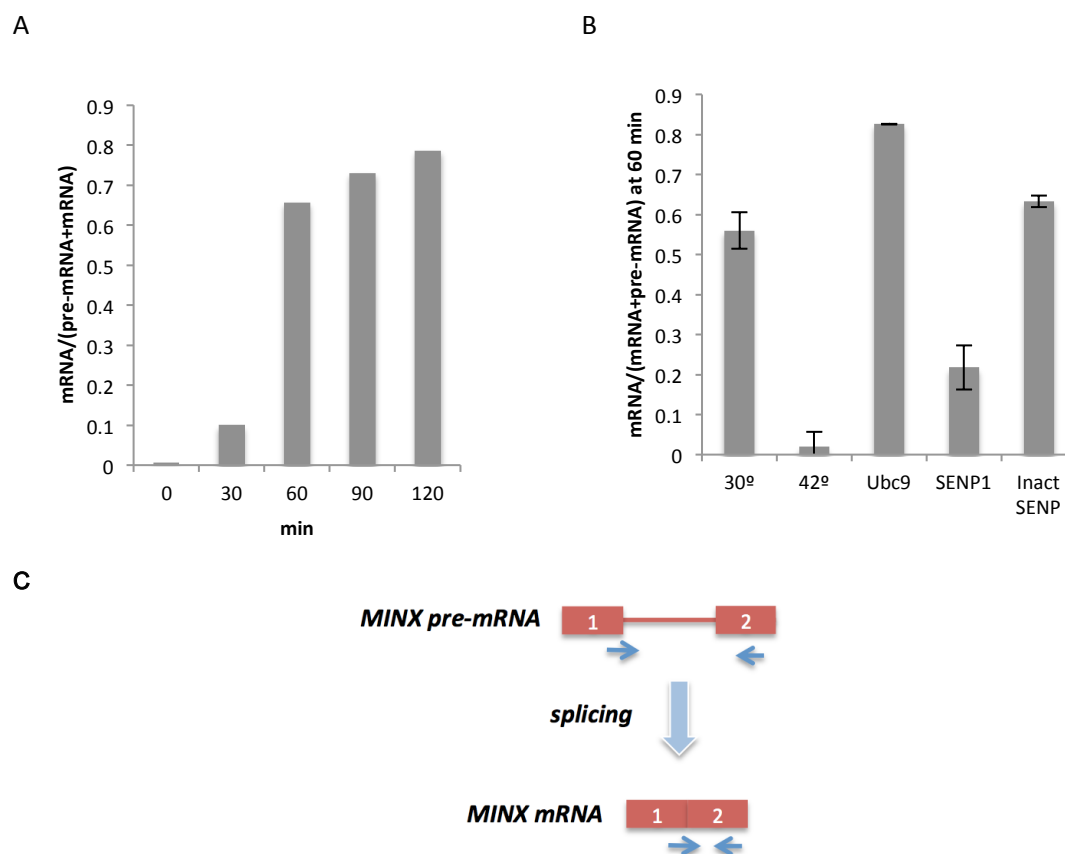


Figura R4: La eficiencia de splicing *in vitro* fue monitoreada mediante RT-qPCR, determinada como el cociente $\text{ARNm}/(\text{pre-ARNm} + \text{ARNm})$ (A). Los niveles de SUMOilación fueron afectados con pre-incubaciones durante 10 minutos como se indica al pie del gráfico y la eficiencia de splicing se midió a los 60 minutos luego de la adición del pre-ARNm. Las barras de error fueron calculadas a partir de triplicados para cada condición (B). Esquema mostrando la ubicación de los *primers* empleados para la detección del pre-ARNm y el ARNm de MINX (C).

7.3 Proteínas spliceosomales son sustrato de SUMOilación

Con el objetivo de evaluar si las proteínas spliceosomales se encuentran SUMOiladas en spliceosomas ensamblados *in vitro*, llevamos a cabo una precipitación o *pull-down* de los complejos spliceosomales a distintos tiempos de la reacción de splicing. Para este propósito, aprovechamos los tres sitios de unión a la proteína de envoltura viral MS2 presentes en el extremo 3' del pre-ARNm de MINX, empleado como sustrato de la reacción. Luego de combinar la proteína recombinante MS2-MBP (*maltose binding protein*) con el pre-ARNm, los complejos spliceosomales se ensamblaron a partir de extractos nucleares de células HeLa y a diferentes tiempos de reacción (de 2 a 90 minutos) fueron purificados con resina de agarosa-amilosa y subsiguiente elución con maltosa.

Los eluatos fueron analizados mediante western blot con un anticuerpo anti-SUMO2 evidenciando que el nivel de SUMOilación de las proteínas asociadas al pre-ARNm aumenta con el tiempo, con un incremento importante entre 2 y 7 minutos, mientras que la SUMOilación en el extracto no parece cambiar (*flow through*) (Figura R5A). El análisis de la formación de los complejos spliceosomales (Figura R5B) y el contenido de ARN de los eluatos (Figura R5C), los cuales reflejan la identidad de los complejos spliceosomales purificados a cada tiempo, indica que a los 7 minutos el complejo B se ha ensamblado como consecuencia de la interacción del tri-snRNP U4/U6.U5 con el complejo pre-spliceosomal A. Teniendo en cuenta las cantidades de pre-ARNm y de snRNA U2, la cantidad de spliceosomas purificados entre 0 y 7 minutos es similar. En este sentido, el incremento en los niveles de SUMOilación observado puede deberse al aumento de la conjugación de SUMO a las proteínas asociadas al pre-ARNm y/o al reclutamiento de proteínas SUMOiladas adicionales con la integración del tri-snRNP al spliceosoma. Estos resultados nuevamente sugieren que las proteínas spliceosomales son activamente modificadas por conjugación de SUMO durante el proceso de splicing.

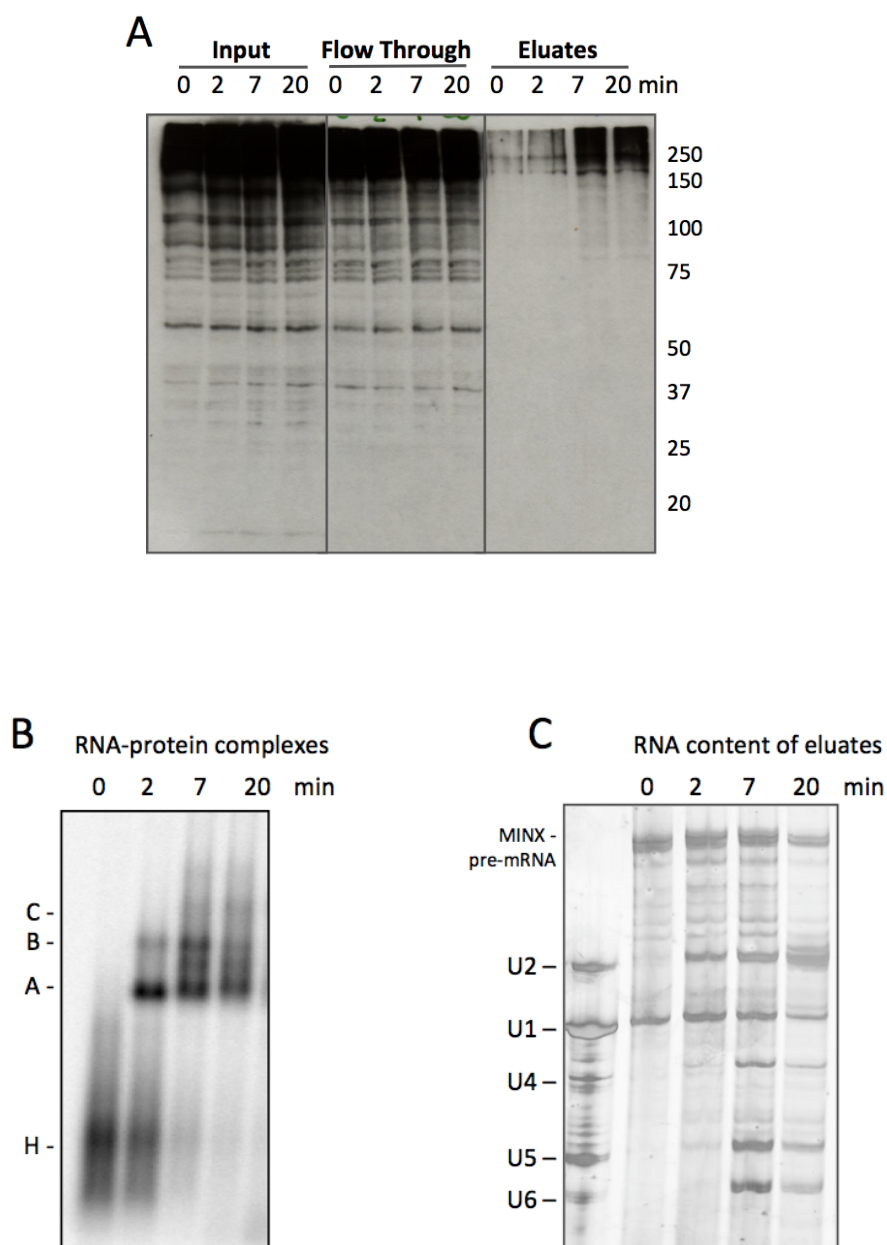


Figure R5. Proteínas SUMOiladas en spliceosomas ensamblados *in vitro*: Reacciones de splicing fueron incubadas en presencia del pre-ARNm MINX conteniendo sitios de unión a MS2, marcado radiativamente, en presencia de MBP-MS2 durante distintos tiempo, de 0 a 90 minutos. Los complejos spliceosomales fueron purificados con resina de amilosa y, luego de ser eluidos con maltosa, las proteínas presentes en los eluates, así como también en el input y flow-through, fueron analizadas mediante western blot anti-SUMO2 (**A**). La cinética de la formación de los complejos spliceosomales fue monitoreada mediante electrophoresis nativa en gel de agarosa (**B**). La composición de ARN de los complejos purificados (snRNAs U1-U6) y los niveles de pre-ARNm MINX fueron analizados mediante PAGE desnaturizante y posterior tinción con plata (**C**).

Para conocer más acerca de potenciales sustratos de SUMOilación entre las proteínas spliceosomales, realizamos una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-SUMO a partir de complejos spliceosomales purificados mediante la estrategia de *pull-down* descrita anteriormente, a diferentes tiempos de la reacción de splicing. Para aislar proteínas individuales pero no sus interactores, los complejos spliceosomales purificados fueron primero sonicados y desnaturalizados con el fin de irrumpir interacciones entre proteínas, mientras que se agregó NEM (N-ethyl maleimide) para inactivar las peptidasas de SUMO, de acuerdo al protocolo descrito en (Becker et al. 2013). Luego, las muestras fueron sometidas a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-SUMO2 o IgG como control. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron luego identificadas por espectrometría de masa (Figura R6).

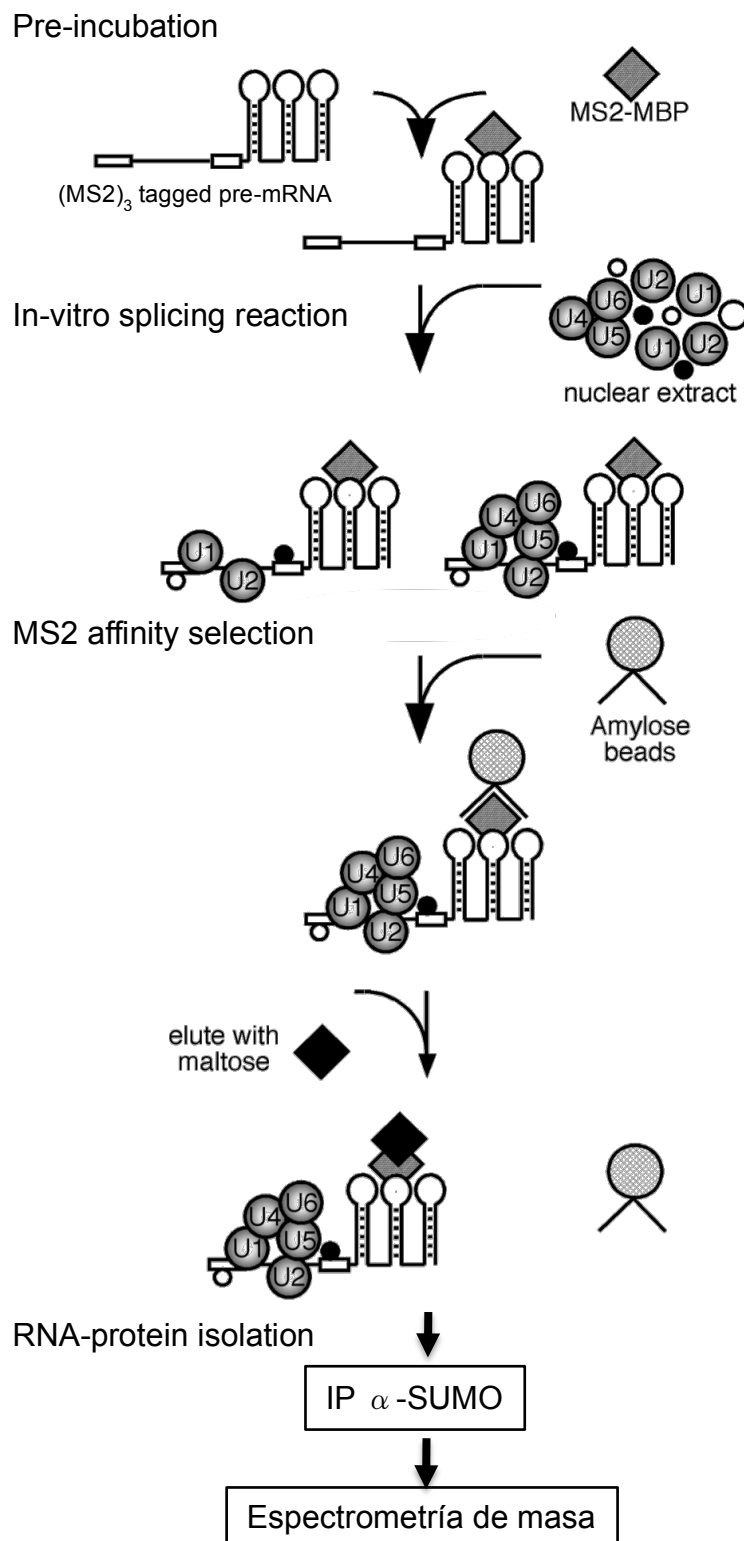


Figura R6: Esquema experimental de la identificación de proteínas spliceosomales SUMOiladas por espectrometría de masa. Figura adaptada de (Deckert et al. 2006).

Diversas proteínas fueron enriquecidas en los precipitados, como se revela en la tinción con *coomassie blue* (Figura R7). Las proteínas spliceosomales enriquecidas con esta estrategia se enumeran en la Tabla R1.

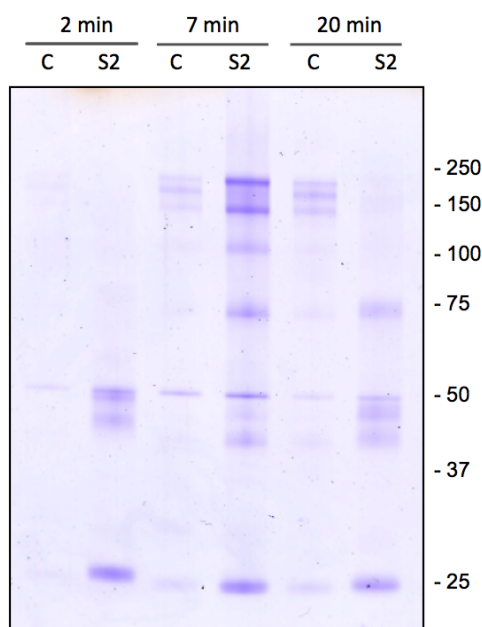


Figura R7: Las proteínas SUMOiladas en los complejos spliceosomales purificados fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-SUMO2 (S2) luego de la disrupción de los complejos, y analizadas mediante SDS-PAGE. Se realizó también la inmunoprecipitación con IgG como control (C).

A continuación se detallan las proteínas identificadas por espectrometría de masa, junto a los datos de nombre del gen, peso molecular y tiempos de reacción en los que fueron detectadas.

Protein Name	Gene name	gi number	MW (kDa)	2 min	7 min	20 min
Sm proteins				SmE		SmB/B' SmD2 SmE SmF
SmB/B'	SNRPB	gi 190247	30			
SmD2	SNRPD2	gi 4759158	14			
SmE	SNRPE	gi 4507129	11			
SmF	SNRPF	gi 61237391	10			
U1 snRNP						U1-70K
U1-70K	SNRNP70	gi 119572836	51			
U2 snRNP						

U2-A'	SNRPA1	gi 50593002	28	U2-A'		U2-A'
SF3a120	SF3A1	gi 5032087	89	SF3a120		SF3a120
SF3a66	SF3A2	gi 116283242	51	SF3a66	SF3a66	SF3a66
SF3a60	SF3A3	gi 119627711	59	SF3a60		SF3a60
SF3b155	SF3B1	gi 54112117	146	SF3b155	SF3b155	
SF3b145	SF3B2	gi 33875399	100			SF3b145
SF3b130	SF3B3	gi 40788938	140		SF3b130	
SF3b10	SF3B5	gi 13775200	10			SF3b10
SF3b14a/p14	SF3B6	gi 7706326	15	SF3b14a/p14		
U4/U6-snRNP						
U4/U6-90K, hPrp3	PRPF3	gi 4758556	78		U4/U6-90K, hPrp3	
U4/U6-60K, hPrp4	PRPF4	gi 189053699	58	U4/U6-60K, hPrp4	U4/U6-60K, hPrp4	
U4/U6-61K , hPrp31	PRPF31	gi 221136939	55		U4/U6-61K , hPrp31	
U5 snRNP						
U5-220K, hPrp8	PRPF8	gi 119610995	274		U5-220K, hPrp8	
U5-200K, hBrr2	SNRNP200	gi 40217847	245		U5-200K, hBrr2	
U5-116K, hSnu114	EFTUD2	gi 12803113	109		U5-116K, hSnu114	U5-116K, hSnu114
U5-102K, hPrp6	PRPF6	gi 24212088	100	U5-102K, hPrp6	U5-102K, hPrp6	
U4/U6.U5 tri- snRNP						
U4/U6.U5- 110K, hSnu66	SART1	10863889	90	U4/U6.U5-110K, hSnu66		
non-snRNP						
CDC5L	CDC5L	gi 11067747	92	CDC5L	CDC5L	CDC5L
SKIP/Prp45	SNW1	gi 34783485	61	SKIP/Prp45		SKIP/Prp45
FBP2	KHSRP	gi 119589502	77			FBP2
Npw38bp	WBP11	gi 194378864	67		Npw38bp	Npw38bp
Prp19	PRPF19	gi 7657381	55	Prp19	Prp19	
Luc7-like 2	LUC7L2	gi 116812577	47	Luc7-like 2		Luc7-like 2
MFAP1	MFAP1	gi 205831094	52			MFAP1
SF2/ASF	SRSF1	gi 730773	28			SF2/ASF
GPKOW, hSpp2	GPKOW	gi 15811782	52	GPKOW, hSpp2	GPKOW, hSpp2	
Smu-1	SMU1	gi 7023065	58		Smu-1	
PSF	SFPQ	gi 119627826	76	PSF	PSF	
hSyf1	XAB2	gi 10566459	100			
Bud13	BUD13	gi 14249338	71			
SF4	SUGP1	gi 158257602	72			
RBM22	RBM22	gi 119582116	47			

hnRNP						
hnRNPA1	HNRNPA1	gi 288558857	33	hnRNPA1		
hnRNPK	HNRNPK	gi 119583080	51		hnRNPK	hnRNPK
hnRNPE1	PCBP1	gi 460771	38		hnRNPE1	hnRNPE1
hnRNPC1/C2	HNRNPC	gi 193785255	32		hnRNPC1/C2	
hnRNPD	HNRNPD	gi 119626277	41	hnRNPD		
hnRNPH	HNRNPH1	gi 119574194	44	hnRNPH		
hnRNPH3	HNRNPH3	gi 14141157	37		hnRNPH3	
hnRNPF	HNRNPF	gi 16876910	46		hnRNPF	
hnRNPM	HNRNPM	gi 55977747	78	hnRNPM		

Tabla R1: Análisis por espectrometría de masas de proteínas spliceosomales y factores de splicing inmunoprecipitados con anti-SUMO2: Se indican los potenciales sustratos de SUMOilación, enriquecidos en la inmunoprecipitación anti-SUMO2 con respecto a IgG.

Muchas de las proteínas de la tabla anterior ya han sido reportadas como posibles blancos de SUMOilación en otros estudios proteómicos. De hecho, consideramos que los trabajos que fueron siendo publicados en el transcurso del desarrollo de esta tesis apoyaron nuestros resultados en reiteradas ocasiones y sumaron evidencia a la importancia de la SUMOilación durante el proceso de splicing. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que las proteínas identificadas se encuentran SUMOiladas en el contexto del spliceosoma en las reacciones de splicing.

La tabla R2 presenta la correlación entre nuestro ensayo de espectrometría de masa y estudios proteómicos previos, identificándose en amarillo las proteínas halladas en este trabajo de tesis.

Spliceosomal proteins		Refs
SNRPD1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1;snRNP core protein D1	1, 2, 4
SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2;snRNP core protein D2	1, 2, 3
SNRPA1	U2 small nuclear ribonucleoprotein A';SNRPA1 protein	1, 2
SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1;SF3a120	2
SF3A2	Splicing factor 3A subunit 2; SF3a66	6, 7
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1	1, 2, 8
SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	2
PRP3	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	2, 4, 7
SART1	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	2, 4, 6
DDX39	ATP-dependent RNA helicase DDX39	1, 3

PRP31;PRPF31	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	3
PRPF4;PRP4	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4/60 kDa protein	2
USP39	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	2, 5, 8
EFTUD2, SNU114	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	1, 2, 6
SNRNP200	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1, 2, 7
PRP8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8;Splicing factor Prp8	1, 2, 5, 6

Auxiliary splicing factors

U2AF2;U2AF65	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	1, 2
U2AF1;U2AF35	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	2

SR proteins

SFRS1;ASF;SF2	Splicing factor, arginine/serine-rich 1;pre-mRNA-splicing factor SF2	1, 7
SFRS3;SRP20	Splicing factor, arginine/serine-rich 3;Pre-mRNA-splicing factor SRP20	1, 2
SFRS7	Splicing factor, arginine/serine-rich 7;Splicing factor 9G8	1
SFRS10;TRA2B	Splicing factor, arginine/serine-rich 10	2

hnRNP proteins

HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1, 2, 3
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	1, 3
HNRNPD;AUF1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	1, 2, 3
HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L;	1, 3, 6, 8
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	1, 6, 8
HNRNPA0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	1, 3
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2, 3
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	3

Tabla R2: Lista de proteínas spliceosomales, factores auxiliares de splicing y proteínas de unión al ARN identificadas como sustratos de SUMOilación en estudios proteómicos previos: Las proteínas identificadas en nuestro estudio se encuentran marcadas en gris.

Las referencias incluídas en esta tabla son:

- 1) Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues (Becker et al. 2013);
- 2) System-Wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock (Golebiowski et al. 2009);
- 3) Proteome-wide Identification of SUMO2 Modification Sites (Tammsalu et al. 2015);
- 4) Identification of SUMOylated proteins in the silkworm *Bombyx mori* (Tang et al. 2014);
- 5) In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice (Tirard et al. 2012);
- 6) A proteomic study of SUMO2 target proteins (Vertegaal et al. 2004);
- 7) System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites (Hendriks et al. 2015);

8) Important role of SUMOylation of Spliceosome factors in prostate cancer cells (Wen et al. 2014).

7.4 Las proteínas spliceosomales son SUMOiladas en células en cultivo

Luego de identificar componentes spliceosomales SUMOilados en spliceosomas ensamblados *in vitro*, nos preguntamos si era posible detectar la modificación de estas proteínas por conjugación de SUMO en células en cultivo. Sabemos que la SUMOilación es una modificación altamente reversible e inestable, lo que dificulta mucho su detección. Para facilitarla, decidimos co-transfectar células HEK 293T con un vector de expresión de SUMO2 fusionado a un *tag* de 6 histidinas (His-SUMO2) y un vector de expresión para Ubc9 (enzima E2 conjugadora de SUMO) o la proteasa de SUMO SENP1. Los extractos proteicos provenientes de dichas células fueron sometidos a una cromatografía de afinidad a Níquel con el fin de enriquecerlos en proteínas SUMOiladas y los precipitados fueron analizados mediante western blot primeramente contra la proteína spliceosomal Snu114, perteneciente al snRNP U5, que había sido detectada como blanco de SUMOilación en nuestro ensayo de espectrometría de masa descrito anteriormente y para la cual contábamos con anticuerpos específicos. Observamos una banda de menor movilidad electroforética que la correspondiente al peso molecular de la proteína, la que aumenta al sobre-expresar Ubc9 y desaparece con SENP1, lo que sería congruente con que se trate de Snu114 conjugada a SUMO (Figura R8A). En concordancia con resultados anteriores de nuestro laboratorio, la sobre-expresión de SRSF1 aumentó la conjugación a SUMO de Snu114 (Figura R8B), mientras que el silenciamiento de SRSF1 por RNA de interferencia (RNAi) la disminuyó (Figura R8C).

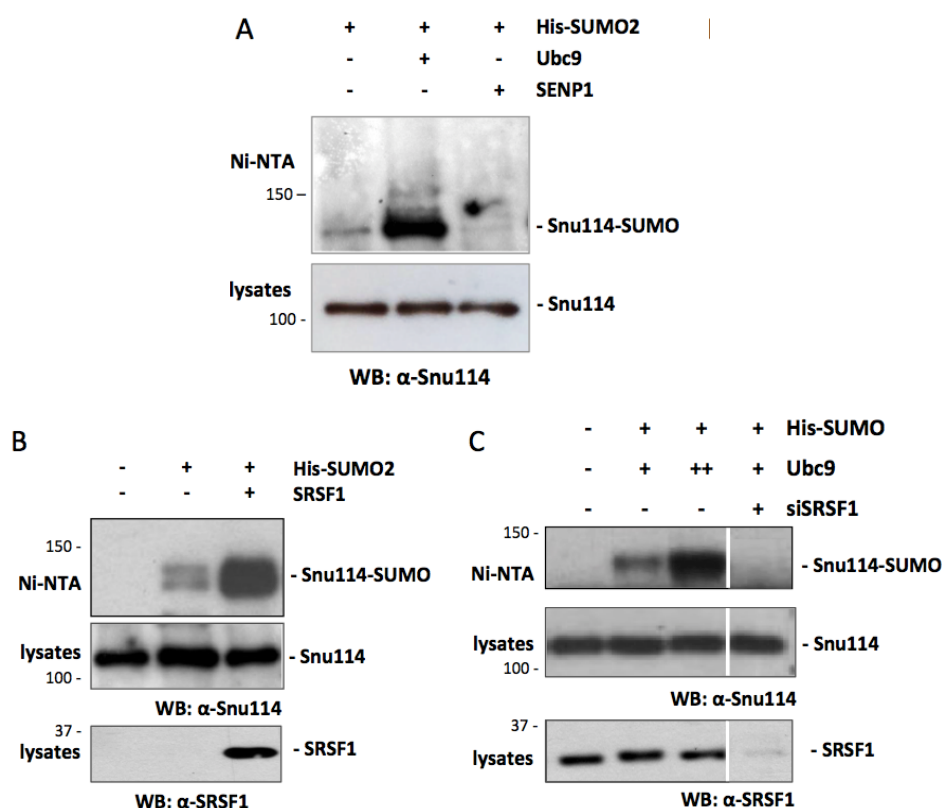
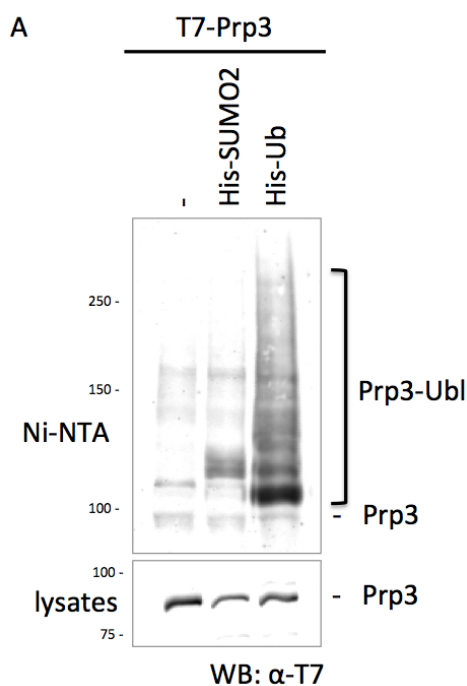


Figura R8: La proteína spliceosomal del snRNP U5 Snu114 es SUMOilada en células en cultivo y su SUMOilación es regulada por SRSF1. Células HEK 293T fueron transfectadas con los siRNAs y/o los vectores de expresión indicados en cada panel. Luego de 48 horas, las células fueron lisadas y sometidas a cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA). Alícuotas de los lisados y los eluatos (Ni-NTA) fueron analizados por western blot con los anticuerpos indicados debajo de cada panel.

A continuación, llevamos a cabo un análisis similar pero en este caso para la proteína spliceosomal Prp3 perteneciente al di-snRNP U4/U6. Esta proteína nos resultaba de especial interés teniendo en cuenta que su ubiquitinación ya había sido reportada como moduladora de la interacción de Prp3 con otra proteína spliceosomal, Prp8, contribuyendo a la estabilización del tri-snRNP. Sin embargo, esta vez los anticuerpos disponibles contra Prp3 no resultaron satisfactorios y decidimos clonarla en un vector de expresión fusionada a la etiqueta T7. Nuevamente se realizaron ensayos de co-transfección de células HEK 293T con el vector de expresión de T7-Prp3 y el vector de expresión de His-SUMO2 o alternativamente de His-ubiquitina, seguidos de preparación de lisados celulares y cromatografía de afinidad a níquel. Se detectaron bandas de menor movilidad electroforética correspondientes a los conjugados de Prp3 a los pequeños péptidos (Figura R9A). Nótese que tanto para los

conjugados a SUMO como a Ubiquitina se observa un patrón de múltiples bandas. La cantidad de bandas y el patrón de corrida de las mismas está determinado por la cantidad de lisinas modificadas, como así también por el número de moléculas de SUMO o Ubiquitina conjugadas en cada sitio. Los patrones observados para Prp3 sugieren o bien que múltiples lisinas han sufrido conjugación o que en un mismo residuo lisina se ha formado una cadena de péptidos de tipo de ubiquitina (poli-SUMOilación o poli-ubiquitinación), siendo más probable el primer caso dado que para el segundo suelen observarse bandas discretas y no una señal extendida como se aprecia en las calles 2 y 3 de la figura R9A.

Diversas son las evidencias que dan cuenta de la conjugación de SUMO a Prp3. En primer lugar, que las bandas de menor movilidad electroforética no se observan en ausencia de transfección de His-SUMO2. En segundo lugar, que esas bandas parecen aumentar en co-transfección con Ubc9 y disminuir con SENP1 (Figura R9B). Por otra parte, para el caso de Prp3 también hemos observado que su conjugación a SUMO es regulada por SRSF1: si bien la sobre-expresión de SRSF1 no parece aumentar la SUMOilación de modo muy drástico (Figura R9B), el silenciamiento de SRSF1 por RNAi sí la reduce notoriamente (Figura R9C).



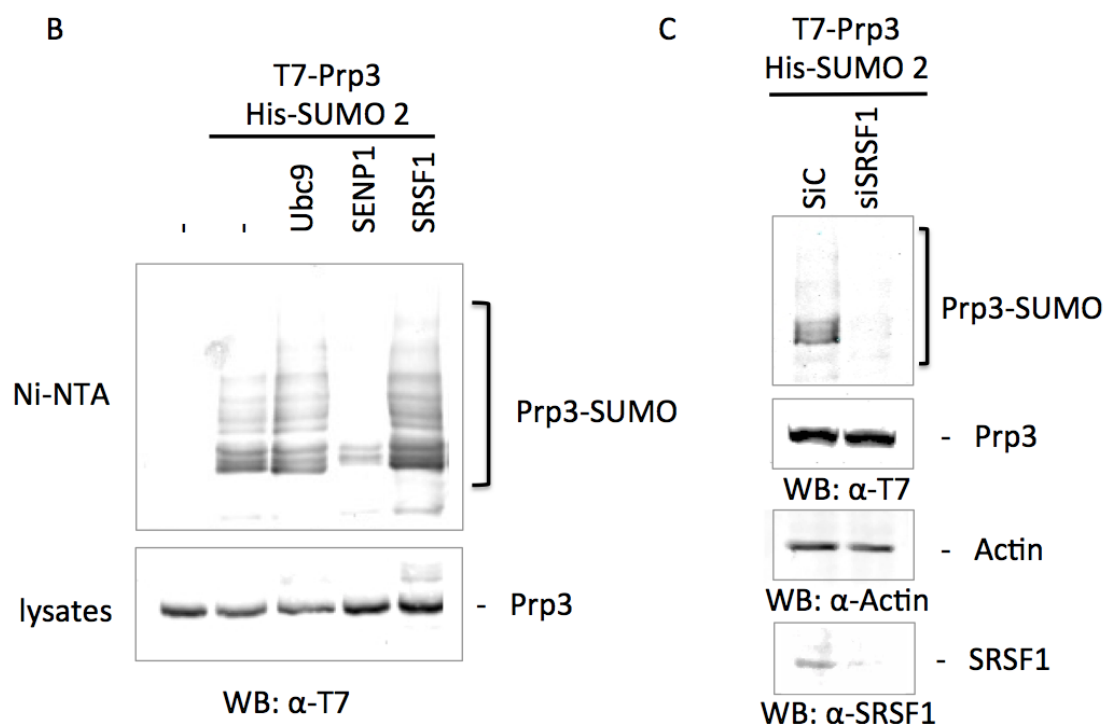


Figura R9: La proteína spliceosomal del di-snRNP U4/U6 Prp3 es SUMOilada en células en cultivo y su SUMOilación es regulada por SRSF1. Células HEK 293T fueron transfectadas con los siRNAs y/o los vectores de expresión indicados. Luego de 48 horas, las células fueron lisadas y sometidas a cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA). Alícuotas de los lisados y los eluatos (Ni-NTA) fueron analizados por western blot con los anticuerpos indicados debajo de cada panel.

7.5 La proteína spliceosomal Prp3 se conjuga a SUMO en las lisinas 289 y 559

Una de las mayores dificultades para estudiar cómo afecta la SUMOilación de Prp3 (o cualquier otro sustrato) a su función, es el hecho de lograr regular esta modificación específicamente en la proteína de interés. Es decir, podríamos realizar la sobre-expresión o depleción de la E2 conjugadora Ubc9 o algún factor primordial de la vía de SUMOilación, como se realizó en los experimentos anteriores, pero de esta manera estaríamos afectando la SUMOilación global de la célula sin poder separar los correspondientes efectos indirectos debido a cambios en la SUMOilación de otras proteínas celulares sobre la actividad que

queremos testear. Uno de los enfoques más ampliamente utilizados para intentar resolver este problema es generar proteínas mutantes para los aminoácidos lisina blanco de SUMOilación en la proteína sustrato estudiada. Generalmente se realiza el mutante de sustitución de aminoácido lisina por arginina, que es un aminoácido con la misma carga neta pero no es sustrato de SUMOilación, con la intención de no generar cambios estructurales fuertes en la proteína blanco.

Para este fin, primeramente analizamos mediante el uso de dos programas de computación (*software*) especializados (SUMOplot y SUMOsp) los posibles sitios blanco de SUMOilación (aminoácidos lisina, K) más cercanos al consenso conocido para esta modificación (“ΨKxD/E”) dentro de la estructura primaria de la proteína. Las lisinas blanco putativas se muestran en la figura R10, ya sea en el contexto de la secuencia consenso detectada *in silico* como en el esquema de dominios de Prp3.

A

ΨKxD/E

244	AMGIAPKVELKDQT
289	KANIRAVKREQFKQQ
376	RLALIAPKKELKEGD
559	SNPAKKKIEANAGQ

B

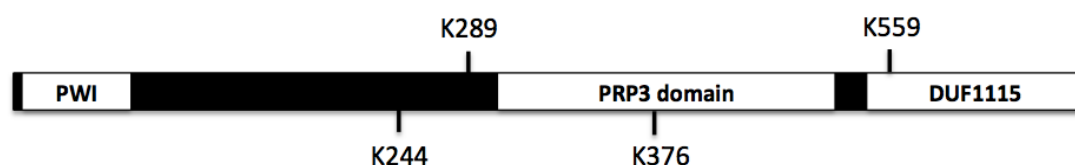


Figura R10: Secuencias consenso y sitios putativos de SUMOilación en la proteína spliceosomal Prp3: Sitios putativos de SUMOilación en Prp3 detectados *in silico* y el consenso de SUMOilación circundante. Ψ aminoácido “bulky”, hidrofóbico; X, cualquier aminoácido; E, ácido glutámico; D, ácido aspártico (A). Arquitectura de los dominios de Prp3 y localización de los sitios de conjugación a SUMO detectados *in silico* (B).

Mediante mutagénesis dirigida, reemplazamos las lisinas seleccionadas por arginina y evaluamos la conjugación a SUMO de estos mutantes. Para esto empleamos nuevamente cromatografía de afinidad a níquel de proteínas purificadas de células expresando His-

SUMO2 y las numerosas versiones salvaje o mutantes de T7-Prp3 seguido de western blot anti-T7 (Figura R11). De los simples mutantes, la mutación de las lisinas 289 y 559 parecía tener una reducción moderada de la SUMOilación. Sin embargo, en ninguno de los cuatro casos analizados esta reducción resultó sustancial en comparación a la proteína *wild type*. En base a esto optamos por generar dobles mutantes y, efectivamente, al combinar ambas mutaciones (K289/559R) obtuvimos una marcada reducción de la conjugación a SUMO. A esta versión doble mutante, que será utilizada en los experimentos posteriores de este trabajo, la denominamos “Prp3 2KR”.

Incorporamos en el análisis dos mutantes en lisinas que no habían sido predichas *in silico* dado que en el transcurso del desarrollo de este trabajo Prp3 fue reportada como blanco de SUMOilación en un estudio proteómico con especificidad de sitio (*Proteome-wide Identification of SUMO2 Modification Sites (Tammsalu et al. 2015)*), en el cual se identificaban la lisinas 205 y 328 como putativos sitios de conjugación. Si bien es cierto que ninguna de estas lisinas se encuentra en el contexto del consenso canónico descrito, ello no debe sorprendernos dado que, como se mencionó anteriormente, es cada vez más frecuente la detección de proteínas SUMOiladas que carecen de secuencia consenso. Sin embargo, ese no fue el caso de Prp3. En nuestras manos, las mutantes simples K205R y K328R, e incluso la combinación de ambas, presentaron niveles de SUMOilación comparables a los de la proteína *wild type*. De cualquier manera, debe tenerse en cuenta que, no siendo el consenso de SUMOilación totalmente crítico, es posible que al mutar alguna de las lisinas blanco la maquinaria de SUMOilación pueda usar otras lisinas cercanas que en la proteína salvaje no eran utilizadas (lisinas crípticas). Esto ha llevado en algunos casos, como para la proteína Scc1, a tener que mutar 15 lisinas blanco para obtener una disminución considerable en la SUMOilación (Wu et al., 2012). Esto es, sin dudas, un indicio de que existe cierta presión a favor de la SUMOilación de esa proteína en el microentorno celular, lo cual pone más en relevancia su funcionalidad biológica.

Consideraciones al margen, observamos que el reemplazo de los residuos ácidos proximales a las lisinas 289 y 559 por alaninas (Glu291Ala, Glu561Ala), dentro del consenso, condujo a una reducción similar en los niveles de SUMOilación (Figura R11), confirmando que las lisinas 289 y 559 antes mencionados son efectivamente sitios de conjugación a SUMO.

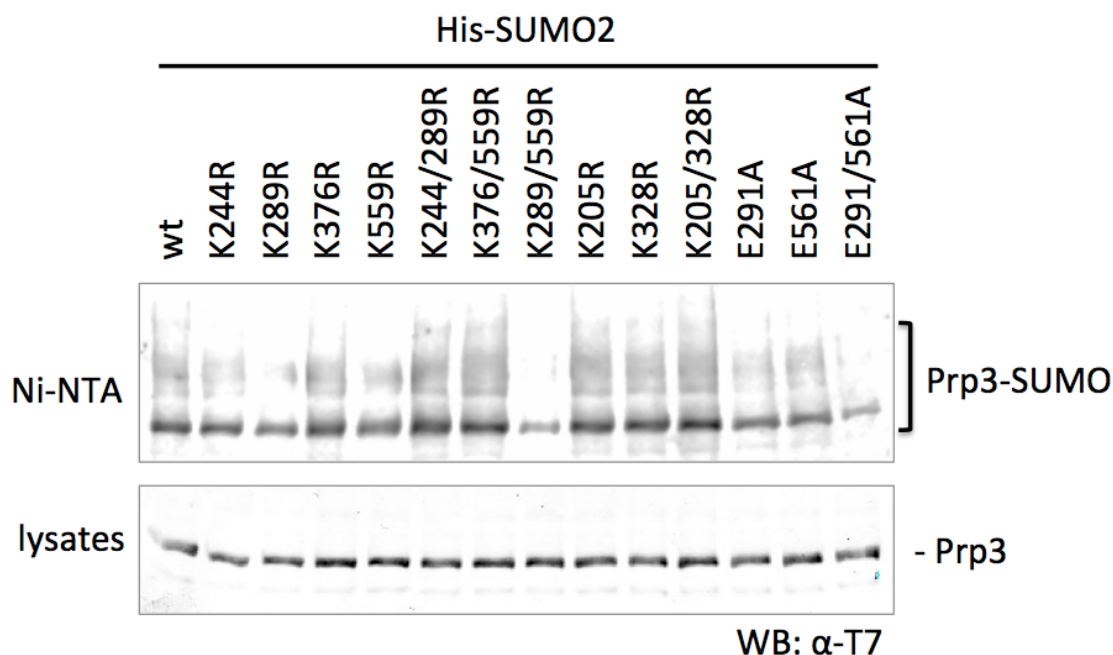


Figura R11: Prp3 es SUMOilada en las lisinas 289 y 559. Células HEK 293T fueron co-transfectadas con vectores de expresión codificando para T7-Prp3 *wild type* o mutantes y His-SUMO2. Luego de 48 horas, las células fueron lisadas y sometidas a cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA). Alícuotas de los lisados (lysates) y los eluatos (Ni-NTA) fueron analizados por western blot con un anticuerpo anti-T7.

El uso de mutantes como aproximación experimental conlleva varios riesgos. Entre ellos, que la mutación afecte el plegamiento y/o la estabilidad de la proteína o incluso que afecte a otras modificaciones postraduccionales. Esto último adquiere relevancia en el marco del amplio estudio que ha recibido la regulación cruzada entre las mismas. En nuestro caso, sabemos que los residuos lisina son blancos de otras modificaciones, tales como ubiquitinación y acetilación. O, incluso, podría ocurrir que dichas modificaciones ocurran en otros residuos lisinas pero aun así exista una regulación cruzada entre las mismas. Recordemos que existen reportes previos que dan cuenta de la ubiquitinación de Prp3, con lo que resulta sutancial indagar si la mutante de SUMOilación resulta de algún modo afectada en su conjugación a ubiquitina. En la figura R12 se observa que esta versión deficiente en SUMOilación de Prp3 (Prp3 2KR) es conjugada a ubiquitina en la misma medida y con el mismo patrón que la version *wild type*, lo cual sugiere que las lisinas mutadas no serían blancos de ubiquitinación.

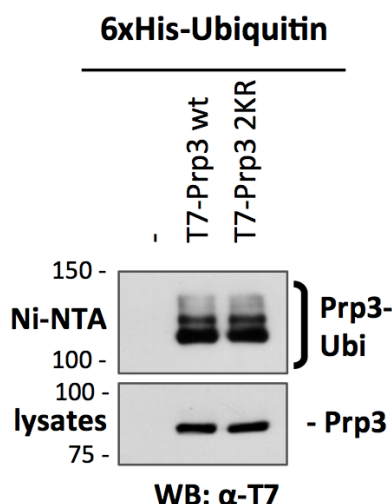


Figura R12: La mutación de las lisinas 289 y 559 no afecta los niveles de ubiquitinación de Prp3. Células HEK 293T fueron transfectadas con vectores de expresión codificando para T7-Prp3 *wild type* y 2KR y His-Ubiquitina. Luego de 48 horas, las células fueron lisadas y sometidas a cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA). Alícuotas de los lisados y los eluatos (Ni-NTA) fueron analizados por western blot con un anticuerpo anti-T7.

Cabe destacar que la lisina 559 está localizada dentro del dominio DUF1115 de Prp3 (PFAM ID PF06544; Figura R10), el cual no sólo se encuentra altamente conservado desde levaduras hasta humanos sino que, en particular, se observa una alta conservación de dicha lisina y la secuencia consenso de SUMOilación (Figura R13). La alta conservación de este dominio es consistente con resultados publicados por Liu y col. en los que demostraron que la región C-terminal de Prp3, incluyendo el dominio DUF1115, une fragmentos del di-snRNA U4/U6. La lisina 289, en cambio, presenta menor conservación aunque ya se encuentra presente en *D. melanogaster*.

A

<i>S. cerevisiae</i>	QGHGLKTELHSALKSSNLNLIIRRT---YQTGENPYLSD-PH-----DRGSSSRFNR
<i>S. pombe</i>	STKGVSLSQHQLLKPPAI-----TEQNPFLDTAPTPrLEDSPFYDPRTKESRKT
<i>C. elegans</i>	-----PLPEAVQQAEEK-VQQQITK-----ESKEPEKLI EYLDPRIQARTAD
<i>D. melanogaster</i>	SGRTINIPTVTPTLKANIRAKRRVFQRQTGLGERSESGTSAQEEAIKYFDDRIALKPTV
<i>D. rerio</i>	SGKEIELTHRMPTLKANIRAVRRQFRQQLKE-----KPSDDLESTSYFDPRVALAPAL
<i>X. laevis</i>	MGKEIELTHRMPTLKANIRAVRRQFKLQLKE-----KPSDDLEANTFFDSRVSIASSQ
<i>M. musculus</i>	TGKEVELTHRMPTLKANIRAVRRQFKQQLKE-----KPSDEMSENFFDPRVSIAPSQ
<i>H. Sapiens</i>	TGKEIELTHRMPTLKANIRAVRRQFKQQLKE-----KPSDEMSENFFDPRVSIAPSQ

:

*

B

<i>S. cerevisiae</i>	KRRK-EAVNMNVEKPTVYHCKVFQFKNLQ-NPKIR	ELKMNSKELSLKGLCLRIRDDGPG
<i>S. pombe</i>	ERKEKAFRKKDEDSAGLRCLVFRIKYLA-HRPHRL	IDLNAKQWGATGVCILNAN--FN
<i>C. elegans</i>	QKRAKTKKLS EDTSTAVNVSVYRVKSLA-HPSKK	VTNAKQLQMSGAIMMHKA--QN
<i>D. melanogaster</i>	QKSEKKQRKLREDTSCGVHVS VYRIRDLQDNQSKK	VTNAKQLQMTGSVVLFRD--CC
<i>D. rerio</i>	QRKEKKVKKLKEDLSHGVIHAVYRIRNLH-NPAKK	VTANANQLYLTGTVVVLHKD--VN
<i>X. laevis</i>	QRKEKKVKKLKEDISQGIHVS VYR--NLS-NPSKK	VTANANQLYLTGTVVVLHKD--VN
<i>M. musculus</i>	QRKVKKIKKKLKEDISQGVHISVYRVRNLS-NPAKK	VTANAGQLYLTGTVVVLHKD--VN
<i>H. sapiens</i>	QRKVKKIKKKLKEDISQGVHISVYRVRNLS-NPAKK	VTANAGQLYLTGTVVVLHKD--VN
	:: : : . **: * : ::*: *: .* :	

Figura R13: Alineamiento de la secuencia aminoacídica correspondiente a la proteína Prp3 de diversas especies, mostrando la conservación de la lisina blanco y la secuencia consenso de SUMOilación. (A) Lisina 289. (B) Lisina 559.

7.6 El mutante de SUMOilación de Prp3 presenta menor interacción con componentes spliceosomales

Con el fin de determinar si la pérdida de SUMOilación de Prp3 afecta su función, primero analizamos la interacción de las versiones salvaje y mutante de Prp3 con distintos componentes de los snRNPs en células HEK293T. Para este propósito, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación (co-IP) e inmunoprecipitación de ARN (RIP) con un anticuerpo anti-T7 a partir de extractos celulares provenientes de células transfectadas con vectores de expresión de T7-Prp3. La co-precipitación con otras proteínas spliceosomales fue analizada mediante western blot. Las proteínas SF3a120 componente del snRNP U2; Snu114 del snRNP U5 y 60K (Prp4) del di-snRNP U4/U6, así como también los snRNAs U2, U4, U5 y U6 fueron co-precipitados con la versión salvaje de T7-Prp3 (Figura R14). Con la versión mutante T7-Prp3 2KR, los niveles precipitados de la proteína 60K/Prp4, la cual presenta interacción directa con Prp3, y de los snRNAs U4 y U6 fueron comparables a las de la versión salvaje, sugiriendo que Prp3 2KR, como la versión salvaje, sigue ensamblándose en el di-snRNP U4/U6. Por el contrario, los niveles de SF3a120/SF3A1, U5-Snu114 así como también de los snRNAs U2 y U5, se redujeron drásticamente (Figura R14A y B). De aquí se desprende que Prp3 2KR presenta una menor asociación que la versión salvaje con complejos conteniendo

el snRNP U5, como el tri-snRNP U4/U6.U5, así como con complejos que también contienen el snRNP U2 (complejo spliceosomal B). Todos estos resultados sugieren que la SUMOilación de Prp3 es importante para la interacción del di-snRNP U4/U6 con el snRNP U5 en la formación del tri-snRNP o bien con el reclutamiento del tri-snRNP para la formación del complejo B durante el ciclo del spliceosoma.

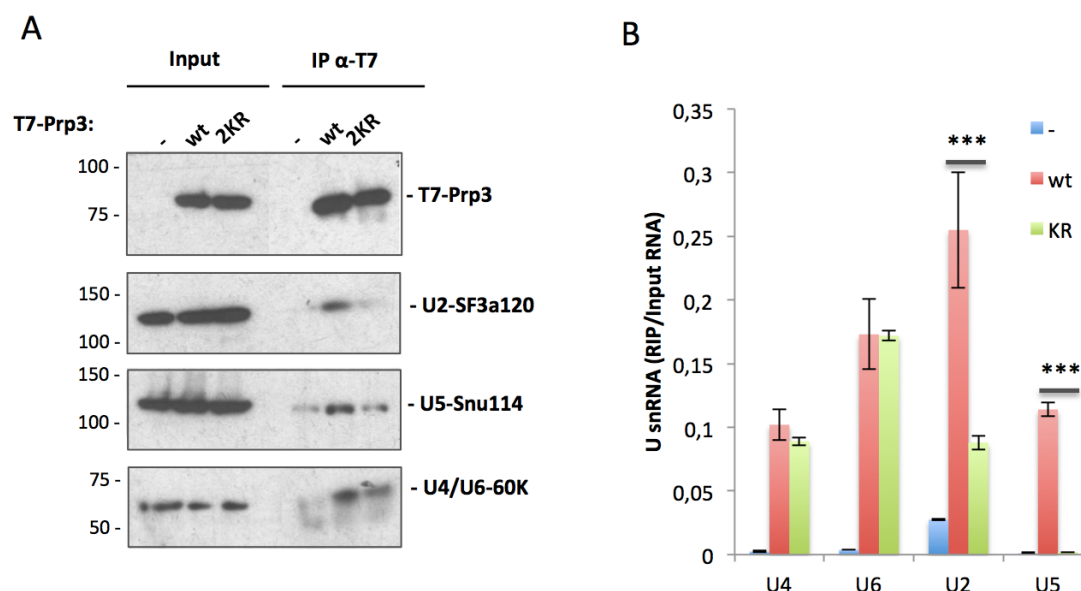
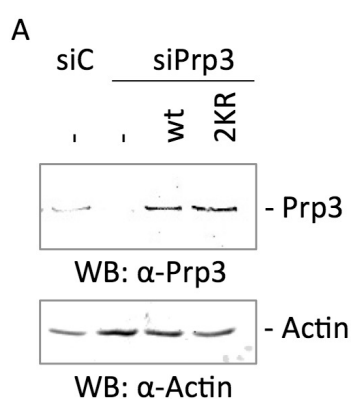


Figura R14: Interacción reducida de Prp3 2KR con los snRNPs U2 y U5. Prp3 en sus versiones salvaje y mutante fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-T7 a partir de lisados de células HEK 293T. Co-IP de U2-SF3a120, U5-Snu114 y U4/U6-60K fue analizada mediante western blot con anticuerpos específicos contra las distintas proteínas **(A)**. RIP de los snRNAs U4, U6, U2 y U5 cuantificados mediante RT-qPCR con *primers* específicos para cada snRNA ($n= 3$, $***P \leq 0.001$; Student's *t* test) **(B)**.

7.7 La falta de SUMOilación de Prp3 afecta la eficiencia de splicing en células en cultivo

Analizamos la eficiencia de splicing en células en cultivo transfectadas con vectores de expresión de ambas versiones, salvaje y mutante, previo silenciamiento de Prp3 endógena por RNAi (Figura R15A), y medimos los niveles de pre-ARNm y ARNm para diversos genes de expresión constitutiva y/o elevada por RT-qPCR. Observamos que casi todos los genes analizados respondían al silenciamiento de esta proteína con una reducción, más o menos

significativa, de la eficiencia de splicing (Figura R15B). Ello es de esperarse teniendo en cuenta que Prp3 es un componente *core* del spliceosoma, e incluso podría esperarse aún una mayor reducción; aunque esto podría estar más relacionado con el nivel de silenciamiento alcanzado. Lo que parece indiscutible es que cada gen responde de una manera distinta, probablemente relacionado con una sensibilidad diferencial a los niveles de Prp3. Por su parte, el rescate con la versión salvaje de Prp3 recuperó la eficiencia de splicing del pre-ARNm en la mayoría de los casos e incluso llegó a superar los niveles basales, de modo consistente con la señal de Prp3 en el WB, la cual indica niveles algo mayores de Prp3 en el rescate que en la condición endógena (Figura 15A). El rescate con Prp3 2KR merece mayor discusión, teniendo en cuenta que para algunos genes logró recuperar algo de la eficiencia reducida con el silenciamiento (ACTB y GAPDH por ejemplo) mientras que para otros genes no (Akt y TBP). Análogamente a lo ya mencionado, esto sugiere una sensibilidad diferencial del splicing de cada gen a los niveles de SUMOilación de Prp3. Con todo, los resultados de este experimento son difíciles de asir, y quizás un análisis de un mayor número de genes a modo de panel resultaría beneficioso para aportar más luz sobre el asunto. Lo que es evidente es que en todos los casos la eficiencia de splicing fue menor con el mutante de SUMOilación que con la versión salvaje y ello es consistente con la idea de que la SUMOilación de Prp3 juega un rol importante en el proceso de splicing.



B

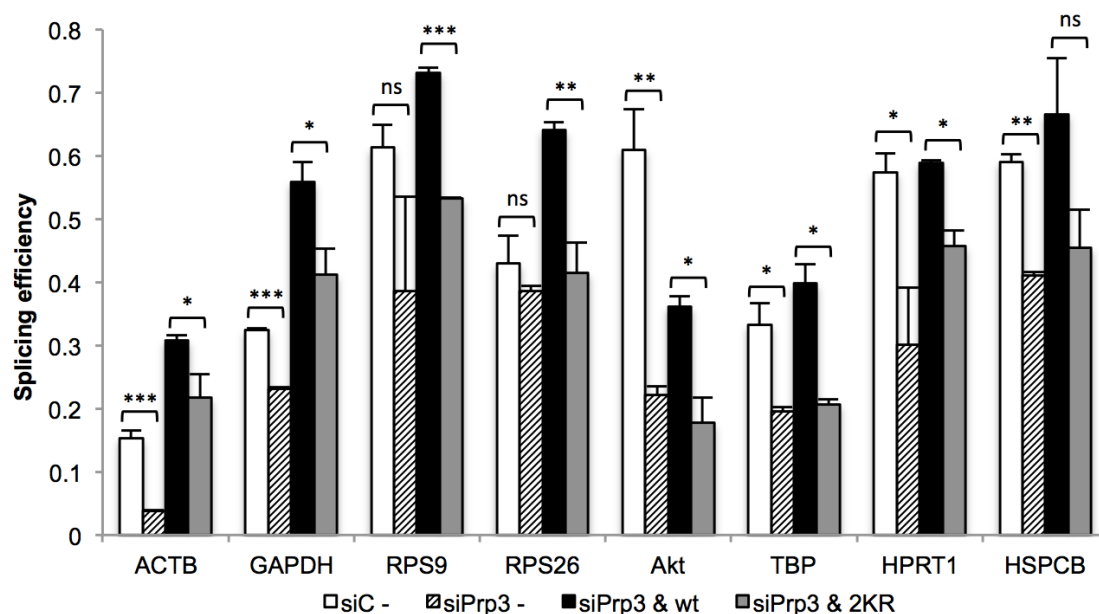
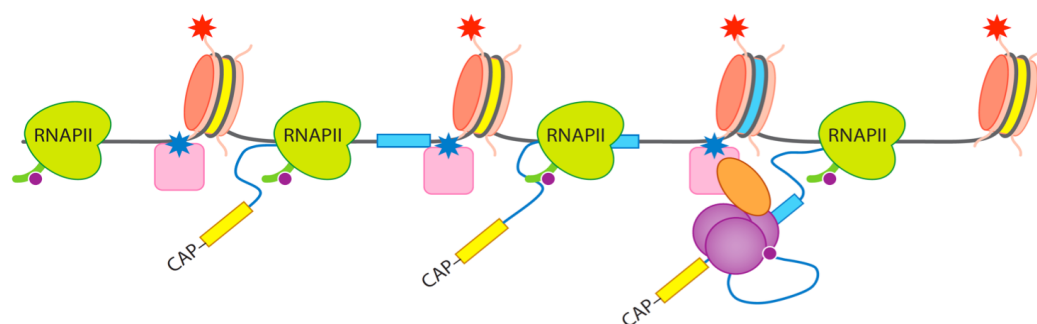


Figura R15: La falta de SUMOilación de Prp3 afecta la eficiencia de splicing en células en cultivo. Células HeLa fueron transfectadas con un siRNA dirigido contra Prp3 (o siLuc como control) y 48 hs después con un plásmido control (pcDNA) o vectores de expresión codificando para Prp3 salvaje o Prp3 2KR. Luego de 72 horas, el nivel de Prp3 fue analizado mediante western blot (A) y el ARN total fue extraído. La eficiencia de splicing (relación entre ARNm y preARNm+ARNm) de los transcritos fue determinada mediante RT-qPCR ($n=3$, $*P < 0.05$; $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$; Student's t test) (B).

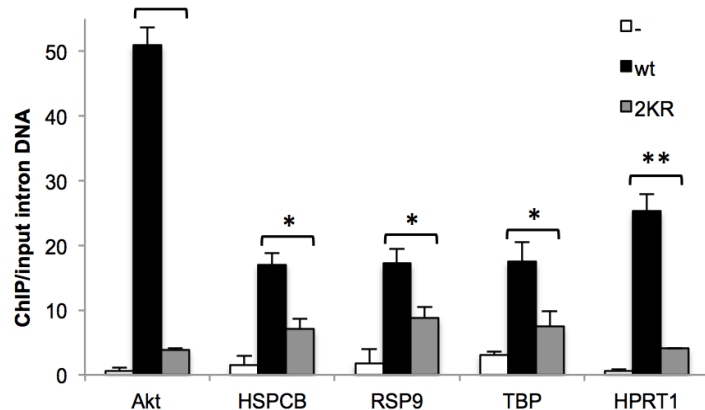
Con el fin de indagar un poco más acerca de esto, analizamos el reclutamiento de Prp3 en sus dos versiones a la cromatina, donde tiene lugar el splicing co-transcripcional. Realizamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con un anticuerpo anti-T7 y medimos por qPCR las cantidades inmunoprecipitadas de secuencias intrónicas de diversos genes transcripcionalmente activos, a modo de evaluar el reclutamiento de Prp3 a spliceosomas que se encuentran catalizando el splicing co-transcripcional de los pre-ARNm de dichos genes (Figura 16A). De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente, la versión deficiente de SUMOilación de Prp3 se asocia considerablemente menos a la cromatina que la versión salvaje en todos los genes analizados (Figura R16B). Es de esperar que en este caso los resultados sean más “limpios” que los del experimento anterior teniendo en cuenta que en las condiciones del mismo, la eficiencia de transfección (tanto de siRNA como de ADN) podría haber estado diluyendo los efectos del silenciamiento y la SUMOilación de Prp3 al medir la eficiencia de splicing de genes endógenos. En este caso, en cambio, la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-T7 permite centrarnos únicamente en las

versiones salvaje y mutante de Prp3 sobre-expresadas, dejando de lado a la proteína endógena. Dado que Prp3 es reclutado al spliceosoma como parte del tri-snRNP U4/U6.U5, estos resultados son consistentes con la idea de que la falta de SUMOilación de Prp3 afecta la formación del tri-snRNP.

A



B



C

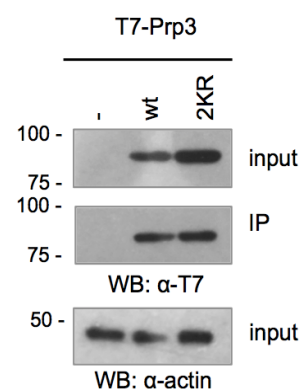


Figura R16: Prp3 2KR se encuentra menos asociada a la cromatina de genes transcritos que la versión salvaje. (A) El esquema muestra la co-transcripción del proceso de splicing y por ende del reclutamiento de los spliceosomas. Tomado de (Naftelberg et al. 2015). (B) Células HeLa fueron transfectadas con un plásmido control (pcDNA) o vectores de expresión codificando para Prp3 salvaje o Prp3 2KR y sometidas a ChIP. La inmunoprecipitación de ambas variantes de Prp3 se realizó con un anticuerpo anti-T7 y la cuantificación de ADN precipitado mediante qPCR con primers específicos dirigidos contra regiones intrónicas de los genes mencionados ($n=3$, $*P < 0.05$; $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$; Student's t test). (C) Los niveles de T7-Prp3 expresados e inmunoprecipitados fueron analizados mediante western blot.

8. DISCUSIÓN

8.1. Resumen de los resultados obtenidos

En este trabajo hemos demostrado que alterar los niveles de SUMOilación tiene consecuencias sobre la eficiencia de splicing, tanto *in vitro* como en células en cultivo. Enfocando nuestro estudio en la maquinaria spliceosomal, detectamos por espectrometría de masa que varias de las proteínas que la componen son conjugadas a SUMO. Logramos obtener una mutante de la proteína spliceosomal Prp3, que presenta menores niveles de SUMOilación, pero que aún es capaz de ensamblarse en di-snRNPs U4/U6 de modo comparable a la proteína salvaje. Sin embargo, su sobre-expresión no logra rescatar la disminución de la eficiencia de splicing ocasionada por el silenciamiento de la proteína endógena. Por otra parte, también notamos que presenta menor interacción con los snRNPs U2 y U5, y menor reclutamiento a cromatina. Todos estos resultados sugieren un rol de la SUMOilación de Prp3 en la formación del tri-snRNP U4/U6.U5 y, por ende, de complejos B en el ensamblado de spliceosomas activos.

8.2. SPLICING *IN VITRO*: Ventajas y desventajas

En esta tesis, hemos investigado la conjugación de SUMO a proteínas spliceosomales en un sistema de *splicing in vitro* así como también en células en cultivo. En primer lugar, hemos hallado que los efectos de alterar la maquinaria SUMOilatoria en ambos sistemas tiene efectos contradictorios, lo cual podría responder, como se explicó en la sección de resultados, a múltiples causas. Es probable que en el caso de células en cultivo, la biogénesis de la maquinaria de *splicing* resulte afectada, así como también la transcripción y/o el procesamiento de pre-ARNm asociado a la misma. Es por ello que decidimos emplear el sistema *in vitro* para enfocar nuestro estudio en el ensamblado y la actividad catalítica de la maquinaria spliceosomal. En este sistema, hemos hallado que la eficiencia de splicing resulta comprometida cuando la SUMOilación se reduce severamente por la incorporación de la proteasa de SUMO SENP1. Por su parte, la adición de Ubc9 no tuvo efecto apreciable sobre

la reacción de splicing, en concordancia con el hecho de que los extractos nucleares utilizados presentaban un nivel de SUMOilación importante incluso sin el agregado de Ubc9 (Figura R3). Estos resultados nos permiten proponer que la SUMOilación de una o más proteínas spliceosomales es requerida para un proceso de splicing eficiente *in vitro*. Sin embargo, no debemos olvidar las limitaciones que este modelo presenta. Como acabamos de decir, se encuentra completamente desacoplado de la transcripción y con ello dista de recrear la biogénesis y el metabolismo de los ARNm en células. Por otra parte, el uso de un reportero de longitud de secuencia reducida con sitios canónicos de splicing limita el estudio a una minoría de los eventos de splicing siendo que la longitud de los intrones puede alcanzar varias kilobases y los sitios de splicing desviarse en mayor o menor medida del consenso dando lugar a una gran plasticidad de todo el proceso. Es por todo esto que más adelante en el estudio retomamos el modelo de cultivo celular pero esta vez con preguntas y una dirección más acotada. Consideramos que el sistema de splicing *de in vitro* fue una herramienta muy útil para el análisis de sustratos de SUMOilación spliceosomales por espectrometría de masa. Nos permitió elucidar la cinética de la reacción de splicing y asignar la identidad de los complejos spliceosomales para luego ir en busca de sustratos de SUMOilación. Como mencionamos más arriba, nuestro abordaje intentaba ser holístico en el marco del concepto de “SUMOilación en grupo”, con la hipótesis de que la conjugación de varios blancos implicados en el mismo proceso podría tener un rol en la regulación del proceso de splicing. Efectivamente, los resultados indican que diversas proteínas se encuentran SUMOiladas en el contexto del spliceosoma. Indagar acerca de la funcionalidad de la conjugación de SUMO a cada una de ellas así como también de la SUMOilación del conjunto sigue siendo una tarea pendiente. Actualmente, estamos evaluando los efectos de perturbar la maquinaria SUMOilatoria sobre el splicing de otros reporteros *in vitro*, con el fin de dilucidar el alcance de los resultados observados para el caso del pre-ARNm de MINX.

8.3. Proteínas SUMOiladas en el spliceosoma

La purificación de complejos spliceosomales ensamblados a diferentes tiempos de la reacción de splicing, seguida de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-SUMO y análisis por espectrometría de masa, indicó que diversas proteínas presentes en el spliceosoma se encuentran SUMOiladas (Tabla R1). Estas incluyen, entre otras, proteínas esenciales del

snRNP U2 (SF3B1, SF3B3, SF3A1, SF3A2, SF3A3), las cuales asisten en el reclutamiento de dicho snRNP al sitio de ramificación (Dybkov et al. 2006). Además, las proteínas del di-snRNP U4/U6 Prp3 y Prp31, ambas requeridas para la formación del tri-snRNP, también fueron identificadas como targets putativos de SUMOilación. Por su parte, los factores del snRNP U5 funcionalmente importantes, tales como la helicasa de ARN Brr2 (Absmeier et al. 2015), la GTPasa Snu114 (Bartels et al. 2002) y la proteína *scaffold* del *core* catalítico Prp8, también fueron detectadas. Luego corroboramos en células en cultivo que varias de ellas son SUMOiladas (Figuras R8 y R9). Es posible especular que la SUMOilación regule la actividad o las interacciones de estas proteínas con otros componentes spliceosomales. De hecho, como se discutirá más adelante, la inhibición de la SUMOilación de Prp3 por mutagénesis de sus dos sitios de conjugación a SUMO parece inhibir la interacción del di-snRNP U4/U6 con el snRNP U5 en la formación del tri-snRNP, conduciendo a una reducción de la eficiencia de splicing. Muchas de las proteínas SUMOiladas identificadas por espectrometría de masa a partir de reacciones de splicing *in vitro* en esta tesis, habían sido detectadas en estudios proteómicos previos (Tabla R2). Sin embargo, no se había indagado en dichos estudios si estas proteínas se encontraban SUMOiladas en el spliceosoma, como nuestro trabajo ahora postula.

8.4. Los sitios de SUMOilación

Observando con más detenimiento los distintos sustratos de SUMOilación hallados, pudimos detectar residuos lisina en el contexto de secuencias consenso de SUMOilación, postulándolos como posibles sitios de conjugación. El estudio de la conjugación de SUMO a un determinado sustrato es una tarea ardua. La SUMOilación es una modificación altamente reversible, y altamente inestable lo cual dificulta mucho su detección (Da Silva-Ferrada et al., 2012). En un principio, la mayoría de los estudios clásicos sobre esta modificación fueron hechos con los sustratos con más altos niveles de SUMOilación de la célula, como por ejemplo, la proteína RanGAP1. En la última década ha habido un mejoramiento en algunas técnicas de detección, lo cual permitió trabajos muy interesantes sobre esta modificación y consecuentemente llevó a un aumento en el interés de la comunidad científica. Aún así, el uso de sistemas de sobre-expresión en células en cultivo es crítico en estos estudios, y probablemente sea una de las mayores debilidades de la segunda mitad de esta tesis.

El abordaje experimental para determinar la relevancia de la conjugación de SUMO a sustratos específicos ha sido, entonces, la mutación de los residuos lisina, putativos *targets* de SUMOilación, a arginina. Por mutagénesis dirigida, obtuvimos una versión mutante de la proteína spliceosomal Prp3 que presenta una drástica disminución en su conjugación a SUMO pero que conserva la capacidad de conjugarse a Ubiquitina. El hallazgo de los sitios blanco de SUMOilación de Prp3 no fue tarea fácil, puesto que para varias de las mutantes analizadas, incluyo aquellas que aparecían en la literatura como detectadas en estudios proteómicos específicos de sitio, no presentaban disminución de su SUMOilación. En nuestras manos, la mutante que menor conjugación a SUMO mostró fue la de los residuos 289 y 559 (Figura R11). La existencia de multiples lisinas de conjugación a SUMO en un sustrato se ha reportado reiteradamente en la literatura, y pareciera ser aún más común que la existencia de un sitio único. Un ejemplo de esto es la proteína Scc1, en la cual los autores tuvieron que mutar 15 lisinas de su dominio central de unión para lograr una disminución en sus niveles de SUMOilación (Wu et al., 2012). Evaluando la conservación de los sitios blanco de SUMOilación en Prp3 en varias especies, la lisina 559 se encuentra altamente conservada, probablemente por encontrarse en una región involucrada en la interacción con el dúplex de los snRNAs U4 y U6. Esta evidencia indica que quizás la lisina 559 es un blanco más frecuente de SUMOilación y que quizás la lisina 289 aparezca como un blanco críptico de SUMOilación frente a la imposibilidad de conjugación de SUMO en la lisina 559, sobre todo en células HEK293T que presentan una alta capacidad de sobre-expresión y por lo tanto logramos tener un mayor nivel de actividad de la vía de SUMOilación. Aún cabe la posibilidad de que alguna o ambas de las mutaciones realizadas esté afectando a otra modificación post-traducciona que tenga lugar en ese sitio y que pueda afectar indirectamente los niveles de SUMOilación en Prp3. En nuestro caso, la ubiquitinación de los mutantes no pareció verse afectada. Por otra parte, la mutación de los residuos acídicos del consenso de SUMOilación, que en teoría no debería afectar a otras modificaciones post-traduccionales ocurridas en residuos lisina, condujo también a una disminución de la conjugación de SUMO a Prp3 sugiriendo que la lisinas detectadas son sitios *bona fide* de conjugación. Sin embargo, aún queda la posibilidad de que esas mutaciones afecten el plegamiento, la estabilidad o la funcionalidad de la proteína. En el caso de Prp3, ha sido demostrado que su región C-terminal, incluido el dominio DUF1115, une regiones del di-snRNA U4/U6, incluyendo el extremo 3' del U6 (Liu et al. 2015). De acuerdo a nuestro experimento de RIP (Figura R14B), las mutaciones K289/559R no parecen afectar la unión de Prp3 a dichos snRNAs. Esto es consistente con estudios previos que sugieren que mutaciones simples en el dominio C-

terminal no tienen consecuencias serias sobre la unión de Prp3 al dúplex de snRNAS U4/U6 (Liu et al. 2015). La mutación 2KR tampoco pareció afectar la unión de Prp3 a Prp4. Tampoco hay evidencias de que los niveles proteicos de Prp3 2KR sean menores a los de la versión salvaje en los experimentos de western blot (Figura 14A). Todos estos resultados sugieren que la mutación 2KR no altera significativamente el plegamiento o la estabilidad de Prp3.

En cualquier caso, el uso de una proteína mutante con sustitución de aminoácidos para dilucidar la importancia de la SUMOilación sobre su funcionalidad tiene sus ventajas y desventajas. Su fortaleza es permitir realizar experimentos sencillos ya sea de mera sobre-expresión sin manipular la expresión de la proteína endógena, o bien de “rescate” en aquellos casos en los que la proteína endógena ha sido silenciada, y comparar fácilmente los niveles de actividad de la proteína mutante con respecto a su contraparte salvaje. Por otro lado, su debilidad es basarse justamente en el uso de una proteína mutante a la cual se le podrían atribuir efectos debido a la mutación en sí misma, pero independientes de la regulación por SUMOilación de la proteína. El cambio de aminoácido realizado en esta mutante es de aminoácido lisina a arginina. Estos dos aminoácidos tienen tamaño y estructura similar, y la misma carga neta con lo cual no se espera que afecten fuertemente las estructuras secundaria y terciaria de la proteína. Otro indicio de que la estructura no se encuentra afectada en el mutante Prp3 2KR es el hecho de que encontramos que puede ser modificada por ubiquitinación de la misma manera que lo es Prp3 WT, con lo cual se puede concluir que los factores responsables de esta modificación post-traducciona están reconociendo e interaccionando perfectamente con la mutante. Lo mismo ocurre con el ensamblado del di-snRNP U4/U6, no alterado en presencia de la mutante. Todas estas evidencias avalan el uso del mutante Prp3 2KR como una buena herramienta para el estudio de la conjugación por SUMO de Prp3.

8.5. Las consecuencias de la SUMOilación

Prp3 es un componente del di-snRNP U4/U6 y también del tri-snRNP U4/U6.U5, y es reclutado al spliceosoma durante la formación del complejo B (Wahl et al. 2009). Con la activación del spliceosoma (formación del complejo B^{act}), Prp3 es desplazado junto al snRNP U4. El hecho de que las interacciones de este mutante con los snRNAs U4 y U6 así como también con la proteína del di-snRNP 60K/Prp4 no parecen estar afectadas (Figura 14)

sugiere que el di-snRNP U4/U6 se ensambla adecuadamente en presencia de la versión mutante de Prp3. Sin embargo, ésta presenta interacción reducida con proteínas de los snRNPs U2 y U5 así como también con sus respectivos snRNAs (Fig 6). Esto indica que la SUMOilación de Prp3 sería requerida para la formación del tri-snRNP y/o el correcto reclutamiento del di-snRNP como parte del tri-snRNP a spliceosomas activos. Ciclos de SUMOilación/de-SUMOilación podrían modular las interacciones de Prp3 con el snRNP U5, estabilizando la interacción del di-snRNP con U5, y luego favoreciendo la disociación de Prp3 durante la activación del spliceosoma. Teniendo en cuenta que sólo una pequeña fracción de Prp3 parece SUMOilarse, podría ocurrir que la conjugación a SUMO fuese requerida de modo transitorio para establecer y/o estabilizar las interacciones (por ejemplo aquellas requeridas para la formación del tri-snRNP) y no a lo largo de todo el ciclo.

Teniendo en cuenta la naturaleza co-transcripcional del splicing (Listerman et al. 2006), realizamos inmunoprecipitación de la cromatina con el objeto de analizar si la versión mutante de Prp3 es reclutada a genes transcripcionalmente activos del mismo modo que la versión salvaje, ambas sobre-expresadas en células en cultivo. Consistentemente con los resultados anteriores que postulan que la SUMOilación de Prp3 favorece su reclutamiento, como parte del tri-snRNP, a spliceosomas activos; detectamos menores niveles de Prp3 2KR asociado a cromatina (Figura R16). Estos hallazgos también concuerdan con el hecho de que la sobre-expresión de Prp3 2KR logra una menor eficiencia de splicing de algunos pre-ARNm que la versión salvaje, en el contexto del noqueo de Prp3 endógena en células en cultivo (Figura R15). En este contexto, resulta oportuno mencionar reportes recientes que muestran que alteraciones en componentes *core* del spliceosoma no necesariamente afectan al splicing de modo global sino a eventos de splicing particulares. Esto parece depender de una sensibilidad diferencial de los distintos pre-ARNms a los diversos factores de splicing (Corrionero et al. 2011; Papasaikas et al. 2015), lo cual podría ser el caso de los eventos analizados aquí.

8.6. Ubiquitina y SUMO en el spliceosoma

Estudios previos han reportado que Prp3 se conjuga a ubiquitina (Song et al. 2010), proponiendo que la forma ubiquitinada de Prp3 tiene mayor afinidad por el componente del snRNP U5 Prp8 estabilizando la interacción con el U5 y la formación del tri-snRNP. Prp3 es

ubiquitinada por Prp19 y de-ubiquitinada por Usp4/Sart3, lo cual facilitaría su disociación junto con el snRNP U4 durante la maduración del sitio activo. Como con la SUMOilación, es probable que la falta de ubiquitinación reduzca los niveles del tri-snRNP inhibiendo la formación de spliceosomas pre-catalíticos. Si bien los sitios de ubiquitinación no han sido identificados, nuestros resultados sugieren que no parecen ser los mismos sitios que los de SUMOilación. Sin embargo, una posible interconexión entre ambas modificaciones no puede ser descartada y amerita ser investigada en mayor detalle.

Del mismo modo que la ubiquitinación, la SUMOilación también es un mecanismo atractivo para proponer como regulador de los rearrreglos estructurales del spliceosoma. Como esta modificación frecuentemente afecta las interacciones proteicas, es posible que su conjugación/de-conjugación a factores de splicing esté involucrada en los cambios en la composición y estructura del spliceosoma que se observan en casi todos sus estadios (Wahl et al. 2009). Además, el reciclado de factores luego de cada ciclo de splicing requeriría reversibilidad de este tipo de modificación, lo cual en el caso de SUMO es logrado por acción de las SENPs. Como se mencionó anteriormente, un concepto emergente en el campo es lo que se conoce como “SUMOilación en grupo”, lo cual se refiere al requerimiento de la modificación simultánea de múltiples blancos involucrados en un mismo proceso (Flotho & Melchior 2013), y que podría ser perfectamente el caso del spliceosoma. Es tentador sugerir que alterar la SUMOilación de varios componentes spliceosomales, además del que se ha estudiado en este trabajo, tenga consecuencias aun más drásticas sobre el proceso de splicing. Nuestro laboratorio se propone seguir indagando en esta dirección.

Casi todo lo que se conoce hasta el momento sobre la modificación post-traducciona de componentes spliceosomales tiene que ver con fosforilación (Mathew et al. 2008), acetilación (Gunderson et al. 2011; Choudhary et al. 2009) y ubiquitinación (Song et al. 2010; Bellare et al. 2008). Prácticamente nada se conocía de la modificación de dichos componentes por SUMO, lo cual es curioso teniendo en cuenta que las proteínas involucradas en distintos pasos del metabolismo del ARN son el grupo más abundante entre los sustratos de SUMOilación (Blomster et al. 2009; Vethantham et al. 2007; Desterro et al. 2005).

8.7. El enigma de SUMO

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

8.8. SRSF1 como E3 ligasa de SUMO

Aún en tiempos en que la proteómica arroja más y más blancos de SUMOilación, no siempre las enzimas responsables de la regulación de esta modificación post-traducciona se encuentran caracterizadas. En este trabajo hemos identificado al factor de splicing SRSF1 como reguladora de la SUMOilación de proteínas spliceosomales, en consistencia con estudios previos de nuestro laboratorio que postularon a SRSF1 como un nuevo componente de la vía de SUMO (Pelisch et al. 2010). SRSF1 no sólo tiene características de E3 ligasa sino que también afecta la actividad de una de ellas, PIAS1, la cual ha sido co-purificada con el spliceosoma (Rappsilber et al. 2003). El hecho de que SRSF1 afecte la SUMOilación de

algunos componentes spliceosomales, indica que, más allá de sus ya conocidos y bien caracterizados mecanismos de acción sobre el splicing, podría estar también regulando este proceso a través de la SUMOilación de la maquinaria responsable del mismo. En la actualidad, estamos trabajando en la disección de los mecanismos moleculares subyacentes al rol de SRSF1 en la vía de SUMO, intentando separarlos de aquellos involucrados en el proceso de splicing, lo cual nos conducirá a una caracterización más integral de su actividad como E3 ligasa. No deja de ser curioso que de la familia de proteínas SR, a la cual pertenece SRSF1, algunas ejerzan un rol en SUMOilación y otras no, lo cual creemos que tiene que ver con sus arquitecturas modulares, sus localizaciones sub-celulares así como también con su capacidad diferencial de interacción con el amplio repertorio de ARNm presentes en la célula.

8.9. Patobiología del proceso de splicing

Estudiar el splicing a nivel molecular no sólo es importante para entender los mecanismos básicos de la regulación de la expresión genética, sino que también presenta relevancia biomédica; teniendo en cuenta que el splicing aberrante de numerosos pre-ARNms es la base de muchas enfermedades humanas o contribuye a su severidad (Ward & Cooper 2010; Wahl & Lührmann 2015). Mutaciones hereditarias y somáticas asociadas a diversas patologías, desde desórdenes retinales y del desarrollo hasta distintas formas de cáncer, han sido documentadas tanto para proteínas como snRNAs integrantes del spliceosoma (Scotti & Swanson 2016). Es interesante notar que Prp3 y Prp8 se encuentran mutados en una forma familiar de retinitis pigmentosa (Chakarova et al. 2002; Boon et al. 2007). Es tentador especular que la des-regulación del spliceosoma, causada por mutaciones que tengan que ver con la SUMOilación de alguno de sus componentes, también pueda contribuir al desarrollo de enfermedades humanas.

9. CONCLUSIONES

- ❖ En el contexto de una reacción de splicing in vitro, muchas proteínas de unión al pre-ARNm se encuentran SUMOiladas.
- ❖ La reducción de los niveles de conjugación a SUMO en extractos nucleares provoca una disminución de la eficiencia de splicing in vitro.
- ❖ La conjugación a SUMO de algunas proteínas spliceosomales se encuentra regulada por SRSF1 en células en cultivo.
- ❖ La reducción de la conjugación a SUMO de la proteína spliceosomal Prp3 disminuye su interacción con otras partículas spliceosomales.
- ❖ La reducción de la conjugación a SUMO de la proteína spliceosomal Prp3 afecta la eficiencia de splicing en células en cultivo y disminuye su reclutamiento a spliceosomas co-transcripcionalmente activos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Absmeier, E. et al., 2015. The large N-terminal region of the Brr2 RNA helicase guides productive spliceosome activation. *Genes and Development*, 29(24), pp.2576–2587.
- Achsel, T. et al., 1999. A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO Journal*, 18(20), pp.5789–5802.
- de Almeida, S.F. & Carmo-Fonseca, M., 2014. Reciprocal regulatory links between cotranscriptional splicing and chromatin. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 32, pp.2–10.
- Andersen, J.B. & Hassel, B.A., 2006. The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: Friend or foe? *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 17(6), pp.411–421.
- Andersen, J.S., Matic, I. & Vertegaal, A.C.O., 2009. Identification of SUMO target proteins by quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology*, 497, pp.19–31.
- Andrews, E.A. et al., 2005. Nse2, a component of the Smc5-6 complex, is a SUMO ligase required for the response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 25(1), pp.185–96. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=538766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Aronova, A. et al., 2007. Functional interactions between Prp8, Prp18, Slu7, and U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(9), pp.1437–44. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1950762&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ayadi, L. et al., 1998. Functional and structural characterization of the prp3 binding domain of the yeast prp4 splicing factor. *J Mol Biol*, 284(3), pp.673–687. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826507>.
- Bartels, C. et al., 2002. The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome. *EMBO Reports*, 3(9), pp.875–880.
- Bayer, P. et al., 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of molecular biology*, 280(2), pp.275–286.
- Becker, J. et al., 2013. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues.

- Nature structural & molecular biology*, 20(4), pp.525–31. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503365>.
- Beggs, J.D., 2005. Lsm proteins and RNA processing. *Biochemical Society transactions*, 33, pp.433–438.
- Bell, M. et al., 2002. p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *EMBO Journal*, 21(11), pp.2724–2735.
- Bellare, P. et al., 2008. A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nature structural & molecular biology*, 15(5), pp.444–51. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2737727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bellare, P. et al., 2006. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(2), pp.292–302. Available at:
<http://rnajournal.cshlp.org/content/12/2/292.long>.
- Berget, S.M., 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6), pp.2411–2414.
- Bessonov, S. et al., 2008. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, 452(7189), pp.846–850.
- Blaustein, M. et al., 2005. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nature structural & molecular biology*, 12(12), pp.1037–1044.
- Blaustein, M., Pelisch, F. & Srebrow, A., 2007. Signals, pathways and splicing regulation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(11), pp.2031–2048.
- Blomster, H. a et al., 2009. Novel proteomics strategy brings insight into the prevalence of SUMO-2 target sites. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 8(6), pp.1382–90.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2690485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Boddy, M.N. et al., 1996. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, 13(5), pp.971–82. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806687>.
- Bonnal, S. et al., 2008. RBM5/Luca-15/H37 Regulates Fas Alternative Splice Site Pairing after Exon Definition. *Molecular Cell*, 32(1), pp.81–95.
- Boon, K.-L. et al., 2007. prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nature structural & molecular biology*, 14(11),

- pp.1077–1083.
- Brenner, T.J. & Guthrie, C., 2005. Genetic analysis reveals a role for the C terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* GTPase Snu114 during spliceosome activation. *Genetics*, 170(3), pp.1063–1080.
- Brow, D. a, 2002. Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annual review of genetics*, 36, pp.333–360.
- Burgess, S.M. & Guthrie, C., 1993a. A mechanism to enhance mRNA splicing fidelity: The RNA-dependent ATPase Prp16 governs usage of a discard pathway for aberrant lariat intermediates. *Cell*, 73(7), pp.1377–1391.
- Burgess, S.M. & Guthrie, C., 1993b. Beat the clock: paradigms for NTPases in the maintenance of biological fidelity. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(10), pp.381–384.
- Cao, W., Jamison, S.F. & Garcia-Blanco, M.A., 1997. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA (New York, N.Y.)*, 3(12), pp.1456–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1369586&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Capili, A.D. & Lima, C.D., 2007. Structure and Analysis of a Complex between SUMO and Ubc9 Illustrates Features of a Conserved E2-Ubl Interaction. *Journal of Molecular Biology*, 369(3), pp.608–618.
- Carbia-Nagashima, A. et al., 2007. RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1?? during Hypoxia. *Cell*, 131(2), pp.309–323.
- Carey, M.F., Peterson, C.L. & Smale, S.T., 2009. Dignam and Roeder nuclear extract preparation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(12).
- Chakarova, C.F. et al., 2002. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics*, 11(1), pp.87–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773002>.
- Chan, S.-P. et al., 2003. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5643), pp.279–82. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/302/5643/279.abstract%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1086602%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970570>.
- Chen, C.-H. et al., 2006. Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(5), pp.765–774.

- Chen, J.Y.F. et al., 2001. Specific alterations of U1-C protein or U1 Small nuclear RNA can eliminate the requirement of Prp28p, an essential DEAD Box splicing factor. *Molecular Cell*, 7(1), pp.227–232.
- Chen, M. & Manley, J.L., 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(11), pp.741–54. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Choudhary, C. et al., 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5942), pp.834–40. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608861>.
- Ciechanover, A., 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79(1), pp.13–21.
- Clark, T. a, Sugnet, C.W. & Ares, M., 2002. Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. *Science*, 296(5569), pp.907–910. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988574>.
- Corrionero, A., Mi??ana, B. & Valc??rcel, J., 2011. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes and Development*, 25(5), pp.445–459.
- Crotti, L.B., Bačíková, D. & Horowitz, D.S., 2007. The Prp18 protein stabilizes the interaction of both exons with the U5 snRNA during the second step of pre-mRNA splicing. *Genes and Development*, 21(10), pp.1204–1216.
- Deckert, J. et al., 2006. Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Molecular and cellular biology*, 26(14), pp.5528–43. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1592722&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Deshaies, R.J. & Joazeiro, C. a P., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry*, 78, pp.399–434.
- Desterro, J.M.P. et al., 1999. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), pp.10618–10624.
- Desterro, J.M.P. et al., 2005. SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity. *Molecular biology of the cell*, 16(11), pp.5115–26. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1266412&tool=pmcentrez>

- &rendertype=abstract.
- Desterro, J.M.P., Thomson, J. & Hay, R.T., 1997. Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Letters*, 417(3), pp.297–300.
- Deutsch, M. & Long, M., 1999. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Research*, 27(15), pp.3219–3228.
- Drag, M. & Salvesen, G.S., 2008. DeSUMOylating enzymes--SENPs. *IUBMB Life*, 60(11), pp.734–742. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18666185>http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/iub.113/asset/113_ftp.pdf?v=1&t=h6w5abcp&s=58c452b0833ccadde8163aa6a809d3a79442eccf.
- Dybkov, O. et al., 2006. U2 snRNA-protein contacts in purified human 17S U2 snRNPs and in spliceosomal A and B complexes. *Molecular and cellular biology*, 26(7), pp.2803–2816.
- Fabrizio, P. et al., 2009. The Evolutionarily Conserved Core Design of the Catalytic Activation Step of the Yeast Spliceosome. *Molecular Cell*, 36(4), pp.593–608.
- Flotho, A. & Melchior, F., 2013. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*, 82, pp.357–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746258>.
- Fox-Walsh, K.L. et al., 2005. The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), pp.16176–81. Available at: http://www.pnas.org/content/102/45/16176.abstract?ijkey=4979010e0400eb0ae76ed676cc902e22744d5c2f&keytype2=tf_ipsecsha.
- Geiss-friedlander, R. & Melchior, F., 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), pp.947–956.
- Geng, J. & Klionsky, D.J., 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein modifications: beyond the usual suspects” review series. *EMBO reports*, 9(9), pp.859–64. Available at: <http://embor.embopress.org/content/9/9/859.abstract>.
- Gill, G., 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? *Genes and Development*, 18(17), pp.2046–2059.
- Golebiowski, F. et al., 2009. System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Science signaling*, 2(72), p.ra24.
- Gong, L. et al., 1999. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Letters*, 448(1), pp.185–

189.

- Gonzalez-Santos, J.M. et al., 2002. Central region of the human splicing factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *Journal of Biological Chemistry*, 277(26), pp.23764–23772.
- Groettrup, M. et al., 2008. Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(5), pp.230–237.
- Gunderson, F.Q., Merkhofer, E.C. & Johnson, T.L., 2011. Dynamic histone acetylation is critical for cotranscriptional spliceosome assembly and spliceosomal rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), pp.2004–2009.
- Guo, D. et al., 2004. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature genetics*, 36(8), pp.837–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247916>.
- Hammer, E., Heilbronn, R. & Weger, S., 2007. The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA topoisomerase I in vitro and in vivo. *FEBS Letters*, 581(28), pp.5418–5424.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557–580.
- Hay, R.T., 2005. SUMO: A history of modification. *Molecular Cell*, 18(1), pp.1–12.
- Heideker, J., Perry, J.J.P. & Boddy, M.N., 2009. Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases. *DNA Repair*, 8(4), pp.517–524.
- Hendriks, I.A. et al., 2015. System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites. *Nature communications*, 6, p.7289. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26073453><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4490555>.
- Hendriks, I.A. & Vertegaal, A.C.O., 2016. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(9), pp.581–95. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm.2016.81><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27435506>.
- Herold, N. et al., 2009. Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. *Molecular and cellular biology*, 29(1), pp.281–301.
- Hershko, a & Ciechanover, a, 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry*, 61, pp.761–807.
- Hietakangas, V. et al., 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO

- modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), pp.45–50. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1324973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hochstrasser, M., 2000. Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5479), pp.563–564.
- Hochstrasser, M., 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458(7237), pp.422–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07958>.
- Hochstrasser, M., 2001. SP-RING for SUMO: New functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell*, 107(1), pp.5–8.
- Hoffman, B.E. & Grabowski, P.J., 1992. U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65 to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon. *Genes and Development*, 6(12 B), pp.2554–2568.
- House, A.E. & Lynch, K.W., 2006. An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nat Struct Mol Biol*, 13(10), pp.937–944.
Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998487><http://www.nature.com/nsmb/journal/v13/n10/pdf/nsmb1149.pdf>.
- Hunter, T., 2007. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell*, 28(5), pp.730–738.
- Hurley, J.H., Lee, S. & Prag, G., 2006. Ubiquitin-binding domains. *The Biochemical journal*, 399(3), pp.361–72. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1615911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hutten, S. et al., 2014. A role for the Cajal-body-associated SUMO isopeptidase USPL1 in snRNA transcription mediated by RNA polymerase II. *Journal of cell science*, 127(Pt 5), pp.1065–78. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/127/5/1065.long>.
- Jacquier, A., 1990. Self-splicing group II and nuclear pre-mRNA introns: how similar are they? *Trends in Biochemical Sciences*, 15(9), pp.353–356.
- Jentsch, S. & Psakhye, I., 2013. Control of nuclear activities by substrate-selective and protein-group SUMOylation. *Annual review of genetics*, 47, pp.167–86. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24016193>.
- Johnson, E.S. et al., 1997. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO Journal*, 16(18), pp.5509–5519.

- Johnson, E.S. & Blobel, G., 1997. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), pp.26799–26802.
- Johnson, E.S. & Gupta, A.A., 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, 106(6), pp.735–744.
- Jurica, M.S. & Moore, M.J., 2003. Pre-mRNA splicing: Awash in a sea of proteins. *Molecular Cell*, 12(1), pp.5–14.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. & Hochstrasser, M., 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp.159–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753028>.
- Kirsh, O. et al., 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO Journal*, 21(11), pp.2682–2691.
- Kistler, A.L. & Guthrie, C., 2001. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for Sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes and Development*, 15(1), pp.42–49.
- Knipscheer, P. et al., 2008. Ubc9 Sumoylation Regulates SUMO Target Discrimination. *Molecular Cell*, 31(3), pp.371–382.
- Koidl, S. et al., 2016. The SUMO2/3 specific E3 ligase ZNF451-1 regulates PML stability. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 79, pp.478–487.
- Korneta, I., Magnus, M. & Bujnicki, J.M., 2012. Structural bioinformatics of the human spliceosomal proteome. *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp.7046–7065.
- Kotaja, N. et al., 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Molecular and cellular biology*, 22(14), pp.5222–5234.
- Kuhn, A.N. et al., 2009. Stalling of spliceosome assembly at distinct stages by small-molecule inhibitors of protein acetylation and deacetylation. *RNA (New York, N.Y.)*, 15(1), pp.153–175.
- Lee, K.M. & O'Connell, M.J., 2006. A new SUMO ligase in the DNA damage response. *DNA Repair*, 5(1), pp.138–141.
- Liang, Y. et al., 2016. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Scientific Reports*, 6(26509), pp.1–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26509>.
- Lim, S.R. & Hertel, K.J., 2004. Commitment to splice site pairing coincides with a complex formation. *Molecular Cell*, 15(3), pp.477–483.
- Listerman, I., Sapra, A.K. & Neugebauer, K.M., 2006. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *TL* - 13.

- Nature structural & molecular biology*, 13 VN-r(9), pp.815–822. Available at:
[/Users/yurikoharigaya/Documents/ReadCube
Media/listerman2006.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/nsmb1135.](#)
- Liu, S. et al., 2015. A composite double-/single-stranded RNA-binding region in protein Prp3 supports tri-snRNP stability and splicing. *eLife*, 4, p.e07320. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26161500%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4520091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Liu, S. et al., 2006. The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA (New York, N.Y.)*, 12(7), pp.1418–30. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1484429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Maeder, C., Kutach, A.K. & Guthrie, C., 2009. ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nat Struct Mol Biol*, 16(1), pp.42–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098916>.
- Mahajan, R. et al., 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88(1), pp.97–107.
- Makarov, E.M. et al., 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5601), pp.2205–2208. Available at:
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/298/5601/2205%5Cnpapers3://publication/doi/10.1126/science.1077783>.
- Martin, S. et al., 2007. Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(12), pp.948–959.
- Matera, A.G. & Wang, Z., 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(2), pp.108–21. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4060434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mathew, R. et al., 2008. Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nature structural & molecular biology*, 15(5), pp.435–443.
- Matic, I. et al., 2010. Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif. *Molecular Cell*, 39(4), pp.641–652.
- Matlin, A.J., Clark, F. & Smith, C.W.J., 2005. Understanding alternative splicing: towards a

- cellular code. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(5), pp.386–398. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956978>.
- Matlin, A.J. & Moore, M.J., 2007. Spliceosome assembly and composition. *Advances in experimental medicine and biology*, 623, pp.14–35. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380338>.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. & Blobel, G., 1996. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology*, 135(6), pp.1457–1470.
- Mayas, R.M., Maita, H. & Staley, J.P., 2006. Exon ligation is proofread by the DExD/H-box ATPase Prp22p. *Nature structural & molecular biology*, 13(6), pp.482–90. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3729281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- McGlinchy, N.J. & Smith, C.W.J., 2008. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends in Biochemical Sciences*, 33(8), pp.385–393.
- Melchior, F., 2000. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, pp.591–626. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11031248>.
- Melchior, F., Schergaut, M. & Pichler, A., 2003. SUMO: Ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(11), pp.612–618.
- Meluh, P.B. & Koshland, D., 1995. Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Molecular biology of the cell*, 6(7), pp.793–807. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=301241&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Merrill, J.C. et al., 2010. A role for non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity. *PLoS ONE*, 5(1).
- Misteli, T. et al., 1998. Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. *Journal of Cell Biology*, 143(2), pp.297–307.
- Miyazono, K., Kamiya, Y. & Miyazawa, K., 2008. SUMO amplifies TGF- β signalling. *Nature Cell Biology*, 10(6), pp.635–637.
- Mohideen, F. et al., 2009. A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nature structural & molecular biology*, 16(9), pp.945–52. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2771680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Moore, M.J. & Sharp, P. a, 1993. Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature*, 365(6444), pp.364–368. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/365364a0>.
- Mossessova, E. & Lima, C.D., 2000. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Molecular Cell*, 5(5), pp.865–876.
- Mukhopadhyay, D. & Dasso, M., 2007. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(6), pp.286–295.
- Naftelberg, S. et al., 2015. Regulation of Alternative Splicing Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), pp.165–198. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034242>
<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-biochem-060614-034242>.
- Ngo, J.C.K. et al., 2005. Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Molecular Cell*, 20(1), pp.77–89.
- Nilsen, T.W. & Graveley, B.R., 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463(7280), pp.457–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nottrott, S., Urlaub, H. & Lührmann, R., 2002. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: A biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO Journal*, 21(20), pp.5527–5538.
- Okura, T. et al., 1996. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(10), pp.4277–4281.
- Ouyang, J. & Gill, G., 2009. SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription. *Epigenetics*, 4(7), pp.440–444.
- Palvimo, J.J., 2007. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 6), pp.1405–8. Available at: <http://www.biochemsoctrans.org/content/35/6/1405.abstract>.
- Pandit, S., Lynn, B. & Rymond, B.C., 2006. Inhibition of a spliceosome turnover pathway

- suppresses splicing defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), pp.13700–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1564266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Papasaikas, P. et al., 2015. Functional splicing network reveals extensive regulatory potential of the core spliceosomal machinery. *Molecular Cell*, 57(1), pp.7–22.
- Park, J.W. et al., 2004. Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), pp.15974–15979.
- Pelisch, F. et al., 2010. The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), pp.16119–16124.
- Perry, J.J.P., Tainer, J.A. & Boddy, M.N., 2008. A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(5), pp.201–208.
- Pichler, A. et al., 2002. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*, 108(1), pp.109–120.
- Pichler, A. et al., 2004. The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), pp.984–991.
- Pitha-Rowe, I.F. & Pitha, P.M., 2007. Viral defense, carcinogenesis and ISG15: Novel roles for an old ISG. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 18(5–6), pp.409–417.
- Pleiss, J.A. et al., 2007. Transcript specificity in yeast pre-mRNA splicing revealed by mutations in core spliceosomal components. *PLoS Biology*, 5(4), pp.745–757.
- Rader, S.D. & Guthrie, C., 2002. A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA (New York, N.Y.)*, 8(11), pp.1378–92.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1370345&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Raghunathan, P.L. & Guthrie, C., 1998. A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5352), pp.857–860.
- Rappsilber, J. et al., 2003. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research*, 13(1), pp.1231–1245.
- Reed, R., 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(3), pp.340–345.

- Reverter, D. & Lima, C.D., 2005. Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature*, 435(June), pp.687–692.
- Risso, G. et al., 2013. Modification of Akt by SUMO conjugation regulates alternative splicing and cell cycle. *Cell Cycle*, 12(19), pp.3165–3174.
- Ritchie, K.J. & Zhang, D.E., 2004. ISG15: The immunological kin of ubiquitin. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15(2), pp.237–246.
- Ritterhoff, T. et al., 2016. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 SUMO E3 ligase is a disassembly machine for Crm1-dependent nuclear export complexes. *Nature communications*, 7(May), p.11482.
- Rizos, H., Woodruff, S. & Kefford, R.F., 2005. p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle*, 4(4), pp.597–603.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C. & Hay, R.T., 2001. SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp.12654–12659.
- Rosas-Acosta, G. et al., 2005. A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(1), pp.56–72.
- Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3477800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rouvière, J.O., Geoffroy, M.C. & Palancade, B., 2013. Multiple crosstalks between mRNA biogenesis and SUMO. *Chromosoma*, 122(5), pp.387–399.
- Rytinki, M.M. et al., 2009. PIAS proteins: Pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(18), pp.3029–3041.
- Sapetschnig, A. et al., 2002. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO Journal*, 21(19), pp.5206–5215.
- Savare, J., Bonneaud, N. & Girard, F., 2005. SUMO Represses Transcriptional Activity of the Drosophila SoxNeuro and Human Sox3 Central Nervous System–specific Transcription Factors. *Molecular biology of the cell*, 16(June), pp.1–13.
- Schneider, M., Will, C.L., et al., 2010. Exon Definition Complexes Contain the Tri-snRNP and Can Be Directly Converted into B-like Precatalytic Splicing Complexes. *Molecular Cell*, 38(2), pp.223–235.
- Schneider, M., Hsiao, H.-H., et al., 2010. Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation. *Nature structural & molecular*

- biology*, 17(2), pp.216–221. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1718>.
- Schulz, S. et al., 2012. Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO reports*, 13(10), pp.930–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3463963&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schwartz, A.L. & Ciechanover, A., 2009. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49, pp.73–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834306>.
- Schwartz, D.C. & Hochstrasser, M., 2003. A superfamily of protein tags: Ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), pp.321–328.
- Schwer, B., 2008. A Conformational Rearrangement in the Spliceosome Sets the Stage for Prp22-Dependent mRNA Release. *Molecular Cell*, 30(6), pp.743–754.
- Scotti, M.M. & Swanson, M.S., 2016. RNA mis-splicing in disease. *Nature reviews. Genetics*, 17(1), pp.19–32. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg.2015.3>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26593421>.
- Seu, C.S. & Chen, Y., 2009. Identification of SUMO-binding motifs by NMR. *Methods in Molecular Biology*, 497, pp.121–138.
- Sharma, S. et al., 2008. Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nature structural & molecular biology*, 15(2), pp.183–91. Available at: <http://www.nature.com.ezproxy1.lib.asu.edu/nsmb/journal/v15/n2/full/nsmb.1375.html>.
- Shen, H. et al., 2008. Distinct activities of the DExD/H-box splicing factor hUAP56 facilitate stepwise assembly of the spliceosome. *Genes and Development*, 22(13), pp.1796–1803.
- Shen, Z. et al., 1996. UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics*, 36(2), pp.271–279. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030249870&partnerID=40&md5=74ada4fe958a9f13be929530ee923c2c>
http://a.c.els-cdn.com/S0888754396904620/1-s2.0-S0888754396904620-main.pdf?_tid=85a12f60-b30b-11e3-b43f-00000aacb361&acdnat=1395634962_c59112f4.
- Shi, Y., Reddy, B. & Manley, J.L., 2006. PP1/PP2A Phosphatases Are Required for the Second

- Step of Pre-mRNA Splicing and Target Specific snRNP Proteins. *Molecular Cell*, 23(6), pp.819–829.
- Shin, C., Feng, Y. & Manley, J.L., 2004. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature*, 427(6974), pp.553–558.
- Da Silva-Ferrada, E. et al., 2012. Strategies to identify recognition signals and targets of SUMOylation. *Biochemistry Research International*.
- Small, E.C. et al., 2006. The EF-G-like GTPase Snu114p Regulates Spliceosome Dynamics Mediated by Brr2p, a DExD/H Box ATPase. *Molecular Cell*, 23(3), pp.389–399.
- Smith, C.W.J. & Valcarlos, J., 2000. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(8), pp.381–388.
- Smith, D.J., Query, C.C. & Konarska, M.M., 2007. trans-Splicing to Spliceosomal U2 snRNA Suggests Disruption of Branch Site-U2 Pairing during Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 26(6), pp.883–890.
- Song, E.J. et al., 2010. The Prp19 complex and the Usp4/Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. *Genes and Development*, 24(13), pp.1434–1447.
- Sorek, R. et al., 2004. Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in Alu exons. *Molecular Cell*, 14(2), pp.221–231.
- Soret, J. et al., 2003. Altered Serine/Arginine-Rich Protein Phosphorylation and Exonic Enhancer-Dependent Splicing in Mammalian Cells Lacking Topoisomerase I. *Cancer Research*, 63(23), pp.8203–8211.
- Staley, J.P. & Guthrie, C., 1999. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Molecular Cell*, 3(1), pp.55–64.
- Staley, J.P. & Guthrie, C., 1998. Mechanical devices of the spliceosome: Motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 92(3), pp.315–326.
- Staley, J.P. & Woolford, J.L., 2009. Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(1), pp.109–118.
- Staněk, D. & Neugebauer, K.M., 2006. The Cajal body: A meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma*, 115(5), pp.343–354.
- Stevens, S.W. & Abelson, J., 2002. Yeast pre-mRNA splicing: Methods, mechanisms, and machinery. *Methods in Enzymology*, 351, pp.200–220.
- Su, H.L. & Li, S.S.L., 2002. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene*, 296(1–2), pp.65–73.
- Suh, H.Y. et al., 2012. Crystal structure of DeSI-1, a novel deSUMOylase belonging to a

- putative isopeptidase superfamily. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80(8), pp.2099–2104.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., et al., 2001. Yeast Ull1/Siz1 Is a Novel SUMO1/Smt3 Ligase for Septin Components and Functions as an Adaptor between Conjugating Enzyme and Substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), pp.48973–48977.
- Takahashi, Y. et al., 2000. Yeast Ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *Journal of biochemistry*, 128(5), pp.723–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11056382>.
- Takahashi, Y., Toh-e, A. & Kikuchi, Y., 2001. A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene*, 275(2), pp.223–231.
- Tammsalu, T. et al., 2015. Proteome-wide identification of SUMO modification sites by mass spectrometry. *Nature protocols*, 10(9), pp.1374–1388. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.095>.
- Tanaka, N., Aronova, A. & Schwer, B., 2007. Ntr1 activates the Prp43 helicase to trigger release of lariat-intron from the spliceosome. *Genes and Development*, 21(18), pp.2312–2325.
- Tang, X. et al., 2014. Identification of SUMOylated proteins in the silkworm *Bombyx mori*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), pp.22011–22027.
- Tazi, J. et al., 1993. Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing. *Nature*, 363(6426), pp.283–286.
- Tazi, J., Bakkour, N. & Stamm, S., 2009. Alternative splicing and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(1), pp.14–26.
- Tirard, M. et al., 2012. In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(51), pp.21122–21127. Available at: <http://www.pnas.org/content/109/51/21122.full.pdf>.
- Tsai, R.-T. et al., 2007. Dynamic interactions of Ntr1-Ntr2 with Prp43 and with U5 govern the recruitment of Prp43 to mediate spliceosome disassembly. *Molecular and cellular biology*, 27(23), pp.8027–8037.
- Tsai, R.T. et al., 2005. Spliceosome disassembly catalyzed by Prp43 and its associated components Ntr1 and Ntr2. *Genes and Development*, 19(24), pp.2991–3003.
- Tseng, C.-K. & Cheng, S.-C., 2008. Both catalytic steps of nuclear pre-mRNA splicing are reversible. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5884), pp.1782–1784.
- Umen, J.G. & Guthrie, C., 1995. A novel role for a U5 snRNP protein in 3' splice site selection. *Genes and Development*, 9(7), pp.855–868.

- Valin, a & Gill, G., 2007. Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 6), pp.1393–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031229>.
- van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L., 2012. Ubiquitin-Like Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), pp.323–357.
- Verdone, L. et al., 2004. Lsm proteins promote regeneration of pre-mRNA splicing activity. *Current Biology*, 14(16), pp.1487–1491.
- Verger, A., Perdomo, J. & Crossley, M., 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO reports*, 4(2), pp.137–142.
- Vertegaal, A.C.O. et al., 2004. A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), pp.33791–33798.
- Vertegaal, A.C.O. et al., 2006. Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5(12), pp.2298–2310.
- Vethantham, V., Rao, N. & Manley, J.L., 2007. Sumoylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex. *Molecular and cellular biology*, 27(24), pp.8848–58. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2169417&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vijay-Kumar, S. et al., 1987. Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *Journal of Biological Chemistry*, 262(13), pp.6396–6399.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E. & Cook, W.J., 1987. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 194(3), pp.531–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3041007>.
- Wahl, M.C. & Lührmann, R., 2015. SnapShot: Spliceosome Dynamics III. *Cell*, 162(3), pp.690–690.
- Wahl, M.C., Will, C.L. & Lührmann, R., 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell*, 136(4), pp.701–718.
- Wang, C. et al., 1998. Phosphorylation of spliceosomal protein SAP 155 coupled with splicing catalysis. *Genes and Development*, 12(10), pp.1409–1414.
- Wang, G.-S. & Cooper, T. a, 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, 8(october), pp.749–761.
- Wang, H.Y. et al., 1998. SRPK2: A differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in

- mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 140(4), pp.737–750.
- Wang, Z. & Burge, C.B., 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(5), pp.802–13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2327353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ward, A.J. & Cooper, T.A., 2010. The pathobiology of splicing. *Journal of Pathology*, 220(2), pp.152–163.
- Warkocki, Z. et al., 2009. Reconstitution of both steps of *Saccharomyces cerevisiae* splicing with purified spliceosomal components. *Nature structural & molecular biology*, 16(12), pp.1237–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19935684>.
- Weger, S., Hammer, E. & Heilbronn, R., 2005. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Letters*, 579(22), pp.5007–5012.
- Wen, D. et al., 2014. Important role of SUMOylation of spliceosome factors in prostate cancer cells. *Journal of Proteome Research*, 13(8), pp.3571–3582.
- Will, C.L. & Lührmann, R., 2006. 13 Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 43, pp.369–400. Available at: <https://cshmonographs.org/csh/index.php/monographs/article/view/3739>.
- Will, C.L. & Lührmann, R., 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), pp.1–2.
- Xiao, S.H. & Manley, J.L., 1997. Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes and Development*, 11(3), pp.334–344.
- Xiao, X. et al., 2007. Coevolutionary networks of splicing cis-regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), pp.18583–18588.
- Xirodimas, D., 2008. Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 5), pp.802–806. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18793140%5Cnfile:///Users/nrehjerpe/Documents/Papers2/Articles/2008/Xirodimas/XirodimasBiochem Soc TransNovel substrates and functions for the ubiquitin-like molecu.
- Xu, Y.Z. & Query, C.C., 2007. Competition between the ATPase Prp5 and Branch Region-U2 snRNA Pairing Modulates the Fidelity of Spliceosome Assembly. *Molecular Cell*, 28(5), pp.838–849.

- Yang, S.-H. et al., 2006. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO journal*, 25(21), pp.5083–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1630412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yang, S.H. et al., 2003. SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(6), pp.528–530.
- Yang, S.H. & Sharrocks, A.D., 2004. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Molecular Cell*, 13(4), pp.611–617.
- Yeh, E.T.H., 2009. SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with life's processes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), pp.8223–8227.
- Yunus, A.A. & Lima, C.D., 2009. Purification of SUMO conjugating enzymes and kinetic analysis of substrate conjugation. *Methods in Molecular Biology*, 497, pp.167–186.
- Yunus, A. a & Lima, C.D., 2006. Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway. *Nature structural & molecular biology*, 13(6), pp.491–499.
- Zhao, X. & Blobel, G., 2005. A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), pp.4777–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=555716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zhou, L. et al., 2014. Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA. *Nature*, 506(7486), pp.116–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24240276>.
- Zillmann, M., Zapp, M.L. & Berget, S.M., 1988. Gel electrophoretic isolation of splicing complexes containing U1 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol*, 8(2), pp.814–821. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2832738>.