



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular**

# **Caracterización del rol del factor de *splicing* SRSF1 en la vía de conjugación de SUMO**

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

**Pablo Andrés Mammi**

Director de tesis: Dra. Anabella Srebrow

Consejero de Estudios: Dr. Alberto Kornblihtt

Lugar de trabajo: IFIBYNE-CONICET; FCEyN-UBA

Buenos Aires, 2019

## Caracterización del rol del factor de *splicing* SRSF1 en la vía de conjugación de SUMO

La familia de proteínas SR, ampliamente caracterizadas como reguladores del proceso de *splicing*, comparten una estructura modular conservada que consiste en uno o dos motivos de reconocimiento de RNA (RRMs) y un dominio rico en Serinas-Argininas. Hoy sabemos que algunos miembros de esta familia, y en particular SRSF1, están involucrados en una amplia variedad de funciones regulatorias a diferentes niveles de la expresión genética. Trabajos previos de nuestro laboratorio identificaron una nueva función para el factor de *splicing* SRSF1 como regulador de la conjugación del péptido SUMO a diferentes proteínas blanco o "SUMOilación". Esta modificación post-traducciona involucra una cascada enzimática que se asemeja a la de Ubiquitina, con la particularidad de que para ésta se han reportado una cantidad muy limitada de factores involucrados. El hallazgo de nuevas formas de regulación de la conjugación de SUMO es fundamental para comprender cómo se comporta esta modificación post-traducciona de proteínas y cuál es su relevancia para el funcionamiento celular. Esta tesis estuvo orientada a comprender los mecanismos por los cuales SRSF1 es capaz de favorecer la SUMOilación de ciertos sustratos en células de mamífero en cultivo.

Con el fin de desacoplar las diversas actividades de SRSF1, hemos trabajado con distintas versiones mutantes de dicha proteína, algunas obtenidas de otros laboratorios y otras desarrolladas en el nuestro. Se validaron estas variantes en su capacidad de regular el *splicing* alternativo, así como en múltiples aspectos de su localización subcelular. Una vez analizadas en estos rasgos, las diferentes versiones de SRSF1 fueron probadas en ensayos de SUMOilación (global y sustrato-específica), interacciones proteína-proteína, regulación de estabilidad proteica y del RNA, y unión al RNA. Descartamos que el mecanismo involucre algunos aspectos característicos de proteínas que regulan la SUMOilación, como la presencia de sitios de interacción con SUMO (SIM), o la propia conjugación de SRSF1 a este péptido. Detectamos dos variantes de SRSF1 (SRSF1 W134A y SRSF1 NRS) incapaces de estimular la conjugación de SUMO a nivel global. Estos datos, conjuntamente con información preexistente sobre dichas variantes, sugerirían una dependencia de la unión al RNA y de la localización celular en el mecanismo de acción estudiado. Sin embargo, otra de las mutantes utilizadas (SRSF1 FFDD), para la cual se había reportado una pérdida en su capacidad de interaccionar con el RNA, mostró efectos exacerbados en la regulación de la SUMOilación, poniendo en duda esta

hipótesis así como también algunos datos bibliográficos. Los hallazgos obtenidos abren múltiples panoramas posibles y generan inquietantes preguntas, no sólo sobre el rol de este factor en la regulación de la SUMOilación, sino también en la caracterización funcional de sus distintos dominios que hacen de SRSF1 una proteína multifacética.

Palabras claves: factores de *splicing*, conjugación a SUMO, SUMO E3-ligasa, proteínas de unión al RNA

## **Characterizing the activity of the splicing factors in the SUMO conjugation pathway**

The SR family of proteins, widely characterized as regulators of the splicing process, share a conserved modular structure comprising one or two RNA recognition motifs (RRMs) and a serine-arginine rich domain. We currently know that some members of this family, and in particular SRSF1, are involved in a wide variety of regulatory functions at different levels of gene expression. Previous work of our laboratory has identified a new activity of the splicing factor SRSF1 as a regulator of the conjugation of the SUMO peptide to different target proteins or “SUMOylation”. This post-translational modification involves an enzymatic cascade that resembles the Ubiquitin one, with the peculiarity that for this one a very limited number of involved factors have been reported. Unraveling new forms of regulation of this conjugation is fundamental to understand how this protein modification behaves as well as its relevance for cellular function. This thesis was focused on understanding the mechanisms by which SRSF1 is able to stimulate SUMO conjugation to certain substrates in mammalian cultured cells. In order to uncouple the various activities of SRSF1, we made use of different mutant versions of this protein, either obtained from other laboratories or generated in ours. These variants were validated in their ability to regulate alternative splicing as well as in multiple aspects of their subcellular localization. Once analysed in these traits, the different versions of SRSF1 were tested in SUMOylation assays (global and substrate-specific), protein-protein interactions, regulation of protein and RNA stability, and RNA binding. We discarded that this mechanism involves some characteristic features shared by other proteins that regulate SUMOylation, such as the presence of SUMO interactive motif (SIM), or SRSF1 own conjugation to this peptide. We detected two variants of SRSF1 (SRSF1 W134A and SRSF1 NRS) unable to stimulate SUMO conjugation at a global level. These data combined with available information about these mutants suggest a dependence on RNA binding and cellular localization in the mechanism of action studied. However, one of the mutants (SRSF1 FFDD), for which a decreased ability to interact with RNA has been previously described, showed exacerbated effects with respect to the enhancement of SUMO conjugation, questioning previous hypotheses of our group as well as bibliographic data. These findings open up multiple possible scenarios and generate puzzling questions, not only about the role of this factor in the

regulation of SUMOylation, but also in the functional characterization of its different domains that make of SRSF1 a multifaceted protein.

*Keywords:* Splicing factors, SUMO conjugation, SUMO E3 ligase, RNA binding proteins

## ...AGRADECIMIENTOS

... ¡Y se larga el partido! Un partido en el que hay mucho en juego. Un equipo jugándose por alcanzar un título importantísimo en la carrera de todo jugador.... Un partido que promete mucho desde la previa pero, como todos los partidos, ¡hay que jugarlo!...

... Y este partido tiene una particularidad, en la semana nos enteramos de que el gran Guille Risso colgó los botines y dejó un lugar en el equipo para una joven incorporación: Pablito Mammi. Muy difícil reemplazar al Guille Risso... un maestro, un compañero, un jugador gambeteador como pocos, un amigo... un grande dentro y fuera de la cancha... Fue duro escuchar hablar de su retiro, pero estamos seguros de que su legado quedó marcado en los hinchas... Se comenta que todo lo que Pablito sabe de este juego, lo aprendió de Guille Risso... Veremos qué tiene para dar....

... Pablito parece que salió a la cancha sin las canilleras... Ahí se las está alcanzando Vale desde un costado del campo de juego...

... Y se empiezan a ver las conexiones... ¡A este equipo se lo ve muy unido! Mucho tendrá que ver la presencia de los más experimentados Petry, Nolo, Nacho, Manu, Lu... Ellos supieron transmitir en la cancha cosas que pocas veces se han visto en un equipo. ¿Se puede ser de los mejores profesionales y además divertirse en un partido? Ellos demuestran constantemente que si...

... El equipo viene seguro, ganando 2 a 0. Se ve la mano del presidente Alberto. Es que, detrás de un buen equipo, siempre hay una buena gestión. Este presidente con su pasión por el juego logra mantener siempre al club en un nivel competitivo, entre las mejores ligas del mundo, incluso en las peores épocas. Es indiscutible la mano del presidente en estos logros...

... Pablito empieza a tirar paredes con Laureano... Este jugador BIEN del interior se acomodó rapidísimo al equipo y hoy en día es piedra fundamental de la formación...

... Se está resbalando mucho Pablito... Sale enseguida del banco Vale con un par de botines nuevos para hacer el cambio...

... Y desde la popular, donde cuelga el cartel: “¿Y? ¿Qué hay de nuevo en el splicing alternativo? – Tomy – “... desde ahí empiezan a bajar los primeros alientos de la hinchada por la nueva incorporación: “Pabliiito! Paaabliiiiitoooo!” ¡Increíble cómo alientan esos muchachos! Son de los que no tienen absolutamente ni idea de cómo es este juego, pero para ellos su amigo siempre fue Messi... Se leen algunos de los trapos que lograron entrar: “LosPo”, “StaME”... Y tantos otros que no están afiliados a ningún gremio, pero que lo alentaron desde las inferiores sin parar... Y ahora tampoco paran de gritar... le deben recordar las cosas más emocionantes de la vida... conmovedor...

... El partido se pone complicado, áspero, rudo, trabado, embarrado... por momentos, un verdadero potrero... Pablito no encuentra su lugar en la cancha, tiene que cambiar reiteradas veces de posición y todo se le hace cuesta arriba...

... final del primer tiempo y el partido va empatado 2 -2.... Entretiempo...

... vamos a una pequeña tanda comercial...

... Este partido es auspiciado por “CONICET” y llega a nosotros gracias a “Universidad de Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales... ¿No sabés dónde estudiar? Estudié en la UBA. Universidad de Buenos Aires, excelencia en educación...” ....

... ¡Comienza el segundo tiempo!... Ya desde la primera pelota se nota que este equipo cambió la actitud... ¡Con qué fuerza salieron estos jugadores! Se nota que en el vestuario hubo una gran charla técnica de la DT Anabella. Y, ¿cuándo no? Siempre una palabra de aliento, siempre un consejo acertado, siempre pensando en la cancha y fuera de ella. ¡¡Ella sí que sabe sacar lo mejor de sus jugadores!!!...Definitivamente, la GALLARDO de la ciencia...

... El equipo empieza a tocar mejor... ¡Ya era hora que los jugadores den respuestas! y más cuando se invirtió tanto en la pre-temporada trayendo jugadores de Europa. José y Rita empiezan a hacer lo suyo dentro de la cancha... Estoy convencido que dejarán grandes huellas en este club...

... ¿Cómo corre la capitana de este equipo? Firme a su entrenamiento, Berta demuestra que está en perfectas condiciones para llevar y merecer la cinta que le rodea el brazo. Experiencia, sabiduría, ternura (Si... ahí hay ternura aunque no lo crean... y mucha)... Por lejos la que más motiva... Con ella en el equipo, ¡hasta a la guerra!...

... Pablito se corta la cabeza (¿o fueron las manos?)... entra Vale corriendo con un botiquín para atenderlo cuanto antes...

... Y la DT mete un cambio estratégico... Entra la joven promesa: El Pocho Gaioli... Un gran jugador desde lo táctico. Se lo ve siempre estudiando mucho el juego. Creemos que ese entusiasmo algún día se va a concretar en grandes proezas dentro de la cancha... sobretodo el día que se ponga anteojos para ver mejor la pelota... Gran cambio de Anabella para darle más aire a Pablito y que se ubique mejor en la cancha en los últimos minutos...

... El equipo empieza a remontar... Se nota la sangre fresca que se suma a los experimentados... Juan, Carmela, Guilli y Lucho no pasan desapercibidos en esta formación. Ellos le recuerdan al resto la emoción del juego amateur con la cuál se puede jugar todos los días...

... Desde el banco se escucha el aliento desesperado de los recién incorporados: Cami, Rocha, Alejo, Lukaku, Marqui, Eze... ¡Cómo mueven los pibes de la reserva! No dejen de alentar nunca...

... Se lo nota un poco cansado a Pablito... Parado en la cancha, con las manos en las rodillas.... Levanta la cabeza buscando algo de aire... tratando de encontrar aliento en la tribuna... Y, ¿cómo no apoyarse en la tribuna? Si ahí está toda su familia... Los padres que lo apoyaron incondicionalmente siempre, ¿ja cuántos entrenamientos lo habrán llevado?i (y eso que es hijo del medio)... el orgullo en sus semblantes, cómo si su hijo jugara en el Barcelona... eso parece alcanzar... si para ellos es el Barça, para él es el Barça... Todo, TODO, a ellos... ¡Están los hermanos! Los que a meta empuje hacen más divertida la rutina del jugador... ¡La abuela! Cuando Pablito jugaba en el club de barrio de Manzanares ella ya movía contactos para que él salga en primera plana del diario local. ¡Qué lujo de abuela!... Y ahí, como loco, ¡el tío! Ese que lo hizo hinchar de todo... la música, del más GR4NDE, de la vida... Hasta están por ahí saltando cuñados, primos, otros tíos, una suegra copada, y una chiquita de año y meses con un cartel de un corazón seguido de la palabra "padrino" ... Imposible no encontrar aliento ahí... Pablito se levanta y sale a correr como en el primer minuto...

... Pablito enchufado de nuevo... Con Fede se tiran mutuamente pases filtrados, ¡Qué bien se entienden estos dos jugadores!... Pablito ahora juega tranquilo, con la confianza de tener en la espalda dos estandartes como Mica y Botti... Pablito mira de reojo a Nico y amaga siempre a darle la pelota, pero nunca concreta...

... Jugada que promete de Pablito.. se le acaba la cancha y se va con pelota y todo afuera... tranquilos, ahí está Vale... Vale, Vale, Vale ¿Otra vez? ¡¡¡Por favor que alguien le de la copa a esta mujer!!!... le alcanza la pelota en mano, palmadita en la espalda y frase alentadora: “Vamo’ pibe, ¡vos podés!”....

... ¿Quién es esa que enfocan en la tribuna?... Tiene una vincha de Pablito... Debe ser Coti... ¡¡¡Esa sí que es una gran groupie!!! La que estuvo siempre... y eso que pasaron por malas... cuando se fue a la B a ella no le importó... Ahí se mantuvo siempre... aunque él esté lejos de ser el mejor jugador, el más hábil, el más fácil... ella piensa lo contrario... y poco importa... ella hace que él sea mejor... ella hace que todo sea un poco mejor... por lejos, ¡LA mejor!... ¡¡¡Inexplicable lo que debe sentirse tener ese aliento incondicional!!!... Inmerecida botinera se ganó este jugador...

... El partido sigue 2-2...

... Y cuando todo parece perdido... Cuando el partido casi se daba por terminado... No todo estaba dicho... Aparece Pablito solo con la pelota... enfrente, ningún obstáculo... Se va solo para la victoria... ¿En qué estará pensando?... ¡Si pudiéramos meternos en su cabeza!...

*“(corriendo)... cuantas cosas en la cabeza.... Se me vienen los primeros entrenamientos en el LFBM... las risas de oficina con Dani y Elba... los mates y los jueves dulces en el labo Sur con Andre, Viki (310) y Martu... Los ciclos de cine... La mudanza a un estadio en construcción... Los amigos con los que empezamos juntos en el club... algunos siguen jugando (Silvio), otros le siguen metiendo (Valen)... (sigo corriendo)... Se me vienen a la cabeza los que ya se fueron del equipo hace un tiempo (Celi, Anita F, Anita Q, y hasta un francés renegado) y algunos más recientes (Marianita, Dieguito, Tincho, Meli)... Luchita, la que se fue, pero sigue estando, siempre estando, incluso en Escocia, estuvo... Se me cruza mi abuelo del club, Matute Blaustein... (sigo corriendo)... Se me viene a la cabeza Orlando, el increíble ORLANDO, ese aguador que de vez en cuando me tira un poco de agua en la cara para que me mantenga despierto y no me olvide jamás de que hay cosas más importantes que una jeringuita...(sigo corriendo)”*

... Y ahí se va Pablito hacia adelante... La victoria está al alcance, ahí nomás... De fondo se escucha toda la tribuna alentando...

*“Y va el tercero, y va el tercero, y va el tercero...”*

**GGGGOOOOOOLLLLLLLLLL**

Declaraciones de Pablito:

*“Quiero agradecer al equipo. Acá lo importante es el equipo. Esto no hubiera sido posible sin el equipo que trabajó unido para que lleguemos a donde estamos. No me quiero olvidar de ninguno, pero no puedo dejar de nombrar a Fla, Domi, Car, Mica, Agus, Eve, Cari, los ACLs, los jefes de las otras categorías. Acá se labura todo el año para lograr un objetivo como este. Para que hoy pudiéramos hacer nuestro mejor juego los utileros (Pepe, Amaranta, Marian, Hernán, Marie, Esteban, Euge, Juana) se rompieron el alma desde temprano. Hasta los que mantienen las instalaciones, el guerrero Alfred, Juancito, los muchachos de seguridad y las muchachas de limpieza. Sin ellos se cae a pedazos esto. No solo el equipo, sino toda la institución. Cuando se hacen las cosas bien, se ven resultados. Y a mi familia y amigos que me bancaron en todas. Ellos son parte de esto también. Hoy quizás el que ganó fue el equipo, pero atrás del equipo hubo mucho laburo de todos. Definitivamente esta fue una victoria de todos. Así que este festejo, ¡es para todos ellos!”*

*“No fracasé, sólo descubrí mil cosas que no funcionaron.”*

Thomas A. Edison (1847-1931)

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b>	16
<i>1.1 Splicing</i>	16
1.1.1 ¿Qué es el <i>splicing</i> ?	16
1.1.2 Factores de <i>splicing</i>	17
1.1.3 Proteínas SR	19
1.1.4 SRSF1	22
1.1.4.1 Estructura	23
1.1.4.2 Localización	25
1.1.4.3 SRSF1 y NMD	26
1.1.4.4 SRSF1 y transporte de mRNA	27
1.1.4.5 SRSF1 y traducción	28
1.1.4.6 SRSF1 y estabilidad genómica	29
<i>1.2 Modificaciones Post-traduccionales</i>	30
1.2.1 UBLs	31
1.2.2 SUMO	33
1.2.3 Vía de conjugación de SUMO	34
1.2.4 E3 Ligasas	36
1.2.5 Funciones de la conjugación de SUMO	38
<i>1.3 SUMO y splicing</i>	40
1.3.1 La SUMOilación y el proceso de <i>splicing</i>	41
1.3.2 Numerosas proteínas son conjugadas a SUMO durante el proceso de <i>splicing in vitro</i>	42
1.3.3 Participación de SRSF1 en la vía de conjugación de SUMO	43
1.3.4 La regulación de la SUMOilación por SRSF1 es dependiente del dominio RRM2	44
1.3.5 Otras proteínas de la familia SR también son capaces de estimular la SUMOilación	45

I.3.6	SRSF1 interacciona con Ubc9 y PIAS1	46
I.3.7	SRSF1 es también sustrato de SUMOilación	47
I.3.8	La SUMOilación de proteínas spliceosomales es regulada por SRSF1 en células en cultivo	47

## **OBJETIVOS**

49

## **MATERIALES Y METODOS**

50

M.1	Cultivo celular	50
M.1.1	Mantenimiento líneas celulares	50
M.1.2	Transfecciones con DNA	50
M.2	Purificación de proteínas conjugadas a 6xHis-SUMO	51
M.3	Técnicas de interacción entre macromoléculas	53
M.3.1	Co-Inmunoprecipitación	53
M.3.2	Inmunoprecipitación de complejos RNP (RIP)	53
M.4	Western Blots	54
M.5	Técnicas de imágenes de Fluorescencia	55
M.5.1	Microscopía de Fluorescencia	55
M.5.2	Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado (FRAP)	56
M.6	Etiquetado de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular (SILAC)	57
M.6.1	Generación de líneas marcadas	57
M.6.2	Transfección de células con construcciones GFP-SRSF1	58
M.6.3	Cosechado de células	58
M.6.4	Inmunoprecipitación y preparado de muestras para proteómica	58
M.6.5	Evaluación de péptidos detectados	60
M.6.6	Análisis ontológico	62
M.7	Preparación de plásmidos	63

M.7.1 Transformación de bacterias	63
M.7.2 Preparación de plásmidos a pequeña escala o minipreps	64
M.7.3 Preparación de plásmidos a gran escala o maxipreps	64
M.7.4 Cuantificación de plásmidos	64
M.7.5 Mutagénesis dirigida	64
M.8 RNA, RT & PCR	66
M.8.1 Purificación de RNA	66
M.8.2 Transcripción reversa (RT)	67
M.8.3 PCR: detección de cDNA correspondiente a mRNAs derivados de minigenes reporteros de <i>splicing</i> de EDI	68
M.8.4 PCR en tiempo real (qPCR)	69
M.8.5 Lista de <i>primers</i> utilizados	70

## **RESULTADOS**

R.1 La SUMOilación de diversas proteínas es regulada por SRSF1	71
R.2 Elección de mutantes de SRSF1	74
R.3 Validación de la actividad de mutantes de SRSF1 en el proceso de <i>splicing</i> alternativo	77
R.4 Validación de la localización de mutantes SRSF1	79
R.5 Dinámica nuclear de mutantes de SRSF1	81
R.6 Regulación de la SUMOilación de sustratos por mutantes de SRSF1	85
R.7 SUMOilación global regulada por mutantes de SRSF1	87
R.8 SUMOilación de las variantes de SRSF1	89
R.9 Interacción de mutantes de SRSF1 con proteínas cuya SUMOilación es regulada por este factor	92
R.10 Interacción de variantes de SRSF1 con proteínas de la vía de SUMO	93

R.11	Interactoma de SRSF1	95
R.12	SRSF1 y sus variantes sus variantes interaccionan con diversos mRNAs	103
R.13	Regulación de la estabilidad de Ubc9 por SRSF1	106
R.14	Regulación de la estabilidad de PIAS1 por SRSF1	107
R.15	Resumen de los resultados obtenidos	110

## **DISCUSIÓN**

D.1	¿Depende de la unión al RNA?	111
D.2	¿Depende de la localización?	113
D.3	Todo lo que sube, tiene que bajar: de-conjugación de SUMO	115
D.4	Un efecto, ¿un solo mecanismo? (y un poco de cronología)	117
D.5	Regulación de PIAS1: la clave de la mutante W134A	118
D.6	Perspectivas a futuro	119

## **BIBLIOGRAFÍA**

# INTRODUCCIÓN

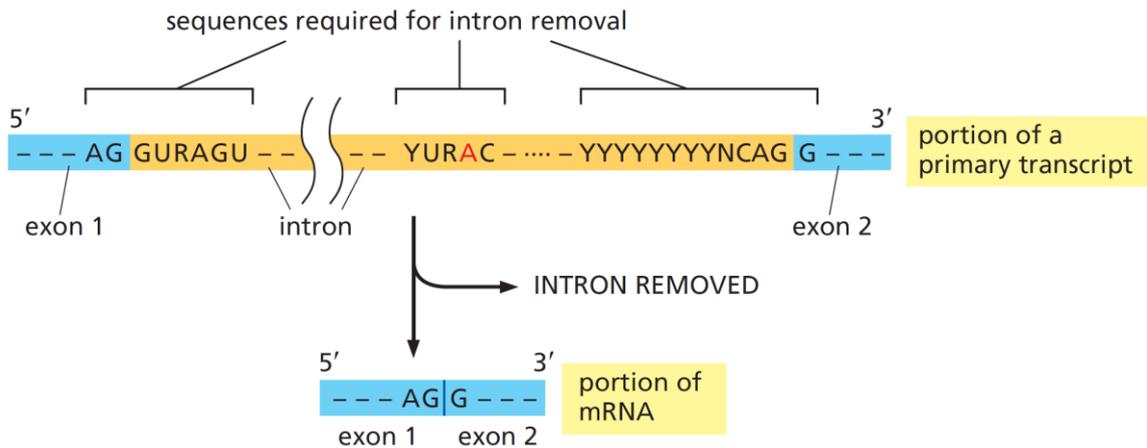
## ***I.1 Splicing***

¿Cómo es posible que el ser humano y un organismo tanto más simple como el nematode *C. elegans* posean una cantidad similar de genes? ¿A través de qué mecanismos la célula puede producir proteínas que lleven a cabo las tan diversas funciones de los eucariotas superiores a partir de ese número de genes que no explica la complejidad de estos? El descubrimiento del *splicing* en 1977 aportó un nuevo paso al flujo de la información genética desde el DNA al RNA y síntesis proteica, y hoy en día nos ayuda a responder estas intrigantes preguntas. No sólo expandió el conocimiento sobre la expresión genética, sino que aportó luz a la evolución de mecanismos que derivaron en la selección de nuevos genes en eucariotas. El proceso de *splicing* explicó, en parte, la complejidad de organismos superiores a partir de un número relativamente bajo de genes, con el descubrimiento del *splicing alternativo*, un mecanismo descrito actualmente para el 95% de los genes de mamíferos. Se podría decir entonces, que esta forma de procesamiento del RNA es la regla para la síntesis de mRNA, ampliando exponencialmente las isoformas proteicas que se pueden obtener a partir de un único gen. Desde la publicación original de Berget *et al.*[1], el *splicing* se convirtió en uno de los mecanismos moleculares de la expresión genética mayormente estudiado y más aún, se describen constantemente nuevas funciones de los factores asociados a dicho proceso, así como su implicancia en distintos eventos de la regulación del funcionamiento celular.

### ***I.1.1 ¿Qué es el splicing?***

Dentro del procesamiento de los pre-mRNAs, un transcripto precursor es transformado en un mRNA maduro a través de una serie de mecanismos moleculares entre los que se incluye el *splicing*. Durante este proceso los intrones son escindidos de sus exones flanqueantes y estos últimos son posteriormente religados [2]. Podemos definir a los exones, entonces, como todo elemento de RNA que se transcribe y permanece en el mRNA maduro. Este mecanismo es co-transcripcional y necesita de

secuencias específicas que en el RNA reclutan distintos factores guiando el procesamiento de la molécula mensajera emergente. Estos sitios se pueden resumir en tres: sitio dador del *splicing* (también llamado sitio 5'SS); sitio receptor del *splicing* (también llamado 3'SS) conteniendo un tracto de poli-pirimidinas; y una adenina en el sitio de ramificación (**figura I.1**).



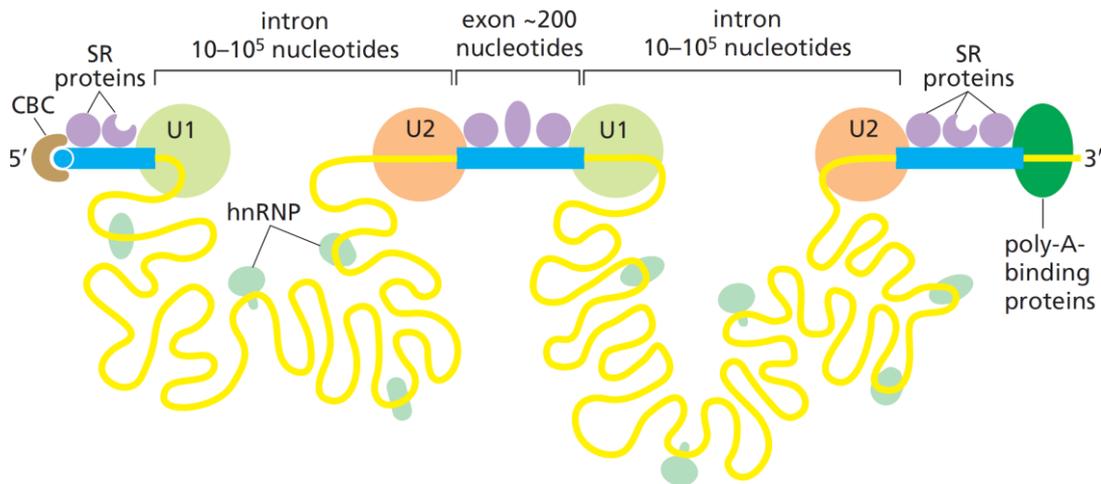
**Figura I.1 | Secuencias consenso dentro de intrones y exones de mamíferos:** En color azul se observan los extremos de los exones flanqueantes a un intrón, de color amarillo. Los nucleótidos marcados representan las secuencias consenso, reconocidas por el spliceosoma, necesarias para una reacción de *splicing* eficiente. (Molecular Biology of the Cell, 6th edition-Alberts).

Los intrones son removidos mediante dos reacciones de trans-esterificación [3]. Primero, el grupo 2'OH de la adenosina del sitio de ramificación lleva a cabo un ataque nucleofílico al 5'SS. Esto resulta en un clivaje en este sitio y la ligación del extremo 5' del intrón a la adenosina del sitio de ramificación, 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 mRNA maduro y liberando el intrón.

### 1.1.2 Factores de *splicing*

Para poder llevarse a cabo, el *splicing* necesita de la ayuda de varios factores. La maquinaria principal encargada de la catálisis de este proceso es el *spliceosoma*, un complejo macromolecular compuesto por proteínas y RNA no codificante. Dos tipos de *spliceosoma* han sido descritos, el "mayor" y el "menor". El *spliceosoma* mayor, que es el responsable de la mayoría de los eventos de *splicing*, está compuesto por cinco

partículas ribonucleoproteicas (snRNP) denominadas U1, U2, U5, U4 y U6. El ensamblado del spliceosoma se realiza de una manera sincronizada y específica sobre los sitios de *splicing* determinando qué eventos se llevarán a cabo sobre las moléculas precursoras de RNA que están siendo transcritas [4], [5].

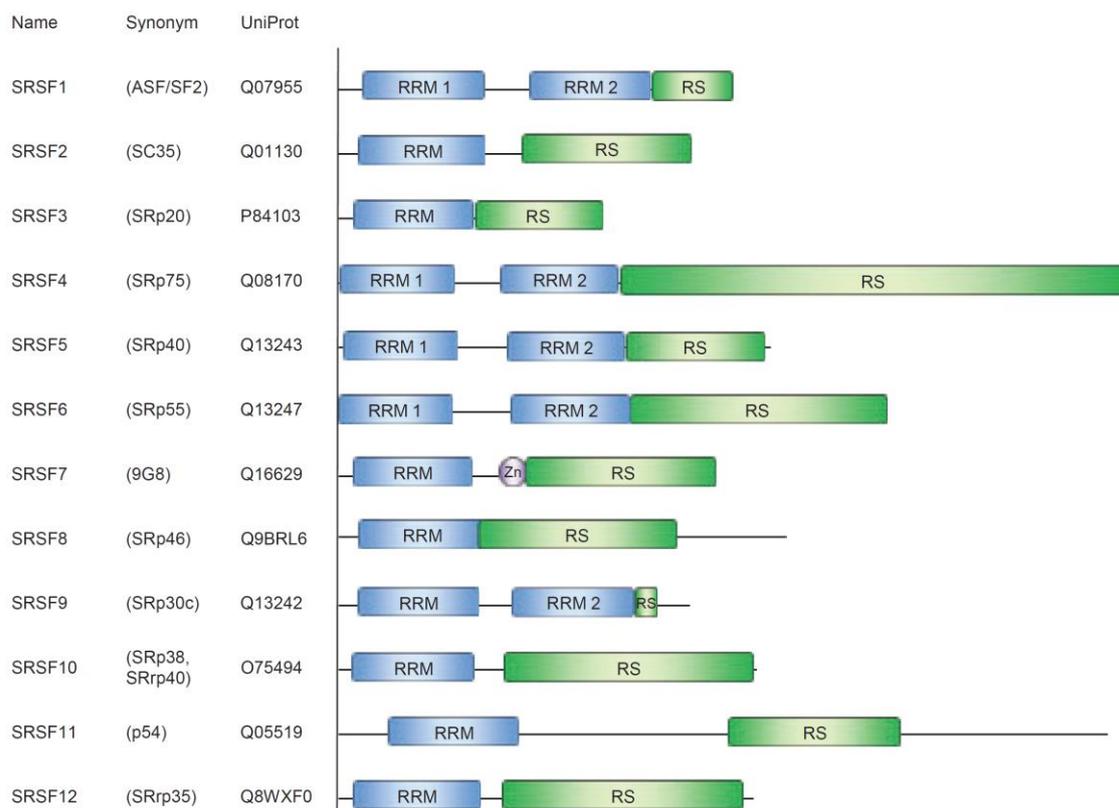


**Figura I.2| Factores accesorios de splicing:** En el esquema se observan los exones en forma de cajas rectangulares azules, y los intrones como líneas serpenteantes amarillas. Además de las partículas ribonucleoproteicas U1 y U2, se observan factores accesorios hnRNP, color verde azulado, y SR, color violeta, sobre los sitios específicos de pegado. (Molecular Biology of the Cell, 6th edition- Alberts)

Un eficiente *splicing* del pre-mRNA no solo requiere de las snRNPs, sino que durante toda la reacción numerosos factores auxiliares desempeñan roles esenciales. Dos grandes grupos de proteínas resaltan por su participación tanto en el *splicing* constitutivo como en el alternativo: las proteínas ricas en serinas-argininas (SR) y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP). Estas proteínas de unión al RNA interactúan con secuencias específicas de este, localizadas tanto en intrones como en exones, denominadas *splicing enhancers* o *splicing silencers*, según recluten factores que estimulen o inhiban el *splicing* respectivamente (**Figura I.2**). Estos factores comparten una estructura modular específica que contiene al menos un dominio de unión al RNA, llamado RRM (RNA Recognition Motif), que es crucial para el desarrollo de sus funciones.

### I.1.3 Proteínas SR

Esta familia de proteínas descriptas por su función tanto en *splicing* constitutivo como alternativo, además de contener uno o dos dominios RRM hacia el N-terminal, se caracteriza por la presencia de varias repeticiones de dipéptidos Serina-Arginina, que conforman el dominio RS en el extremo C-terminal [6]–[8]. Al ser muchas las proteínas que cumplen con estas características, en el 2010 se estableció un estricto criterio de definición para este grupo de factores. A partir de esa fecha se considera dominio RS a aquel motivo proteico de al menos 50 aminoácidos consecutivos con un porcentaje de contenido Serina-Arginina mayor al 40% [9]. Se clasificaron de esa manera doce proteínas SR en humanos cuyas estructuras se esquematizan en la **figura I.3**. Si bien inicialmente se describieron interacciones proteína-proteína a través de estos dominios, se ha demostrado que los mismos también son capaces de interactuar de forma directa con moléculas de RNA [10], [11]. Análogamente, también se han descrito interacciones proteicas a través de los dominios RRM [12].

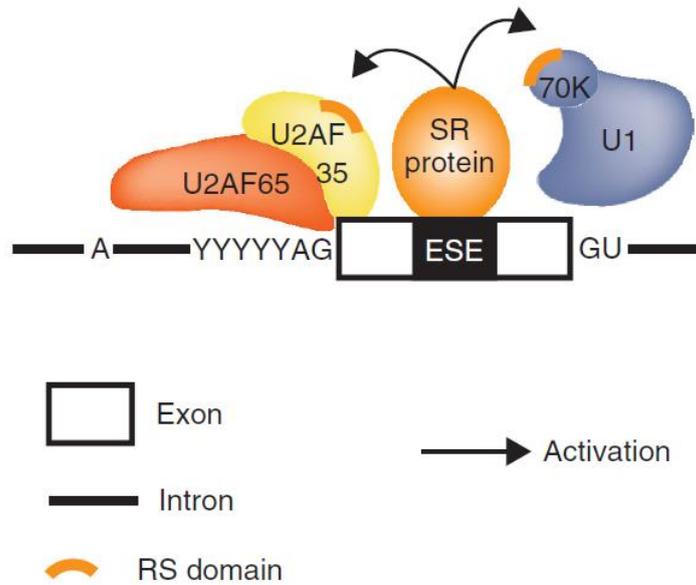


**Figura I.3 | Representación esquemática de las 12 proteínas SR en humanos:** En la columna izquierda se observa el nombre según la clasificación de Manley y colaboradores [9], y en las columnas siguientes se muestra el nombre original de cada proteína junto al código de identificación de UniProt. Todas las proteínas SR presentan al menos un dominio de unión a RNA (azul), y un dominio RS (verde). Extraído de [13].

Las proteínas SR están involucradas en el reclutamiento del *spliceosoma* en las distintas secuencias consenso de *splicing* mencionadas en la sección anterior (**figura I.1**). El modelo de definición exónica del *splicing* [14] propone que la interacción entre los componentes reclutados sobre los sitios 3'SS y 5'SS que flanquean un determinado exón, sirven para distinguir ese exón de los intrones adyacentes. Las proteínas SR participan en este proceso fundamental para el *splicing* constitutivo uniéndose simultáneamente a las proteínas ensambladas en ambos sitios. Se ha propuesto que el dominio rico en Serinas-Argininas de una proteína SR unida a un ESE (*Exon Splicing Enhancer*) interactúa directamente con el dominio SR de otros factores, facilitando así el reclutamiento de componentes como la U1 snRNP al sitio 5'SS y U2AF al sitio 3'SS [6] (**figura I.4**). Estos factores, además, aseguran el acoplamiento entre el *splicing* y la transcripción, ya que son reclutados junto a la snRNP U1 por la RNA polimerasa II y conjuntamente se depositan en los transcritos nacientes [15].

En contraste con la clara regulación positiva del *splicing* constitutivo, las proteínas SR regulan de manera más compleja el *splicing* alternativo. La posición relativa dentro del pre-mRNA donde ocurre la interacción entre esta molécula y la proteína SR puede tener efectos muy distintos sobre los sitios de *splicing* alternativo seleccionados en un determinado evento [16], [17]. Incluso se ha demostrado que mientras la unión exón-SR tiende a la inclusión del exón alternativo, la unión intrón-SR tiende al efecto opuesto [18]–[20].

Si bien en conjunto las proteínas SR son esenciales para el *splicing*, distintos miembros de la familia muestran cierto grado de redundancia funcional, dado que pueden sustituirse unas por otras en ensayos *in vitro* [6], [21]–[23]. Sin embargo, cada factor parece poseer una especificidad de sustrato particular [24]. Esto se ve enfatizado por el hecho de que ratones knock-out para SRSF1, SRSF2 o SRSF3 son letales embrionarios [25]–[27].



**Figura I.4 | Reclutamiento de factores de splicing por proteínas SR:** las proteínas SR se unen a sitios específicos sobre el pre-mRNA e interactúan con otros factores de splicing, componentes del spliceosoma, a través de los dominios RS presentes en todas estas proteínas (segmentos naranjas sobre las proteínas). Como consecuencia de estas interacciones diversas proteínas se reclutan sobre los sitios de splicing. En la figura se ejemplifica la unión de una proteína SR a un elemento potenciador del splicing (ESE), y el reclutamiento del complejo U2AF y U1-70k. Tomado de [28].

Aunque inicialmente fueron descritos como factores de *splicing*, los miembros de esta familia se caracterizan por la amplia variedad de funciones celulares en las que se los vio implicados en hallazgos más recientes. Algunas de las proteínas SR fueron vinculadas a la regulación de la estabilidad del genoma [29], la elongación transcripcional [21], el procesamiento de micro RNAs [30], la exportación de mRNAs [31], la estabilidad del mRNAs [32] y la traducción de mRNAs [12].

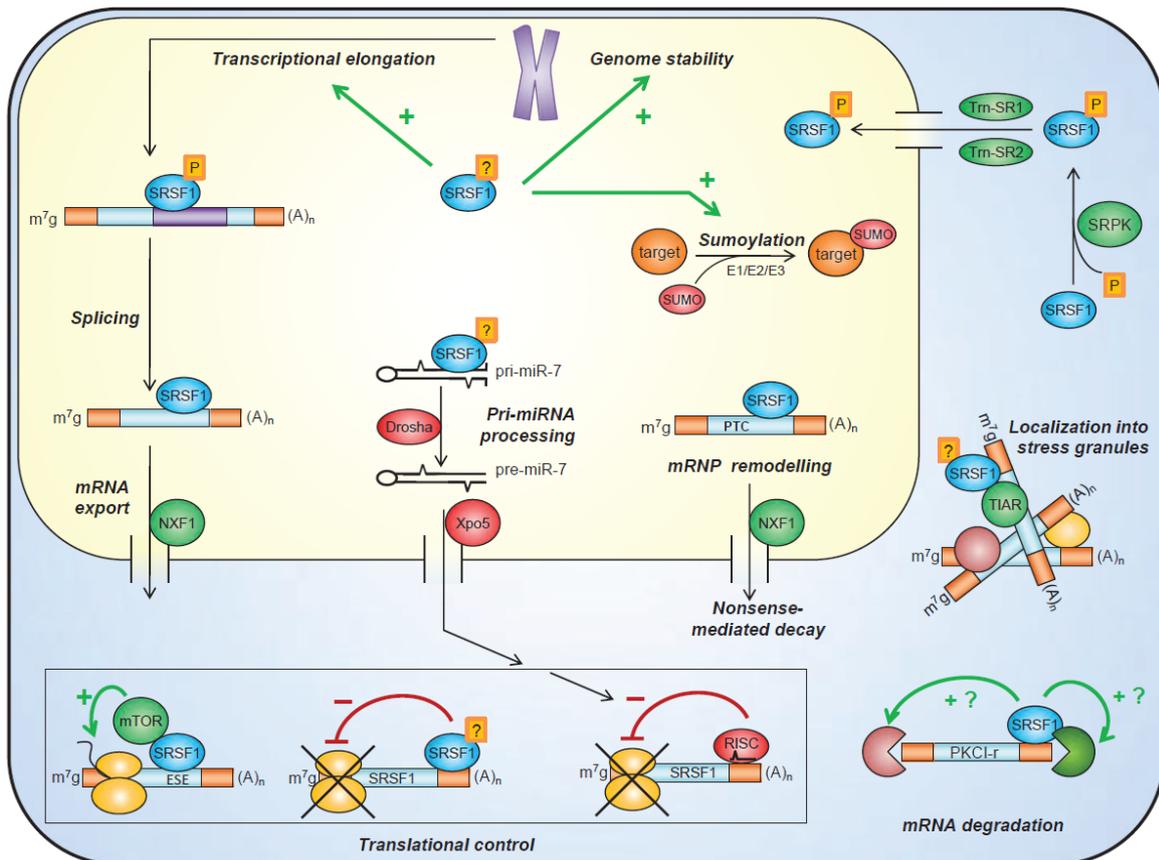
Si bien las proteínas SR están mayoritariamente localizadas en el núcleo, algunas de estas actividades reportadas son ejercidas en el citoplasma gracias a la capacidad de translocar entre estos dos compartimentos celulares, o capacidad de *shuttling*, característica de estos factores. No todas las proteínas de esta familia, sin embargo, poseen la misma capacidad de translocar. Hasta mediados del 2017, se creía que algunas proteínas SR, como SRSF2, no eran capaces de hacer *shuttling*, y otras, como SRSF1 lo hacían con gran frecuencia. Pero el reciente trabajo conjunto de los laboratorios Neugebauer y Müller-McNicoll, pudo demostrar que esta translocación es dependiente del estado de diferenciación, así como del tipo celular, y que los doce miembros de esta familia de factores de *splicing* son capaces de translocar entre núcleo-citoplasma en mayor o menor medida [33].

#### I.1.4 SRSF1

El factor de *splicing* SRSF1 (antes conocido como SF2/ASF) es un miembro prototípico de la familia de proteínas SR y es probablemente el factor auxiliar de *splicing* más estudiado hasta la fecha. Fue identificado simultáneamente por dos trabajos independientes. El primero lo describió por su actividad necesaria para complementar un extracto de células HeLa S100 que es deficiente en actividad de *splicing* [34]. El otro grupo, a partir de un purificado de células HEK 293, describió a SRSF1 como un factor capaz de alterar la selección de sitios de *splicing* 5' alternativos de un pre-mRNA del virus SV40 [35]. De este modo se demostró que SRSF1 funciona como un regulador del *splicing*, tanto constitutivo como alternativo [35], [36]. Con el tiempo se fue expandiendo la lista de pre-mRNAs cuyo *splicing* es regulado por SRSF1 y, por lo tanto, los procesos celulares afectados río abajo por este factor. Incluso se ha caracterizado a SRSF1 como un proto-oncogén, mediado por su acción como factor de *splicing* de ciertos RNAs específicos, algunos de ellos involucrados en el control de la proliferación celular y la apoptosis [37]. Otro estudio, en este caso del laboratorio de Giuseppe Biamonti, demostró cómo los niveles de SRSF1 regulan la migración celular y el proceso de transición epitelio-mesenquimal, ambos procesos cruciales en la transformación maligna, a través de la regulación del *splicing* alternativo del pre-mRNA del gen RON, el cual codifica para un receptor de tipo tirosina quinasa [38].

En cuanto a las funciones de SRSF1 no relacionadas al *splicing*, la primera identificada fue en el proceso de estabilidad del mRNA y fue reportada por el laboratorio del Dr. Robert Lafyatis [39]. Algunos años más tarde, se describió el rol de SRSF1 en la exportación de mRNAs [40], función que ya había sido descrita para otras proteínas SR [41]. Posteriormente, el Dr. Javier Cáceres y colaboradores, demostraron el rol de SRSF1 en la traducción, indagando profundamente en los mecanismos moleculares subyacentes a dicha regulación [42]. Este grupo describió cómo la fosforilación de SRSF1 afecta su rol en la regulación traduccional [43] y demostraron que SRSF1 interacciona directamente vía su segundo RRM (RRM2) con el regulador traduccional mTOR [12]. Por otra parte, se publicaban los reportes que asignaban a SRSF1 un rol clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica [29], [44], [45] como así también en el proceso de NMD [32]. Contribuyendo a esta lista de nuevas funciones de SRSF1 (**figura I.5**), nuestro laboratorio publicó en el 2010 un trabajo que motivó esta tesis doctoral, donde se demostró que SRSF1 está implicada en la regulación de la modificación post-traduccional por conjugación de SUMO [46]. Cabe remarcar que, si bien la regulación de

estos procesos por SRSF1 es independiente de su actividad como factor de *splicing*, muchos de ellos están relacionados con el metabolismo del mRNA y, en particular, con la capacidad de SRSF1 de unirse directamente al mismo. En las próximas secciones se explicará en mayor detalle las características y funciones de este factor conocidas hasta el día de la fecha.

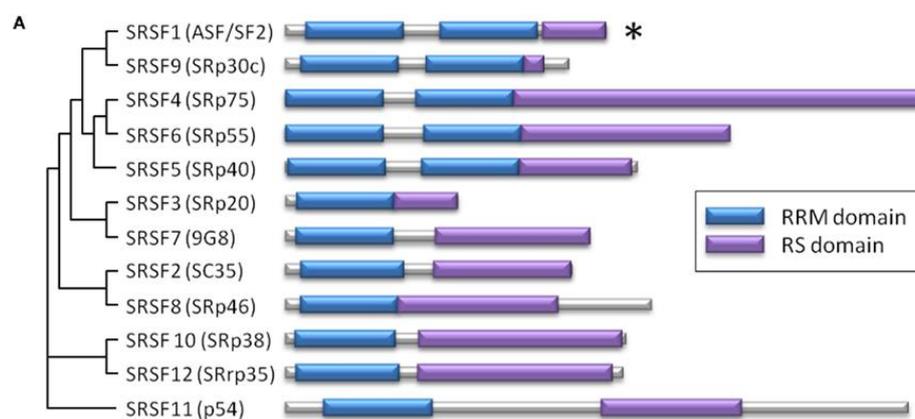


**Figura I.5 | Funciones reportadas del factor SRSF1: Roles de SRSF1 en varios procesos celulares y compartimientos.** ESE, exonic splicing enhancer; NXF1, nuclear export factor 1; P, phosphate group RISC, RNA induced silencing complex; Xpo5, exportin 5. Extraído de [13].

#### 1.1.4.1 Estructura

SRSF1 cuenta con dos dominios RRM y un dominio RS, este último en el extremo C-terminal. En su extremo N-terminal, se encuentra el dominio canónico de unión al RNA, llamado RRM1. Los dominios “clásicos” de interacción con el RNA se caracterizan por tener dos sub-motivos llamados RNP1 y RNP2, de seis y ocho aminoácidos

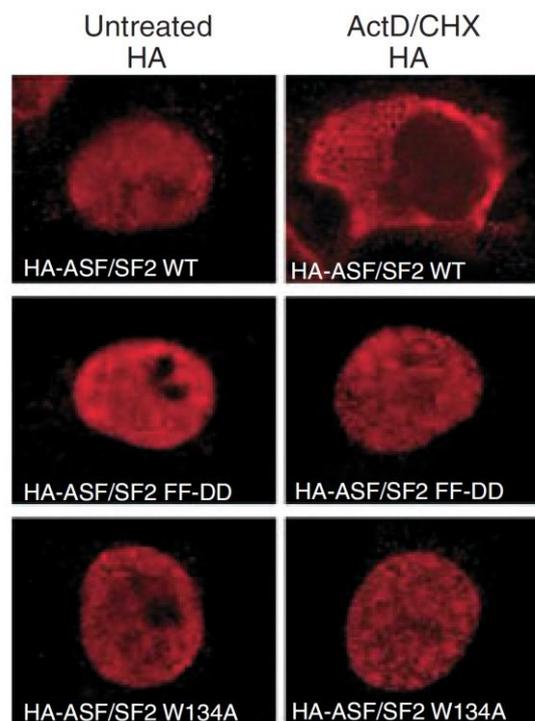
respectivamente, mayormente aromáticos y cargados positivamente. Estos dominios adquieren una estructura globular característica de cuatro láminas- $\beta$  y dos  $\alpha$ -Hélices, intercaladas de la siguiente manera:  $\beta$ 1-  $\alpha$ 1-  $\beta$ 2-  $\beta$ 3-  $\alpha$ 2-  $\beta$ 4. Especialmente  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3, donde se encuentran los sub-motivos RNP-1 y RNP-2 respectivamente, se orientan de forma antiparalela y constituyen el sitio de unión al RNA. El segundo dominio de reconocimiento de RNA en SRSF1 es el RRM2, un dominio no canónico o pseudo-RRM. A diferencia de los canónicos, los pseudo-RRMs no cuentan con aminoácidos aromáticos responsables de la unión al RNA en sus láminas- $\beta$ , sugiriendo un modo no convencional de interacción. Algunos trabajos han caracterizado un heptapéptido de secuencia conservada (SWQDLKD) dentro de la  $\alpha$ -hélice-1 que pareciera estar implicado en la unión al RNA [47]. En la **figura I.6** se esquematiza la estructura modular por homología de todos los miembros de la familia SR.



**Figura I.6 | Homología entre miembros de la familia de proteínas SR:** *el esquema representa el nivel de homología a lo largo de las proteínas SR de humanos, basado en alineamientos de ClustalW2. Extraído de [48].*

### 1.1.4.2 Localización

Como se mencionó anteriormente, las proteínas SR son mayoritariamente nucleares. Su importación depende de la transportina-SR que contacta con el dominio RS para atravesar el poro nuclear [49], [50]. Sin embargo, se ha reportado que el dominio RS no es suficiente para la exportación de estas proteínas. En particular se ha establecido que la habilidad de *shuttling* para el factor SRSF1 depende de la unión al RNA. La primera evidencia de esto fue obtenida en 1998 a través de una mutante incapaz de unirse al RNA por el dominio RRM1 (SRSF1 F56-58D o FFDD) [51]. Doce años después, un nuevo trabajo demostró que una nueva mutante de unión al RNA, pero esta vez del dominio RRM2 (SRSF1 W134A), también tiene anulada su habilidad de translocar entre el núcleo y el citoplasma (**figura 1.7**) [52]. Vale mencionar que en estos trabajos se utilizan dos técnicas diferentes para el análisis de la localización de las mutantes de unión al RNA. Las consecuencias de estas conclusiones, en conjunto con experimentos propios sobre esta temática, serán ampliamente discutidas en la última sección de esta tesis.



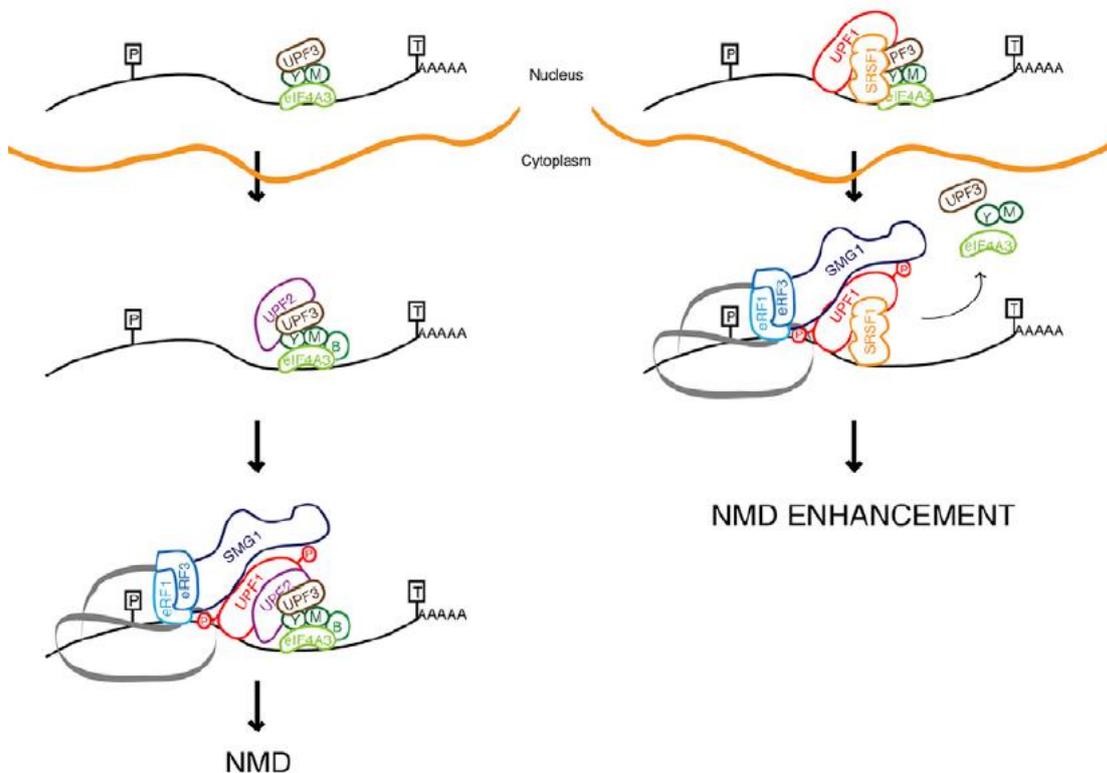
**Figura 1.7 | Capacidad de translocación núcleo/citoplasma del factor SRSF1 y mutantes de unión al RNA:** Distribución subcelular de SRSF1 Wt y mutantes luego de la inhibición de la transcripción. Células COS fueron tratadas por 3 horas con cicloheximida y actinomicina D. Las proteínas de fusión HA-SRSF1 fueron detectadas con anticuerpos primario anti-HA y secundario Alexa-594. Extraído de [52]

Dentro del núcleo, SRSF1 se localiza mayoritariamente en las estructuras sub-nucleares conocidas como *speckles*. Las evidencias de estos gránulos datan del año 1910 (Ramon y Cajal), pero fueron caracterizados recién a principios de la década del 90 como regiones enriquecidas en factores de *splicing* [53], [54]. Si bien en estos focos, entre 20 y 50 por núcleo, no ocurre el proceso de *splicing*, al encontrarse próximos a sitios activos de transcripción, y funcionando como reservorios de estos factores, pueden coordinar espacialmente este proceso y el procesamiento de los mRNA [55]. La primera proteína SR identificada en estos gránulos fue SRSF2 [56], [57]. La identificación de SRSF1 en estos cuerpos sub-nucleares llegó en el año 1997 por un trabajo del Dr. Krainer [58]. Se había demostrado que para el reclutamiento de la familia de proteínas SR a estos focos era necesario, y suficiente, el dominio RS [59]. Sin embargo, en este trabajo se observó que para el caso específico de SRSF1 el dominio RS no es necesario para su localización en *speckles*, pero sí es fundamental para su localización nuclear. Estos resultados, en principio contradictorios, solo ejemplifican el hecho de que los mecanismos involucrados en la localización específica en estas regiones sub-nucleares son escasamente conocidos.

#### 1.1.4.3 SRSF1 y NMD

En células de mamífero, tanto por mutaciones en el genoma como por errores propios del mecanismo de replicación y transcripción, incluyendo la ejecución del proceso de *splicing*, frecuentemente resultan en la inclusión de codones de terminación prematuros en los transcritos maduros. Dichos transcritos son rápidamente eliminados por la vía NMD (del inglés nonsense-mediated RNA decay). El *splicing* del pre-mRNA es un pre-requisito para la degradación por NMD dependiente del complejo de juntura de exones (exon junction complex). Esta vía de control de calidad del mRNA es disparada por la presencia de EJs río abajo de un codón de terminación, y que por lo tanto no son removidos por el ribosoma durante la denominada ronda “pionera” de la traducción [60]. Varias proteínas conteniendo dominios RS se han identificado como parte del EJC [61]. En particular, se ha reportado que algunas proteínas SR clásicas, dentro de las cuales se destaca SRSF1, regulan el proceso de NMD, y que para esta función es necesario el dominio RS pero no así su habilidad de translocar entre núcleo y citoplasma [32].

A mediados de 2018, un nuevo trabajo aportó luz sobre el mecanismo por el cual SRSF1 ejerce este rol. Se probó que esta proteína SR favorece el reclutamiento de factores de NMD, específicamente de UPF1, al mRNA [62] (**figura I.8**). Más aún, se demostró que el dominio RRM2 cumple un rol fundamental al interactuar con la quinasa PP2A que desforforila a UPF1 ocasionando el desensamblado del complejo encargado de NMD que permite un reciclado más eficiente de toda la maquinaria.



**Figura I.8 | Rol del factor SRSF1 en NMD:** a la izquierda se observa un diagrama de la vía NMD por defecto. A la derecha, la vía de NMD estimulada por SRSF1 (naranja) quien recluta a UPF1 (rojo) e interactúa con otros factores en el núcleo. El complejo de mRNA y proteínas es exportado al citoplasma. Ocurre la traducción en presencia de UPF1, sin la necesidad del reclutamiento de UPF2, e inicia el proceso de NMD. P: codón STOP prematuro, T: codón STOP principal. Extraído de [62].

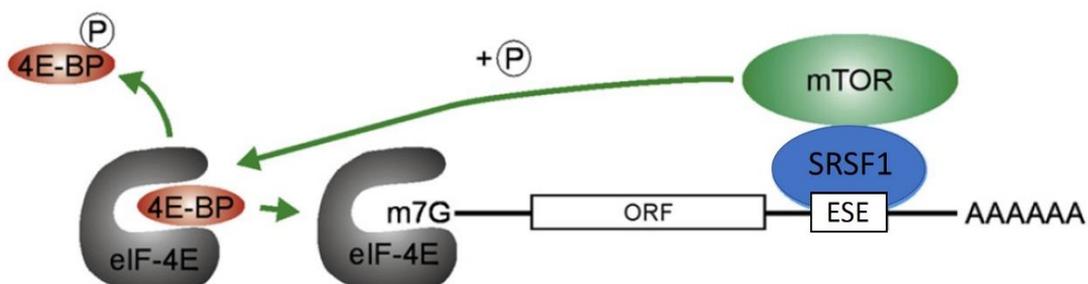
#### I.1.4.4 SRSF1 y transporte de mRNA

El rápido tránsito entre núcleo y citoplasma es fundamental para el rol que cumplen las proteínas SR en la exportación del mRNA al citoplasma [41], [63]. Para el factor SRSF1, y otras SR, esta función se ha asociado a la habilidad de interactuar

directamente con el factor de exportación de RNA, NXF1 (también conocido como TAP). En particular, NXF1 interacciona preferencialmente con las proteínas SR en estado hipofosforilado [31], [64]. Dado que la fosforilación de las proteínas SR es esencial para el ensamblado del spliceosoma mientras que su de-fosforilación es esencial para la progresión hacia la catálisis (las transesterificaciones del proceso del *splicing*), esto implicaría que las proteínas SR podrían tener un rol en integrar los procesos de *splicing* y exportación del RNA de manera secuencial [65].

#### 1.1.4.5 *SRSF1* y traducción

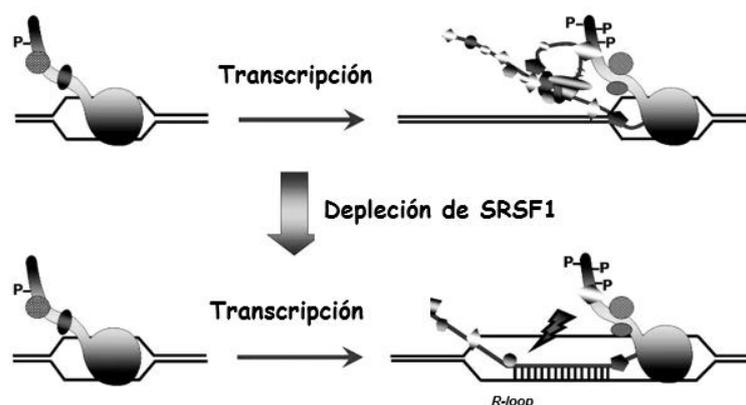
Las proteínas SR son capaces de estimular la síntesis proteica promoviendo la entrada de los mRNA a polisomas [42], [43]. Se ha reportado que SRSF1 estimula la iniciación de la traducción interaccionando con mRNA y reclutando a componentes de la vía de señalización de la proteína quinasa mTOR [12]. Estas interacciones desencadenan una fosforilación y liberación del factor 4E-BP, un inhibidor competitivo de la traducción CAP-dependiente (**figura I.9**) [12]. Curiosamente, SRSF1 no es la única proteína de la familia SR que se vio involucrada directamente en el proceso de traducción [66]. Vale la pena aclarar que tanto SRSF1 como otras las proteínas SR fueron descritas como reguladoras de la exportación de mRNA carentes de intrones [41] y su rol en traducción también fue estudiado con reporteros sin intrones [42], [43], de modo que las proteínas SR pueden llevar a cabo estas funciones de una manera *splicing*-independiente.



**Figura I.9 | Rol de la proteína SRSF1 en la traducción del mRNA:** *SRSF1* interacciona, vía su dominio RRM2, con la quinasa mTOR, lo que lleva a la fosforilación de la proteína 4E-BP1 y el consecuente aumento en la traducción cap-dependiente. Tomado de [12].

#### 1.1.4.6 *SRSF1 y estabilidad genómica*

La depleción de SRSF1 en las células de pollo DT40 induce rupturas de la doble cadena de DNA, DSBs (del inglés *double-stranded DNA breaks*) y eventos abruptos de recombinación [29]. Efectos similares se observaron con otras proteínas SR: la ausencia de SRSF2 (previamente conocida como SC35) en fibroblastos embrionarios de ratón desencadena DSBs [67]. Cómo la depleción de las proteínas SR causa inestabilidad genómica es una pregunta importante que comenzó a ser respondida por el laboratorio de James Manley, uno de los dos investigadores que varios años atrás había identificado a SRSF1. Con el complejo elongador de la RNA polimerasa II se forma una “burbuja” transcripcional referida como *R-loop*, una configuración en la cual el RNA naciente se asocia a la hebra molde del DNA, desplazando a la hebra codificante [68]. Normalmente, esas estructuras se resuelven a medida que el complejo elongador avanza a lo largo del DNA. Sin embargo, un bloqueo en la transcripción puede resultar en un *R-loop* que permanece formado por más tiempo, permitiendo que el DNA simple cadena quede expuesto a nucleasas o deaminasas. Estos daños de DNA simple cadena pueden ser posteriormente convertidos a DSBs [69]. La formación de las partículas ribonucleoproteicas (mRNA en complejo con proteínas, mRNP) juega un rol vital en la prevención de la formación de *R-loops*, desde bacterias hasta mamíferos [44], [70]. SRSF1 juega un rol directo en la prevención de la formación de *R-loops* [29] y, notablemente, el efecto se observa en genes sin intrones, reforzando la idea de otro rol *splicing*-independiente para las proteínas SR (**figura I.10**).



**Figura I.10 | Rol de la proteína SRSF1 en la prevención de R-loops.** Modelo elaborado por el laboratorio de James Manley sobre la formación de R-loops luego de la depleción de SRSF1. El conocido rol de SRSF1 en la formación del complejo RNP mensajero y en el *splicing* co-transcripcional, naturalmente previene que los transcritos nacientes re-hibridicen con el DNA templado. La depleción de SRSF1 resulta en defectos en el empaquetado y/o *splicing* del RNA lo que permite que los transcritos nacientes re-hibridicen con el DNA templado, formando un R-loop. Extraído de [29].

Existe otra arista respecto de la relación proteínas SR/R-loops/elongación transcripcional. La elongación transcripcional induce superenrollamientos a ambos lados del *R-loop* los cuales, si no fueran removidos, retardarían al complejo elongador de la RNA polimerasa II. Una enzima clave involucrada en la remoción de dichos superenrollamientos del DNA es la Topoisomerasa I [71]. Es interesante que la Topoisomerasa I interacciona con SRSF1 y también la fosforila [72]. La actividad quinasa de la Topoisomerasa I es inhibida cuando está asociada al DNA y, de manera inversa, su actividad isomerasa es inhibida cuando está asociada a SRSF1 en estado hipofosforilado [73].

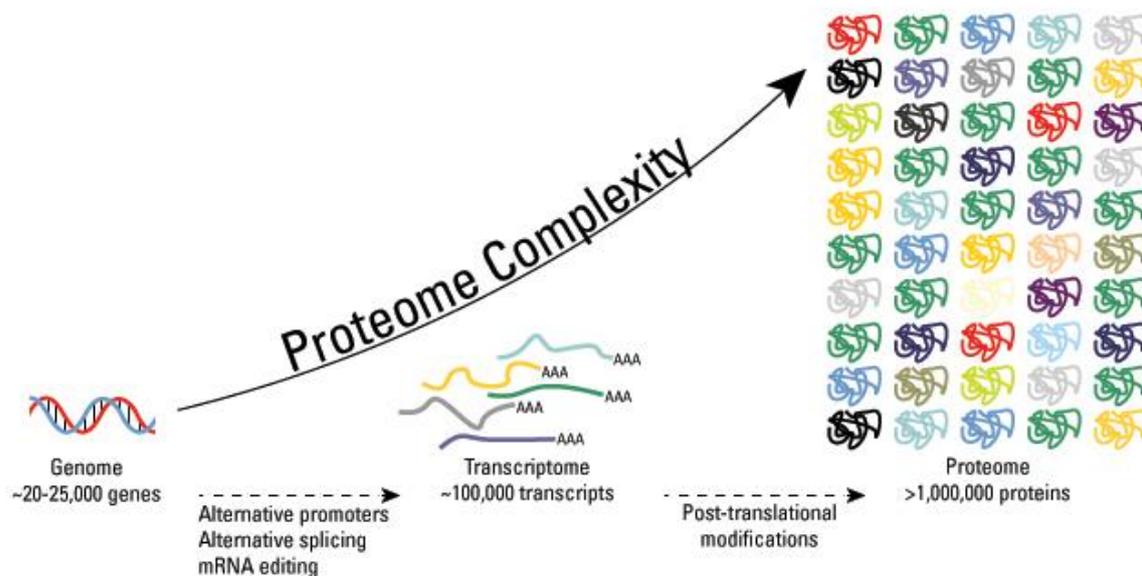
## 1.2 Modificaciones Post-traduccionales

Así como el *splicing* alternativo es el mecanismo que más aporta a la expansión genómica a nivel de ácidos nucleicos, las modificaciones post-traduccionales lo son a nivel proteico. En conjunto, estos dos mecanismos logran explicar en gran parte la complejidad proteómica de organismos superiores a partir de un número relativamente bajo de genes (**figura I.11**).

La biosíntesis de la cadena polipeptídica en los ribosomas normalmente no produce una proteína completamente funcional. Las modificaciones post-traduccionales, o MPTs (del inglés *post-translational modifications*), son alteraciones químicas de la cadena polipeptídica resultante de la traducción de un mRNA maduro. Estas pueden ser por procesamiento proteolítico, modificaciones químicas de residuos, o unión covalente de otras moléculas. Las MPTs suelen modificar la funcionalidad de las proteínas alterando su estructura tridimensional, actividad, localización y/o el repertorio de interacción con otros componentes celulares. Esta diversificación de acción es la que permite que distintas isoformas de una misma proteína puedan realizar, incluso, tareas opuestas en distintos contextos celulares.

Probablemente el caso más prototípico, o mejor estudiado, de estas alteraciones sea la fosforilación, donde un  $\gamma$ -ATP dona un grupo fosfato a residuos treonina, serina o tirosina. Sin embargo, las modificaciones post-traduccionales no son sólo pequeñas variaciones químicas, sino que pueden tratarse de la adición de otros péptidos. Dentro

de estas, la más emblemática es la unión covalente de Ubiquitina. Pero ésta, es sólo una de las MPTs por conjugación de péptidos que en conjunto forman la familia de proteínas tipo Ubiquitina o UBLs por sus siglas en inglés (*Ubiquitin-like proteins*). En la sección 2 describiremos en mayor detalle esta modificación post-traducciona y en especial la conjugación del péptido SUMO.



**Figura I.11| Expansión genómica:** Mientras que el genoma humano comprende alrededor de 25 mil genes, el proteoma está estimado en más de 1 millón de proteínas. Cambios a nivel transcripcional y del mRNA incrementan el tamaño del transcriptoma en comparación al del genoma. Las numerosas modificaciones post-traduccionales incrementan exponencialmente la complejidad del proteoma en comparación al genoma y al transcriptoma.

### I.2.1 UBLs

La proteína ubiquitina (Ub) (1975) y los miembros de su familia, UBLs, son unidas covalentemente (conjugadas) a otras proteínas, alterando las propiedades de estas últimas y aumentando enormemente la complejidad del proteoma en células eucariotas [74]. La vía de conjugación de Ub fue ampliamente descrita [75]–[77], e involucra una cascada de tres enzimas: E1 activadoras, E2 conjugadores y E3 ligasas. La reversibilidad y control de esta modificación está a cargo de las deubiquitininas. Por homología de secuencia o estructura tridimensional, han sido identificadas varias Ubls en humanos (**figura I.12**), destacándose, NEDD8 [78], ISG15 [79]–[81], FAT10 [82], Atg8 y Atg12 [83], y SUMO [84]. La mayoría de estos péptidos son conjugados a las proteínas blanco por

una cascada enzimática que se asemeja a la de Ub, sin embargo, en general para todos ellos, se ha identificado y resulta suficiente un número más limitado de enzimas E2 y E3.

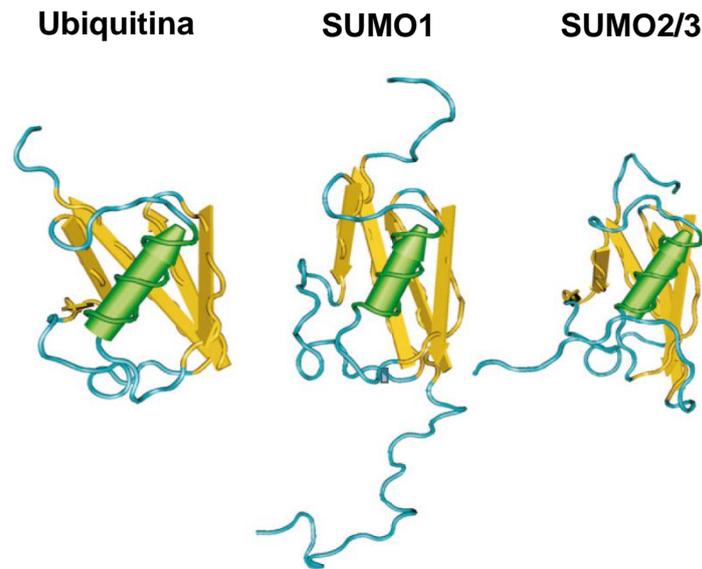
La conjugación de los péptidos de esta familia a los sustratos proteicos blanco de la modificación, frecuentemente promueve la interacción de estos últimos con nuevas proteínas, ya sea por cambios alostéricos o por interacción directa de los componentes. Otro efecto de la conjugación es simplemente bloquear el sitio de interacción con otras proteínas. Como consecuencia de estos cambios, y a pesar de que sólo una muy baja proporción del *pool* celular de una dada proteína blanco se encuentra modificada por una UBL en un determinado momento, se observan profundos cambios fisiológicos. Se han descrito UBLs involucradas en procesos como transporte nuclear, proteólisis, traducción, autofagia, y respuestas antivirales [85].

Ub/UbIs	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 I.12 | Lista de Ubls conocidas:** Se detallan las proteínas Ubl descritas hasta la fecha junto con su porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica con respecto a los dominios Ub, y las enzimas E1 y E2 específicas para la conjugación de cada Ubl (ver “Vía de conjugación” más abajo). Extraído de [85].

## I.2.2 SUMO

El gen de SUMO (Smt3 en levaduras) fue inicialmente identificado en *Saccharomyces cerevisiae* en un trabajo cuyo objetivo era la búsqueda de supresores de una proteína centromérica [86]. Al siguiente año, tres estudios distintos caracterizaron a este péptido como una proteína capaz de interactuar con otros polipéptidos [87]–[89]. Finalmente, se descubrió que SUMO era capaz de unirse covalentemente a otras proteínas, siendo la primera identificada RanGAP1 [90], [91]. El proceso conocido como conjugación de SUMO, o “SUMOilación” entonces, es una rápida y reversible modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente del péptido denominado SUMO a una proteína blanco, en forma similar a la conjugación de Ub. Algunos organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, tienen un solo gen de SUMO. Otros como las plantas y vertebrados poseen varios genes de SUMO [92]. Actualmente se conocen cinco genes en mamíferos que codifican para distintas isoformas de SUMO: SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4 y SUMO5. Todas ellas codifican para un polipéptido de aproximadamente 10 kDa, con una alta identidad de secuencia [93], [94]. 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 [95]. Con respecto a SUMO4, incluso aún hoy en día no está claro si se procesa, aunque una mutación en su secuencia (sustitución M55V) ha sido asociada a diabetes tipo I [96]. La diferencia entre estas isoformas se ve reflejada en su funcionalidad, se cree que SUMO1 y SUMO2/3 cumplen funciones distintas *in vivo* porque son conjugadas a diferentes proteínas blanco [97], [98]. 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 [93], [99] (**figura I.13**).



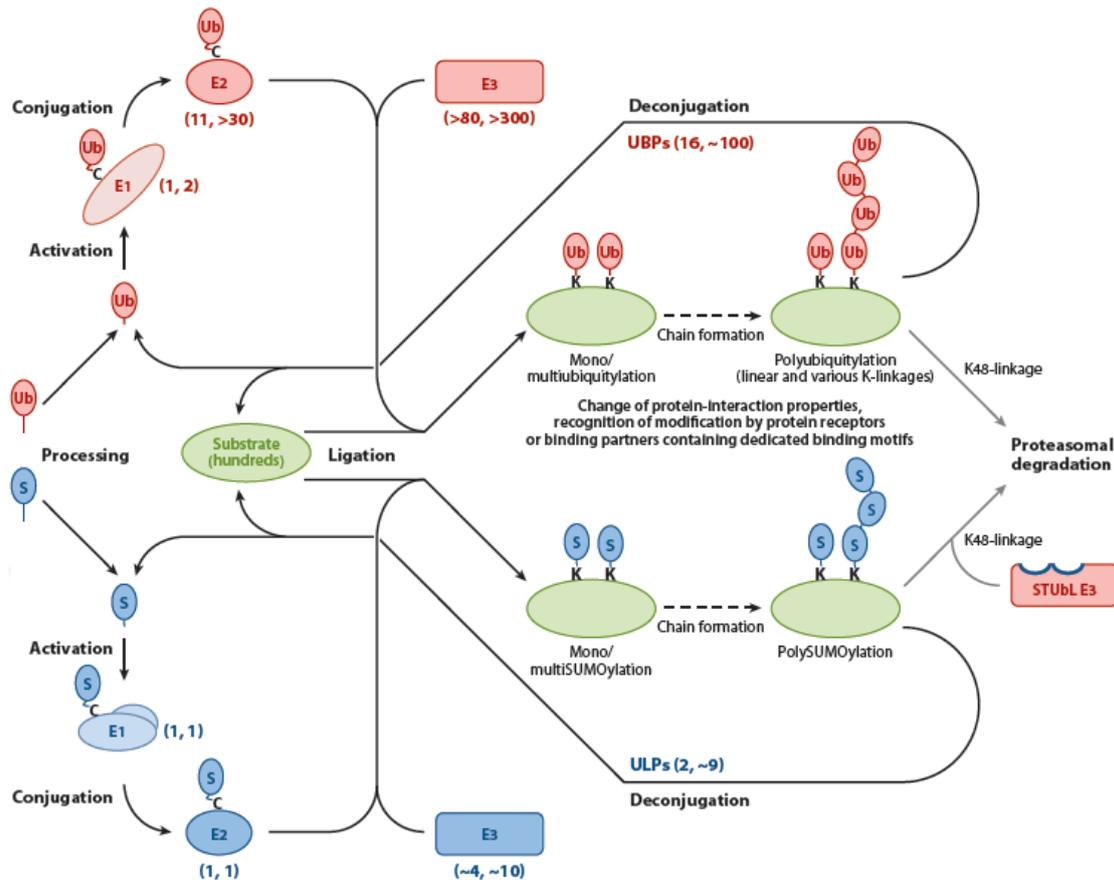
**Figura I.13 | Estructura tridimensional de Ub y SUMO.** Esquema comparativo de las estructuras tridimensionales de Ub, SUMO1 y SUMO2/3. Extraído de [100].

### I.2.3 Vía de conjugación de SUMO

Como la ubiquitinación, la SUMOilación resulta en la formación de una unión isopeptídica entre la glicina C-terminal de SUMO y el grupo amino  $\epsilon$  de una lisina en la proteína blanco [101]. El péptido SUMO es sintetizado de manera “inmadura” y para ser conjugado a las proteínas blanco es necesario que atraviese un evento de maduración mediante el cual quedan expuestas dos glicinas en su extremo C-terminal. Para ello se requiere el clivado de los aminoácidos río abajo de esta di-glicina, proceso llevado a cabo por las proteasas de SUMO conocidas como SENPs (*SUMO-specific proteases/isopeptidases*) a través de su actividad hidrolasa C-terminal. Una vez que SUMO sufrió esta proteólisis, se dice que el péptido está “activado” y es capaz de conjugarse a los sustratos mediante la vía enzimática correspondiente. Todas las Ubls se conjugan a sus proteínas blanco por una cascada enzimática que involucra una enzima activadora de Ubl (E1), una enzima conjugadora de Ubl (E2) y, típicamente, una enzima ligasa de Ubl (E3). En cuanto a la conjugación de SUMO específicamente, el primer paso consiste en la activación de SUMO por la enzima activadora E1 específica de SUMO, un heterodímero de las proteínas SAE1-SAE2 en mamíferos (Uba2-Aos1 en levaduras). Esta reacción utiliza ATP para la formación de un intermediario SUMO-adenilato, en el que el extremo C-terminal de SUMO está covalentemente unido a AMP. La ruptura de la

unión SUMO-AMP es seguida de la formación de un enlace tioester entre el grupo carboxilo del C-terminal de SUMO y el grupo -SH de la cisteína catalítica en SAE2 (C173). En el segundo paso de la reacción, SUMO es transferido desde SAE2 a la enzima conjugadora E2, Ubc9, formando un nuevo enlace tioester, esta vez entre la cisteína catalítica de Ubc9 (C93) y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal de SUMO. 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. 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. Las E3 ligasas facilitan la transferencia de SUMO a la proteína blanco, regulan la selección de sustrato y el grado de SUMOilación *in vivo*.

Pero el proceso de SUMOilación no se encuentra totalmente descrito por estos tres pasos enzimáticos. La reversibilidad de esta modificación es llevada a cabo por proteasas de SUMO que se encargan de de-conjugar este péptido de las proteínas blanco. Curiosamente, las enzimas encargadas de este proceso de proteólisis son las mismas que se encargan de la maduración de SUMO, las proteasas SENPs a través de su actividad isopeptidasa. Esta doble participación de las SENPs primero en la maduración del péptido SUMO y luego en su de-conjugación para el reciclado del mismo, es evidencia del fino proceso de regulación al cual se encuentra sometida esta modificación post-traducciona. Esta serie de pasos enzimáticos, así como también su comparación con la vía de conjugación de Ub, se resumen, en forma de esquema, en la **figura I.14**.



**Figura I.14 | Comparación de la vía de conjugación de Ub y SUMO:** Tanto ubiquitina (rojo), como SUMO (azul), pueden conjugarse a cientos de sustratos (verde), a pesar de la gran diferencia en el número de enzimas involucradas (E1, E2 y E3). Estos números de enzimas involucradas para *Saccharomyces cerevisiae* y humanos se indican entre paréntesis para cada caso. Luego del procesamiento de los respectivos precursores, los péptidos son unidos covalentemente por sus residuos glicinas (G) C-terminal, al grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas en los sustratos. Esta modificación es reversible gracias a la presencia de las enzimas deconjugasas. Extraído de [102].

## I.2.4 E3 Ligasas

Dentro de las proteínas involucradas en la cascada de conjugación de SUMO, cabe destacar algunas características de las E3 ligasas, pertinentes al tema de estudio de esta tesis. En levaduras, las E3 ligasas de SUMO caracterizadas hasta la fecha incluyen a miembros de la familia Siz/PIAS (del inglés *Protein Inhibitor of Activated Stat*), la proteína del complejo del poro nuclear RanBP2 (del inglés *Ran binding protein 2*), Pc2 (del inglés *Polycomb group 2*) y la proteína Topors (del inglés *Topoisomerase I-binding, RS domain-containing protein*). Las proteínas Siz identificadas en levaduras poseen actividad de E3 ligasas de SUMO *in vitro* y la depleción de los genes Siz1 y Siz2 elimina

casi toda la conjugación de SUMO *in vivo* [103]. En eucariotas superiores, las proteínas PIAS son homólogas de las proteínas Siz y también funcionan como E3 ligasas de SUMO. Los polipéptidos de la familia Siz/PIAS son similares a la familia de las E3 ligasas de Ub que contienen dominios RING, las cuales funcionan como adaptadores que aproximan al sustrato y a la E2 cargada con Ub. Las E3 ligasas RanBP2 y Pc2 no están relacionadas con ninguna E3 ligasa de Ub. RanBP2 es parte del complejo del poro nuclear y cataliza la transferencia de SUMO1 a los sustratos Sp100 y HDAC4. Mientras que RanBP2 y Siz/PIAS actúan como verdaderos catalizadores, no está claro si ese también es el caso de Pc2. También se ha identificado a la proteína Topors, una conocida E3 ligasa de Ub, como una E3 ligasa de SUMO específica para los sustratos p53 y Topoisomerasa I. 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. Otra E3 ligasa descrita, es la proteína ZNF451, la cual es capaz de interactuar con la enzima E2 conjugadora gracias a dos sitios SIM en su estructura. A través de estos motivos, ZNF451 puede entrar en contacto de forma simultánea con el péptido SUMO unido a una cisteína de Ubc9 y a otro péptido SUMO unido a Ubc9 por interacciones no covalentes [104].

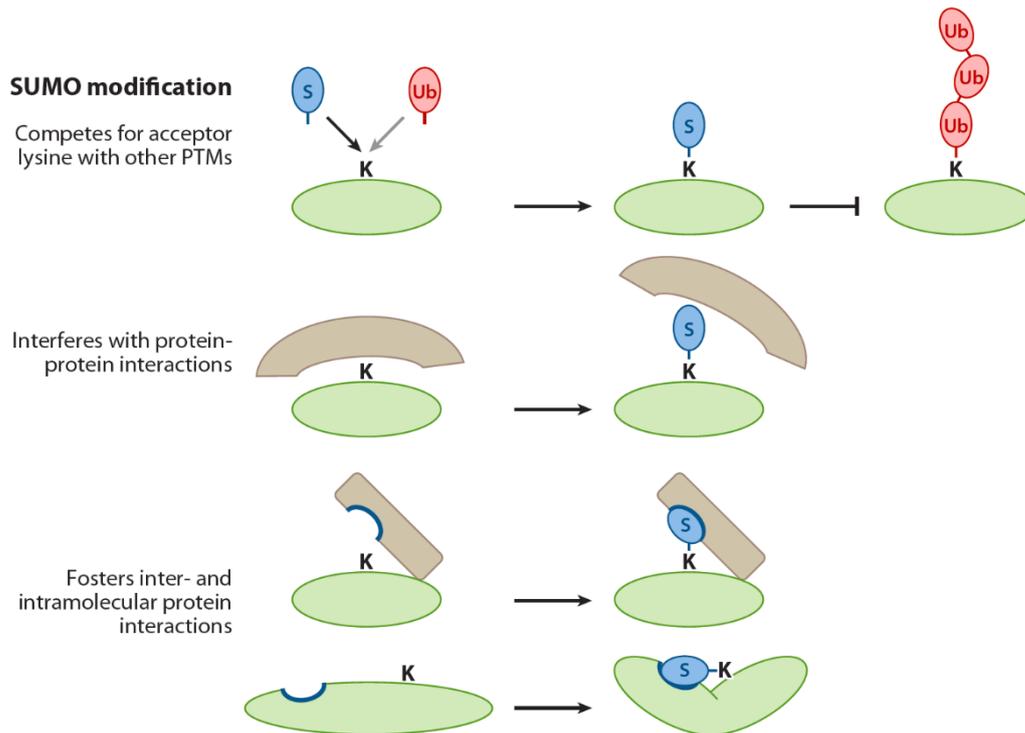
A pesar del gran avance reciente en el campo de la SUMOilación de proteínas, la regulación de este proceso es aún escasamente conocida. Es difícil concebir que el número tan limitado de componentes identificados hasta la fecha puedan dar cuenta de la compleja regulación de este proceso. En este aspecto, también ha sido reportado que la proteína RSUME es capaz de estimular la SUMOilación mediante la promoción de la interacción entre las enzimas E1 y E2, la formación del enlace tioéster entre SUMO y Ubc9, la interacción no covalente entre SUMO y Ubc9 y la transferencia de SUMO a proteínas blanco-específicas [105]. 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. En este sentido, se ha descrito un gran complejo de varias subunidades con actividad de E3 ligasa de SUMO. Un ejemplo de esto es el complejo estable formado por RanBP2, RanGAP SUMOilado y Ubc9 capaz de funcionar como E3 ligasa de SUMO cuando el factor RanBP2 solo lo hace de manera muy ineficiente [106].

### I.2.5 Funciones de la conjugación de SUMO

Así como la lista de funciones relacionadas a la conjugación de Ub fue ampliándose a medida que avanzó la investigación de esta modificación post-traducciona, que hoy en día ya no es relacionada de manera exclusiva con una única consecuencia celular, lo mismo sucede con las consecuencias de la SUMOilación. Estas son variadas y dependientes del sustrato, pudiendo alterar la localización sub-celular, la actividad y/o la estabilidad de la proteína blanco, así como también el repertorio de proteínas que interactúan con esta.

Si bien suele asociarse la ubiquitinación con el proceso de degradación proteica, en los últimos años se ha establecido un rol para Ub en la regulación de interacciones proteína-proteína más allá del etiquetado para proteólisis, debido principalmente a la existencia de distintos motivos proteicos capaces de reconocer la Ub o cadenas de la misma conjugadas a diferentes sustratos a través de lisinas alternativas en su secuencia aminoacídica [107]. De hecho, vale la pena citar un trabajo en el que demuestran que la mono-ubiquitinación de un factor esencial de *splicing* es indispensable para la interacción de determinadas partículas ribonucleoproteicas en el correcto ensamblado del spliceosoma [108]. De manera análoga, la SUMOilación modifica superficies proteicas o estructuras tridimensionales, pudiendo alterar interacciones con otras macromoléculas [101]. Hace apenas unos años ha sido identificado un motivo aminoacídico corto y de naturaleza hidrofóbica en proteínas que interactúan con SUMO en forma no-covalente. Este motivo se denomina SIM (del inglés *S*UMO-*I*nteraction *M*otif) [109], [110]. 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 [111]. De este modo, dichos sustratos se independizarían de la actividad de E3 ligasas, cuya función sería reemplazada por la interacción SIM-SUMO-Ubc9 [111]. También se ha demostrado que la actividad de ciertas E3 ligasas dependen de motivos SIM. El primer caso descrito fue el de la proteína Pc2 en el 2010 en un trabajo de Merrill y colaboradores, y hace solo dos años atrás se ha reportado que tanto la actividad de PIASY como su interacción con el péptido SUMO dependen de dos motivos SIM en el extremo C-terminal de esta proteína [112].

A nivel funcional, las consecuencias de la conjugación de SUMO pueden ser variadas [101]. A diferencia de la conjugación de Ub que, en la mayoría de los casos, es una marca de degradación por el proteosoma, la SUMOilación no lleva a sus proteínas blanco a un único destino específico. La conjugación de SUMO altera la superficie de una proteína de manera tal que la misma puede perder o ganar interacciones (**figura I.15**).



**Figura I.15 | Consecuencias moleculares de la conjugación de SUMO:** Se toma como ejemplo una proteína blanco de SUMOilación (óvalo verde) que puede interactuar con la proteína partner (figura gris). Extraído de [102].

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 [113]. El número de procesos celulares reportados que son regulados por la SUMOilación está en aumento e incluyen: transcripción [114]–[118], estructura de la cromatina [119], reparación del DNA y

estabilidad genómica [120]–[122], vías de señalización celulares [123], [124] y función neuronal [100], [125]–[127]. Para una descripción completa y detallada de los mecanismos y roles diversos de la SUMOilación, el artículo de una investigadora pionera en el campo, Frauke Melchior, posee una lista muy completa de referencias bibliográficas y es una excelente guía para profundizar en el tema [101].

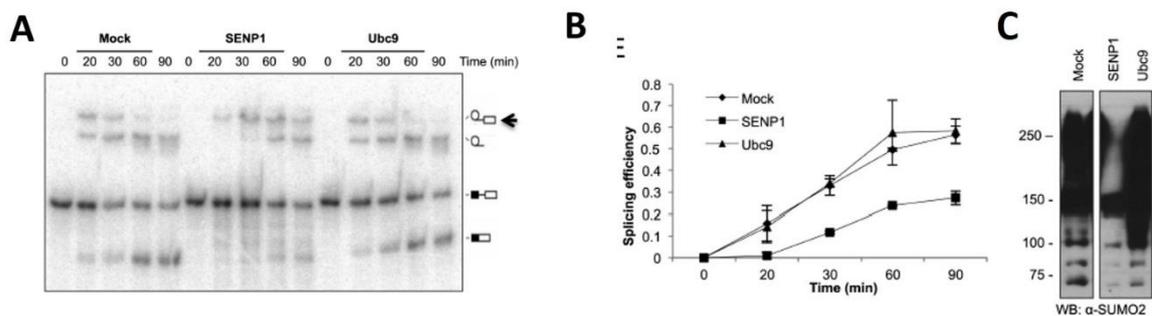
### **1.3 SUMO y *splicing***

Los primeros indicios de una relación entre el metabolismo del RNA y la modificación post-traducciona por conjugación a UBLs fueron sugeridos en el 2010, al ser reportado que sustratos de ubiquitinación conjuntamente con enzimas de esta vía parecen coexistir dentro del spliceosoma [128]. El vínculo entre el *splicing* y las UBLs pareció fortalecerse en el 2011 donde un ensayo de espectrometría de masa de alto rendimiento, identificó más de diez mil sitios de ubiquitinación en numerosas proteínas de unión al RNA, y particularmente en miembros de la familia SR [129]. Más aún, a través de estudios proteómicos de tipo SILAC realizados en combinación con inhibidores de proteosoma, fue demostrado que una gran porción de las ubiquitinaciones no son degradativas, lo cual indica un claro rol regulatorio de esta MPT en las proteínas analizadas, y dentro de ellas los factores de *splicing* encontrados [130]. En cuanto a la SUMOilación se identificaron en particular dos mecanismos que forman parte del metabolismo del RNA que son regulados por esta MPT: el procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA y el RNA *editing* [131], [132]. Posteriormente, nuestro grupo hizo grandes aportes en este campo, relacionando la SUMOilación con el proceso *splicing*, que fueron plasmados en dos publicaciones: Pelish y colaboradores, PNAS 2010; y Pozzi y colaboradores, NAR 2017 [46], [133]. En la primera de ellas se identificó la regulación de la SUMOilación como una nueva actividad del conocido factor de *splicing* SRSF1. Este inesperado rol para una proteína de unión al RNA fuertemente involucrada en el procesamiento de los pre-mRNAs y capaz de interactuar con la maquinaria de *splicing* nos abrió la puerta hacia la búsqueda de una posible conexión entre dicha maquinaria y la de conjugación de SUMO, hipotetizando que la SUMOilación de proteínas componentes del spliceosoma podría estar involucrada en la regulación del ensamblado y actividad catalítica de este mega complejo ribonucleoproteico. En la publicación más reciente, nuestro grupo determinó la presencia de un vasto grupo de proteínas

spliceosomales conjugadas a SUMO durante la reacción de *splicing* y describió cómo dicha modificación afecta las interacciones entre diferentes componentes del spliceosoma, así como también la eficiencia del *splicing*. A continuación, detallaremos los descubrimientos más sobresalientes de estas publicaciones, pertinentes a los objetivos de estudio de esta tesis.

### 1.3.1 La SUMOilación y el proceso de *splicing*

En nuestra publicación en la revista *Nucleic Acids Research* se trabajó inicialmente con un sistema de *splicing in vitro* utilizando como sustrato de reacción un pre-mRNA reportero. Analizando la cinética de la reacción mediante la detección de sustratos, intermediarios y productos frente al agregado de la proteasa SENP1, se observó en conjunto a una disminución en los niveles de SUMOilación de los extractos nucleares, una reducción en la eficiencia de la reacción de *splicing* (**figura 1.16**), indicando claramente la participación de la conjugación de SUMO en este proceso.



**Figura 1.16 | La SUMOilación afecta la eficiencia de *splicing*:** Extractos nucleares de células HeLa fueron incubados conjuntamente con el pre-mRNA sustrato radiactivo en condiciones de *splicing*, durante los tiempos indicados en la parte superior del panel A, en presencia de las enzimas recombinantes SENP1, Ubc9 o buffer de dilución de SENP1 (mock) y posteriormente analizada por electroforesis desnaturalizante (**A**). La eficiencia de *splicing* (SE) fue analizada por cuantificación de las bandas radiactivas y calculada según  $SE = \text{productos de reacción} / (\text{sustrato} + \text{intermediarios} + \text{productos})$  (**B**). Los niveles de SUMOilación global de los extractos nucleares fueron analizados por western blot con anticuerpo anti-SUMO2 (**C**). [133]

En este trabajo no sólo demostramos que la SUMOilación afecta la eficiencia de *splicing*, sino que mostramos que la conjugación de SUMO a proteínas asociadas al pre-mRNA aumenta durante el proceso de *splicing*. Este aumento podría deberse a un incremento en la SUMOilación de ciertas proteínas asociadas al pre-mRNA o bien al reclutamiento de nuevas proteínas SUMOiladas a lo largo de la reacción de *splicing*.

### I.3.2 Numerosas proteínas son conjugadas a SUMO durante el proceso de *splicing in vitro*

A través de un análisis por espectrometría de masa de aquellas proteínas unidas al pre-mRNA a diferentes tiempos a lo largo de la reacción de *splicing in vitro*, identificamos una gran variedad de proteínas componentes del spliceosoma como sustratos de SUMOilación. En la **figura I.17** se muestra una lista de los factores del spliceosoma más relevantes detectados en este experimento.

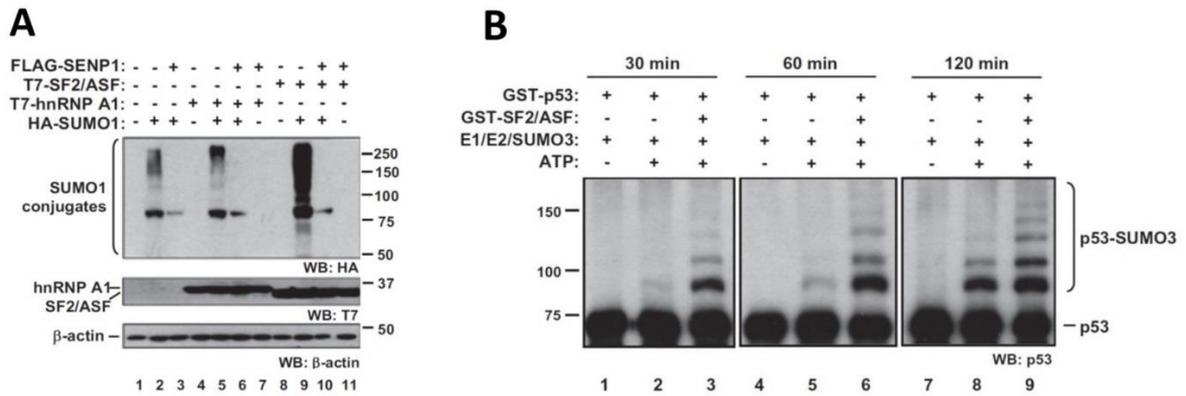
	Splicing reaction		
	2 min	7 min	20 min
<b>Sm proteins</b>	SmE		SmB/B' SmD2 SmE SmF
<b>U1 snRNP</b>			U1-70K
	U2-A' SF3a120 SF3a66 SF3a60 SF3b155  SF3b14a/p14	SF3a66  SF3b155  SF3b130	U2-A' SF3a120 SF3a66 SF3a60  SF3b145  SF3b10
<b>U4/U6-snRNP</b>	U4/U6-60K, hPrp4	U4/U6-90K, hPrp3 U4/U6-60K, hPrp4 U4/U6-61K, hPrp31	
<b>U5 snRNP</b>	U5-102K, hPrp6	U5-220K, hPrp8 U5-200K, hBrr2 U5-116K, hSnu114 U5-102K, hPrp6	U5-116K, hSnu114
<b>U4/U6.U5 tri-snRNP</b>	U4/U6.U5-110K, hSnu66		
<b>non-snRNP</b>	CDC5L SKIP/Prp45  Prp19 Luc7-like 2  GPKOW, hSpp2  PSF	CDC5L  Npw38bp Prp19  GPKOW, hSpp2 Smu-1 PSF	CDC5L SKIP/Prp45 FBP2 Npw38bp  Luc7-like 2 MFAP1 SF2/ASF
<b>hnRNP</b>	hnRNPA1  hnRNPD hnRNPH  hnRNPM	hnRNPK hnRNPE1 hnRNPC1/C2  hnRNPH3 hnRNPF	hnRNPK hnRNPE1

**Figura I.17 | Proteínas spliceosomales SUMOiladas: Resumen de proteínas spliceosomales y asociados, enriquecidas con inmunoprecipitación de His-SUMO2. [133]**

Si bien muchas de las proteínas identificadas ya habían sido reportadas como putativos blancos de conjugación de SUMO en diferentes estudios proteómicos publicados [134], nuestros resultados mostraron por primera vez que estas proteínas se encuentran conjugadas a SUMO formando parte de complejos spliceosomales durante una reacción de *splicing*, llevada a cabo en condiciones *in vitro*. Algunos de esos sustratos fueron validados en células en cultivo. En particular, demostramos que la SUMOilación de Prp3, una proteína específica del complejo spliceosomal U4/U6, resultó ser necesaria para la interacción de esta proteína con otros factores spliceosomales como SF3a120 y Snu114. Además, demostramos que la disminución en la eficiencia de *splicing* producida por la depleción de Prp3 endógena puede ser revertida por la reincorporación de una versión salvaje de Prp3 pero no así por la reincorporación de Prp3 deficiente en su SUMOilación. Estos resultados, y otros no detallados aquí, nos llevaron a proponer que la SUMOilación de esta proteína splicesomal en particular podría estar afectando la eficiencia de *splicing* mediante la regulación de dos etapas específicas a lo largo del ciclo del spliceosoma, la formación de la partícula tripartita snRNP U4/U5/U6 o bien el reclutamiento de dicha partícula para la formación del complejo spliceosomal pre-catalítico.

### I.3.3 Participación de SRSF1 en la vía de conjugación de SUMO

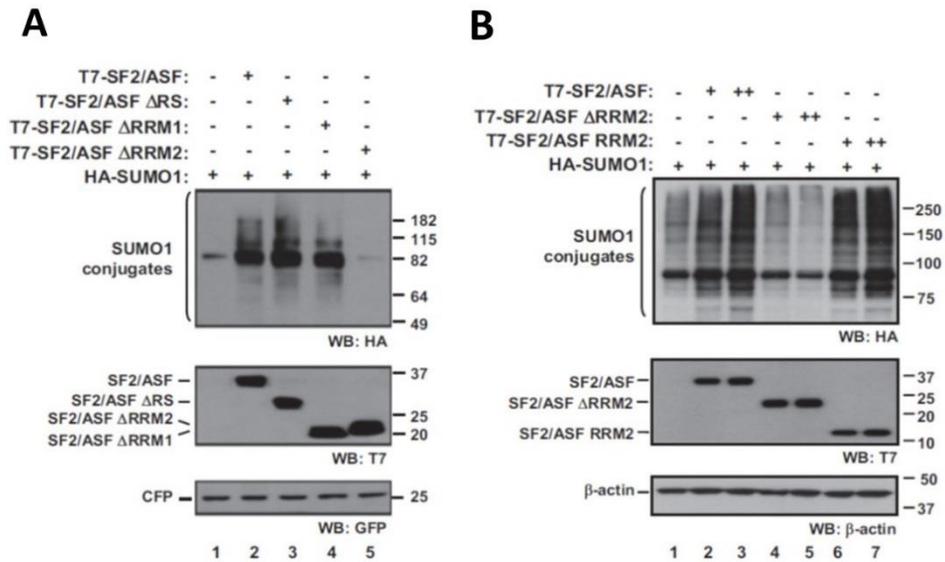
Años atrás, nuestro laboratorio reportó que el factor de *splicing* SRSF1 regula la conjugación de SUMO tanto en células de mamífero en cultivo como *in vitro* (**figura I.18**). Diversas características de esta novedosa actividad del factor de *splicing* fueron descritas en esta publicación. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual SRSF1 lleva a cabo este nuevo rol sobre la SUMOilación, es aún completamente misterioso. En estas tesis nos propusimos ahondar en esta caracterización. Pero antes de presentar los resultados obtenidos, resumiremos los rasgos previamente conocidos de esta nueva función de SRSF1.



**Figura I.18 | Regulación de la SUMOilación por SRSF1. A)** Regulación de la SUMOilación global con sobre-expresión de SRSF1. **B)** Regulación de la SUMOilación sustrato específico *in-vitro*. Extraído de [46].

### I.3.4 La regulación de la SUMOilación por SRSF1 es dependiente del dominio RRM2

Utilizando mutantes de delección de SRSF1, se pudo determinar que el efecto estimulador de la SUMOilación depende de uno de los dominios modulares de esta proteína, su segundo dominio de unión al RNA o “RRM2”, ya que la delección de dicho dominio ( $\Delta$ RRM2) anula por completo esta capacidad estimuladora ejercida por SRSF1 (**figura I.19 A**), y que dicho dominio aislado es suficiente para producir un aumento de la SUMOilación similar al observado con la proteína completa (**figura I.19 B**).



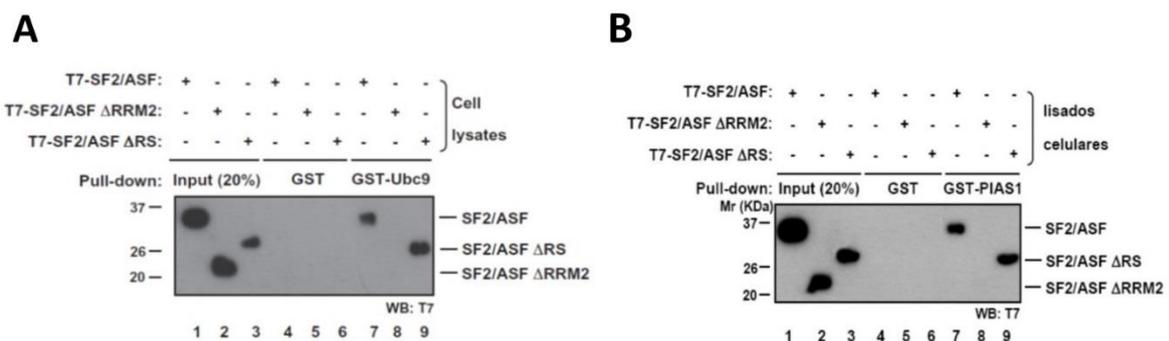
**Figura I.19| Dependencia de dominios de SRSF1 en la regulación de la SUMOilación: A)** Regulación de la SUMOilación en células en cultivo con sobre-expresión de mutantes de delección de los distintos dominios de SRSF1. **B)** Regulación de la SUMOilación dependiente del dominio RRM2. Extraído de [46].

### I.3.5 Otras proteínas de la familia SR también son capaces de estimular la SUMOilación

Sorprendentemente, nuestro laboratorio descubrió que SRSF1 no es la única proteína de esta familia de factores de *splicing* capaz de favorecer la conjugación del péptido SUMO a proteínas blanco, aunque tampoco todos sus miembros parecen compartir esta actividad. Mientras que la sobre-expresión de SRSF9 (antes llamada SRp30C) genera aumentos en los niveles de SUMOilación global comparables a los producidos por SRSF1, los factores SRSF3 y SRSF5 (conocidos también como SRp20 y SRp40, respectivamente) no alteran esta MPT. Curiosamente, SRSF3 no posee dominio RRM2 y aunque SRSF5 sí, sólo tiene un 37% de homología con el mismo dominio de SRSF1. En cambio, el RRM2 de SRSF9 comparte un 72% de identidad con este último. Estos datos sugieren que la participación de las proteínas SR en la regulación de la conjugación de SUMO está relacionada no sólo a la presencia, sino también a ciertas secuencias y/o estructuras conservadas dentro de este dominio RRM2.

### I.3.6 SRSF1 interacciona con Ubc9 y PIAS1

Demostramos que SRSF1 interacciona con algunas proteínas de la vía de SUMOilación, como la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 y la E3 ligasa PIAS1 (**figura I.20**). En ambos casos, esta interacción parece correlacionar con la capacidad de estimular la SUMOilación. Esto es evidenciado por el hecho de que la mutante de delección del dominio RRM2, que no puede estimular esta MPT, tampoco puede interactuar con las proteínas Ubc9 y PIAS1. En cambio, la mutante  $\Delta$ RS puede interactuar con la E2 conjugadora y la E3 ligasa, así como también aumentar la SUMOilación global. Además, realizando los mismos ensayos, pero en presencia o ausencia de DNasa/RNasa, se reportó que estas interacciones se producen de manera DNA- y RNA-independiente.



**Figura I.20 | Interacción de SRSF1 con proteínas de la vía de SUMO:** Ensayos de pull-down a partir de lisados celulares con expresión de T7-SRSF1 o mutantes de delección en sus dominios, combinados con GST-Ubc9 **A**), o GST-PIAS1 **B**). Extraído de [46].

Más aún, este trabajo del tesista doctoral Federico Pelisch aportó evidencia de que la interacción de SRSF1 con PIAS1 regula la actividad de esta conocida E3 ligasa. Esta observación fue hecha a partir de ensayos en células en cultivo donde la sobre-expresión de PIAS1 estimula la conjugación de SUMO a nivel global, efecto que es drásticamente inhibido por el silenciamiento de SRSF1 mediante RNA de interferencia. Este mismo resultado fue validado por Min Li y colaboradores en el año 2015 [135].

### I.3.7 SRSF1 es también sustrato de SUMOilación

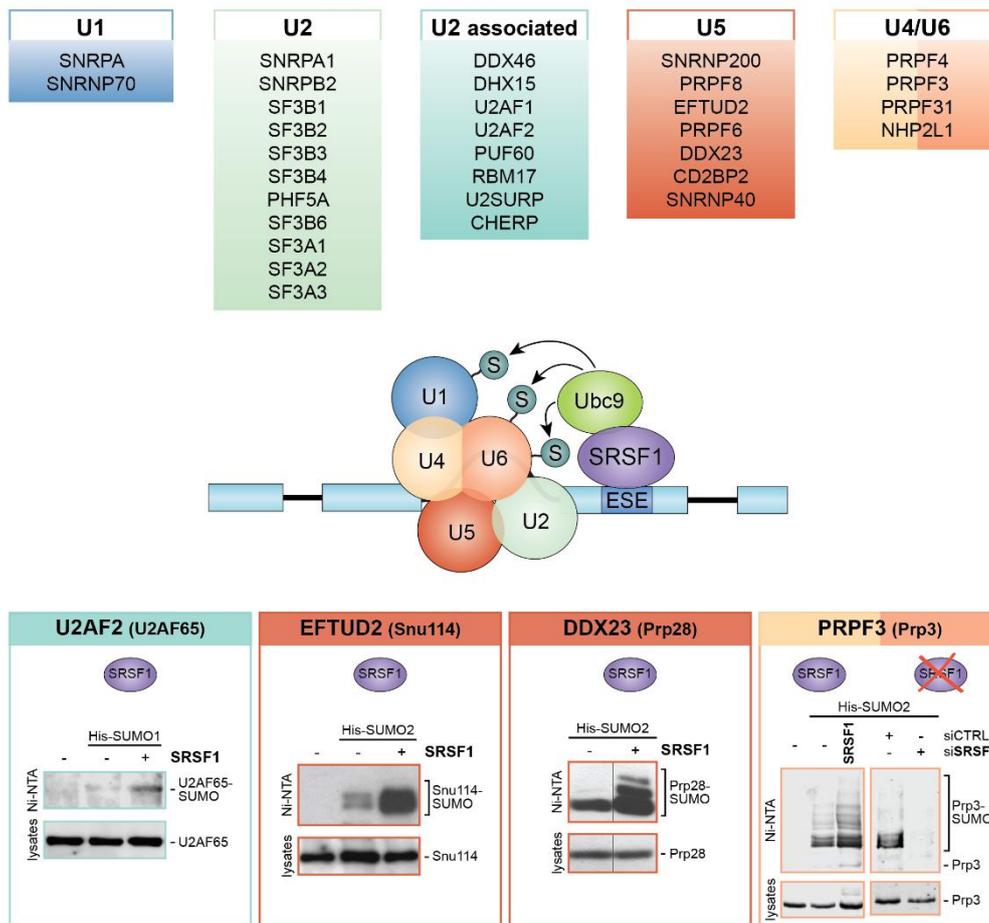
Posteriormente, observamos que SRSF1 es a su vez modificada por conjugación de SUMO, identificando por primera vez esta modificación post-traducciona l en este factor de *splicing* (datos no publicados). Más aún, utilizando un software de predicción de secuencias consenso de SUMOilación (GPS-SUMO 1.0), detectamos posibles lisinas blanco de esta MPT dentro de la proteína SRSF1. Por mutagénesis dirigida modificamos la secuencia codificante para esta proteína, generando diversas mutantes, en las cuales uno de los putativos residuos blanco de conjugación de SUMO fue reemplazado por una arginina. De esta manera, pudimos identificar a la Lisina en posición 174, dentro del dominio RRM2, como el aminoácido al cual se une covalente el péptido SUMO. El hecho de que se haya descrito que algunas E3 ligasas como PIAS1, PIAS $\alpha$  o PIASy [136], son a su vez sustratos de conjugación de SUMO, y que esta modificación resulta necesaria para regular la SUMOilación de otros sustratos [137], nos hace preguntarnos si esta modificación post-traducciona l de SRSF1 podría estar relacionada con su propia capacidad de estimular la SUMOilación. Estos hallazgos, claramente ameritan ser profundizados de forma de indagar las implicancias de la propia SUMOilación de SRSF1.

### I.3.8 La SUMOilación de proteínas spliceosomales es regulada por SRSF1 en células en cultivo

A lo largo de estos años trabajando en el vínculo entre el proceso de *splicing* y la SUMOilación, pudimos corroborar la conjugación de SUMO2 a un subgrupo de las proteínas identificadas por espectrometría de masa por nuestro y otros laboratorios, en células de mamífero en cultivo.

El laboratorio del profesor Lamond aportó un nuevo capítulo en la historia entre el *splicing* y la SUMOilación [138]. Identificaron un compuesto derivado de plantas que no sólo altera el *splicing* sino que incrementa los niveles globales de conjugación de SUMO, y en particular la SUMOilación de varios componentes spliceosomales. Todos estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis de que los ciclos de conjugación/deconjugación de SUMO están involucrados en el ensamblado y en la actividad catalítica de la maquinaria de *splicing*.

Así mismo, y en concordancia con nuestros resultados previos [4], demostramos que la sobre-expresión de la proteína SR SRSF1 estimula, mientras que la depleción de SRSF1 endógena disminuye, la SUMOilación de algunas proteínas spliceosomales (**figura I.21**, sólo se muestra una condición para cada proteína) [6]. Resulta muy pertinente seguir ahondando en el mecanismo de acción de SRSF1, para comprender si su rol en la regulación de la conjugación de SUMO es parte de su actividad como factor de *splicing* (como se esquematiza en la **figura I.21**) o si esta función va incluso más allá de esto.



**Figura I.21 | SUMOilación de proteínas spliceosomales reguladas por SRSF1. Extraído de Pozzi B, Mammi P et al. 2018 [139].**

# OBJETIVOS

El objetivo general planteado para este trabajo de investigación consistió en caracterizar el rol que desempeña el factor SRSF1 en la regulación de la conjugación de SUMO. Para ello se utilizaron distintas variantes de esta proteína y, mediante ellas, pusimos a prueba diferentes funciones de SRSF1.

Dentro de este contexto, en esta tesis nos propusimos:

- Obtener y desarrollar variantes de SRSF1, que nos permitiesen desacoplar su rol en la SUMOilación de otras actividades de esta proteína.
  - Caracterizar dichas variantes de SRSF1 en cuanto a su actividad en *splicing* y su localización y dinámica sub-celular.
  - Evaluar a las variantes de SRSF1 en su capacidad de regular la SUMOilación.
  
- Correlacionar diferentes actividades y/o características de SRSF1 con su rol en la conjugación de SUMO.
  - Describir el repertorio de macromoléculas (proteínas y/o RNA) que interaccionan con las diferentes variantes de SRSF1.
  - Analizar el efecto de SRSF1, y sus distintas variantes, sobre las interacciones reportadas en el punto anterior.

# MATERIALES Y METODOS

## M.1 Cultivo celular

### M.1.1 Mantenimiento 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 estreptomycin). 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. Las células fueron congeladas en N<sub>2</sub> 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.

### M.1.2 Transfecciones con DNA

Las células HEK 293T ( $5 \times 10^5$  células) o HeLa ( $2,5 \times 10^5$  células) fueron transfectadas en placas de cultivo con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según el protocolo provisto por el fabricante. Cada pocillo fue transfectado en relación 1:3 de DNA total y Lipofectamina. Brevemente, el protocolo de transfección con Lipofectamina que utilizamos en nuestro laboratorio es el siguiente (se ejemplifica utilizando las cantidades de los reactivos adecuadas para pocillos de 35mm):

- Se coloca 2 µg totales de DNA plasmídico en un tubo eppendorf 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 eppendorf al tubo con Lipofectamina 2000 y se mezcla vigorosamente.
- Se incuba 20 minutos para que se formen los complejos entre el poli-cación y el DNA.

- Se agregan por goteo 500  $\mu$ l de los complejos en cada pocillo.
- Se dejan las células en el incubador durante 4 a 6 hs aproximadamente para que ocurra la transfección.
- Luego se aspira el medio para eliminar la Lipofectamina 2000, que de lo contrario tiene efectos tóxicos a largo plazo, y se agrega 2 ml de medio completo por pocillo.

## M.2 Purificación de proteínas conjugadas a 6xHis-SUMO

Células HEK293T ( $5 \times 10^5$  células) fueron plaquedas en placas de 35mm y 24hs más tarde transfectadas de acuerdo con el protocolo arriba mencionado. Luego de 48 hs, las células se cosecharon en PBS con inhibidores de proteasas de SUMO (iodoacetoamida 50mM) y se tomó el 5% como alícuota input al cual se le agregó directamente cracking buffer 2X. El resto se lisó en 1 ml de buffer de extracción. Los lisados fueron sonicados a una amplitud del 40% por 10 segundos para disminuirles la viscosidad y se le agregó 40  $\mu$ l de la resina  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (QIAGEN). Luego de incubar con rotación durante 4 hs, los tubos fueron centrifugados a 5.000 g por 5 min y se descartó el buffer. La resina fue resuspendida en 0,5 ml de buffer Urea I. 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 II y Urea III. Luego, se eluyeron las proteínas unidas a la resina incubando por 20 min con 40  $\mu$ l de buffer de elución. En la **figura M.1** se muestra la esencia de esta técnica, así como la visualización esperada de los resultados por western blot.

A continuación, se detalla la composición de todos los buffers mencionados:

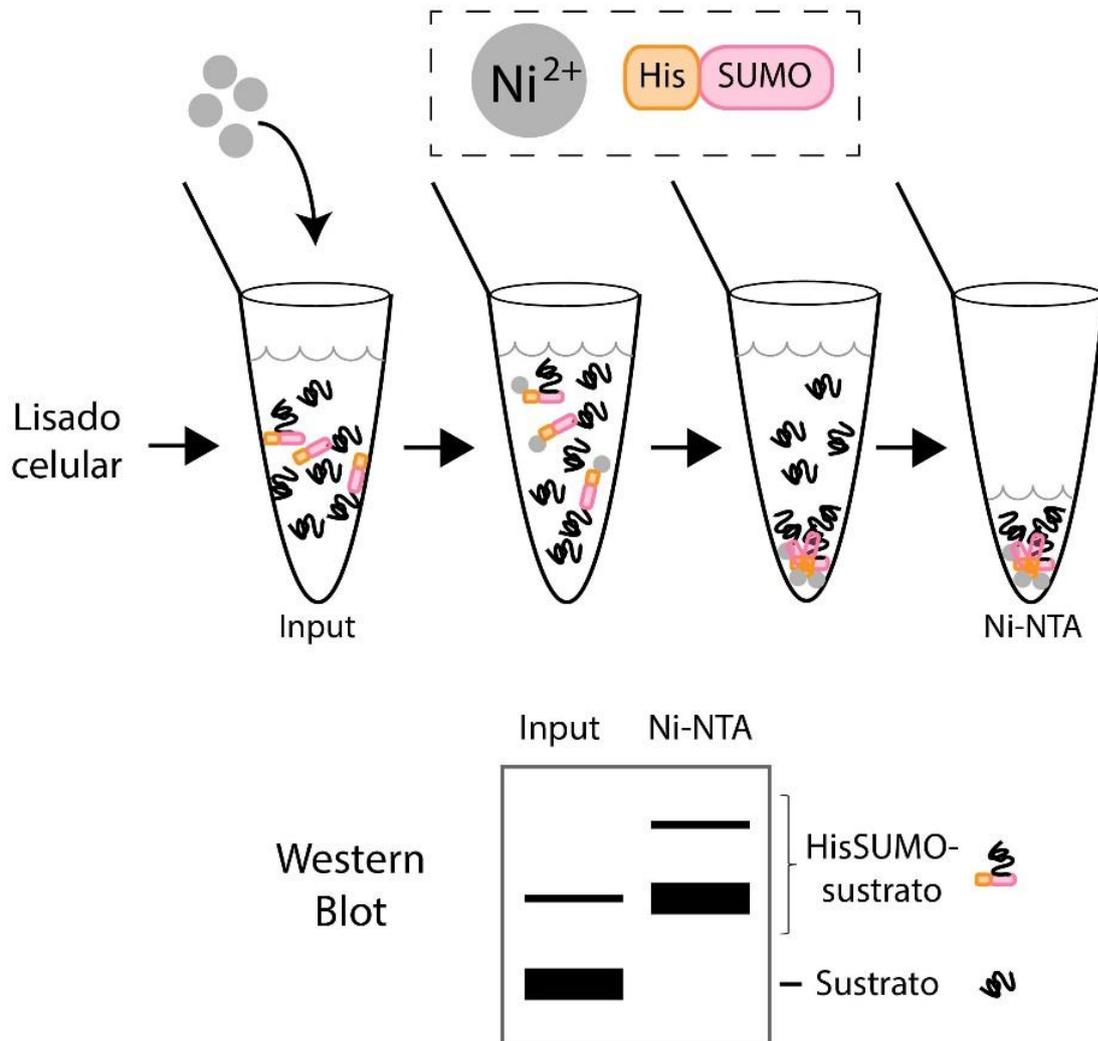
**Buffer de extracción** (pH 8): guanidinio-HCl 6M, Tris-HCl 10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

**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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, tritón X- 100 0,1%, imidazol 5 mM y iodoacetamida 10 mM.

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



**Figura M.1| Purificación de proteínas SUMOiladas por resina de Niquel (Ni-NTA):** Células en cultivo se transfectan con plásmidos para la expresión de una versión de SUMO etiquetada con 6 histidinas (His-SUMO). Una vez obtenidos los lisados celulares, donde algunas de las proteínas estarán conjugadas a His-SUMO, se toma un 5% como Input y al resto se les agrega microesferas con resina de Niquel (Ni<sup>2+</sup>). Se incuban por el tiempo suficiente para permitir la interacción entre el Niquel y la etiqueta de histidinas. Finalmente, y luego de los lavados con buffer Urea, se resuspenden las microesferas en buffer de elución (fracción Ni-NTA). Ambas fracciones son analizadas por western blot con anticuerpos contra el sustrato (o bien, contra la etiqueta fusionada al mismo). Las bandas de menor corrida electroforética en la fracción Ni-NTA, evidencian sustrato conjugado a His-SUMO.

## M.3 Técnicas de interacción entre macromoléculas

### M.3.1 Co-Inmunoprecipitación

Células HEK 293T ( $3 \times 10^6$ ) fueron cosechadas en su propio medio de cultivo 24-36 horas luego de ser transfectadas. Luego de centrifugarlas a 500g por 5 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con PBS frío. El pellet de células fue resuspendido en 500  $\mu$ l de buffer IP complementado con inhibidores de proteasas (Complete, Roche) e inhibidores de fosfatasas ( $\beta$ -glicerofosfato 5mM y KF 5mM). Posteriormente se sonicaron las muestras en hielo por tres pulsos de 20% de amplitud. Luego de una incubación de 30 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaron a 4000g por 20 minutos a 4°C. Se tomó el 5% del volumen de sobrenadante como input, y con el resto (lisados celulares) se procedió con los ensayos de co-inmunoprecipitación según se detalla a continuación para cada caso.

Para inmunoprecipitación de proteínas etiquetadas con la secuencia T7, se utilizó 1  $\mu$ l de anticuerpo anti-T7 y se incubaron con los lisados a 4°C en rotación. Al día siguiente se agregó 20  $\mu$ l de Proteína A/G Plus a microesferas magnéticas (Invitrogen), previamente equilibradas en buffer IP. Luego de incubar en rotación por 1-2 horas a 4°C, el pellet de microesferas se lavó cuatro veces con buffer Wash complementado con los inhibidores de fosfatasas. Los inmunoprecipitados se resuspendieron en 30  $\mu$ l de Laemmli sample buffer 2X (Laemmli, 1970).

Para las inmunoprecipitaciones con GPF-trap (Chromotek), los lisados celulares se incubaron con 10  $\mu$ l de GPF-trap durante una hora a 4°C. Luego de la incubación, se lavaron las microesferas cuatro veces con buffer Wash y se resuspendieron los inmunoprecipitados en 100  $\mu$ l de Laemmli sample buffer 2X.

**Buffer IP:** Tris HCl pH 7,5 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P-40 1%, Deoxicolato Na 0,5%

**Buffer Wash:** Tris HCl 7,5 50mM, NaCl 250mM, Deoxicolato Na 0,05%, NP-40 0,1%

### M.3.2 Inmunoprecipitación de complejos RNP (RIP)

Células HEK 293T ( $3 \times 10^6$ ) fueron cosechadas en su propio medio de cultivo 24-36 horas luego de ser transfectadas. Luego de centrifugarlas a 500g por 5 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con PBS frío. El pellet de células fue resuspendido en 500  $\mu$ l de buffer

IP complementado con inhibidores de proteasas (CComplete, Roche) e inhibidores de fosfatasa ( $\beta$ -glicerofosfato 5mM y KF 5mM). Posteriormente se sonicaron las muestras en hielo por tres pulsos de 20% de amplitud. Luego de una incubación de 30 minutos a 4°C, las muestras se centrifugaron a 4000g por 20 minutos a 4°C. Se tomó el 10% del volumen de sobrenadante como input, y con el resto (lisados celulares) se procedió con los ensayos de inmunoprecipitación.

A partir del 10% de input, la mitad del volumen fue analizada por western blot con anticuerpo anti-GFP y el resto sometido a extracción de RNA y RT-qPCR.

Los lisados celulares fueron incubados por 1 hora a 4°C en rotación con 10  $\mu$ l de GFP-trap, previamente equilibrados con buffer IP. Las microesferas fueron posteriormente lavadas cuatro veces con buffer Wash complementado con los inhibidores de fosfatasa. En el último lavado, se tomó el 5% del volumen para control de inmunoprecipitación de proteínas por Western Blot. Las microesferas restantes fueron resuspendidas en 250  $\mu$ l de Tri-Reagent (Invotrogen) para la posterior extracción de RNA y RT-qPCR.

## M.4 Western Blots

Las muestras proteicas fueron corridas en geles de poliacrilamida con SDS en buffer de corrida durante 50 minutos a 200V, y posteriormente transferidas por 1 hora a 100V en buffer de transferencia, a membranas de polivinilidenofluoruro, PVDF, o Nitrocelulosa (GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas por una hora en una solución conteniendo 5% leche en TBS. 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 TBS más 0,1% tween-20 (TTBS), las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes, acoplados a peroxidasa (Biorad) en solución de bloqueo o acoplados a fluoróforos (Licor). 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) para los secundarios acoplados a peroxidasa, o escaneados en el equipo Odyssey para los anticuerpos Licor.

**Buffer de corrida:** 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS

**Buffer transferencia:** 25 mM Tris, 192 mM glycine, Metanol 20%

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Epítope	Fabricante	Descripción	cat. #
B-actin	Santa Cruz	Ratón - Monoclonal	sc-47778
HA.11	Covance	Ratón - Monoclonal	MMS-101P
T7	Novagen	Ratón - Monoclonal	69522
GFP (B-2)	Santa Cruz	Ratón - Monoclonal	sc-9996
Sam68	Santa Cruz	Ratón - Monoclonal	sc-1238
Ubc9	BD Biosciences	Ratón - Monoclonal	610748
U1A-70K	Abcam	Conejo - Policlonal	ab83306
U2AF65	Abcam	Conejo - Policlonal	ab37530
p53 (DO-1)	Abcam	Ratón - Monoclonal	ab1101

## M.5 Técnicas de imágenes de Fluorescencia

### M.5.1 Microscopía de Fluorescencia

Células HeLa fueron plaqueadas en placas de cultivo multiwell sobre vidrios cubre objetos de microscopía. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 fusionadas a GFP. A las 24 horas, las células fueron fijadas con “Buffer de fijación” por 10 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 1% en PBS por 10 minutos. Para la tinción de núcleos se utilizó el colorante TOTO-3 por 20 minutos a temperatura ambiente, tratando previamente a las células con RNAsa 0,1 mg/μl a 37°C por media hora. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y montadas en medio VECTASHIELD (Vector Labs). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus FV300, con un objetivo 60X 1,4 NA.

**Buffer de fijación:** PIPES 240mM; HEPES 100 mM; MgSO<sub>4</sub> 8mM; EGTA 40 mM; pH 7; paraformaldehído 4%.

Para cuantificar la señal de fluorescencia a partir de un número elevado de imágenes de microscopía confocal, se utilizó el *software* CellProfiler (v3.1.5). Se elaboró una línea de comando para reconocer de manera automatizada los núcleos y los *speckles* observados en cada fotografía. Para lograrlo, se aprovechó la diferencia de intensidades apreciables entre ambos compartimentos. Estableciendo un diámetro mínimo y máximo para cada objeto (núcleo o *speckle*), se asignó un límite de intensidad para diferenciar cada estructura como un objeto independiente. A continuación, se estableció una relación de “parentesco” para asociar cada *speckle* a un determinado núcleo. Una vez reconocidos estos, se identificó el objeto “nucleoplasma” como la resta de los *speckles* al núcleo asociado. La cuantificación se realizó analizando el cociente entre las intensidades media de los *speckles* de un determinado núcleo, y la del nucleoplasma correspondiente (obtenido restando los *speckles* al núcleo).

### M.5.2 Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado (FRAP)

Células HeLa fueron plaqueadas en placas de cultivo multiwell sobre vidrios cubre-objetos de microscopía. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 fusionadas a GFP. 24 horas después, las células fueron captadas con un microscopio Olympus U-Plan-Apo con un objetivo 100x1.35NA y fotoblanqueada usando la función “*photokinetic experiment*” del microscopio DeltaVision Spectris. Una pequeña región dentro del núcleo fue fotoblanqueada con un láser de 488nm (100% de potencia por 0,15 segundos), y se tomaron fotografías en intervalos de 300 mSeg. Las intensidades de las áreas seleccionadas, antes y después del fotoblanqueado, fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ.

Para el análisis de datos se procedió de la siguiente manera con las imágenes de cada *speckle*: se relativizó cada medición de intensidad sobre el área de interés, a un punto fuera de este área (para evitar los efectos de cambio de foco entre cada imagen, fotoblanqueado por exposición, y disminución de la población de proteínas fluorescentes por el fotoblanqueado); se realizó un promedio de las intensidades pre-fotoblanqueado en el área de interés; se normalizó cada punto post-fotoblanqueado al promedio de puntos pre-fotoblanqueado; se graficaron estos valores en función del tiempo post-fotoblanqueado; se ajustaron los datos a la siguiente función exponencial

que describe la dinámica de recuperación. Los gráficos de las curvas de recuperación, y los distintos gráficos de los parámetros de los ajustes, así como también los análisis estadísticos fueron realizados con RStudio.

$$\text{Intensidad de fluorescencia} = a \left( 1 - e^{(-t)/b} \right) + c$$

## M.6 Etiquetado de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular (SILAC)

Se realizó un protocolo basado en [140].

### M.6.1 Generación de líneas marcadas

Medios DMEM sin lisinas y sin argininas, fueron complementados con suero 10%, penicilina/estreptomicina, y separado en tres grupos. A cada uno se le agregaron los aminoácidos con isótopos diferenciales según se indica a continuación:

Liviano: arginina R0 (Sigma), Lisina K0 (Sigma)

Medio: arginina R6 (Sigma), Lisina K4 (Sigma)

Pesado: arginina R10 (Sigma), Lisina K8 (Sigma)

Un cultivo inicial de células HEK 293T fue separado en tres placas de 10cm. Cada una de ellas fue incubada con uno de los medios (liviano, medio, pesado). Se realizaron seis pasajes de cada una de estas líneas, siempre manteniendo el medio con los isótopos correspondientes, para lograr obtener un marcado total de las proteínas en cada grupo. En los repiques, las células se levantaron por *up-down* con pipeta, y no se utilizó tripsina ya que esta puede tener restos de aminoácidos no marcados. 24 horas antes de la transfección,  $3,5 \times 10^6$  células por cada condición experimental fueron plaqueadas en placas de 10 cm.

## M.6.2 Transfección de células con construcciones GFP-SRSF1

Células HEK 293T marcadas con isótopos de aminoácidos fueron transfectadas con Lipofectamine 2000 (Invotrogen), según el protocolo mencionado en la sección M.1.2. Para cada condición se utilizaron 12 µg del plásmido de expresión para la versión GFP-SRSF1 correspondiente, o bien GFP solo. Luego del agregado de los complejos, se dejaron las células a 37°C y 10% CO<sub>2</sub> por 24 horas.

## M.6.3 Cosechado de células

Las células fueron cosechadas por *up-down* con pipeta semi-automática en su propio medio de cultivo. Luego se cuantificaron las células y se tomaron la misma cantidad en cada condición. Estas células fueron centrifugadas a 500g por 5 minutos a 4°C, y se lavaron dos veces con PBS frío.

## M.6.4 Inmunoprecipitación y preparado de muestras para proteómica

Se utilizó el kit iST GFP-Trap (Chromotek, PREOMICS), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Un esquema del procedimiento se puede observar en la **figura M.2**.

**Preparación muestras:** Se lisaron las células en el buffer IP-Lysis suplementado con inhibidores de proteasas (ROCHE) e inhibidores de fosfatasas (PhosphoSTOP), por 30 minutos en frío, pipeteando exhaustivamente cada 10 minutos. Los lisados se centrifugaron en frío a 20000g por 10 minutos. Al sobrenadante se le agregó un volumen de IP-Wash II suplementado con los mismos inhibidores.

**Captura:** Se agregaron 25 µl de microesferas magnéticas previamente equilibradas en buffer IP-Wash I. Se incubó en rotación a 4°C por una hora.

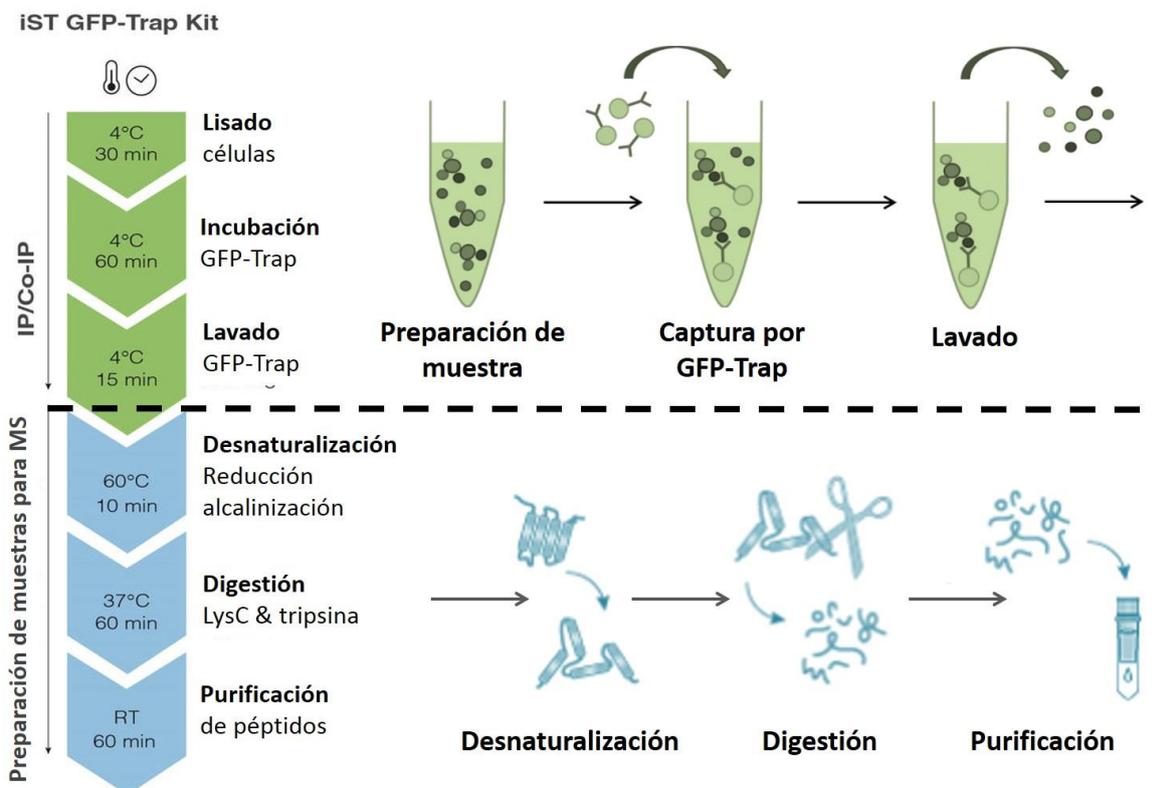
**Lavados:** Luego las microesferas fueron lavadas una vez en CO-IP buffer y posteriormente tres veces en IP-Wash II, transfiriendo en el último paso a un tubo nuevo.

**Desnaturalización:** Se agregaron 50 µl de la solución Lyse a las microesferas magnéticas. Se dejó 10 minutos a 60°C en un bloque térmico con agitación 1000rpm.

**Digestión:** 50  $\mu$ l de la solución DIGEST fueron agregos a las microesferas. Se incubó 1,5 horas a 37°C en un bloque térmico con agitación de 500 rpm. La digestión fue frenada con el agregado de 100  $\mu$ l de la solución STOP, en agitación por 1 minuto a temperatura ambiente.

**Purificación:** se centrifugaron las microesferas a temperatura ambiente por 2 minutos a 2500g. El sobrenadante se introdujo en las columnas CARTRIDGE y se centrifugó 3 minutos a 3800g. Se procedió a lavar la columna seguidamente con dos buffers, WASH I y WASH II. Los péptidos fueron eluidos dos veces en 100  $\mu$ l de solución ELUTE en un tubo recolector nuevo. Una vez llegado a este paso, se combinaron las muestras de cada mutante, manteniendo separados únicamente los triplicados de cada condición. Utilizando una centrifuga de vacío a 45°C se liofilizaron las muestras. Estas fueron resuspendidas en 30  $\mu$ l de la solución LC-LOAD y sonicadas en baño ultrasónico por 5 minutos para asegurar la completa resuspensión.

Las muestras fueron analizadas por espectrometría de masa.



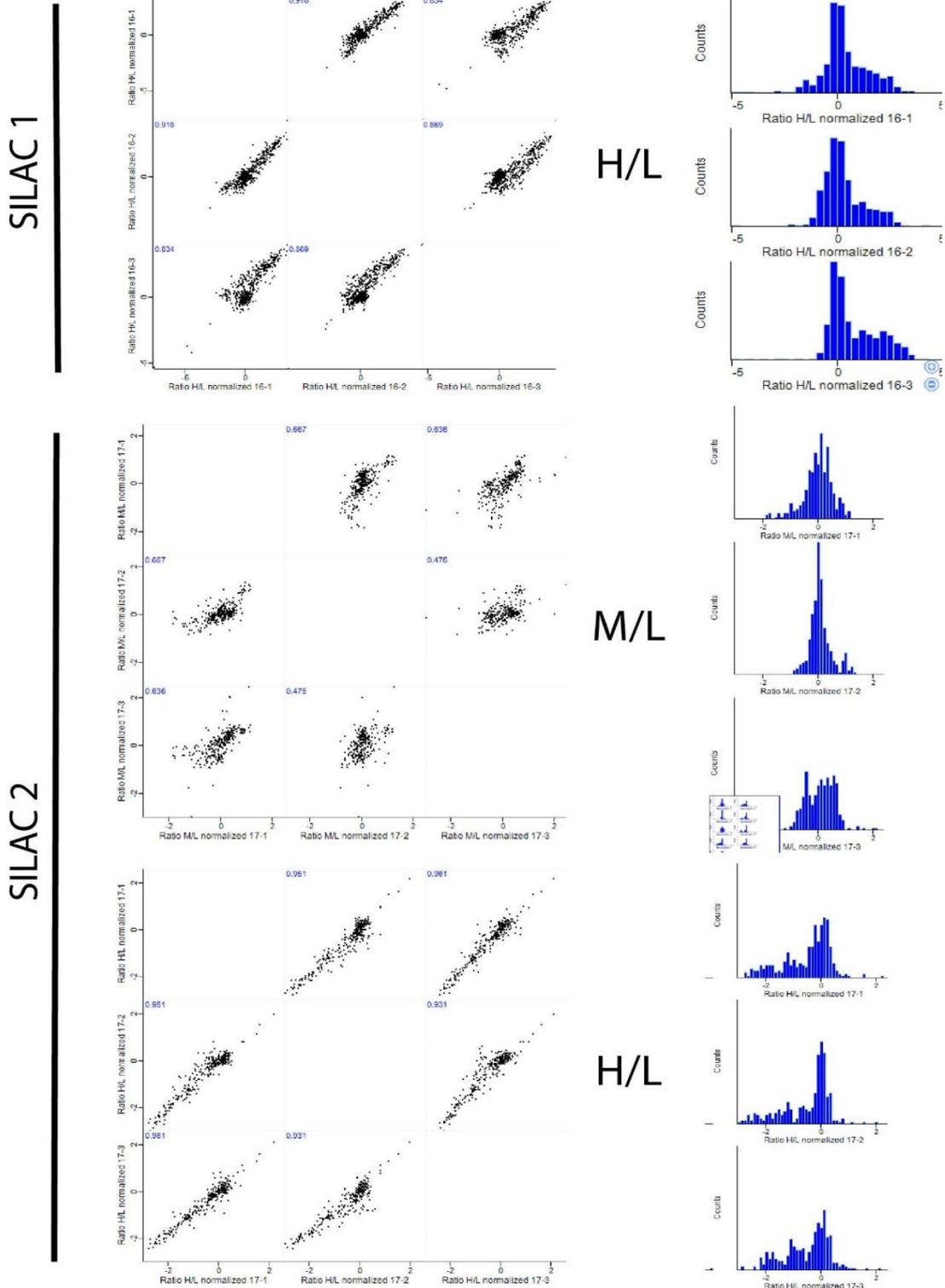
**Figura M.2 | Esquema experimental SILAC:** Una vez obtenidas las líneas celulares con aminoácidos marcados que expresen las proteínas de interés, se procedió a la inmunoprecipitación y preparación de las muestras para espectrometría de masa. Las etapas se pueden resumir en tres pasos cada una.

### M.6.5 Evaluación de péptidos detectados

Se analizaron cocientes de intensidades de péptidos de a dos condiciones: pesado/liviano (H/L) o medio/liviano (M/L). Para ello, los cocientes de intensidades de los péptidos obtenidos en cada condición fueron normalizados de manera que un cociente entre péptidos de intensidades iguales tome un valor de 0 (cero). De esta manera, un valor positivo indica un enriquecimiento de dicho péptido en la condición del numerador, y un cociente negativo indica un enriquecimiento en la condición del denominador.

El primer paso consistió en analizar la calidad de las réplicas biológicas. En un gráfico de correlación se volcaron los resultados de los cocientes normalizados para las distintas comparaciones de condiciones en ambos experimentos SILAC (**figura M.3**). Se observó una muy buena correlación entre las réplicas de H/L para el SILAC GFP – Wt (SILAC 1), para H/L del SILAC Wt - W134A – FFDD (SILAC 2). Si bien la correlación para M/L de este último SILAC es más pobre, fue aceptable dentro de lo esperado para réplicas biológicas.

SILAC 1: GFP (L) - Wt (H)  
 SILAC 2: Wt (L) - W134A (M) - FFDD (H)



**Figura M.3 | Análisis de los cocientes entre réplicas biológicas de SILAC:** *Los cocientes normalizados (H/L para ambos SILACs, y M/L para el SILAC 2) se graficaron en comparación entre réplicas, gráfico de correlación (panel izquierdo), y en un histograma de frecuencias (panel derecho).*

En un histograma de frecuencia se graficaron los cocientes normalizados para cada condición. Se observó el enriquecimiento esperado de péptidos para la inmonoprecipitación de SRSF1 Wt respecto a GFP solo (SILAC 1). Para el SILAC 2 se observa cómo la variante FFDD (M/L) presenta una gran variedad de péptidos empobrecidos con respecto a la Wt. Para la variante W134A (M/L), se observa cómo en la réplica 2, el patrón de cocientes es diferente a las demás. Esto pone en evidencia algún inconveniente técnico con esta réplica y explica la menor correlación observada entre estas.

Del análisis de los cocientes, se procedió al estudio de las proteínas resultantes. Se consideraron las proteínas que cumplieran con los siguientes requisitos: detección de al menos dos péptidos por proteína; cocientes presentes en más de una réplica; un valor de desvío estándar relativo de los cocientes (RSTD) menor al 20%. Como límite de significancia se consideró el promedio de todos los cocientes +/- un desvío estándar.

### M.6.6 Análisis ontológico

Para el análisis ontológico (GO) se recurrió a la plataforma bioinformática DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) [141], [142]. Este análisis fue hecho respecto a tres clases: procesos biológicos (BP por sus siglas en inglés), componente celular (CC) y funciones moleculares (MF). Para cada categoría dentro de estas clases, se calculó las veces de enriquecimiento de la muestra respecto a la cantidad de genes esperados en una selección al azar. Para cada enriquecimiento, a su vez, se estudió la significancia del cambio a través del parámetro p-value. Este estadístico, como se observa en la fórmula de la **figura M.4**, contempla no solo la cantidad de genes positivos en la muestra, sino también el número total de genes en la muestra y el tamaño de la categoría respecto al número de genes en humanos.

$$\text{Enriquecimiento} = \frac{m/n}{M/N}$$

$$\text{P-value} = \sum_m^{\min(K,n)} \frac{\binom{M}{m} \binom{N-M}{n-m}}{\binom{N}{n}}$$

N: números de genes en humanos

M: número de genes en una determinada categoría

n: número de genes totales de la lista analizada

m: números de genes de la lista analizada que pertenecen a la categoría M

**Figura M.4 | Fórmulas de análisis de enriquecimiento del GO:** *los grupos de proteínas disminuidos en su inmunoprecipitación para cada mutante fueron analizados por GO con la plataforma DAVID. Se calculó el enriquecimiento para cada categoría según se indica en la figura. Para cada enriquecimiento se calculó el estadístico p-value.*

## M.7 Preparación de plásmidos

### M.7.1 Transformación de bacterias

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl<sub>2</sub> y otras sales. Con este protocolo, se generan bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ $\mu$ g. Estas bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan [143].

Alternativamente, se prepararon bacterias electrocompetentes en los casos en que se necesitó una mayor eficiencia de transformación (10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> UFC/ $\mu$ g DNA). El protocolo utilizado para desarrollar estas bacterias electrocompetentes fue extraído del trabajo [144].

### M.7.2 Preparación de plásmidos a pequeña escala o minipreps

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

### M.7.3 Preparación de plásmidos a gran escala o maxipreps

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

### M.7.4 Cuantificación de plásmidos

Para conocer la concentración de DNA o RNA en solución se midió absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (NanoDrop). Como alternativa se midieron concentraciones por fluorimetría, utilizando el lector Qubit y los reactivos Quant-iT RNA y dsDNA BR (Invitrogen). Paralelamente, para cuantificar fragmentos de DNA 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).

### M.7.5 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 molde. La reacción de amplificación contiene:

Buffer PCR para Pfu (con Mg)	5 $\mu$ l
Plásmido templado	50 ng
Primer Fw	125 ng
Primer Rev	125 ng
dNTPs 10 mM	1 $\mu$ l
PfuTurbo DNA polimerasa (2.5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O c.s.p.	50 $\mu$ l

La reacción de PCR consistió en:

N° Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94	30 seg
18	94	30 seg
	55	60 seg
	72	60 seg / Kb
1	72	10 min

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

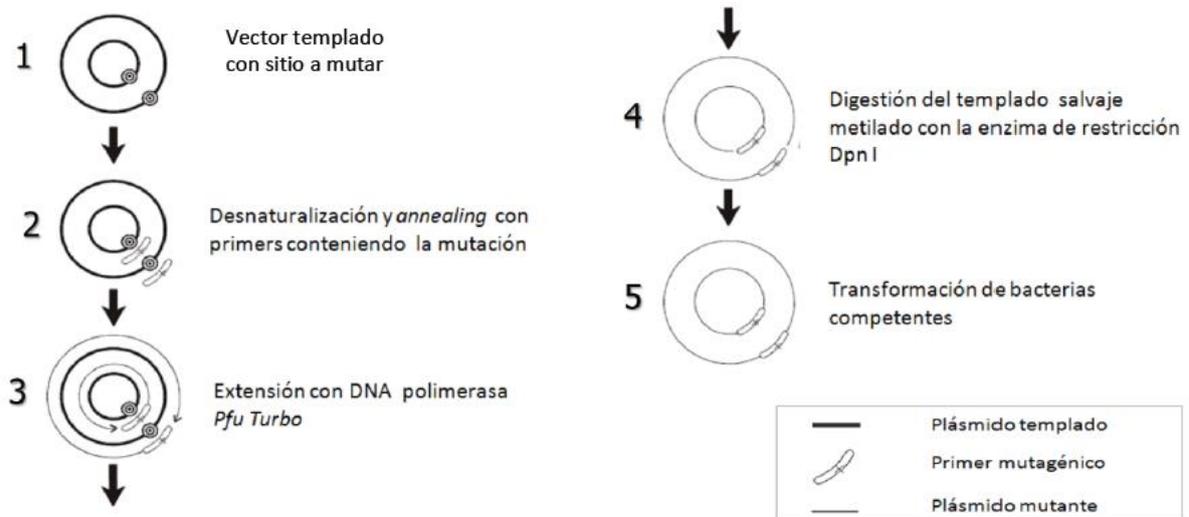


Figura M.5| Esquema experimental del método de mutagénesis mediada por *Dpn I*.

*Adaptado de Pfu DNA polymerase Agilent Technologies.*

## M.8 RNA, RT & PCR

### M.8.1 Purificación de RNA

Para obtener RNA de las células transfectadas, se utiliza el protocolo del reactivo TRIzol (Invitrogen) o TRI Reagent (MRC). Cabe aclarar que todos los reactivos utilizados deben estar libres de RNAsas, lo que se logra autoclavando las soluciones o utilizando stocks nuevos, manipulados con todas las precauciones necesarias para no introducir RNAsas presentes en el ambiente.

Se cosecha cada pocillo de células directamente con el agregado de 500  $\mu$ l de reactivo y se las transfiere a un tubo eppendorf. Se agrega 1/5 de volumen (100  $\mu$ l) de cloroformo y se mezcla vigorosamente. Se deja reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se centrifuga a 12000g por 15 minutos a 4°C. Se toma la fase acuosa (superior) y se la pasa a un nuevo tubo eppendorf. Se precipita con un volumen (250  $\mu$ l) de isopropanol y se agita por inversión. Luego de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga 15 minutos a 12000g a 4°C. Se descarta el sobrenadante por volcado y se agregan 500  $\mu$ l de etanol 75% v/v y se agita por inversión

para lavar el precipitado. Luego se centrifuga 5 minutos a 7600g a temperatura ambiente para disminuir la cantidad de sales precipitadas. Se vuelca el sobrenadante y se aspira bien para que no queden restos de etanol. Se seca el pellet al aire, se agrega agua (20  $\mu$ l generalmente. Para muestras de RIP se resuspende en 10  $\mu$ l) y se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para resuspender el RNA, se descongela en un bloque térmico a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 5 min y se agita vigorosamente con un vortex. Se puede controlar la integridad del RNA extraído corriéndolo en un gel de agarosa 1% p/v, a un voltaje relativamente alto y por poco tiempo, para disminuir la degradación durante la corrida. En una preparación buena de RNA, deben observarse 3 bandas correspondientes, de mayor a menor tamaño, al rRNA 28S, al rRNA 18S y a los tRNA.

### M.8.2 Transcripción reversa (RT)

El protocolo para la obtención de DNA copia a partir de RNA se detalla a continuación. El mismo consiste en el protocolo provisto por el fabricante de la enzima Transcriptasa Reversa (MMLV-RT, Invitrogen) con leves modificaciones. Se desnaturalizan 5  $\mu$ l de RNA colocándolo 5 min a  $65^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se pasa el tubo inmediatamente a hielo para impedir la re-naturalización. Luego se agregan 15  $\mu$ l de mezcla de reacción a cada tubo y se deja 10 min a temperatura ambiente para que el oligo(dT) pueda aparearse a las colas de poli(A) de RNA mensajeros poli-adenilados. Por último, se incuba 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  para que ocurra la reacción y se detiene la misma incubando 10 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$ .

La mezcla de reacción está compuesta de la siguiente manera:

Buffer de RT 5X.	4 $\mu$ l
DTT 100 mM.	2 $\mu$ l
dNTPs 25 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).	0,25 $\mu$ l
Oligo Random 100 $\mu$ M (oligo de 10 nucleótidos).	0,5 $\mu$ l
Enzima M-MLV RT 200 U/ $\mu$ l.	1,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	c.s.p. 15 $\mu$ l.

### M.8.3 PCR: detección de cDNA correspondiente a mRNAs derivados de minigenes reporteros de *splicing* de EDI

Se utilizan 2  $\mu$ l de reacción de RT que contiene el cDNA que servirá de molde para la reacción de PCR. A cada tubo de cDNA se le agregan 48  $\mu$ l de mix que estará compuesta de la siguiente manera:

Buffer de PCR sin MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ l
DMSO (dimetil sulfóxido)	1,5 $\mu$ l
Primer forward 20 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
Primer reverse 20 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l
dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	1 $\mu$ l
Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
dCTP radiactivo (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l, act. esp.: 3000 Ci/mmol)	0,1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	c.s.p. 48 $\mu$ l.

Reacción de PCR EDI:

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	45 seg
30	94	20 seg
	63	60 seg
	72	30 seg
1	72	5 min

### M.8.4 PCR en tiempo real (qPCR)

Para esta reacción de PCR se utilizan como molde, 2,5 µl de una dilución 1:30 de la reacción de RT que contiene el cDNA. La curva estándar es realizada mediante 7 diluciones seriadas al medio partiendo de una dilución 1/2 de un pool de las muestras. A cada pocillo con la dilución de cDNA se le agrega 22,5 µl de mix, compuesta de la siguiente manera:

Buffer PCR	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 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 DNA polimerasa (5 U/µl)	0,15 µl
Sybr Green	0,025 µl
H <sub>2</sub> 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

M.8.5 Lista de *primers* utilizados

		<b>FW</b>	<b>REV</b>
<b>Mutagénesis</b>	<b>FF-DD</b>	GGGGGACCGCCCGACGCCGACGTTGAGTTCGAG	CTCGAACTCAACGTCGGCGTCGGGCGGTCCCCC
	<b>SIM-</b>	CTGCCTACATCCGGGCTAAAGTTGATGGGCC	GGCCCATCAACTTTAGCCCGGATGTAGGCAG
	<b>W134A</b>	CTCCAAGTGAAGTGCGCAGGATTTAAAGG	CCTTTAAATCCTGCGCACTTCCACTTGGAG
	<b>K174R</b>	CTATGCAGTTCGAAGACTGGATAACACTAAG	CTTAGTGTATCCAGTCTTCGAACTGCATAG
<b>Minigen</b>	<b>EDI</b>	CACTGCCTGCTGGTGACTCGA	GCGGCCAGGGGTCACGAT
<b>qPCR</b>	<b>PIAS1</b>	GCGGACAGTGCGGAACTAAA	ATGCAGGGCTTTTGTGAGAAGT
	<b>GAPDH</b>	CAATGACCCCTTCATTGACC	GATCTCGCTCCTGGAAGATG
	<b>Ubc9</b>	AAGTCCCAGACAAAAGGGAAG	GGTGACTAGTCATTGTATGGAG
	<b>HSPCB pre-mRNA</b>	GGTACTTGGTGTGCAAGGA	AGGAACTGCAGCATTGGGTT
	<b>HSPCB mRNA</b>	AACCGCCCTGCTATCTTCTG	AACTGCAGCATTGGGTTCTT
	<b>Akt1 pre-mRNA</b>	TGTCGCTGGCCCTAAGAAAC	CTTGAGGAGGAAGTAGCGTGG
	<b>Akt1 mRNA</b>	TTGTGAAGGAGGGTTGGCTG	CTCACGTTGGTCCACATCCT
	<b>TBP pre-mRNA</b>	ACATGTGGTGTATGCAAATCCT	CGTGGTTCGTGGCTCTCTTA
	<b>TBP mRNA</b>	AGACCATTGCACTTCGTGCC	AAATCAGTGCCGTGGTTCGT
	<b>ACTB pre-mRNA</b>	AGCACAATGAAGATCAAGGT	GAAGGGGACAGGCAGTGAGG
<b>ACTB mRNA</b>	AGCACAATGAAGATCAAGAT	ATTGCGGTGGACGATGGAG	

# RESULTADOS

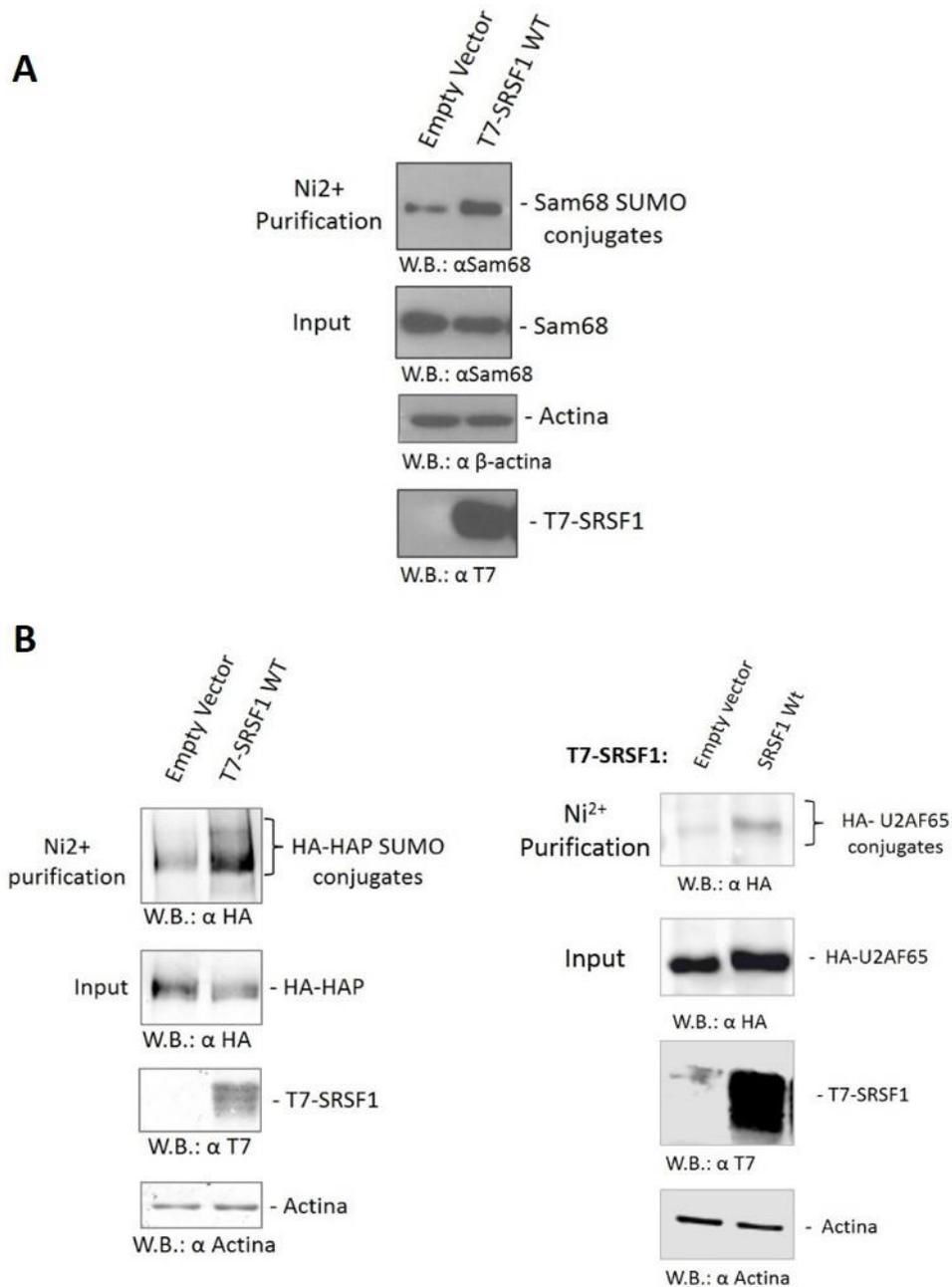
Los resultados de los trabajos previos de nuestro laboratorio despertaron numerosos interrogantes de cómo este conocido factor de *splicing* se ve involucrado en esta novedosa actividad asociada la SUMOilación. El hallazgo, casi por fortuna, de una variante de SRSF1 que demostró no estimular la SUMOilación en comparación a la versión *wild type*, inspiró esta tesis. Decidimos entonces, indagar en el comportamiento de esta mutante en diversas actividades de SRSF1. En este camino, nos fuimos adentrando en la complejidad de las proteínas multifacéticas de la familia SR. A través de bibliografía, contactos con otros laboratorios con campos de estudio similares, e intrigantes preguntas que nos fueron generando los resultados experimentales, fuimos elaborando y adquiriendo nuevas variantes de SRSF1. El comportamiento de estas nos fue haciendo cambiar de hipótesis en reiteradas oportunidades y, en consecuencia, plantearnos diferentes experimentos para poner a prueba las características de estos factores. Si bien no logramos detectar con precisión el mecanismo de acción por el cual SRSF1 regula la SUMOilación, sí hemos descifrado intrigantes aspectos de este factor y sus diversas funciones. En las siguientes secciones, hemos agrupado los resultados obtenidos en todos nuestros análisis. Para mayor entendimiento del lector, en la sección R.15 se presenta una tabla (**figura R.22**) con el resumen de las actividades reportadas.

## R.1 La SUMOilación de diversas proteínas es regulada por SRSF1

Como parte del trabajo publicado en el 2010 y 2017 por nuestro laboratorio, y como antecedente que inspiró esta tesis, se observó que SRSF1 estimula la SUMOilación de diversas proteínas, tanto *in vitro* como en variadas líneas celulares de mamífero. Teniendo en cuenta estos resultados mencionados en la introducción, en primera instancia se decidió ampliar la lista conocida de sustratos cuya SUMOilación es estimulada por la sobre-expresión de SRSF1, para tratar de investigar si este efecto se reduce a un número limitado de proteínas o evidencia un mecanismo más generalizado. A partir de los resultados previos obtenidos por nuestro laboratorio que vinculan el proceso de *splicing* con la vía de conjugación a SUMO, decidimos analizar la SUMOilación

de algunas proteínas de unión al RNA, involucradas en el metabolismo de este. Para ello, células HEK 293T en cultivo fueron co-transfectadas con plásmidos para la expresión de His-SUMO1 (versión de SUMO-1 etiquetada con un *tag* de seis Histidinas consecutivas) y una versión *wild type* de SRSF1 o, como control negativo, un plásmido vacío. Los lisados celulares fueron sometidos a cromatografía de afinidad en resina de Niquel con el fin de enriquecer la muestra en proteínas que contengan el *tag* de 6xHis, es decir, proteínas conjugadas a His-SUMO1. Ensayos de *western blot* con anticuerpos específicos contra las proteínas de interés, ya sea en su versión endógena o, sobre-expresada y etiquetada, revelaron nuevos sustratos cuya regulación post-traduccional por conjugación a SUMO parecería estar regulada por la sobre-expresión de SRSF1, evidenciado por la aparición de bandas de menor movilidad electroforética en la fracción “Ni-NTA” que la correspondiente al peso molecular de la proteína observada en los lisados celulares. Se validó la regulación por SRSF1 de la SUMOilación de Sam68, efecto reportado previamente por nuestro laboratorio [46], y ampliamos la lista de sustratos regulados por SRSF1 al comprobar que las proteínas HAP/SafB y U2AF65, se SUMOilan en mayor medida con la sobre-expresión de la proteína SR en estudio (**figura R.1**). Cabe destacar que si bien la SUMOilación del factor HAP había sido previamente reportada [145], hasta el día de la fecha ningún trabajo ha descrito esta modificación post-traduccional para U2AF65, así como tampoco la regulación de esta MPT de ambas proteínas por SRSF1.

La proteína HAP (también llamada SAF-B), es un factor de andamiaje que, al unirse a regiones específicas del DNA, permite la formación del completo “transcripsomal” (proteínas SR y RNA polimerasa II), acoplado así la transcripción al procesamiento de RNA. Por su lado, la proteína Sam68 ha sido implicada en numerosos mecanismos del procesamiento del RNA, entre los que destacamos la regulación del *splicing* alternativo estimulando la selección de sitios 3’SS y 5’SS, y la inclusión de exones. U2AF65, junto a la subunidad U2AF35, interaccionan con el pre-mRNA y reclutan ciertos factores de procesamiento de RNA al dominio C-terminal de la RNA polimerasa II, acoplado la transcripción y el *splicing*. El hallazgo de la regulación de la conjugación de SUMO ejercida por SRSF1 a estas proteínas, aporta más evidencia a favor del vínculo existente entre los procesos de *splicing* y SUMOilación que nuestro laboratorio viene investigando desde hace años.

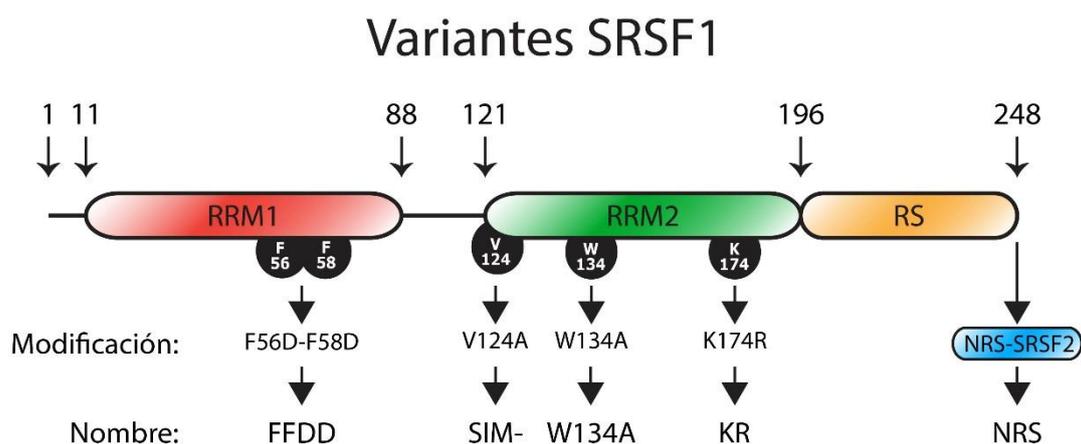


**Figura R.1 | Análisis de la acción regulatoria de SRSF1 sobre la SUMOilación de diversas proteínas:** Células HEK 2931 fueron co-transfectadas con plásmidos de expresión para His-SUMO1, Ubc9, T7-SRSF1 (o vector vacío), y un sustrato de interés etiquetado, o no, con alguna secuencia aminoacídica de uso común. Luego de 48hs, los lisados celulares fueron sometidos a purificación por resina de Niquel para enriquecer en proteínas SUMOiladas y posteriormente analizados por WB con anticuerpos específicos. **A)** validación de la SUMOilación de Sam68, sustratos descrito en [46]. **B)** identificación de nuevos sustratos, cuya SUMOilación pareciera estar regulada por la sobre-expresión de SRSF1.

## R.2 Elección de mutantes de SRSF1

Para caracterizar la participación de SRSF1 en la regulación de la SUMOilación se decidió poner a prueba una serie de versiones mutantes de este factor, esquematizadas en la **figura R.2**, con el objetivo de buscar alteraciones en el mecanismo molecular subyacente a este novedoso rol de dicha proteína. Todas estas variantes fueron elegidas en base a datos de bibliografía que demuestran que las mutaciones introducidas afectan alguna actividad ya descrita de este factor o bien, porque según nuestras hipótesis, podrían hacerlo. En esta sección describiremos cada variante y los datos previos que consideramos pertinentes para elegir las como potenciales proteínas que alteren el mecanismo de regulación de la SUMOilación.

Tres de las variantes elegidas se encontraban ya descritas en la literatura científica en el contexto de otras funciones de SRSF1 y nuestro grupo decidió probarlas en su actividad estimuladora de conjugación de SUMO. Se trata de las variantes FF-DD, W134A y NRS. Las primeras dos fueron generadas por mutagénesis dirigida en nuestro laboratorio a partir de los datos pre-existentes, mientras que la tercera fue generada por el laboratorio del Dr. Cáceres (MRC- Edinburgo, Reino Unido). Las otras dos versiones mutantes, SIM- y KR, fueron ideadas en nuestro laboratorio en el marco de esta tesis, en base a predicciones relevantes al proceso de SUMOilación. Ambas fueron elaboradas también por mutagénesis dirigida.



**Figura R.2 | Esquema de los dominios proteicos de SRSF1 y las variantes a utilizar:** Se indican los cambios aminoacídicos y la posición de cada uno de ellos, realizados para cada una de las variantes de la proteína SRSF1 utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

**FF-DD:** Se trata de una mutante de doble sustitución en el dominio RRM1 diseñada por el laboratorio del Dr. Krainer hace casi tres décadas atrás, donde los residuos fenilalanina en posición 56 y 58 son reemplazados por ácido aspártico [146]. Si bien se han realizado muchos ensayos para analizar distintas actividades de SRSF1 con esta variante, originalmente fue pensada como una proteína que fuera incapaz de unirse al RNA. Como se describió en la introducción, RRM1 se trata de un dominio canónico de unión al RNA donde los residuos aromáticos son los responsables de la interacción con este ácido nucleico. La sustitución de estos aminoácidos por residuos ácidos dentro del RNP-1 permite mantener la exposición al solvente, pero altera drásticamente las interacciones. En la publicación fundacional fue demostrado que esta mutante es incapaz de funcionar en *splicing* constitutivo en ensayos *in vitro*. Cinco años más tarde, los mismos autores, probaron por ensayos con drogas inhibitorias de la transcripción y traducción, que esta mutante es incapaz de translocar entre el núcleo y citoplasma. Los trabajos más recientes con esta mutante, que datan de la última década, están centrados en la actividad regulatoria de la traducción ejercida por SRSF1. Estos estudios propusieron que este factor debe ser reclutado al mRNA para llevar a cabo este efecto. Demostraron que si bien la mutante FF-DD es incapaz de estimular la traducción de ciertos mRNAs analizados, esta actividad se recupera cuando dicha mutante es dirigida a un mRNA específico a través de dominios de interacción MS2. Este experimento indicaría además, que esta actividad no estaría relacionada a una posterior interacción con otras moléculas de RNA como los ribosomales [42].

**W134A:** Esta mutante fue descrita por primera vez en una publicación del 2007 [147]. Se trata de una sustitución aminoacídica en el heptapéptido implicado en la unión al RNA, dentro del dominio de unión al RNA no canónico, el RRM2. En el trabajo mencionado, a través de ensayos de *crosslinking in-vitro* se demostró que esta mutante no une RNA y es incapaz de activar reporteros de la actividad regulatoria de la traducción ejercida por esta proteína (“reporteros traducionales”). En el año 2010, se demostró que esta mutante es incapaz de translocar entre el núcleo y citoplasma en células en cultivo tratadas con drogas inhibitorias de la transcripción, condición necesaria para un transporte activo. Cabe mencionar que, dentro del heptapéptido, el residuo 134 ha sido caracterizado como necesario para la unión al RNA en el *splicing* alternativo [47].

**NRS:** Como se describió en la introducción, SRSF1 es una proteína capaz de hacer *shuttling* entre el núcleo y el citoplasma. Si bien durante muchos años se consideró que algunos miembros de la familia SR no poseían esta habilidad, actualmente sabemos que la misma es compartida con todos los miembros de la familia SR en mayor o menor medida. En particular, otro miembro de esta familia, la proteína SRSF2, posee una señal de retención nuclear (*nuclear retention signal*) que mantiene a este factor dentro del núcleo en la mayoría de las líneas celulares estudiadas. En el trabajo publicado por Cazalla y colaboradores en el año 2002 construyeron una proteína de fusión donde a la secuencia codificante de SRSF1 se le anexó esta secuencia de retención nuclear (proveniente de la proteína SRSF2) en el extremo C-terminal [148]. Según este y otros trabajos del laboratorio del Dr. Cáceres, esta construcción codifica para una proteína cuya habilidad de translocar entre núcleo y citoplasma está anulada, es decir que convierte a SRSF1 en una “*non-shuttling protein*”. Además, esta proteína de fusión SRSF1-NRS, fue probada en su habilidad para regular la traducción que resultó dramáticamente afectada, poniendo en evidencia la necesidad de localización citoplasmática de SRSF1 para ejercer esta actividad.

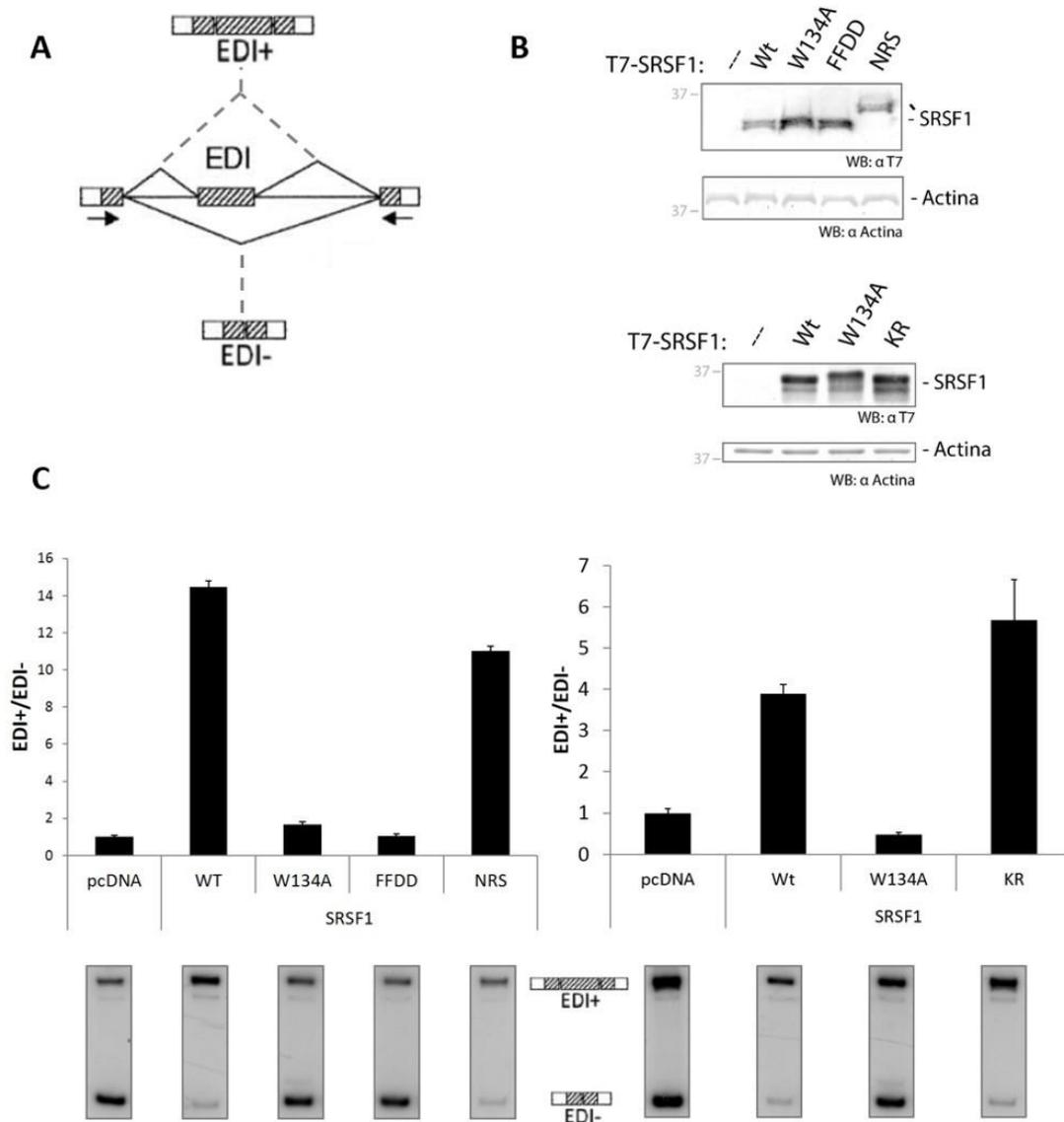
**SIM-:** Las proteínas y enzimas involucradas en la vía de conjugación de SUMO se caracterizan por contar con motivos de interacción a SUMO (SIM). Por lo general, la pérdida de esta interacción SUMO-SIM anula su función en la regulación de la SUMOilación. Utilizando un software de predicción (GPS-SUMO 1.1) encontramos un putativo sitio de unión al péptido SUMO dentro de SRSF1, y decidimos mutarlo para evaluar esta nueva variante de SRSF1 en la caracterización de su actividad estimuladora de la SUMOilación. Reemplazamos una valina por una alanina (V124A), aminoácido neutro, en el *core* de aminoácidos básicos en el elemento de secuencia SIM predicho. Con este reemplazo puntual, el sitio en cuestión deja de ser considerado como SIM por el algoritmo de predicción utilizado.

**KR:** Resultados no publicados de nuestro laboratorio, y mencionados en la introducción, demostraron que SRSF1 es, ella misma, blanco de conjugación de SUMO, siendo modificada post-traduccionamente por SUMOilación en el residuo lisina 174 dentro del dominio RRM2. Estos resultados están apoyados por un reciente análisis proteómico de sustratos de SUMOilación sitio-específico, en donde efectivamente fue detectada la lisina 174 como sitio blanco de conjugación para la proteína SRSF1 [149]. Por mutagénesis dirigida reemplazamos dicho residuo por una Arginina, para obtener la mutante K174R que es incapaz de ser modificada post traduccionamente por

conjugación de SUMO (datos no publicados de nuestro laboratorio). Nos preguntamos si la propia SUMOilación de SRSF1 podría estar jugando algún papel en su actividad en la vía de conjugación de SUMO.

### **R.3 Validación de la actividad de mutantes de SRSF1 en el proceso de *splicing* alternativo**

Habiendo sido caracterizados inicialmente como factores de *splicing* y existiendo un vasto conocimiento acerca de su participación en el proceso de *splicing* alternativo, decidimos analizar a SRSF1 y las variantes de esta proteína recién descritas, en su desempeño como reguladores del *splicing* alternativo. Para ello, hicimos uso de un minigen reportero de este proceso. Se trata de un plásmido conteniendo un *exón* alternativo del gen de fibronectina (el *exón* EDI) rodeado por sus respectivos intrones flanqueantes, y dos exones constitutivos que son híbridos de fusión entre los exones adyacentes del gen de fibronectina original y exones de  $\alpha$ -globina, todo esto bajo la regulación transcripcional de un promotor eucariota constitutivo. Este sistema permite utilizar *primers* que aparean contra la unión o juntura entre los exones de globina y fibronectina, no existente en ningún sitio del genoma endógeno, que resultan específicos para los mRNA derivados de este minigen al ser transfectado en células de mamífero en cultivo. De esta manera, luego de una reacción de transcripción reversa y PCR con los *primers* mencionados, se logra obtener como únicos productos las dos posibles isoformas de mRNA generadas por *splicing* alternativo: la isoforma de inclusión del *exón* (EDI+) o la isoforma de exclusión del mismo (EDI-) (**figura R.3 A**). Este mini-gen es ampliamente utilizado por nuestro y otros laboratorios, y fue probado específicamente para analizar cambios en patrón de *splicing* de fibronectina mediados por SRSF1 y otras proteínas de la familia SR [150]. En células HeLa en cultivo se co-transfectaron plásmidos con dicho mini-gen junto a plásmidos de expresión para cada una de las variantes de SRSF1 mencionadas anteriormente, se extrajo RNA y se procedió a realizar RT-PCR radiactiva con los *primers* específicos (indicados en el esquema de la **figura R.3 A**).



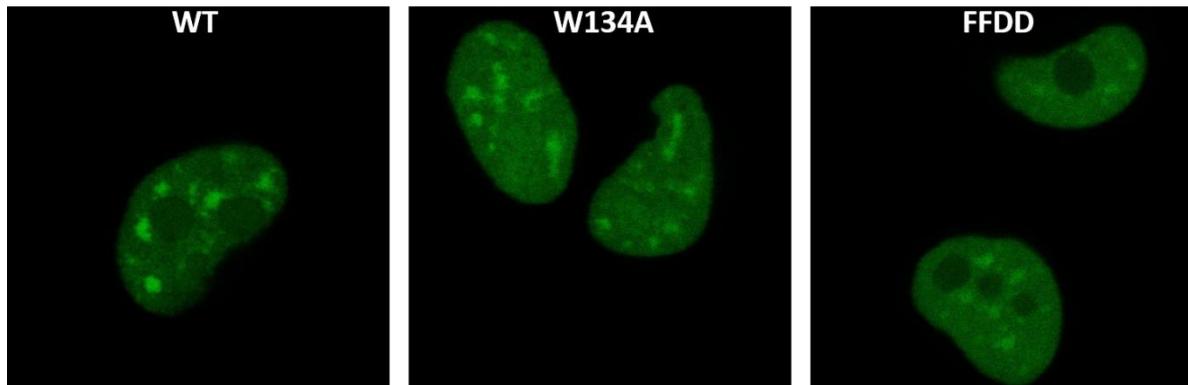
**Figura R.3 | Análisis de *splicing* alternativo con variantes de SRSF1: A)** Esquema del mini-gen reportero de *splicing* alternativo. Las cajas representan exones y las líneas intrones. Los exones rayados corresponden al gen de fibronectina, y los exones blancos al gen de  $\alpha$ -globina. En el centro del esquema se observa la región de interés contenida dentro del plásmido mientras que en la parte superior se muestra la isoforma de mRNA conteniendo al exón alternativo EDI (mRNA EDI+) derivada de dicho mini-gen, y en la parte inferior la isoforma de mRNA que carece del exón alternativo o isoforma de exclusión (mRNA EDI-). Las flechas sobre las junturas de los exones híbridos indican los primers utilizados para cuantificar las isoformas de *splicing*. **B)** Células HeLa fueron transfectadas con el mini-gen y los vectores de expresión de distintas variantes de SRSF1 y los niveles de expresión de cada una de estas proteínas fueron analizados por ensayos de western. **C)** 24 horas post-transfección, se preparó RNA total de los lisados celulares, el cual fue utilizado para reacciones de transcripción reversa (RT) y PCR radioactiva. Posteriormente las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida nativos, los cuales fueron secados y expuestos a placas radiográficas. Las bandas fueron cortadas y la radioactividad fue medida por el método Cherenkov [150]. Se muestra en un gráfico de barras la cuantificación de tres réplicas biológicas y, como ejemplo, en el panel inferior se muestra la imagen de un gel representativo del efecto observado.

Según lo esperado y reportado por nuestro y otros grupos, SRSF1 aumenta la inclusión del exón EDI de fibronectina en mRNA maduros. Un efecto comparable se observa con las variantes NRS, SIM- y KR. Por otro lado, las mutantes W134A y FFDD no favorecen la inclusión del exón alternativo y parecen comportarse como el control negativo, la transfección de plásmido vacío. Estos resultados demuestran que las dos variantes de SRSF1, reportadas como mutantes de unión al RNA, W134A y FFDD, son incapaces de funcionar como factores regulatorios del *splicing* alternativo, al menos en este sistema experimental, coincidiendo con lo esperado según la bibliografía [146]. En cambio, tanto las variantes NRS, como SIM- y KR, parecieran no tener afectada esta capacidad.

## R.4 Validación de la localización de mutantes SRSF1

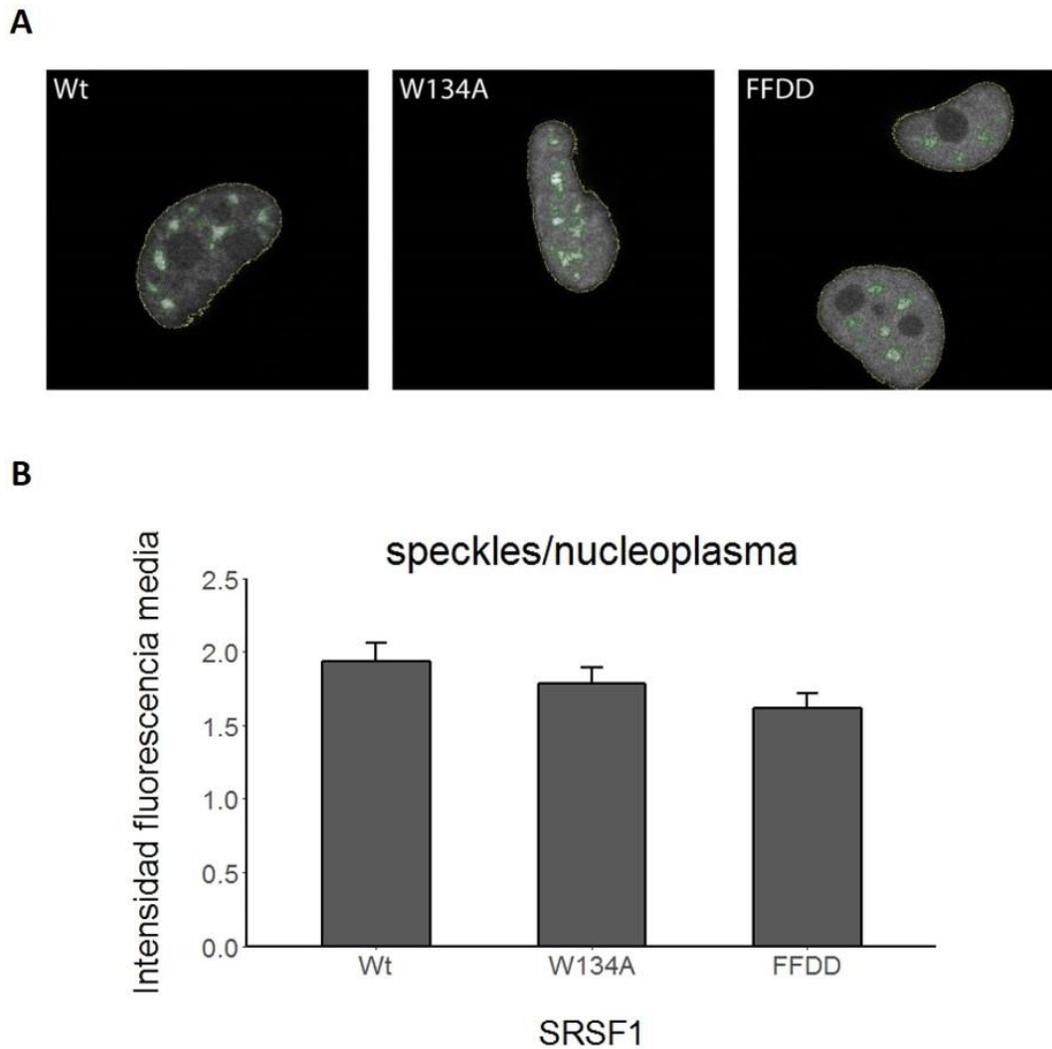
Todos los procesos moleculares que involucran interacción entre dos o más proteínas requieren indefectiblemente que estas co-localicen momentáneamente en el mismo sub-compartimento celular. Decidimos indagar en la localización celular de SRSF1 y sus variantes para obtener información que nos permita hipotetizar posibles mecanismos de acción en su rol en la SUMOilación. Si bien SRSF1 es mayoritariamente nuclear, el *shuttling* núcleo-citoplasma es una de las características más relevantes de esta familia de proteínas, que le permiten desarrollar actividades tanto dentro del núcleo como fuera de él y, como se desarrolló en la introducción de esta tesis, muchas de las funciones de esta proteína SR dependen de esta habilidad.

Como una primera aproximación, decidimos evaluar la localización de las mutantes de unión al RNA en un estado estacionario, transfectando las células con versiones de SRSF1 fusionadas a la proteína fluorescente verde (GFP). Por microscopia confocal obtuvimos imágenes con fluorescencia apreciable solamente en el núcleo (**figura R.4**). Esta señal fluorescente, junto a los gránulos donde parece estar concentrado SRSF1, evidencian no sólo la ubicación nuclear de SRSF1 y ambas mutantes, sino también la sub-compartimentalización en *speckles* de las variantes testeadas.



**Figura R.4 | Localización celular de variantes de SRSF1:** *Células HeLa fueron transfectadas con las variantes GFP-SRSF1 indicadas. 24hs más tarde fueron fijadas y montadas. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal donde se observan los núcleos con marca fluorescente indicando la localización en estos compartimentos de SRSF1 y estas mutantes. Los gránulos más brillantes corresponden a speckles y los círculos más oscuros, o carentes de fluorescencia, a los nucleolos, tal como fuera descrito por otros laboratorios.*

Si bien todas las células observadas mostraban una localización nuclear y sub-compartimentalización en *speckles* de SRSF1 y las variantes evaluadas, en algunas imágenes (como la seleccionada para la **figura R.4**) se puede apreciar una aparente menor intensidad de fluorescencia en *speckles* para la mutante W134A y, aún más evidente, para la FFDD. Para establecer si existe una diferencia de intensidad significativa en estos gránulos formados por las mutantes de SRSF1 decidimos cuantificar fluorescencia en *speckles* de 30 células por variante. Utilizando el software CellProfiler, se desarrolló un comando para reconocer y discriminar automáticamente el nucleoplasma y los *speckles*, y poder calcular las intensidades media de cada uno de estos compartimentos sub-nucleares. No se detectaron diferencias significativas en estas mediciones, aunque la tendencia apreciable en las imágenes se ve reflejada en los valores obtenidos luego de la cuantificación (**figura R.5**).

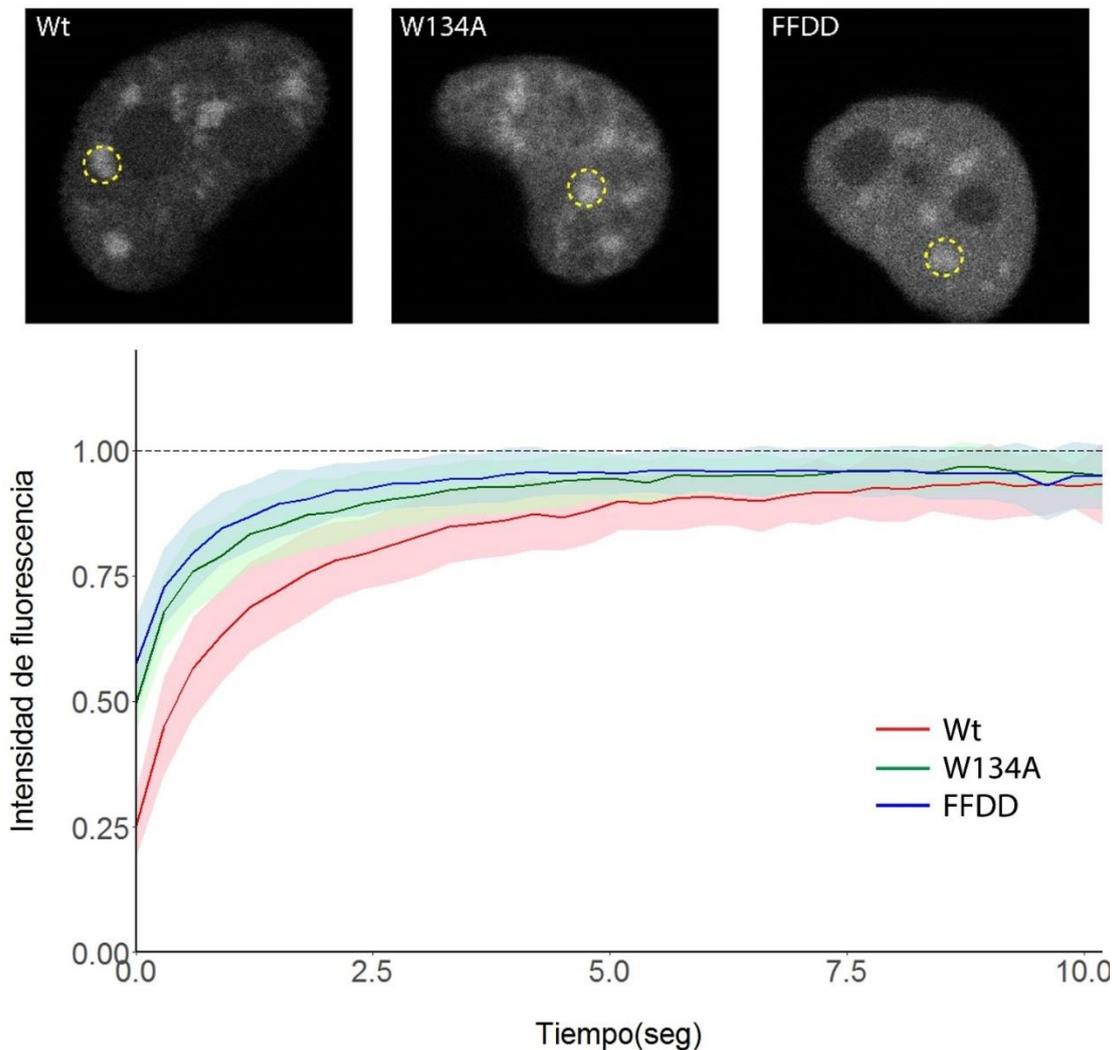


**Figura R.5| Cuantificación de la localización de SRSF1 y mutantes de unión al RNA en speckles:** Las imágenes tomadas por microscopía confocal fueron analizadas con el software CellProfiler. Se desarrolló una línea de comando para identificar de manera automática los núcleos y los speckles de todas las células. Una foto representativa de cada mutante se observa en el panel **A**). Las líneas amarillas delimitan los núcleos mientras que las líneas verdes los speckles. Se cuantificaron las intensidades media de los speckles y nucleoplasma en 30 células, y se graficó el cociente promedio de las mismas **B**).

## R.5 Dinámica nuclear de mutantes de SRSF1

Habiendo determinado la localización en *speckles* de las mutantes, y conociendo la importancia de la unión al RNA en la sub-localización celular de SRSF1, decidimos caracterizar la dinámica subnuclear de las mutantes que tienen afectada dicha capacidad de unión. Para esto estudiamos la difusión y asociación en *speckles* mediante la técnica de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Células HeLa fueron transfectadas con versiones fusionadas a GFP de las variantes de SRSF1 Wt, W134A y FFDD. Estas células transfectadas fueron utilizadas para cuantificar la recuperación de

fluorescencia post-*bleaching* en los *speckles* según lo indicado en materiales y métodos. Las curvas de recuperación de fluorescencia se pueden ver en la **figura R.6**.



**Figura R.6| Dinámica de recuperación de fluorescencia en *speckles*:** *El análisis de FRAP muestra diferencias en la recuperación post-fotoblanqueado de ambas mutantes de SRSF1 con respecto a la versión Wt. Para este experimento fueron utilizadas células HeLa transfectadas transitoriamente con variantes GFP-SRSF1. Una célula representativa de cada grupo es mostrada en el panel superior. El círculo amarillo indica el área del speckle donde el pulso del láser fue aplicado y donde la fluorescencia fue medida antes y después de este evento. La intensidad de fluorescencia está expresada relativa a la fluorescencia pre-fotoblanqueado. Cada curva es el promedio entre la intensidad medida para 25 a 30 células. Las zonas sombreadas en color que acompañan cada curva, representan el desvío estándar para los valores de cada grupo.*

Las diferencias entre ambas mutantes y SRSF1 *wild type* sugieren una aparente diferencia en la afinidad de las interacciones responsables de esta localización. Para realizar un análisis más exhaustivo, decidimos calcular los parámetros que describen el

comportamiento de estas curvas. Para ello se ajustaron los datos de recuperación a una ecuación exponencial de un término que se detalla a continuación:

$$\text{Intensidad de fluorescencia} = a \left( 1 - e^{(-t)/b} \right) + c$$

Donde,

**t:** tiempo a partir del fotoblanqueado.

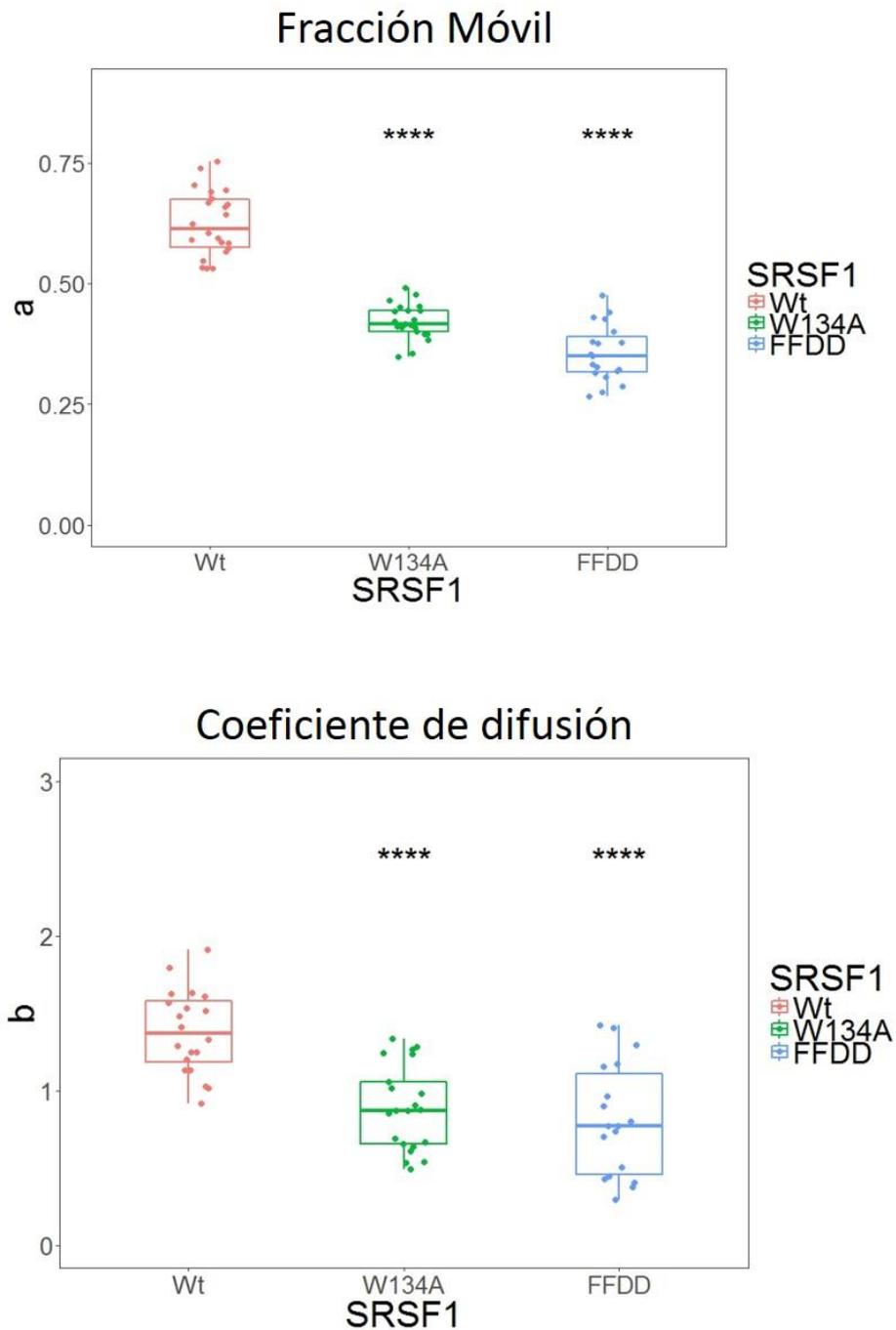
**c:** intensidad inicial de recuperación o intensidad final luego de fotoblanqueado.

**Coefficiente a:** determinado por el *pool* de proteína capaz de intercambiar su posición con nuevas proteínas, lo que se visualiza como recuperación de fluorescencia. A este grupo se lo conoce como fracción móvil.

**Coefficiente b:** término que describe la difusión en la dinámica de recuperación. Este parámetro, conocido como “ $\tau$ ”, se utiliza para calcular los tiempos de recuperación media, es decir cuánto tiempo se tarda en recuperar la mitad de la fluorescencia de la fracción móvil.

Se calcularon los coeficientes a y b para cada *speckle* analizado de las tres variantes de SRSF1, y así poder obtener una relación cuantitativa de las diferencias observadas en la **figura R.6**. Los resultados se esquematizaron mediante un gráfico de caja, donde cada punto representa el coeficiente medido en una célula. Los asteriscos marcan diferencias significativas con respecto a SRSF1 Wt (**figura R.7**). Para ambos parámetros se observa un comportamiento similar en las dos mutantes: poseen significativamente un menor coeficiente de difusión y menor fracción móvil. El menor coeficiente de difusión para SRSF1 FFDD y W134A, nos habla de una dinámica más rápida de entrada y salida de *speckles* con respecto a SRSF1 Wt. Sabiendo que la unión al RNA es uno de los aspectos fundamentales para la biogénesis de estos gránulos, junto al hecho de que no se encontraran diferencias significativas entre las mutantes, podríamos suponer que el mayor intercambio de proteínas SRSF1 W134A y SRSF1 FFDD entre *speckles* y nucleoplasma, se explica por la pérdida de interacción con este ácido nucleico. Los menores valores observados para las fracciones móviles sumado a que las fracciones inmóviles parecen iguales, y casi inexistentes, para las tres versiones, podría estar reflejando dos situaciones: que el mínimo de fotoblanqueado alcanzado para las mutantes sea menor al del Wt, o bien que el mínimo es el mismo pero la recuperación

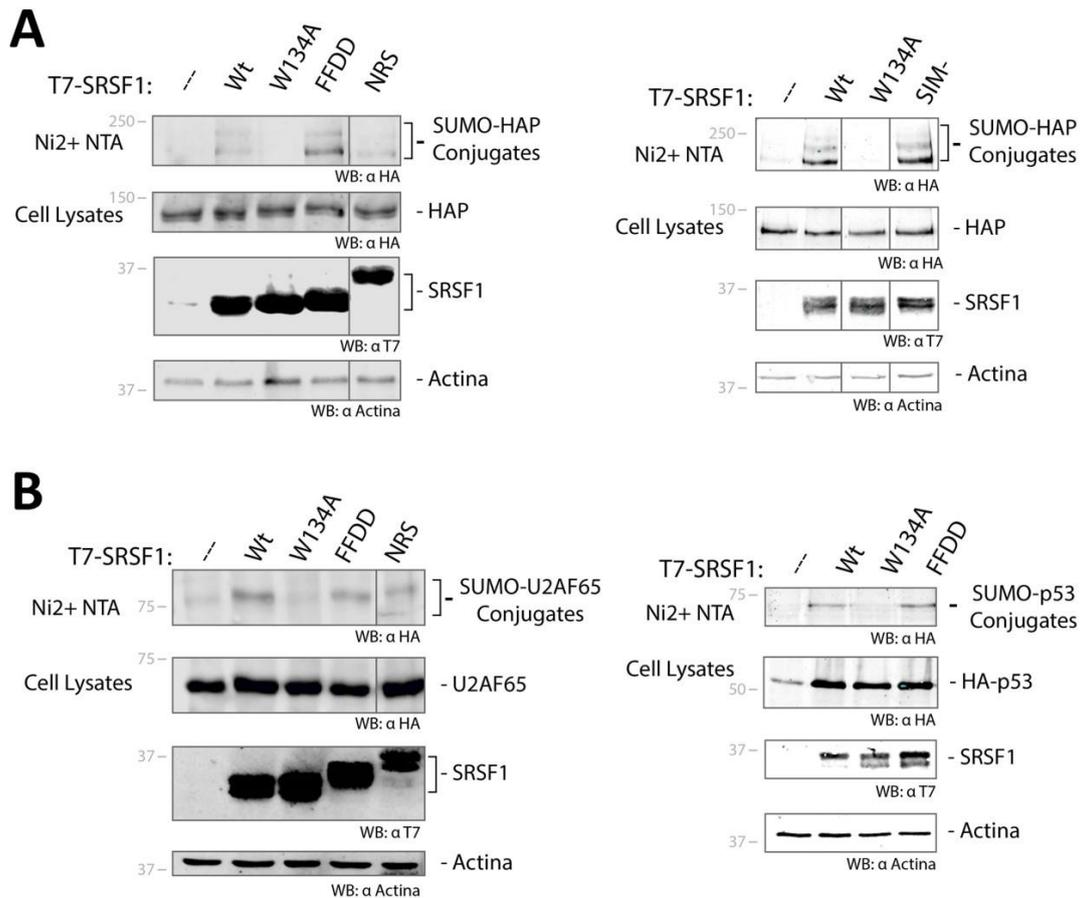
inicial es muy alta. Ambas situaciones se explicarían por una mayor recuperación, que coincide con el análisis de los coeficientes de difusión.



**Figura R.7| Parámetros de recuperación de SRSF1 en speckles:** Gráfico de caja con los parámetros de fracción móvil y coeficiente de difusión para todos los speckles analizados con cada versión de SRSF1. La línea transversal dentro de la caja, representa la mediana de cada muestra. Los asteriscos encima de cada caja muestran diferencias significativas con respecto al Wt para una prueba t. \*\*\*\*  $p$ -valor menor a 0.0001.

## R.6 Regulación de la SUMOilación de sustratos por mutantes de SRSF1

Desarrollada y, en algunos casos, caracterizada esta batería de mutantes, decidimos evaluar su participación en la regulación de la SUMOilación de los sustratos antes descritos (**figura R.8**). Para obtener estos resultados se co-transfectaron células HEK 293T con plásmidos de expresión para: el sustrato de interés (etiquetado con algún epítipo), el péptido His-SUMO1 y Ubc9 (enzima E2 conjugadora de SUMO, para aumentar la eficiencia de la MPT estudiada), más el agregado de un plásmido que exprese cada una de las variantes de SRSF1 por separado. Luego de 48hs, los lisados celulares fueron sometidos a purificación por resina de Niquel, para enriquecer la fracción en proteínas con 6xHis-tag, en este caso, proteínas conjugadas a SUMO, o bien el péptido SUMO libre.



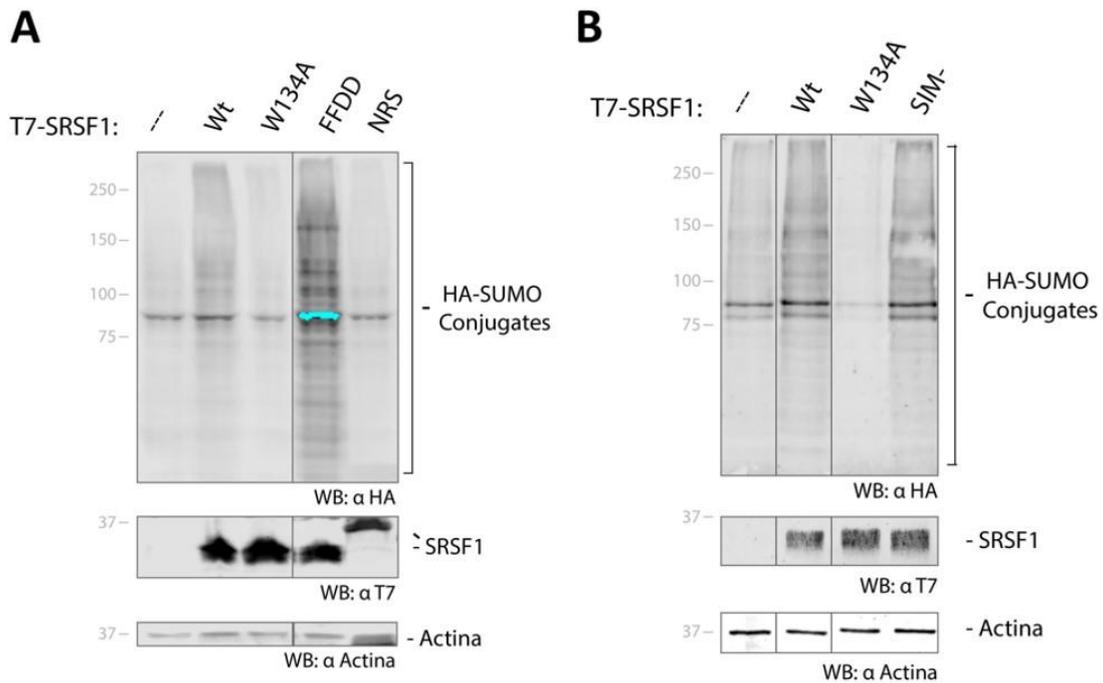
**Figura R.8| Análisis de la actividad regulatoria de variantes de SRSF1 sobre la SUMOilación de diversas proteínas:** Células HEK 293T fueron co-transfectadas con plásmidos de expresión para His-SUMO1, Ubc9, un sustrato de SUMOilación conocido (HA-HAP, HA-U2AF65 o HA-p53) y diferentes variantes de T7-SRSF1 según se indica en la parte superior de cada gel. Luego de 48hs, los lisados celulares fueron sometidos a purificación por resina de Niquel para enriquecer en proteínas SUMOiladas y posteriormente analizados por WB con anticuerpos específicos contra HA. **A)** SUMOilación de HAP con mutantes W134A, FFDD y NRS (panel izquierdo) o con variantes W134A y SIM- (panel derecho). **B)** SUMOilación de HAP (panel izquierdo) y p53 (panel derecho)

Lo primero que podemos observar es que las mutantes de unión al RNA se comportan de forma opuesta en la regulación de la SUMOilación de los tres sustratos evaluados. Mientras que la variante W134A parece no estimular la SUMOilación (bandas de intensidades comparables a los controles negativos), la versión FFDD de SRSF1 parece aumentarla de la misma manera que lo hace la Wt, o incluso más para el caso de la proteína HAP. En cuanto a la variante SRSF1 SIM-, no se observa una diferencia sobre la SUMOilación de HAP en comparación a los efectos ejercidos por SRSF1 Wt (figura R.8 A panel derecho).

La variante de retención nuclear en cambio, no se comporta de igual manera para las dos proteínas estudiadas (HAP y U2AF65). SRSF1-NRS no parece aumentar la SUMOilación de HAP a niveles comparables al Wt, pero si lo hace para U2AF65. La implicancia de estos resultados se analizará en conjunto a los de la sección siguiente.

## R.7 SUMOilación global regulada por mutantes de SRSF1

Habiendo evaluado el comportamiento diferencial de las variantes frente a la SUMOilación de ciertos sustratos específicos, nos preguntamos si estos mismos efectos podrían observarse a nivel global, es decir si la regulación ejercida por SRSF1 y sus variantes (observada en la sección anterior) es un proceso específico de algunos sustratos de conjugación a SUMO, o bien es un proceso generalizado. Para ello se co-transfectaron células HEK293T con plásmidos de expresión para: Ubc9 (para aumentar la eficiencia de la conjugación), el péptido SUMO etiquetado con el epítipo de la Influenza Hemaglutinina Humana (HA-tag), y un plásmido de expresión para cada una de las variantes de SRSF1 por separado. Realizando *western blots* de los lisados celulares y revelando con anticuerpos específicos anti-HA obtenemos un “bandeado” de múltiples pesos moleculares correspondientes a un gran número de proteínas celulares conjugadas a HA-SUMO. Los resultados se observan en la **figura R.9**.



**Figura R.9| SUMOilación global con variantes de SRSF1:** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 y HA-SUMO1. Los lisados celulares fueron analizados por WB con anticuerpos αHA para ver los patrones de SUMOilación. **A)** SUMOilación con las variantes Wt, W134A, FFDD y NRS. **B)** SUMOilación con las variantes Wt, W134A y SIM-.

Las mutantes W134A y FFDD se comportan a nivel global de la misma manera que lo hacían en el análisis sustrato-específico (**figura R.9 A**). Esto evidencia que el aumento de SUMOilación provocado por la versión FFDD, o la falta de SUMOilación por la mutante W134A, son efectos generalizados y no se tratan de algo específico de los sustratos analizados anteriormente. Cabe destacar que el aumento de SUMOilación por la mutante FFDD es incluso mayor al observado con la sobre-expresión de la proteína SRSF1 Wt, al igual que lo observado para la proteína HAP. Los datos previos de nuestro laboratorio demostraron que el dominio RRM2 de manera aislada es suficiente para provocar el aumento de SUMOilación observado, mientras que una versión de SRSF1 carente de este, pierde dicha actividad. La incapacidad de regular la SUMOilación por parte de la mutante W134A en este mismo dominio de unión al RNA, parece ser congruente con este dato. En particular, resulta relevante resaltar el aumento de SUMOilación producido por la versión FFDD, mutante que, tal como se mostró anteriormente, no regula el *splicing* alternativo evaluado con el minigen reportero de fibronectina. Este resultado, en conjunto a lo observado en la sección anterior, refleja

que al igual que ocurre con las actividades de SRSF1 descritas en la introducción, el mecanismo por el cual SRSF1 aumenta la SUMOilación parece ser independiente de su rol en el *splicing* alternativo.

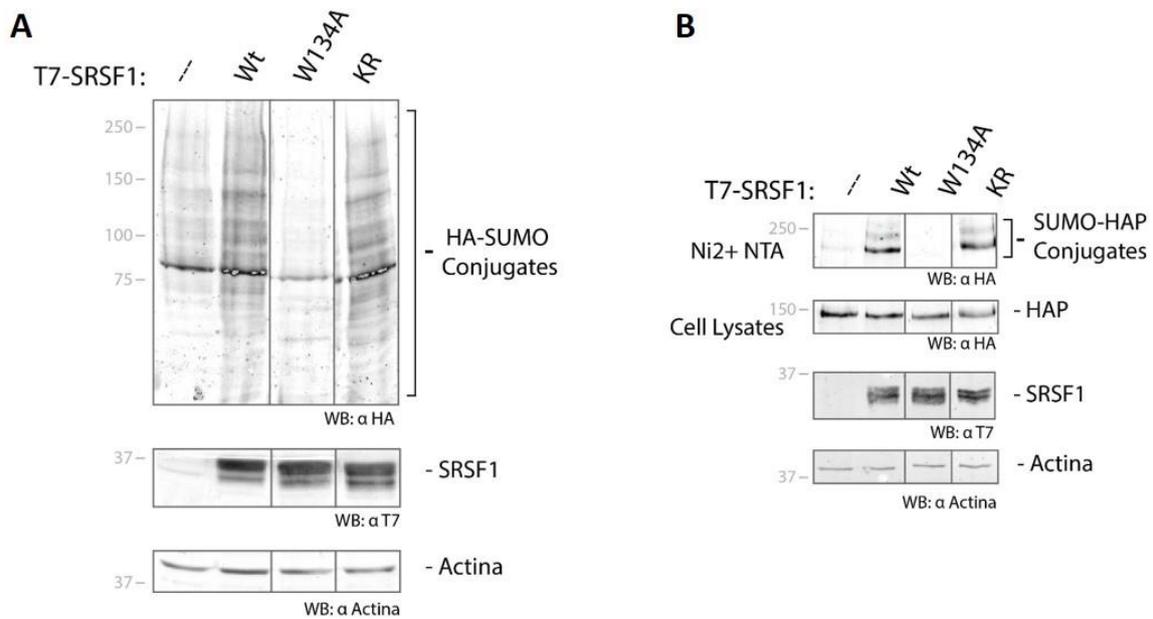
Para el caso de la variante SRSF1 SIM- se observa una SUMOilación global comparable al patrón obtenido con la sobre-expresión de SRSF1 Wt (**figura R.9 B**). Este resultado parece coincidir con detectado a nivel de la conjugación de SUMO a la proteína HAP.

En el caso de la sobre-expresión de la variante SRSF1-NRS, el patrón de SUMOilación global es comparable al control negativo, al igual que la mutante W134A, es decir que no produce un aumento de esta modificación post-traducciona a nivel generalizado (**figura R.9 A**). Este resultado puede evidenciar la dependencia de la localización sub-celular para que SRSF1 estimule la SUMOilación. Como se observó para U2AF65, es posible que a nivel sustrato específico la mutante NRS sea capaz de aumentar la SUMOilación, aún cuando a nivel global pareciera no hacerlo. Esto podría explicarse, por ejemplo, si la gran mayoría de los sustratos cuya SUMOilación es regulada por SRSF1 fuesen citoplasmáticos, y de esta manera la variante de SRSF1 de retención nuclear, no podría favorecer la SUMOilación de los mismos, aunque sí podría hacerlo de manera particular para sustratos nucleares. Aun así, esta hipótesis no se aplicaría al factor HAP, ya que también se trata de una proteína nuclear. Una posible explicación sería que aún estando en el núcleo, esta mutante no se localiza en los compartimentos sub-nucleares adecuados o no logra establecer las interacciones necesarias para favorecer la SUMOilación de este sustrato en particular. Incluso, podría suceder que, al estar retenida en el núcleo, esta mutante careciera de cualquier tipo de modificación y/o activación que SRSF1 pudiese sufrir en el citoplasma y que podría ser necesaria para su actividad estimuladora de la SUMOilación de ciertos sustratos, aún cuando ésta ocurriese en el núcleo.

## R.8 SUMOilación de las variantes de SRSF1

Conociendo el antecedente de enzimas de la vía de conjugación a SUMO, como la E3 ligasa PIAS, que requieren de su propia SUMOilación para ejercer la regulación de esta MPT, nos preguntamos si la capacidad estimuladora de la SUMOilación, o la pérdida de la misma, estaría relacionada a la propia SUMOilación del factor SRSF1. Lo primero

que decidimos, fue hacer uso de la variante KR de SRSF1, mutante que como se describió en la introducción no puede ser modificada por conjugación del péptido SUMO. Si esta MPT fuera necesaria para los efectos regulatorios de la SUMOilación, esperaríamos no ver aumento de SUMOilación en ensayos de sobre-expresión de esta mutante. Sin embargo, la **figura R.10** demuestra que SRSF1-KR es capaz de estimular la SUMOilación tanto a nivel global como sustrato-específico, de manera comparable a lo observado con la proteína Wt.

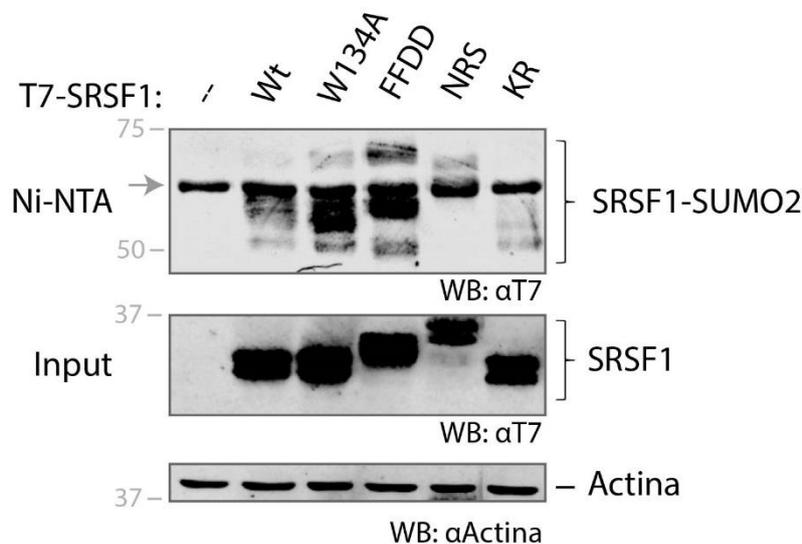


**Figura R.10 | SUMOilación global y sustrato específica con mutante KR: A)** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1, según se indica en la parte superior de cada panel, conjuntamente con plásmidos para la expresión de Ubc9 y HA-SUMO1. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-page, seguidos de western-blots con los anticuerpos indicados. **B)** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1, conjuntamente a plásmidos para la expresión de Ubc9, HA-HAP y His-SUMO1. Los lisados celulares fueron utilizados para la purificación por resina Ni-NTA y posterior análisis por western-blots.

Habiendo observado que SRSF1-KR puede estimular la SUMOilación aún sin estar SUMOilada, quisimos evaluar esta modificación post-traducciona en todas las variantes del factor de *splicing* utilizadas en este trabajo. Se co-transfectaron células HEK 293T en cultivo con plásmidos de expresión para: el péptido His-SUMO2 y Ubc9 (enzima E2 conjugadora de SUMO, para aumentar la eficiencia de la MPT estudiada), más el agregado de un plásmido que exprese cada una de las variantes de SRSF1 por separado.

Luego de 48hs, los lisados celulares fueron sometidos a purificación por resina de Niquel, para enriquecer la fracción en proteínas conjugadas a His-SUMO2 y posteriormente analizados por *western blot* (**figura R.11**). Los resultados muestran, en primera instancia, que la variante KR es incapaz de conjugarse al péptido SUMO, coincidiendo con datos previos de nuestro laboratorio. En cuanto a las variantes W134A y la FFDD, parecieran incluso estar levemente más SUMOiladas que la versión salvaje. Curiosamente, SRSF1-NRS tiene niveles de SUMOilación considerablemente menores a los observados por SRSF1-Wt, aunque estos patrones de bandas de menor corrida electroforética (correspondientes a SRSF1 conjugado a SUMO2) son más difíciles de interpretar ya que SRSF1-NRS es una variante ya de por sí con un mayor peso molecular.

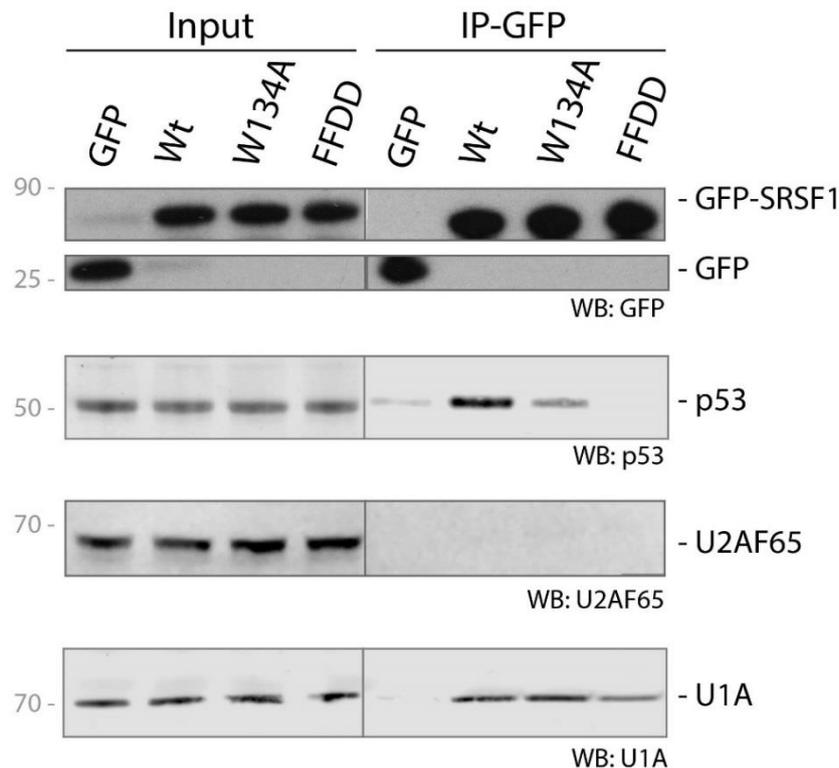
El hecho de que SRSF1-KR regule la conjugación de SUMO de igual manera que la versión Wt, y que el patrón de SUMOilación de las variantes de SRSF1 no correlacione con los efectos regulatorios de las mismas, nos permite suponer que la propia SUMOilación de SRSF1 no estaría condicionando su rol en la regulación de esta misma modificación post-traduccional en otros sustratos.



**Figura R.11 | SUMOilación de las variantes de SRSF1:** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para Ubc9, His-SUMO1 y las distintas variantes de SRSF1, según se indica en la parte superior de cada panel. Con los lisados celulares se procedió a la purificación por Ni-MTA y posteriores ensayos de *western-blot*. La flecha en el panel superior indica una banda inespecífica, evidenciada por la primera calle donde no hay ningún polipéptido transfectado con T7-tag.

## R.9 Interacción de mutantes de SRSF1 con proteínas cuya SUMOilación es regulada por este factor

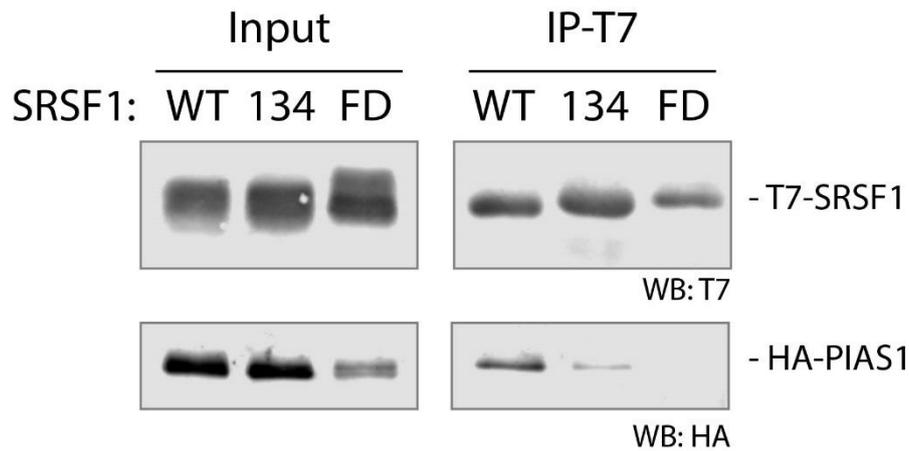
La pérdida de función de algunas de las variantes de SRSF1, como la W134A tanto en *splicing* como en SUMOilación, nos hace pensar en la posibilidad de que el dominio mutado esté afectando ciertas características de este factor que repercuten en su rol sobre la conjugación de SUMO, pero que no estén relacionadas directamente con otras funciones de SRSF1. Un posible panorama, sería que este factor necesite interactuar con los sustratos de SUMOilación para ejercer su efecto estimulador sobre esta MPT. Nos preguntamos entonces si la falta de aumento en la SUMOilación observada con la sobre-expresión de la mutante W134A estaría relacionada a una falta de interacción con los sustratos específicos. Para ello transfectamos células HEK 293T en cultivo con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 Wt, W134A o FFDD fusionadas a GFP, o bien GFP solo. Luego realizamos una inmunoprecipitación con microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-GFP (GFP-trap Chromotek) y mediante *western blot* con anticuerpos específicos revelamos la co-inmunoprecipitación de ciertas proteínas endógenas. Al estar ampliamente descrita en bibliografía la interacción de SRSF1 con U1A-70k, se utilizó a esta proteína como control positivo de esta técnica, que es capaz de interactuar con las tres versiones de SRSF1 por igual (**figura R.12**). Se decidió indagar en la interacción con p53, sustrato de SUMOilación regulado por SRSF1. Como se observa en la **figura R.12**, la mutante W134A pierde levemente la interacción con p53, sin embargo, no lo hace de forma absoluta. Este resultado sugiere que la pérdida de interacción observada en este ensayo no es la responsable de la falta de efectos en la conjugación de SUMO. Un dato que apoya esta hipótesis es que la mutante FFDD que, como se observa en la **figura R.8** de la sección R.6 es capaz de SUMOilar a p53, pierde interacción por completo con este sustrato. En el caso de U2AF65, no se detectó interacción aún con SRSF1 Wt. Estos resultados indican que la interacción de SRSF1 con los sustratos de SUMOilación no son condición necesaria para un aumento en la conjugación, y que una pérdida de interacción no lleva consecuentemente a una disminución de esta MPT.



**Figura R.12 | Interacción de variantes de SRSF1 con proteínas endógenas sustrato de conjugación a SUMO.** Células HEK293t fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de GFP-SRSF1 o GFP solo. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con GFP-trap y analizados por WB con los anticuerpos indicados debajo de cada panel.

## R.10 Interacción de variantes de SRSF1 con proteínas de la vía de SUMO

El trabajo realizado previamente por nuestro laboratorio permitió demostrar que SRSF1 no solo promueve la SUMOilación, sino que interacciona con miembros de esta vía como la E2 conjugadora Ubc9 y la E3 ligasa PIAS1 [46]. Nos preguntamos si la capacidad estimuladora de la SUMOilación de SRSF1 podría estar ligada a la interacción con estas proteínas. Para tratar de responder este interrogante, nos propusimos analizar las variantes de unión al RNA de SRSF1 en un ensayo de co-inmunoprecipitación con las proteínas de la vía de conjugación de SUMO arriba mencionadas. Para ello células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 y para Ubc9 o PIAS1, cada una de ellas con una etiqueta diferente. Los lisados celulares fueron incubados con anticuerpos específicos contra las etiquetas correspondientes y los inmunoprecipitados analizados por *western blot*. Los resultados se observan en la **figura R.13**.



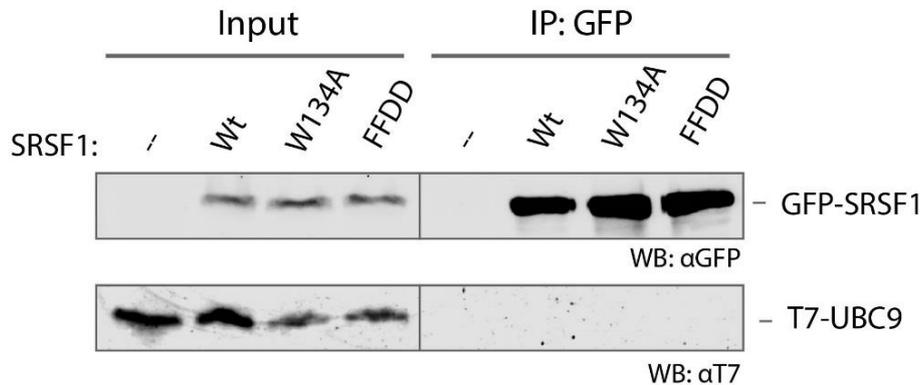
**Figura R.13 | Ensayo de coimmunoprecipitación con PIAS1.** Células HEK293t fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de T7-SRSF1, junto a plásmidos de expresión para HA-PIAS1. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo  $\alpha$ T7 y analizados por WB con los anticuerpos indicados debajo de cada panel.

Como se puede observar en el ensayo de co-inmunoprecipitación mostrado en la **figura R.13**, la E3 ligasa PIAS1 parece interactuar con la versión Wt de T7-SRSF1 pero en mucha menor medida, o en niveles casi despreciables, con la mutante W134A. Para el análisis de la variante FFDD es necesario mencionar que en el lisado total (input) se observa que los niveles proteicos de PIAS1 son considerablemente menores a los observados en los lisados que expresan las otras dos versiones de SRSF1. Por lo tanto, aunque con esta mutante no se aprecia co-inmunoprecipitación de PIAS1, no podemos asegurar que esta interacción no exista, y que no la estemos detectando por cuestiones inherentes a la sensibilidad de la técnica utilizada.

Las diferencias en los niveles proteicos de PIAS1 en el input nos resultó sumamente llamativa y al repetirse en reiteradas ocasiones el mismo resultado, decidimos investigar más al respecto. En la sección 22 se retoman estos experimentos.

Previamente, nuestro grupo detectó mediante ensayos de *pull-down* la interacción entre los factores T7-SRSF1 y GST-Ubc9, siendo el primero inmunopurificado a partir de extractos celulares de mamíferos que lo expresaban, y la enzima E2 purificada a partir de bacterias transformadas con un plásmido de expresión procariota [46]. Nos preguntamos si esta interacción sería detectable en células en cultivo co-transfectadas con plásmidos para la expresión de ambas proteínas y, consecuentemente, si esta interacción existe también con las mutantes de unión al RNA de SRSF1. Se usaron variantes de SRSF1 fusionadas a GFP para realizar la coimmunoprecipitación con microesferas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-GFP

(GFP-Trap® - Chromotek). Como se puede observar en la **figura R.14**, no pudimos detectar esta interacción en células en cultivo, con ninguna de las variantes de SRSF1 utilizadas.



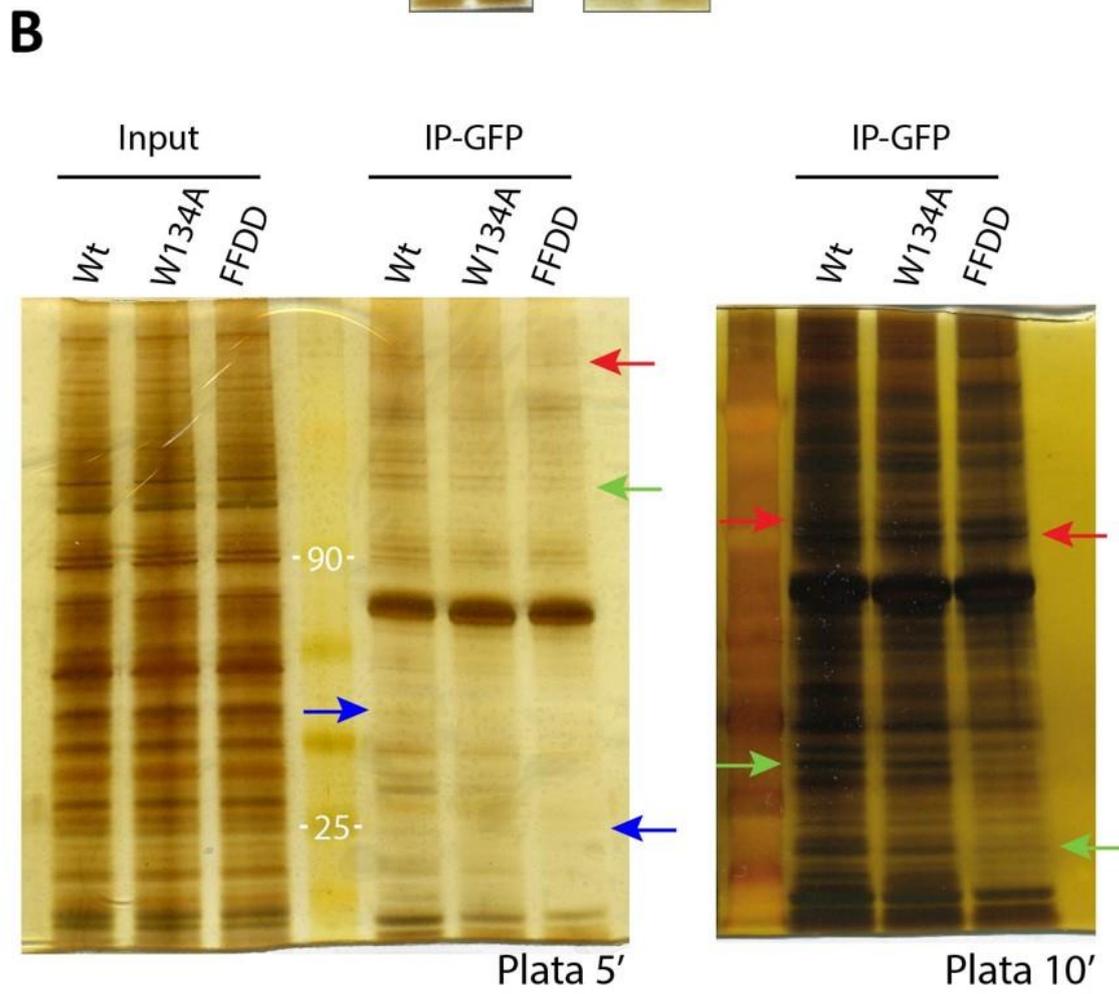
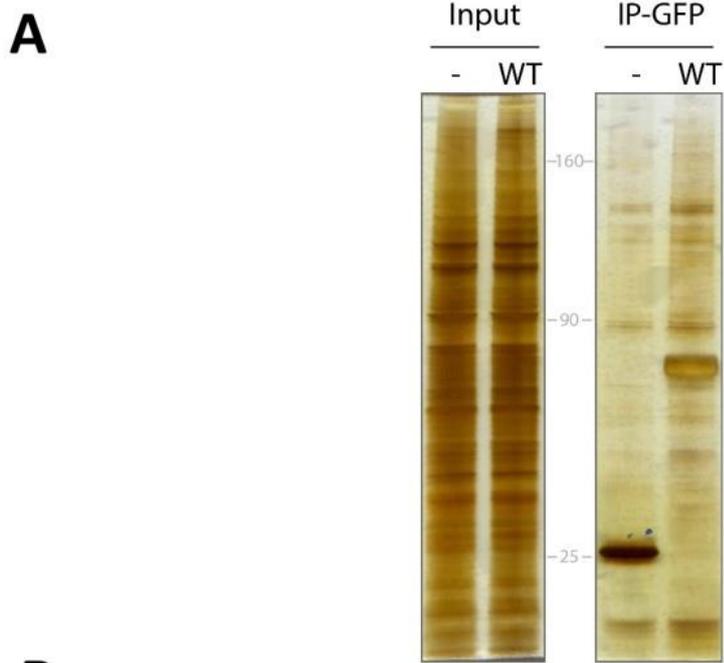
**Figura R.14 | Ensayo de coimmunoprecipitación con Ubc9.** Células HEK293t fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de GFP-SRSF1 o GFP solo, conjunto a plásmidos de expresión para T7-Ubc9. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados utilizando GFP-trap y analizados por WB con los anticuerpos indicados debajo de cada panel.

## R.11 Interactoma de SRSF1

En las secciones anteriores mostramos diversos experimentos en los cuales tuvimos como objetivo analizar el comportamiento de las mutantes en múltiples aspectos de los mecanismos en los que se ve involucrado el factor SRSF1, esperando encontrar alguna relación entre estas actividades y su capacidad de regular la SUMOilación. Pero como fue descrito, los resultados con las variantes de SRSF1 no mostraron correlaciones claras entre estas capacidades. Sin embargo, la elección de las actividades puestas a prueba es limitada, y podríamos estar omitiendo rasgos fundamentales a la hora de describir estas mutantes. Por este motivo, decidimos realizar un estudio a gran escala, preguntándonos si estas variantes presentan diferencias en cuanto al repertorio de proteínas celulares con las cuales se asocian o interaccionan. Obtener estos resultados podría aportar información que nos permita elaborar nuevas hipótesis acerca del mecanismo de acción por el cual el factor SRSF1 regula la SUMOilación. Para tener una primera aproximación del comportamiento de las mutantes de unión al RNA, con efectos opuestos en la regulación de la conjugación de SUMO, decidimos realizar una inmunoprecipitación de lisados celulares que expresaban las variantes de SRSF1 fusionadas a GFP. Utilizando microesferas magnéticas GFP-TRAP

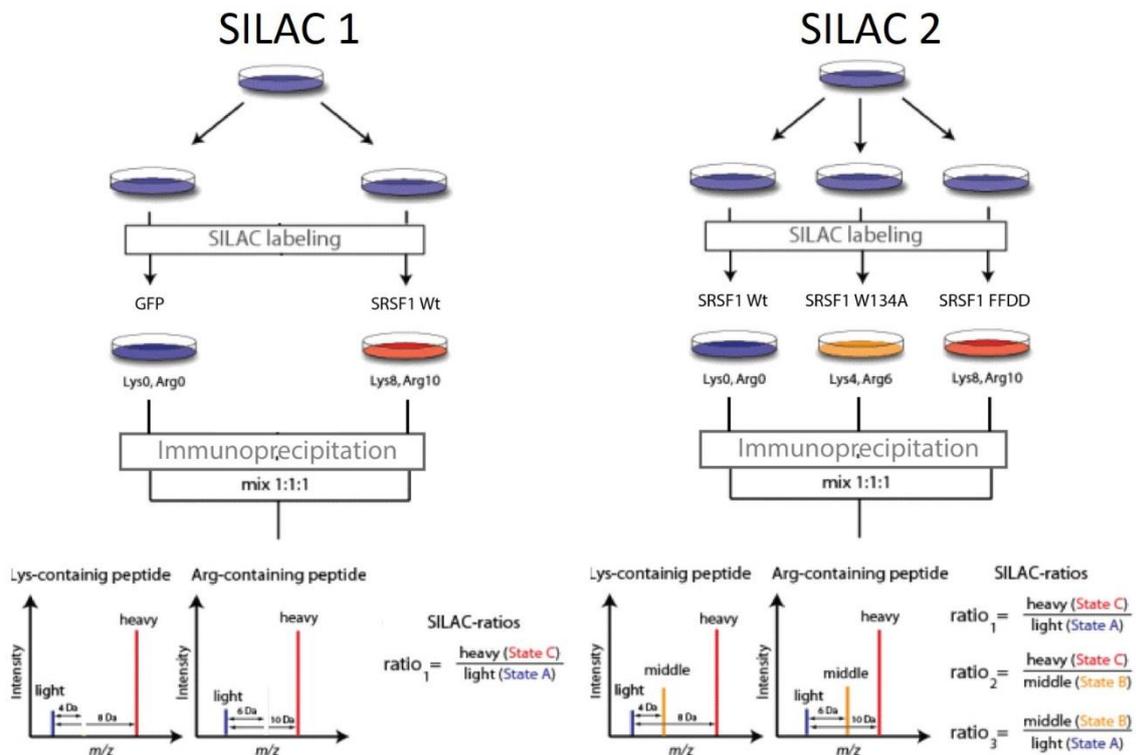
(ChromoTek), se realizó una inmunoprecipitación según se indica en materiales y métodos. Las fracciones resultantes fueron corridas en geles de poliacrilamida y sometidas a tinción por nitrato de plata. Para poner a prueba la sensibilidad de la técnica, en una primera instancia decidimos realizar este ensayo comparando lisados celulares que mediante transfección transitoria expresen SRSF1-GFP o la proteína GFP sola. Esta comparación mediante tinción por plata, nos permitió determinar que, si bien el inmunoprecipitado de GFP solo evidencia la presencia de varias proteínas, el patrón de bandas que co-inmunoprecipitan con SRSF1-GFP es apreciablemente mucho mayor (**figura R.15 A**).

Proseguimos entonces, a evaluar los patrones de proteínas que co-inmunoprecipitan con SRSF1 *wild type* y sus variantes. Los resultados que se pueden observar en la **figura R.15 B** muestran patrones de inmunoprecipitados notablemente distintos entre estas tres proteínas. Comparando las dos mutantes con el Wt lo primero que observamos es que en forma global, tanto la variante W134A como la variante FFDD interaccionan con una menor cantidad de proteínas, evidenciado por un menor bandeo en las calles rotuladas con el nombre de estas mutantes, siendo este efecto aún mucho más visible en el caso de la FFDD. Haciendo un análisis más profundo, podemos apreciar bandas que están presentes, en intensidades similares, tanto en el inmunoprecipitado de SRSF1 Wt como en el de SRSF1 W134 y SRSF1 FFDD (flechas rojas). Pero también, se aprecian bandas de proteínas que parecieran estar únicamente, o en mucha mayor medida, en los inmunoprecipitados de SRSF1 Wt (flechas azules). Comparando las dos mutantes de SRSF1, observamos un patrón muy repetido: bandas presentes tanto con SRSF1 Wt y SRSF1 W134A, pero ausentes, o en cantidades muy reducidas, en el inmunoprecipitado de SRSF1 FFDD (flechas verdes). Estos resultados sugieren que ambas mutantes pierden interacción a gran escala con muchas de las proteínas con las cuales pareciera interaccionar SRSF1 Wt, y comparando entre estas dos variantes, SRSF1 FFDD interacciona aún con menos proteínas que SRSF1 W134A. Esto demuestra que, observando las proteínas con las cuales es capaz de interaccionar SRSF1 *wild type*, no sólo SRSF1 W134A y SRSF1FFDD se comportan de manera distinta a ésta, sino que también hay diferencias entre ambas mutantes.



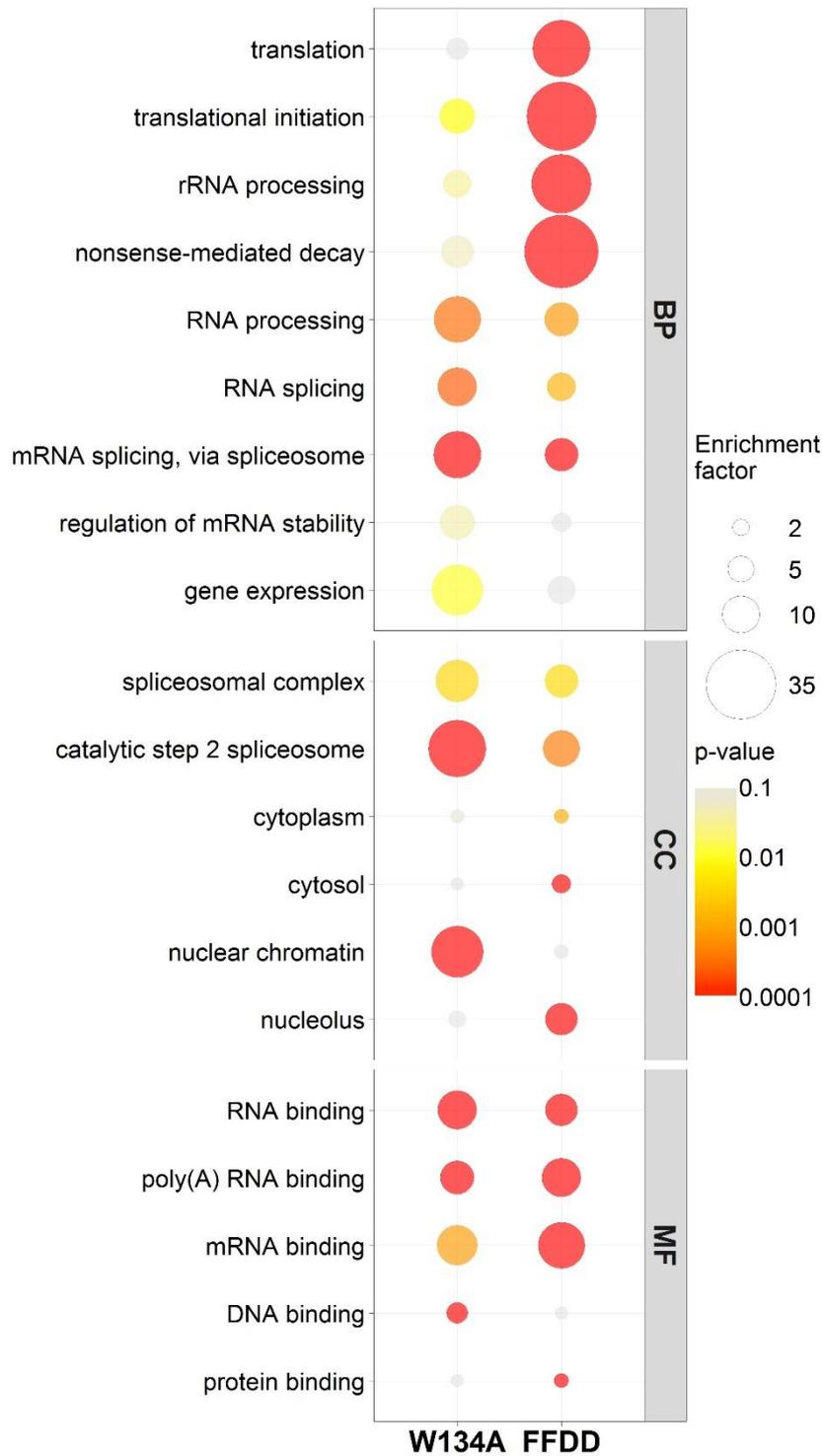
**Figura R.15 (página anterior) | Análisis de co-inmunoprecipitados de variantes de SRSF1:** células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para GFP, GFP-SRSF1 Wt, GFP-SRSF1 W134A o GFP-SRSF1 FFDD. Los lisados celulares fueron sometidos a inmunoprecipitación con GFP-trap y posteriormente corridos en geles de poliacrilamida SDS-page. En las figuras se observa en resultado de la tinción de dichos geles con nitrato de plata. **A)** comparación entre inmunoprecipitación de GFP solo y GFP-SRSF1. **B)** comparación entre inmunoprecipitados de SRSF1 Wt, W134A y FFDD, fusionadas a GFP. Se pueden observar: bandas presentes en los tres inmunoprecipitados (flechas rojas); bandas presentes en mayor intensidad en el inmunoprecipitado de SRSF1 Wt, pero muy reducidas en el de las mutantes (bandas azules); bandas presentes en el inmunoprecipitado de SRSF1 Wt y SRSF1 W134A, pero de intensidad muy leve en el de SRSF1 FFDD (flechas verdes).

Inspirados en estos resultados, y tratando de ahondar en el mecanismo molecular que subyace a la regulación de la SUMOilación por parte de SRSF1, decidimos realizar un análisis de interactoma de estas dos mutantes de unión al RNA que se comportan de manera opuesta en cuanto a la modulación de esta MPT. Estos experimentos fueron realizados durante una pasantía en el laboratorio del Dr. Angus Lamond (*Centre for Gene Regulation & Expression, School of Life Science, Dundee, Reino Unido*). El experimento fue diseñado para inmunoprecipitar las versiones de SRSF1 fusionadas a GFP y detectar las proteínas que co-inmunoprecipitan con cada una de ellas por espectrometría de masa, utilizando la técnica de etiquetado de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular (SILAC). Entre las distintas alternativas proteómicas, decidimos optar por realizar SILAC para poder cuantificar en forma precisa los diferentes niveles de interacción de cada una de las variantes de SRSF1 con sus putativos interactores. Para ello, y por cuestiones operativas, procedimos a realizar dos experimentos SILAC por separado. Por un lado, uno para comparar las proteínas que co-inmunoprecipitan específicamente con GFP-SRSF1 Wt, contrastándolo con las que inmunoprecipitan con GFP sola (“ruido” a los fines de nuestra búsqueda). Por otro lado, en un experimento aparte, se compararon las proteínas co-inmunoprecipitadas entre GFP-SRSF1 Wt y las mutantes W134A y FF-DD. El esquema experimental se observa en la **figura R.16**.



**Figura R.16 | Esquema experimental de SILAC:** un mismo cultivo de células inicial fue replicado en placas separadas. Estas placas fueron incubadas con medios de cultivos complementados con aminoácidos marcados con diferentes isótopos radiactivos, según se muestra en el esquema. Luego de seis pasajes (para garantizar una incorporación total de los aminoácidos marcados), las células fueron transfectadas con las variantes de SRSF1 indicadas. A las 48hs, a partir de un número igual de células para cada condición, se procedió a realizar la co-immunoprecipitación de los lisados. Luego se prepararon las muestras para el análisis de espectrometría de masa utilizando el kit iST GFP-trap. Se calcularon los cocientes de péptidos entre cada una de las condiciones para cuantificar la abundancia relativa de éstos en cada inmunoprecipitado. El análisis de los cocientes entre los péptidos se explica en detalle en la sección M.6 de Materiales y Métodos.

Para llevar a cabo el interactoma por SILAC, se usaron tres réplicas biológicas por cada mutante de SRSF1. Una vez validados los resultados arrojados por el análisis de péptidos (ver sección M.6.5 en Materiales y Métodos), nos quedamos con las proteínas significativamente sub-representadas y significativamente enriquecidas, en el inmunoprecipitado de cada variante de SRSF1 con respecto a cada una de las restantes. Para hacer un análisis más profundo de estos grupos de proteínas, decidimos hacer un estudio ontológico con estos (**figura R.17**). Utilizando la plataforma DAVID, se cargaron los grupos de proteínas significativamente sub-representadas en los inmunoprecipitados de SRSF1 W134A o SRSF1 FFDD, con respecto a SRSF1 Wt, y se analizaron las tres categorías ontológicas: procesos biológicos (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF). Este estudio nos permite clasificar en grupos por actividad/localización a las proteínas con las que cada mutante “pierde” interacción. Vale la pena aclarar que no fue posible hacer este análisis con las proteínas con las cuales ambas mutantes “ganan” interacción en comparación a SRSF1 Wt, a causa de que el bajo número de polipéptidos de estos grupos no es suficiente para que el algoritmo del GO arroje resultados significativos. A pesar de no poder concretar este análisis, creemos que el hecho de que las mutantes “ganen” interacción con un número tan bajo de proteínas es un indicio de la pérdida generalizada de interacciones ocasionadas por estas mutaciones. Esto, además, coincide con nuestros resultados antes mostrados, de inmunoprecipitaciones seguidas de SDS-page y tinción con nitrato de Plata (**figura R.15**), donde se observa claramente que, a grandes rasgos, ambas mutantes pierden interacciones con un gran número de proteínas.



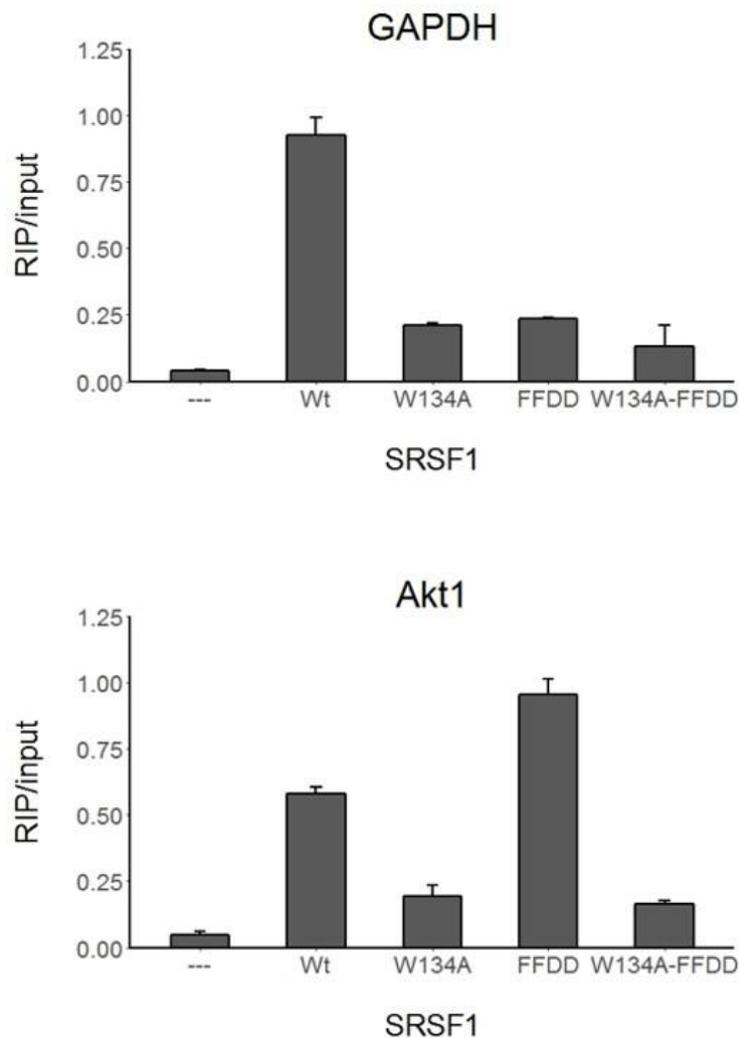
**Figura R.17 | Análisis GO de SILAC con mutantes de SRSF1:** El análisis ontológico se realizó con el grupo de proteínas con las cuales las mutantes pierden interacción en comparación a SRSF1 Wt. El diámetro de los círculos representa el factor de enriquecimiento y el color indica el p-valor del análisis estadístico según la leyenda del panel superior. (BP) Procesos biológicos, (CC) componente celular, (MF) función molecular.

El análisis ontológico comparativo entre estas variantes y SRSF1 Wt, evidencia claras diferencias entre las proteínas con las cuales cada mutante pierde interacción. En coincidencia con lo esperado por las descripciones previas en múltiples trabajos científicos, estas mutantes pierden interacción con proteínas involucradas en procesos relacionados con el metabolismo y unión del RNA, tales como: *RNA* y *mRNA splicing*, y *RNA processing*. SRSF1 W134A marca una mayor pérdida de interacción con proteínas relacionadas a expresión de genes y estabilidad de mRNA, efecto no evidenciado para la otra variante analizada. El resultado más sobresaliente es que la mutante FFDD evidencia una clara pérdida de interacción con proteínas pertenecientes a procesos relacionados con la traducción. Estos grupos, no se presentan de manera tan enriquecida o con un grado de significancia tan alto, para la mutante W134A. Algunos grupos ejemplo de esto son: *translation initiation*, *translation*, *rRNA processing*, *NMD*.

En cuanto al análisis de la categoría “componentes celulares”, los resultados están dentro de lo previsto. Se observa una clara disminución, por parte de ambas variantes de SRSF1, de proteínas relacionadas al spliceosoma (*spliceosome complex*; *catalytic step 2 spliceosome*). Si bien el factor de enriquecimiento no es muy alto, nos llamó la atención las diferencias en *cytosol* y *cytoplasm*, donde la mutante FFDD pareciera perder mayor interacción con proteínas de esta localización. Por último, observamos una diferencia marcada entre nucleolo, categoría de proteínas con las que pierde interacción SRSF1 FFDD, y cromatina nuclear, categoría de proteínas con las que pierde interacción SRSF1 W134A.

## R.12 SRSF1 y sus variantes interaccionan con diversos mRNAs

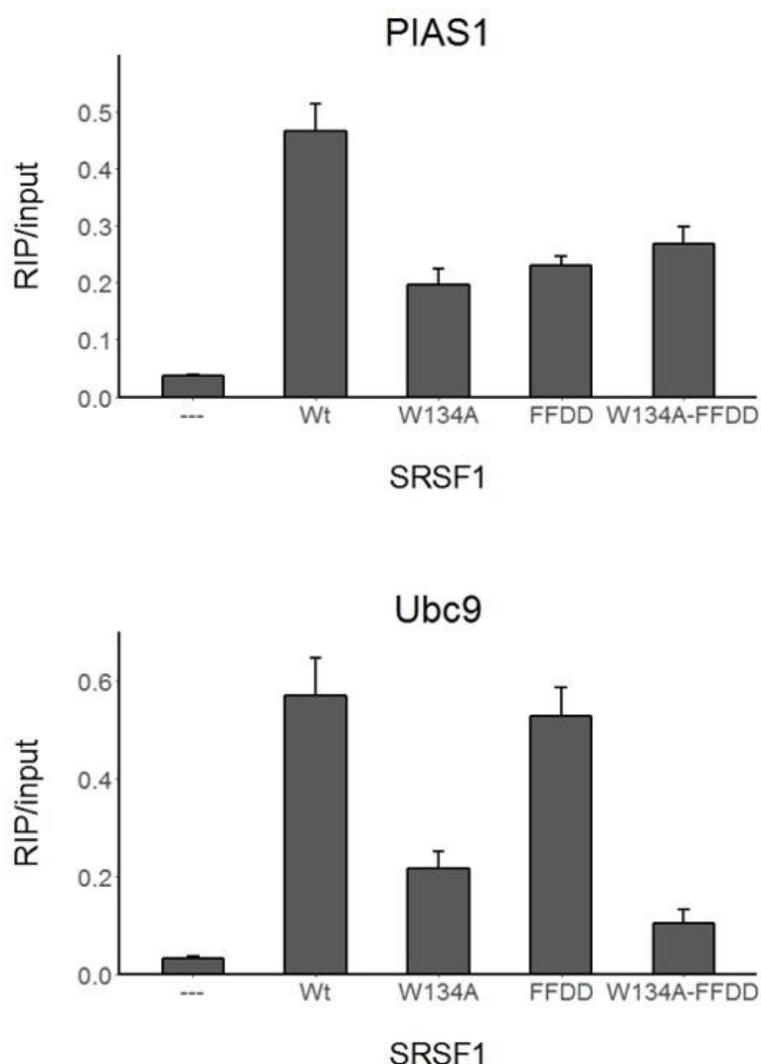
Observando el análisis del interactoma de las mutantes de SRSF1, apreciamos que la mutante W134A refleja una pérdida masiva de interacción con proteínas involucradas en la unión y metabolismo del RNA, lo cual sucede en menor medida con la mutante FFDD. Nos preguntamos entonces si esta pérdida podría estar relacionada con la deficiencia en la regulación de la SUMOilación, y aunque ambas mutantes fueron descritas como incapaces de unirse al RNA, decidimos corroborar esta actividad mediante ensayos de inmunoprecipitación de RNA (RIP). Transfectamos células HEK 293T en cultivo con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 Wt, W134A y FFDD, todas ellas en sus versiones de fusión a GFP. Como control, se decidió transfectar células con plásmidos para la expresión de GFP solo, y otras células con un vector para expresar una versión de SRFS1 que combina las dos versiones mutantes hasta ahora manejadas en forma independiente, FFDD/W134A, de la cual no esperaríamos obtener inmunoprecipitación de RNA al tener ambos dominios de unión mutados. Luego de 24hs, se procedió a la inmunoprecipitación utilizando las microesferas GFP-trap. Se extrajo RNA de los inmunoprecipitados y luego de realizar una transcripción reversa, se procedió a analizar por qPCR los RNA presentes en cada RIP. Al observar el mRNA de GAPDH que co-inmunoprecipita con las variantes de SRSF1, concluimos que la versión Wt es capaz de interaccionar con este, pero ninguna de las mutantes logra hacerlo (**figura R.18** panel superior). Curiosamente, cuando analizamos la interacción con otro mRNA, en este caso el que codifica para Akt1, observamos que la mutante FFDD es capaz de interaccionar de igual manera que la versión Wt, aunque ni la W134A, ni la doble mutante FFDD/W134A logran hacerlo (**figura R.18** panel inferior).



**Figura R.18 | Inmunoprecipitación de mRNA con variantes de SRSF1:** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1 fusionadas a GFP, o bien, GFP solo. Luego de 24hs, se utilizaron microesferas magnéticas para inmunoprecipitar GFP y se prosiguió con la extracción de RNA. Luego de realizar transcripción reversa, se analizaron por qPCR los mRNA inmunoprecipitado de GAPDH y Akt1 presentes en cada inmunoprecipitado, según se indica en la parte superior de cada gráfico.

Estos resultados nos hicieron replantearnos el tema de la inhabilidad de interactuar con el RNA de las distintas variantes de SRSF1, descrita previamente por otros laboratorios. El trabajo de Jeremy Sanford y colaboradores del 2009, describió a gran escala mediante experimentos de CLIP-seq, la población de transcritos a los cuales se une SRSF1 [151]. Los sitios identificados en el trabajo mencionado, fueron divididos en distintos bloques según la naturaleza del transcripto interactuante. Curiosamente, dentro del bloque de genes sin intrones, los investigadores resaltan la unión detectada de SRSF1 al mRNA de Ubc9 y de algunas isoformas de SUMO. Hasta el día de hoy las consecuencias de esta interacción siguen siendo un misterio. Nos preguntamos

entonces si la unión de SRSF1 a los transcritos codificantes de las proteínas de la vía de conjugación a SUMO, podría estar implicada en su capacidad de regular la SUMOilación. A través de ensayos de RIP, nos propusimos analizar el pegado de las variantes de SRSF1 a los mRNA de UBC9 y PIAS1, con el objetivo de detectar si existe una correlación entre esta unión y la capacidad SUMOilatoria de cada mutante. Observamos que SRSF1 Wt es capaz de inmunoprecipitar tanto con el mRNA de PIAS1 como con el de Ubc9, y según lo esperado, esta habilidad es perdida por la doble mutante FFDD/W134A. Curiosamente, aunque la variante W134A pierde la capacidad de unión a ambos mensajeros, la mutante FFDD puede interaccionar con el RNA mensajero de la enzima E2 conjugadora, tanto como la versión salvaje (**figura R.19**).

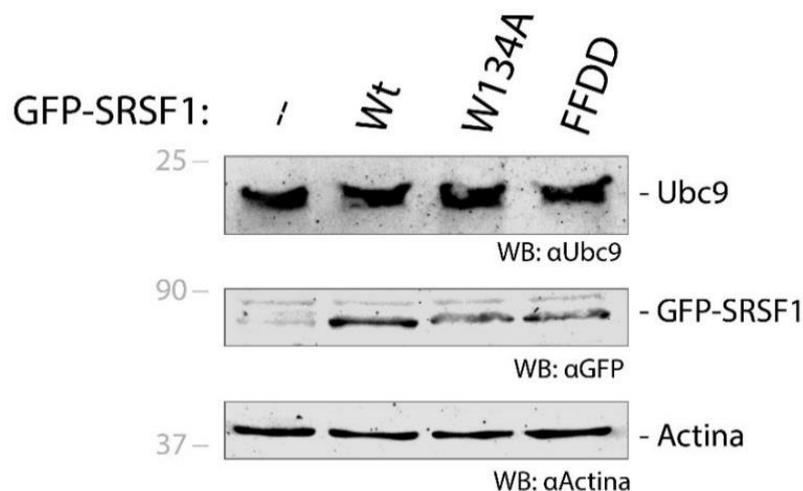


**Figura R.19 | Inmunoprecipitación de RNA relacionados a la vía de SUMO con variantes de SRSF1:** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1 fusionadas a GFP, o bien, GFP solo. Luego de 24hs, se utilizaron microesferas magnéticas para inmunoprecipitar GFP y se prosiguió con la extracción de RNA. Luego de realizar transcripción reversa, se analizaron por qPCR los mRNA presentes en cada inmunoprecipitado.

Los resultados de RIP, en su conjunto, nos despiertan dos grandes interrogantes. En primer lugar, observamos que para la mitad de los mRNA probados la mutante FFDD es capaz de inmunoprecipitar con ellos, poniendo en duda la afirmación de que esta variante pierde interacción con este ácido nucleico de forma generalizada. En segundo lugar, notamos que la interacción de SRSF1 Wt y FFDD con el RNA de Ubc9, correlacionan con el comportamiento de estas mismas variantes frente a la regulación de la SUMOilación, cuestionándonos si estos dos eventos podrían estar relacionados.

## R.13 Regulación de la estabilidad de Ubc9 por SRSF1

La capacidad de SRSF1 FFDD por interaccionar con el mRNA de Ubc9 de igual manera que la versión Wt, y la pérdida de esta habilidad por parte de la mutante W134A, correlaciona con los efectos observados en la regulación de la SUMOilación para cada una de estas mutantes. Nos preguntamos entonces si estas diferencias en la interacción de SRSF1 con los mensajeros de la enzima E2 tiene efectos a niveles de expresión de la proteína Ubc9, lo que podría explicar en cierta medida los efectos observados sobre la estimulación de la conjugación de SUMO. Para ello decidimos analizar las cantidades de proteína, en presencia de las distintas mutantes del factor de *splicing* estudiado.

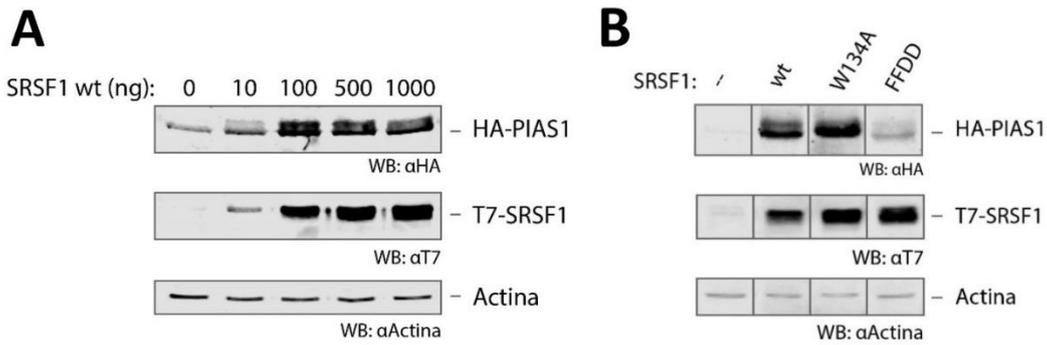


**Figura R.20 | Niveles proteicos de Ubc9 endógeno en presencia de mutantes de SRSF1:** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las variantes de SRSF1 fusionadas a GFP. Luego de 24 horas se analizaron los lisados celulares por western blot con los anticuerpos indicados debajo de cada panel.

En la **figura R.20** se observa cómo los niveles proteicos de Ubc9 endógeno se mantienen inalterables con la sobre-expresión de las distintas variantes de SRSF1. Esto, nos lleva a hipotetizar que la interacción de SRSF1-Wt y SRSF1-FFDD, y la pérdida de ésta por parte de SRSF1-W134A, en principio, no estarían afectando la cantidad total de proteína Ubc9.

## R.14 Regulación de la estabilidad de PIAS1 por SRSF1

Si bien no se observó una interacción diferencial con el mRNA de PIAS1 por parte de las mutantes de SRSF1, en los ensayos de co-inmunoprecipitación de la sección 19 de esta tesis nos llamó la atención notar que en los *western-blots* realizados con lisados de células con co-expresión de SRSF1 FFDD y PIAS1 se evidenciaba un menor nivel proteico de la E3 ligasa de SUMO comparado a la co-expresión con las otras variantes de SRSF1 (**figura R.13**). Por lo tanto, decidimos indagar en este llamativo hallazgo y determinar si SRSF1 es capaz de regular los niveles proteicos de PIAS1. Vale la pena mencionar que en esta sección se muestran algunos resultados obtenidos en colaboración con el estudiante de grado, Becario Estímulo UBA, Nicolas Gaioli, miembro del grupo de trabajo. En primer lugar, realizamos transfecciones de células HEK 293T con distintas cantidades del plásmido de expresión de SRSF1, junto con una cantidad fija del plásmido de expresión de PIAS1 y, posteriormente, analizamos los niveles proteicos de esta última. Los resultados se pueden observar en la **figura R.21 A**, panel izquierdo. Luego, en base a lo observado en este experimento, elegimos para transfectar una cantidad fija del plásmido de expresión para cada una de las variantes de SRSF1 (500 ng) conjuntamente con el plásmido de expresión de PIAS, comparamos la capacidad de las distintas mutantes de regular los niveles proteicos de PIAS1 (**figura R.21 B**)

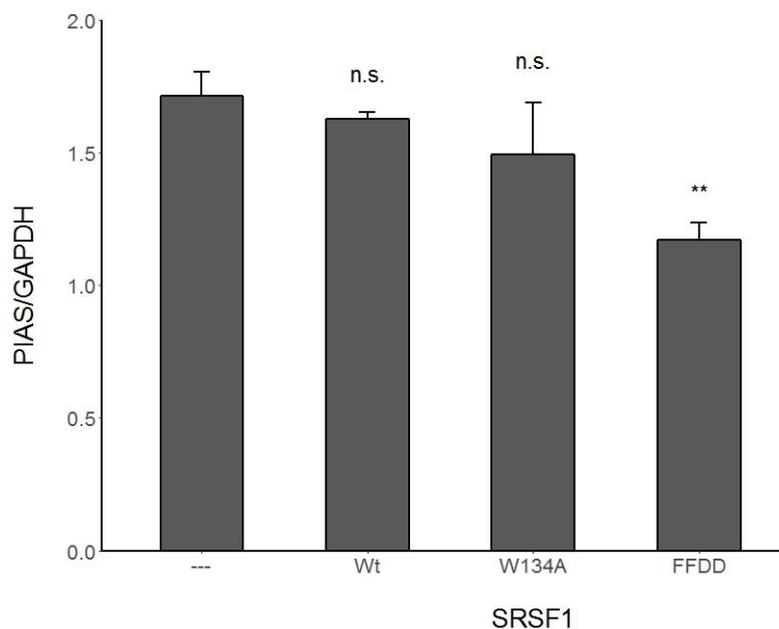


**Figura R.21 | Regulación de los niveles proteicos de PIAS1 por variantes de SRSF1: A)** Células HEK 293T fueron transfectadas con diferentes cantidades de plásmidos de expresión para SRSF1 Wt. Luego de 24hs se analizaron los lisados celulares por WB. **B)** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1. Luego de 24hs se analizaron los lisados celulares por WB. Los anticuerpos utilizados son indicados debajo de cada panel.

Se puede observar un claro aumento de los niveles proteicos de PIAS1 con el agregado creciente del plásmido de expresión para SRSF1 *wild type*. Este efecto parece compartido con la mutante W134A pero no así con la FFDD. Como la E3 ligasa que estamos evaluando (PIAS1) proviene de la expresión de un plásmido con promotor constitutivo, nos preguntamos si el efecto observado a nivel proteico podría deberse a alguna regulación post-transcripcional sobre el mRNA de PIAS1 por parte de SRSF1, al cual, además, demostramos que es capaz de unirse.

Para responder esta pregunta, intentamos analizar por qPCR la abundancia de mRNA de PIAS1 en los experimentos de sobre-expresión de esta E3 Ligasa junto a la sobre-expresión de las variantes de SRSF1. El inconveniente con este diseño experimental, es que los *primers* pensados para medir esta abundancia, son complementarios a las coyunturas de exones, únicamente presentes en los mRNA maduros y no en el genoma. Sin embargo, el plásmido de expresión de PIAS1 está elaborado con cDNA, y por lo tanto estos *primers* también hibridan con él. Como consecuencia, y debido a la gran abundancia de plásmido que logra purificar con la extracción de RNA, la qPCR detecta como producto principal a este vector y no podemos diferenciarlo del mRNA. Dado este inconveniente técnico, decidimos evaluar la abundancia del mRNA endógeno de PIAS1 con sobre-expresión de SRSF1. Para ello transfectamos células con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1 y luego de extraer RNA total de estas muestras y realizar transcripción reversa de los

mismos, analizamos la abundancia de los mRNA de PIAS en presencia de estas mutantes del factor de *splicing*. En el gráfico de la **figura R.22** se muestran los valores obtenidos en promedio de tres réplicas biológicas. Vale la pena aclarar que en este experimento se observan los valores de mRNA endógeno de PIAS1, cuando en los anteriores se evaluaban los efectos sobre los niveles proteicos de la variante transfectada de esta E3 ligasa. El inconveniente al tratar de medir niveles de los mRNA de esos mismos experimentos, es que la qPCR amplifica el plásmido transfectado, el cual se encuentra en gran abundancia y cuya secuencia es idéntica a la del mRNA maduro.



**Figura R.22 | Abundancia de mRNA endógeno de PIAS1 en presencia de variantes de SRSF1:** Células HEK 293T fueron transfectadas con plásmidos de expresión para las distintas variantes de SRSF1. A las 24hs se extrajo RNA y se realizó transcripción reversa seguida de qPCR. Se muestran los valores promedio de tres réplicas biológicas relativizadas a la abundancia de GAPDH en cada muestra. Se realizó una prueba t con los resultados mostrados encima de cada barra: (n.s.) no significativo, (\*\*) diferencias significativas con respecto al control, p-valor menor a 0,01.

Se observa una pequeña disminución del mRNA de PIAS con la transfección de las mutantes FFDD y NRS. Si bien estos efectos son significativos, la abundancia del mRNA de PIAS1 no refleja en su totalidad las grandes diferencias entre los niveles proteicos observados con la expresión de las variantes de SRSF1. En principio, porque la gran disminución de proteína PIAS1 con la mutante FFDD no parece correlacionar con la leve disminución del mRNA del mismo, pero además porque tanto la versión salvaje de

SRSF1 como la W134A parecen aumentar los niveles proteicos de PIAS1 según lo observado en la **figura R.21** de esta misma sección y, sin embargo, no tienen efecto alguno sobre el mRNA de esta E3 ligasa de SUMO. Por otra parte, si bien SRSF1 Wt interacciona con el mRNA de PIAS1, ninguna de las mutantes es capaz de hacerlo, por lo cuál podría suponerse que esta interacción no genera cambios apreciables en los niveles de la E3 ligasa PIAS1.

## R.15 Resumen de los resultados obtenidos

Elaboramos una tabla comparativa entre las variantes de SRSF1 utilizadas a lo largo de esta tesis. En ella volcamos, no sólo los resultados obtenidos como producto de este trabajo, sino también algunos datos bibliográficos de interés. A modo de resumen, podemos observar que las dos mutantes con comportamiento opuesto en cuanto a su capacidad de regulación de la SUMOilación, W134A y FFDD, se desempeñan de manera idéntica para la gran mayoría de características puestas a prueba. La excepción, es la capacidad de co-inmunoprecipitar algunos RNAs, como observamos en los ensayos de RIP de la sección R.12. Esto nos genera ciertos interrogantes que trataremos de abordar en la discusión de esta tesis.

SRSF1	Aumento de SUMOilación	Splicing alternativo	Conjugación a SUMO	Unión RNA	Unión RNA (RIP)	Shuttling	Dinámica speckles	Niveles PIAS
Wt	+	+	+	+	+	+	-	+
W134A	-	-	+	-	-	-	+	+
FF-DD	+	-	+	-	-/+	-	+	-
NRS	-/+	+				-		
KR	+	+	-					
SIM-	+	+						

**Figura R.22 | Resumen de las características de las variantes de SRSF1:** en cada columna se describe una actividad/función particular de SRSF1. Las columnas en rojo representan los resultados obtenidos en esta tesis, mientras que las columnas en azul corresponden a datos bibliográficos. Para las primeras seis columnas, el signo “+” representa que esa versión de SRSF1 es capaz de llevar a cabo la actividad correspondiente a la columna, mientras que el signo “-”, indica que no es capaz. En los casos de dinámica de speckles, el signo “+” representa una mayor dinámica que la versión Wt. Para niveles de PIAS1, el signo “+” representa un aumento en los niveles proteicos respecto a la no transfección de SRSF1. Los casos donde se observa “-/+” son indicativos de comportamientos diferentes para distintos targets analizados.

# DISCUSIÓN

El trabajo realizado a lo largo de esta tesis logró identificar variantes de SRSF1 que se comportan de manera opuesta en cuanto a la regulación de la SUMOilación que ejercen, aunque no se logró correlacionar este efecto con su comportamiento en alguna de las amplias funciones y parámetros que fueron puestas a prueba. Muchos de estos resultados nos hacen dudar de la caracterización previa de las mutantes descritas en bibliografía, y nos desafían a pensar en mejores experimentos para poder evaluar estas características de manera más robusta, en particular, la unión al RNA y la capacidad de translocación entre núcleo y citoplasma. Si bien nuestro trabajo fundador sobre la regulación de la SUMOilación por SRSF1, parecía indicar un comportamiento de tipo E3 ligasa por parte de este factor, estos nuevos resultados nos hacen re-pensar las particularidades que nos llevaron a hipotetizar esto. Una forma de poner a prueba en su capacidad regulatoria de la SUMOilación a las mutantes de SRSF1, de forma independiente a su entorno celular, sería a través de ensayos de conjugación *in-vitro*, experimentos que por las altas dificultades técnicas que implican, no se lograron concretar para este trabajo.

Los resultados expuestos a lo largo de esta tesis nos llevaron a plantear distintos panoramas en cuanto al mecanismo molecular por el cual el factor SRSF1 podría estar regulando la SUMOilación. En las siguientes secciones, no solo discutiremos el alcance de los resultados de nuestros experimentos, sino que también analizaremos las intrigantes perspectivas que se desprendieron de nuestros análisis.

## D.1 ¿Depende de la unión al RNA?

Los resultados obtenidos en la sección R.12 para las mutantes FFDD y W134A, resultan sumamente curiosos en cuanto a la posibilidad de que la regulación de la SUMOilación sea dependiente de la unión al RNA. Ambas mutantes son utilizadas en la bibliografía como versiones de SRSF1 con capacidades reducidas de unión a este ácido nucleico [42], [51], [52], [147], [152]–[155], sin embargo, en las publicaciones fundacionales notamos diferencias en la concepción experimental de estas.

Por análisis de picos en espectros de correlación cuántica única heteronuclear (HSQC), el residuo W134 fue identificado como uno de los aminoácidos de mayor interacción con el RNA dentro del dominio RRM2 [147]. A partir de estas observaciones, se elaboró la mutante W134A que es incapaz de unirse a RNA marcado radiactivamente en ensayos de *crosslinking* por UV. En cuanto a la mutante FF-DD, fue elaborada por primera vez por el Dr. Cáceres en 1993 [146]. Estudios anteriores sobre el dominio canónico de unión al RNA de la proteína hnRNP A1, habían demostrado que las Fenilalaninas dentro de los RNP, eran los residuos responsables de interactuar con el RNA [156]. Basados en este antecedente, se decidió inactivar el dominio RRM1 sustituyendo las fenilalaninas 56 y 58 por ácidos aspárticos que, según la predicción, repelerían la carga negativa de los fosfatos presentes en la estructura del RNA. Se puso a prueba la unión a este ácido nucleico de esta mutante mediante dos técnicas: el *crosslinking* mediado por UV entre RNA marcado radiactivamente y las proteínas recombinantes; y la retención en filtros de nitrocelulosa de proteínas unidas a RNA marcado radiactivamente. En el primer ensayo, se observó una clara pérdida de interacción entre SRSF1 FFDD y el RNA, al igual que lo observado por la misma técnica para la mutante W134A. Curiosamente, en la retención en filtros de nitrocelulosa, esta mutante se comportó de igual manera a la Wt. Si bien estos resultados sugieren que la variante FFDD presenta una pérdida pronunciada de interacción con el RNA, también insinúan que estos residuos no son los únicos involucrados en esta unión dentro de SRSF1. Estas diferencias entre las mutantes, enfatizan el poco conocimiento que aún tenemos sobre el accionar de estos dos dominios de unión al RNA actuando en conjunto sobre la actividad de SRSF1.

Con los experimentos de inmunoprecipitación de RNA, en esta tesis aportamos valiosos datos al interrogante de cómo se comportan estas dos mutantes en extractos de células en cultivo. En ninguno de los casos evaluados, SRSF1 W134A fue capaz de inmunoprecipitar junto al RNA en cuestión. Sin embargo, de los cuatro mRNA puestos a prueba, en la mitad de ellos la mutante SRSF1 FFDD inmunoprecipitó el ácido nucleico en cantidades comparables a la versión salvaje del factor de *splicing*. Estos resultados, junto al análisis GO donde se observa una mayor disminución de proteínas relacionadas con los procesos relacionados al metabolismo del RNA como interactoras de SRSF1 W134A, nos hacen pensar que la pérdida de interacción con el RNA es más generalizada para esta mutante que para SRSF1 FFDD.

Estos resultados, en su conjunto, nos generan algunos interrogantes y nos permiten hipotetizar varios posibles panoramas de mecanismos de acción. Por un lado observamos que las dos mutantes de unión al RNA, W134A y FFDD, se comportan de manera distinta: mientras la segunda es capaz de estimular la SUMOilación, la primera no lo es. En principio esto podría sugerir que el mecanismo de acción no depende de la unión al RNA. Sin embargo, al tratarse de mutaciones en un dominio canónico (FFDD, en el RRM1) y la otra en uno no-canónico (W134A, en el RRM2), que no sólo interaccionan de manera muy distintas con el RNA sino que están involucrados de maneras diferentes en las actividades reportadas, no podemos asegurar con certeza que la regulación de la SUMOilación sea independiente de la unión a este ácido nucleico. De manera más generalizada, sí podemos afirmar que existe un claro comportamiento diferencial en esta actividad con los dominios RRM. Mientras que el dominio RRM2 es capaz de aumentar la SUMOilación por sí solo, la mutación W134A que genera un dominio no funcional, es incapaz de regular positivamente esta MPT, lo mismo que ocurre si se deletiona completamente este dominio (**figura I.19**) [46]. En cambio, anular el dominio RRM1, ya sea por delección del dominio (**figura I.19 A**) o por sustituciones aminoacídicas (**figuras R.8 y R.9**) parece no afectar los efectos estimulatorios de la conjugación de SUMO, e incluso, en algunos casos pareciera favorecer aún más esta modificación.

## D.2 ¿Depende de la localización?

La variante NRS de SRSF1 puede estimular la SUMOilación de ciertos sustratos específicos como U2AF65 (sección R.6), indicando que la retención nuclear no sería un impedimento total para el mecanismo de acción de SRSF1 en la regulación de la SUMOilación. Sin embargo, nuestros resultados de la sección R.7, que muestran la incapacidad de la variante NRS de SRSF1 de aumentar la SUMOilación global, nos hicieron sospechar que de manera generalizada esta función estuviera ligada a algún aspecto de la localización celular de este factor. Lo observado en la sección R.5, junto a experimentos previos con estas mismas mutantes, demuestran que tanto SRSF1 FFDD como SRSF1 W134A se localizan mayoritariamente en el núcleo en estado estacionario. Más aún, dentro de este compartimento celular, ambas versiones de este factor de

*splicing* parecieran encontrarse en *speckles* (sección R.5 y [58]). Por primera vez, sin embargo, en esta tesis demostramos para ambas mutantes que la dinámica de difusión y asociación en estos gránulos es diferente a la de la versión Wt, sugiriendo que la afinidad de las interacciones responsables de esta sub-compartmentalización están siendo afectadas por las sustituciones aminoacídicas correspondientes. Es probable asociar estos efectos a la disminución en la interacción con el RNA reportada para estas mutantes, sabiendo que existen múltiples interacciones proteína-RNA que estabilizan las uniones en estos cuerpos nucleares. A pesar de estas particularidades, no fue posible encontrar diferencias en la sub-localización y dinámica entre las mutantes FFDD y W134A, que pudieran sugerir un mecanismo que explique el comportamiento opuesto de ambas en cuanto a su regulación de la SUMOilación.

Si bien todas las variantes proteicas puestas a prueba en esta tesis se ubican en el núcleo en estado estacionario, la versión de SRSF1 de retención nuclear (NRS) nos indicaría que el paso por el citoplasma sería un requisito para la regulación de la conjugación de SUMO en la mayoría de los sustratos. En este contexto, un aspecto de la localización de SRSF1 merece un análisis más profundo. Se trata de la capacidad de translocación, o *shuttling*, entre el núcleo y el citoplasma. Como se mencionó en la introducción, esta habilidad de las proteínas SR fue involucrada en varios de los procesos moleculares que les permiten a estos factores desempeñar diversas actividades y ser definidas como proteínas multifacéticas. Tanto la variante FFDD como la W134A fueron evaluadas, en trabajos anteriores, en lo que respecta a este rasgo característico de la familia de proteínas SR. Mediante experimentos de inhibición de la transcripción, se observó que ambas mutantes pierden la habilidad de *shuttling*, como se describió en la sección I.1.4.2 de la introducción. Sin embargo, aunque los primeros ensayos para analizar *shuttling* de proteínas consistían justamente en inhibir la transcripción, condición ante la cual algunas proteínas mayormente nucleares tienden a acumularse en el citoplasma evidenciando así su capacidad para salir del núcleo, la técnica más adecuada para evaluar esta característica es el ensayo de “*heterokaryon*”. Esta metodología se basa en tener dos poblaciones de células separadas, donde una de ellas exprese la proteína cuya capacidad de hacer *shuttling* se desea evaluar fusionada a una proteína fluorescente, células “donoras”, y la otra población no, células “ceptoras”. Luego se juntan las poblaciones, se fusionan las células, y se mantienen en cultivo para la difusión proteica. Por microscopía, y mediante diferentes estrategias de fluorescencia, se detectan células bi-nucleadas, con un núcleo proveniente de cada

población. La presencia de la proteína de interés en núcleos aceptores, que originalmente no contenían dicha proteína, sería indicio de *shuttling*. A través de este ensayo, se pone a prueba la habilidad de una proteína de salir de un núcleo dador hacia el citoplasma, y el posterior ingreso a un núcleo aceptor. Sin embargo, aunque este experimento sea el más conveniente para analizar esta característica, las dificultades técnicas de los mismos son muy elevadas, sobre todo para la detección clara de las células dadoras yceptoras. Mediante ensayos de *heterokaryon*, solo fue comprobada la falta de habilidad de SRSF1 FFDD por translocar entre estos compartimentos celulares. Para descartar que esta capacidad de SRSF1 no esté involucrada en la regulación de la SUMOilación, sería pertinente evaluar el *shuttling* de las variantes de SRSF1 usadas en esta tesis mediante esta técnica y así tener resultados inequívocos de esta habilidad. Incluso, resulta de mayor importancia definir en detalle los compartimentos celulares donde estas versiones de SRSF1 pueden localizarse, ya que de esto dependen las interpretaciones de los experimentos de interacción con otras proteínas que, eventualmente, podrían reflejar lo ocurrido en lisados celulares sin tener en cuenta las posibles localizaciones diferenciales dentro de la célula.

Las nuevas y recientes variantes estratégicas para llevar a cabo el experimento de *heterokaryon* simplifican en gran medida el desarrollo de éste [33]. Hacia finales de esta tesis, estuvimos poniendo a punto una adaptación al protocolo de François McNicoll y Michaela Müller-McNicoll [157]. Esperamos poder resolver esta inquietud sobre la localización de cada una de las variantes de SRSF1 con los nuevos ensayos que estamos llevando a cabo actualmente.

### **D.3 Todo lo que sube, tiene que bajar: de-conjugación de SUMO**

A lo largo de esta tesis, analizamos varios aspectos de la conjugación de SUMO. No sólo pusimos a prueba el comportamiento de las variantes de SRSF1 en cuanto a la SUMOilación global y sustrato específica, sino que también evaluamos posibles regulaciones de este factor sobre la expresión de proteínas con roles fundamentales en la conjugación de SUMO, como la E3 ligasa PIAS1 y la enzima E2 conjugadora Ubc9. Sin embargo, parte imprescindible de la vía de regulación de esta MPT es la reversibilidad de esta unión covalente. Sabiendo que la modificación por SUMO generalmente

controla interacciones proteína-proteína (muchas veces mediada por los motivos SIM), la deconjugación de este péptido asegura plasticidad en las redes de interacciones. La deconjugación de SUMO (deSUMOilación) está catalizada por una familia de proteasas de cisteínas, conocidas como isopeptidasas de SUMO o SENPs. Algunas de estas proteínas tienen funciones tanto en la deSUMOilación como en la maduración del péptido SUMO. Hasta el día de la fecha sólo se han identificado nueve enzimas SENPs [158], un número significativamente menor si se lo compara, por ejemplo, con las cientos de deUbiquitinasas reportadas hasta el momento. Una situación similar sucede si se comparan las E3 ligasas de estas dos modificaciones post-traduccionales. Cómo la conjugación y deconjugación de SUMO en cientos de sustratos blanco de esta modificación es controlada por un número tan limitado de enzimas es una duda central en el campo de la SUMOilación. Dentro de las hipótesis que podemos plantear, es posible que SRSF1 esté actuando a este nivel.

Abordar el tema de la deconjugación, sin embargo, no es simple. Por un lado, existe redundancia de funciones entre algunas SENPs, pero por otro, se han descrito diferentes especificidades de sustrato para otras. SENP1 es capaz de procesar SUMO1 muy eficientemente, seguido por SUMO2 y SUMO3, y es esencial para la deconjugación de SUMO1, mientras que no tiene mucha participación en la deSUMOilación de los demás parálogos de esta Ubl [159]. SENP2 demuestra alta participación en la deconjugación pero se ve muy poco involucrada en el procesamiento de maduración del péptido, con una especificidad mayor por SUMO2 que por SUMO1 y SUMO3 [160], [161]. Además, las distintas SENPs poseen diferentes localizaciones sub-celulares, no sólo en cuanto a la distribución núcleo-citoplasma, sino también en diferentes cuerpos subcelulares como nucleolos, gránulos PML o Cajal *Bodies*. Más aún, se han demostrado variantes de estas isopeptidasas, como SENP2, capaces de translocar entre el núcleo y el citoplasma [162]. Para sumar más complejidad a este tema, se han detectado procesos celulares dependientes de deSUMOilación por alguna de las enzimas SENP, como por ejemplo, la activación transcripcional de programas de respuesta inmune innata en linfocitos [163]; regulación de la expresión genética en el desarrollo [164]; control en la biogénesis de ribosomas [165], [166]; regulación de vías de señalización mediadas por cadenas de poli-SUMOilación [167], [168]; remodelado de cromatina [169]; entre otros. Todas estas complejidades requieren desarrollar grandes estrategias experimentales para poder encarar el análisis de una posible regulación de la SUMOilación por SRSF1 a través de las enzimas SENPs.

## D.4 Un efecto, ¿un solo mecanismo? (y un poco de cronología)

Como estrategia para llevar a cabo el objetivo de caracterizar el rol de SRSF1 en la regulación de la SUMOilación, analizamos varias mutantes de SRSF1 tratando de encontrar co-relaciones entre distintas actividades de estas y su capacidad de regular la conjugación de SUMO. A pesar de los múltiples intentos, ninguno de los efectos de las mutantes de SRSF1 coincidió con el observado sobre la SUMOilación. Los resultados nos fueron sorprendiendo a medida que los fuimos obteniendo. El hallazgo de una mutante, SRSF1 W134A, incapaz de aumentar la SUMOilación, fue un inicio prometedor para esta tesis. Esta variante nos permitiría poner a prueba distintas funciones de SRSF1 y así tratar de entender las características esenciales para que este factor cumpla su rol en la SUMOilación. En principio sospechamos que la unión al RNA estaba involucrada en esta regulación. Sin embargo, más tarde al descubrir que la mutante FFDD podía aumentar la conjugación de SUMO, esta hipótesis fue puesta en duda, como se discutió en detalle en la sección D.1. Cuando decidimos probar la mutante de retención nuclear, SRSF1 NRS, y observamos que era incapaz de estimular la SUMOilación global, nos pareció altamente probable que esta actividad dependiera de la localización subcelular. Luego de analizar esta característica y complementar estos datos con bibliografía, concluimos que tanto SRSF1 FFDD como SRSF1 W134A se comportan de igual manera en cuanto a la localización subcelular, en los ensayos evaluados. Si bien aún quedan aspectos por indagar, como se discutió en la sección D.2, la idea de una dependencia de la localización para que SRSF1 ejerza su rol sobre la regulación de la SUMOilación, perdió fuerza. Descartamos también que esta novedosa actividad de SRSF1 dependa de su propia SUMOilación (sección R.8), de su putativo sitio SIM (sección R.6 y R.7), de la interacción con los sustratos y con proteínas de la vía de conjugación (sección R.10) o de su rol en el *splicing* (sección R.3). El único experimento en el cual la mutante W134A y la FFDD se comportaron de manera diferencial, fue al medir los niveles proteicos de PIAS1 con sobre-expresión de estas variantes. Pero para nuestro desconcierto, estos efectos van en dirección opuesta a lo esperado: la versión FFDD de SRSF1, estimula la SUMOilación pero no aumenta los niveles proteicos de PIAS1; mientras que la mutante W134A, incapaz de provocar aumentos de esta MPT, parece aumentar los niveles proteicos de la E3 ligasa en igual medida que SRSF1 Wt.

Recopilando los intrigantes resultados, nos preguntamos si estaremos observando efectos sobre más de una actividad de SRSF1. Una posible explicación es que el mecanismo por el cual la mutante W134A pierde su capacidad de regular la conjugación de SUMO es distinto al mecanismo por el cual la mutante FFDD pareciera conservarla o incluso incrementarla. Dicho de otro modo, quizás SRSF1 es capaz de regular la SUMOilación a dos (o más) niveles distintos: ambas variantes, SRSF1 W134A y/o SRSF1 FFDD, perderían su habilidad de estimular la SUMOilación por uno de estos niveles (como podría ser la unión al RNA), sin embargo, la mutante FFDD tendría ganancia de actividad en el otro nivel. Los comportamientos diferenciales de los RRM's podrían ejemplificar un posible panorama de esta hipótesis. Si el dominio RRM1 resulta en alguna medida inhibitorio o detrimental para la SUMOilación, por ejemplo, y este efecto es jerárquicamente superior a otras regulaciones, es esperable que la mutante FFDD pueda estimular esta MPT aún perdiendo uno de los niveles de regulación como la W134A. Un resultado que indicaría que la complejidad de la participación en la conjugación de SUMO por parte de SRSF1 es consecuencia de múltiples factores, sería el aumento de niveles proteicos de PIAS1 por parte de SRSF1 Wt. La mutante W134A es capaz de aumentar los niveles de enzima PIAS1 aunque esto no se ve reflejado en un aumento de la SUMOilación. Múltiples escenarios probables se desprenderían en esta nueva concepción, como el planteado en la sección D.3: la mutante W134A, ¿podría estar aumentando los niveles/actividad/funcionalidad de alguna enzima SENP, favoreciendo la deconjugación de SUMO? SRSF1 FFDD, ¿podría perder la capacidad de aumentar los niveles proteicos tanto de PIAS1 como de enzimas SENPs, y que en “promedio” haya menos deconjugación? Estas y otras múltiples aristas se desglosan al pensar esta regulación a varios niveles.

## **D.5 Regulación de PIAS1: la clave de la mutante W134A**

Es intrigante el hecho de que uno de los pocos resultados en los que la mutante W134A y la FFDD se comportan de manera distinta entre ellas, la regulación de la estabilidad de PIAS1, implicaría efectos opuestos a los observados en cuanto a la capacidad de estimular la SUMOilación. Como se discutió en la sección anterior, este curioso resultado podría ser la pista que nos haga re-pensar las estrategias de búsqueda de esta nueva y aún enigmática actividad de SRSF1.

Pero más allá de esto, lo observado en este análisis para estas mutantes, y en particular para SRSF1 W134A, nos parece fundamental a los fines de validación experimental de esta tesis. Una de las debilidades de trabajar con proteínas mutantes, es generar polipéptidos aberrantes para múltiples funciones y luego concluir solamente sobre los efectos particulares analizados. Si bien las predicciones, a partir de las cuales se idean estas mutantes, minimizan los cambios de estructura, es de común conocimiento que una simple sustitución aminoacídica puede ocasionar la pérdida total de funciones en una proteína. Este podría ser el caso de SRSF W134A, donde un triptofano, aminoácido caracterizado por generar estructuras rígidas, es sustituido por una alanina, altamente flexible. Para ninguna de las funciones evaluadas, la mutante W134A mostró comportarse de manera similar a la versión salvaje de SRSF1. Podría ser un caso de una proteína totalmente trunca para sus funciones, y por lo tanto las conclusiones acerca de la unión al RNA y la localización, entre otras, serían poco válidas y esta mutante no sería útil para evaluar la pérdida de regulación de la SUMOilación. Sin embargo, SRSF1 W134A aumenta los niveles proteicos de PIAS1 de igual manera a SRSF1 Wt. Este resultado, nos hace pensar que la pérdida de regulación de la SUMOilación, junto con otras de las actividades puestas a prueba de la mutante W134A, son efectos específicos y no son consecuencia de un polipéptido aberrante.

## D.6 Perspectivas a futuro

### SUMOilación *in-vitro*

Para vincular la actividad de SRSF1 con el proceso de SUMOilación, dada la gran cantidad de funciones que se le han adjudicado a esta proteína, resulta de gran relevancia evaluar los mutantes en reacciones *in-vitro* donde solo se analicen los efectos de estos factores en dicho proceso. Dado que la SUMOilación es una reacción ineficiente que ocurre en una baja proporción de moléculas de un sustrato determinado, una de las mayores dificultades que estamos teniendo en estos ensayos es lograr detectar sustratos conjugados al péptido SUMO. En estos experimentos se combinan proteínas recombinantes E1, E2 y algún sustrato de SUMOilación, junto al agregado de SRSF1 purificado a partir de células de mamíferos. Este ensayo ya había sido realizado en el trabajo de nuestro laboratorio publicado en 2010 [46] con la versión Wt del factor de

*splicing*. Sin embargo, los elevados costos de las proteínas recombinantes comerciales obligaron a repetir este ensayo, ahora con las mutantes, a partir de enzimas recombinantes producidas por nosotros mismos. La complejidad de esta técnica, sumado a la baja eficiencia, agudizada en parte por las proteínas recombinantes propias, dificultó la detección de esta MPT en las distintas pruebas que se llevaron a cabo en el marco de esta tesis.

Como búsqueda de ensayos más eficientes para estos propósitos, en los últimos años fueron surgiendo distintas técnicas para medir la vía de conjugación de SUMO de manera independiente al entorno celular. En particular nos interesó un trabajo publicado en 2014, donde se propone obtener proteínas recombinantes conjugadas a SUMO a partir de diferentes opciones de expresión en bacterias [170]. La primera propuesta, llamada *in-cell*, es lograr la co-expresión de todas las proteínas de la vía de SUMOilación, junto a algún sustrato específico, dentro de una bacteria. Para ello, los plásmidos correspondientes se co-transformarían y, luego de inducir la expresión de todas las proteínas involucradas, se esperaría que SUMO se conjugue a los sustratos dentro de la célula procariota, carente de la maquinaria de SUMOilación de forma endógena. La segunda opción, llamada *in-extract*, es transformar distintos cultivos bacterianos con los diferentes plásmidos de expresión para las enzimas de la vía de SUMO, por separado. Luego se lisan los cultivos celulares, y se mezclan los extractos en proporciones específicas agregando ATP. En este caso la SUMOilación ocurriría en los extractos.

A lo largo de este trabajo logramos poner a punto la inducción de todos los plásmidos necesarios para la producción de las proteínas necesarias, y actualmente estamos revisando las proporciones de combinación de los extractos para obtener una SUMOilación recombinante detectable. Nos inclinamos por probar la versión *in-extract*, ya que en la mezcla de extractos podemos agregar las versiones de SRSF1 purificadas a partir de células de mamíferos como se describe en Materiales y Métodos.

Creemos que este ensayo puede aportar claridad a si las distintas versiones de SRSF1 son capaces de estimular la SUMOilación sin intermediarios y de forma independiente a otras actividades de este factor, o de su propia localización subcelular. Aun así, somos conscientes que los resultados de un ensayo *in-vitro*, con toda la cascada de SUMOilación reconstituida a partir de proteínas purificadas en bacterias también tienen altas limitaciones y no permitiría hacer aseveraciones sobre el comportamiento

de estas proteínas en el entorno celular, en el cual diferentes modificaciones post-traduccionales, diferentes compartimientos celulares, entre otros múltiples factores, podrían estar jugando un papel regulatorio clave.

### Dominios de interacción con SUMO

Como se describió en la introducción, los dominios SIM son esenciales para estabilizar ciertos complejos macromoleculares donde participan proteínas conjugadas a SUMO. Pero, además, muchas de las enzimas involucradas en esta MPT poseen estos motivos proteicos que les permiten interactuar de forma más específica con el péptido. Inspirados en estos antecedentes es que decidimos indagar en los potenciales sitios SIM de SRSF1 como se describió en la R.2. La mutante SRSF1 SIM-, no mostró disminución en su capacidad regulatoria de la SUMOilación, evidenciando tres posibles panoramas: que el putativo sitio SIM identificado no es funcionalmente un sitio de interacción con SUMO; que el sitio SIM no es esencial para las actividades evaluadas; o bien, que la mutación introducida no es suficiente para dejar inutilizable al sitio SIM. Dilucidar entre estas alternativas es uno de los objetivos próximos en nuestro trabajo. Un reciente trabajo nos orientó a probar una de las opciones mencionadas. En este, se describieron dos sitios SIM distintos dentro de la E3 ligasa PIAS1. La pérdida de funcionalidad de estos se observa únicamente al mutar simultáneamente ambos sitios [112]. Por esta razón decidimos mutarle a la variante SRSF1 SIM-, el segundo sitio SIM de mayor *score* según la predicción del *software* GPS-SUMO. Este, fue detectado entre los residuos 190 y 194 dentro del dominio RRM2. Una vez seleccionado este sitio, por mutagénesis dirigida elaboramos la doble mutante SIM. El siguiente paso es poner a prueba esta nueva variante de SRSF1 en su capacidad de regular la SUMOilación.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. M. Berget, C. Moore, and P. A. Sharp, "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA\* (adenovirus 2 mRNA processing/5' tails on mRNAs/electron microscopy of mRNA-DNA hybrids)," *Biochemistry*, vol. 74, no. 8, pp. 3171–3175, 1977.
- [2] S. F. de Almeida and M. Carmo-Fonseca, "Reciprocal regulatory links between cotranscriptional splicing and chromatin," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 32, pp. 2–10, 2014.
- [3] M. J. Moore and P. A. Sharp, "Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing," *Nature*, vol. 365, no. 6444, pp. 364–368, 1993.
- [4] D. A. Brow, "Allosteric Cascade of Spliceosome Activation," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 36, no. 1, pp. 333–360, Dec. 2002.
- [5] J. P. Staley and J. L. Woolford, "Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 109–118, 2009.
- [6] B. R. Graveley, "Sorting out the complexity of SR protein functions," pp. 1197–1211, 2000.
- [7] X. D. Fu, "The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors.," *RNA*, vol. 1, no. 7, pp. 663–680, Sep. 1995.
- [8] J. Valcarcel and M. R. Green, "The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 21, no. 8, pp. 296–301, Aug. 1996.
- [9] J. L. Manley and A. R. Krainer, "A rational nomenclature for serine / arginine-rich protein splicing factors ( SR proteins )," pp. 1073–1074, 2010.
- [10] H. Shen and M. R. Green, "A pathway of sequential Arginine-Serine-Rich Domain-Splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly," *Mol. Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 363–373, 2004.
- [11] H. Shen, J. L. C. Kan, and M. R. Green, "Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly," *Mol. Cell*, vol. 13, no. 3, pp. 367–376, 2004.
- [12] G. Michlewski, J. R. Sanford, and J. F. Cáceres, "The Splicing Factor SF2/ASF Regulates Translation Initiation by Enhancing Phosphorylation of 4E-BP1," *Mol. Cell*, vol. 30, no. 2, pp. 179–189, 2008.
- [13] L. Twyffels, C. Gueydan, and V. Kruys, "Shuttling SR proteins: More than splicing factors," *FEBS J.*, vol. 278, no. 18, pp. 3246–3255, 2011.
- [14] S. M. Berget, "Exon Recognition in vertebrate Splicing," *J. Biol. Chem.*, vol. 270,

no. 6, pp. 2411–2414, 1995.

- [15] R. Das *et al.*, “SR Proteins Function in Coupling RNAP II Transcription to Pre-mRNA Splicing,” *Mol. Cell*, vol. 26, no. 6, pp. 867–881, 2007.
- [16] S. Erkelenz, W. F. Mueller, M. S. Evans, A. Busch, and K. Scho, “Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms,” pp. 96–102, 2013.
- [17] M. Shen and W. Mattox, “Activation and repression functions of an SR splicing regulator depend on exonic versus intronic-binding position,” vol. 40, no. 1, pp. 428–437, 2012.
- [18] D. S. Chandler, J. Qi, and W. Mattox, “Direct Repression of Splicing by transformer-2,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 15, p. 5174 LP-5185, Aug. 2003.
- [19] E. C. Ibrahim, T. D. Schaal, K. J. Hertel, R. Reed, and T. Maniatis, “Serine/arginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 14, pp. 5002–5007, Apr. 2005.
- [20] Y. Shi and J. L. Manley, “A complex signaling pathway regulates SRp38 phosphorylation and pre-mRNA splicing in response to heat shock,” *Mol. Cell*, vol. 28, no. 1, pp. 79–90, Oct. 2007.
- [21] S. Lin, G. Coutinho-Mansfield, D. Wang, S. Pandit, and X.-D. Fu, “The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 8, pp. 819–826, 2008.
- [22] J. C. Long and J. F. Caceres, “The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression,” *Biochem. J.*, vol. 417, no. 1, pp. 15–27, 2009.
- [23] J. L. Manley and R. Tacke, “SR proteins and splicing control,” pp. 1569–1579, 1996.
- [24] H. X. Liu, M. Zhang, and A. R. Krainer, “Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins,” *Genes Dev.*, vol. 12, no. 13, pp. 1998–2012, Jul. 1998.
- [25] H. Jumaa, G. Wei, and P. J. Nielsen, “Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20,” *Curr. Biol.*, vol. 9, no. 16, pp. 899–902, Aug. 1999.
- [26] T. Moroy and F. Heyd, “The impact of alternative splicing in vivo: mouse models show the way,” *RNA*, vol. 13, no. 8, pp. 1155–1171, Aug. 2007.
- [27] H. Y. Wang, X. Xu, J. H. Ding, J. R. J. Bermingham, and X. D. Fu, “SC35 plays a role in T cell development and alternative splicing of CD45,” *Mol. Cell*, vol. 7, no. 2, pp. 331–342, Feb. 2001.
- [28] A. Busch and K. J. Hertel, “Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 3, no. 1, pp. 1–12, 2012.
- [29] X. Li and J. L. Manley, “Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2

- results in genomic instability," *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 365–378, 2005.
- [30] H. Wu *et al.*, "A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in MicroRNA Processing," *Mol. Cell*, vol. 38, no. 1, pp. 67–77, 2010.
- [31] Y. Huang, R. Gattoni, J. Stévenin, and J. A. Steitz, "SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 837–843, 2003.
- [32] Z. Zhang and A. R. Krainer, "Involvement of SR proteins in mRNA surveillance," *Mol. Cell*, vol. 16, no. 4, pp. 597–607, 2004.
- [33] V. Botti *et al.*, "Cellular differentiation state modulates the mRNA export activity of SR proteins," *J. Cell Biol.*, p. jcb.201610051, 2017.
- [34] A. R. Krainer, G. C. Conway, and D. Kozak, "Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells," *Genes Dev.*, vol. 4, no. 7, pp. 1158–1171, Jul. 1990.
- [35] H. Ge and J. L. Manley, "A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro.," *Cell*, vol. 62, no. 1, pp. 25–34, Jul. 1990.
- [36] A. R. Krainer, G. C. Conway, and D. Kozak, "The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites.," *Cell*, vol. 62, no. 1, pp. 35–42, Jul. 1990.
- [37] R. Karni, E. de Stanchina, S. W. Lowe, R. Sinha, D. Mu, and A. R. Krainer, "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene," *Nat. Struct. & Mol. Biol.*, vol. 14, p. 185, Feb. 2007.
- [38] C. Ghigna *et al.*, "Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene.," *Mol. Cell*, vol. 20, no. 6, pp. 881–890, Dec. 2005.
- [39] R. Lemaire, J. Prasad, T. Kashima, J. Gustafson, J. L. Manley, and R. Lafyatis, "Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins.," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 5, pp. 594–607, Mar. 2002.
- [40] Y. Huang, T. A. Yario, and J. A. Steitz, "A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 26, pp. 9666–9670, Jun. 2004.
- [41] Y. Huang and J. A. Steitz, "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA.," *Mol. Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 899–905, Apr. 2001.
- [42] J. R. Sanford, N. K. Gray, K. Beckmann, and J. F. Cáceres, "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation," *Genes Dev.*, pp. 755–768, 2004.
- [43] J. R. Sanford, J. D. Ellis, D. Cazalla, and J. F. Cáceres, "Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor

- 2/alternative splicing factor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 42, pp. 15042–7, 2005.
- [44] X. Li and J. L. Manley, "Alternative splicing and control of apoptotic DNA fragmentation.," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 12, pp. 1286–1288, Jun. 2006.
- [45] X. Li and J. L. Manley, "Cotranscriptional processes and their influence on genome stability.," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 14, pp. 1838–1847, Jul. 2006.
- [46] F. Pelisch *et al.*, "The serine/arginine-rich protein SF2/ASF regulates protein sumoylation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 37, pp. 16119–16124, 2010.
- [47] A. Cléry, R. Sinha, O. Anczuków, A. Corrionero, A. Moursy, and G. M. Daubner, "Isolated pseudo – RNA-recognition motifs of SR proteins can regulate splicing using a noncanonical mode of RNA recognition," vol. 1, 2013.
- [48] F. J. Blanco and C. Bernabeu, "The Splicing Factor SRSF1 as a Marker for Endothelial Senescence.," *Front. Physiol.*, vol. 3, p. 54, 2012.
- [49] N. Kataoka, J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss, "Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins.," *J. Cell Biol.*, vol. 145, no. 6, pp. 1145–1152, Jun. 1999.
- [50] M. C. Lai, R. I. Lin, S. Y. Huang, C. W. Tsai, and W. Y. Tarn, "A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 11, pp. 7950–7957, Mar. 2000.
- [51] J. F. Cáceres, G. R. Screaton, and A. R. Krainer, "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 1, pp. 55–66, 1998.
- [52] N. Delestienne, C. Wauquier, R. Soïn, J. F. Dierick, C. Gueydan, and V. Kruys, "The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1- containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression," *FEBS J.*, vol. 277, no. 11, pp. 2496–2514, 2010.
- [53] D. L. Spector, "Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 1, pp. 147–151, Jan. 1990.
- [54] S. Huang and D. L. Spector, "U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 1, pp. 305–308, Jan. 1992.
- [55] D. L. Spector and A. I. Lamond, "Nuclear Speckles," pp. 1–13, 2011.
- [56] X. D. Fu and T. Maniatis, "Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus.," *Nature*, vol. 343, no. 6257, pp. 437–441, Feb. 1990.
- [57] D. L. Spector, X. D. Fu, and T. Maniatis, "Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus.," *EMBO J.*, vol. 10, no. 11, pp. 3467–3481, Nov. 1991.

- [58] J. F. Cáceres, T. Misteli, G. R. Sreaton, D. L. Spector, and A. R. Krainer, "Role of the Modular Domains of SR Proteins in Subnuclear Localization and Alternative Splicing Specificity," vol. 138, no. 2, pp. 225–238, 1997.
- [59] M. L. Hedley, H. Amrein, and T. Maniatis, "An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 25, pp. 11524–11528, Dec. 1995.
- [60] F. Lejeune and L. E. Maquat, "Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 309–315, Jun. 2005.
- [61] H. Le Hir, E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore, "The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions.," *EMBO J.*, vol. 19, no. 24, pp. 6860–6869, Dec. 2000.
- [62] I. Aznarez *et al.*, "Mechanism of Nonsense-Mediated mRNA Decay Stimulation by Splicing Factor SRSF1," *Cell Rep.*, vol. 23, no. 7, pp. 2186–2198, 2018.
- [63] Y. Huang and J. A. Steitz, "SRprises along a messenger's journey.," *Mol. Cell*, vol. 17, no. 5, pp. 613–615, Mar. 2005.
- [64] M.-C. Lai and W.-Y. Tarn, "Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 30, pp. 31745–31749, Jul. 2004.
- [65] X.-Y. Zhong, P. Wang, J. Han, M. G. Rosenfeld, and X.-D. Fu, "SR Proteins in Vertical Integration of Gene Expression from Transcription to RNA Processing to Translation," *Mol. Cell*, vol. 35, no. 1, pp. 1–10, 2009.
- [66] K. M. Bedard, S. Daijogo, and B. L. Semler, "A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation," *EMBO J.*, vol. 26, no. 2, pp. 459–467, 2007.
- [67] R. Xiao *et al.*, "Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 15, pp. 5393–5402, Aug. 2007.
- [68] M. Drolet *et al.*, "The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription.," *Front. Biosci.*, vol. 8, pp. d210–21, Jan. 2003.
- [69] J. C. Harrison and J. E. Haber, "Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint.," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 40, pp. 209–235, 2006.
- [70] R. Luna, S. Jimeno, M. Marin, P. Huertas, M. Garcia-Rubio, and A. Aguilera, "Interdependence between transcription and mRNP processing and export, and its impact on genetic stability.," *Mol. Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 711–722, Jun. 2005.
- [71] J. J. Champoux, "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 70, pp. 369–413, 2001.
- [72] F. Rossi *et al.*, "Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I.," *Nature*, vol. 381, no. 6577, pp. 80–82, May 1996.

- [73] F. F. Andersen *et al.*, "The RNA splicing factor ASF/SF2 inhibits human topoisomerase I mediated DNA relaxation.," *J. Mol. Biol.*, vol. 322, no. 4, pp. 677–686, Sep. 2002.
- [74] R. T. Hay, "SUMO: a history of modification.," *Mol. Cell*, vol. 18, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2005.
- [75] A. Ciechanover, D. Finley, and A. Varshavsky, "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 24, no. 1, pp. 27–53, 1984.
- [76] A. Hershko and A. Ciechanover, "The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins.," *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 33, p. 19–56, 301, 1986.
- [77] A. L. Schwartz and A. Ciechanover, "Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 49, pp. 73–96, 2009.
- [78] D. P. Xirodimas, "Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 36, no. Pt 5, pp. 802–806, Oct. 2008.
- [79] J. B. Andersen and B. A. Hassel, "The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe?," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 17, no. 6, pp. 411–421, Dec. 2006.
- [80] I. F. Pitha-Rowe and P. M. Pitha, "Viral defense, carcinogenesis and ISG15: novel roles for an old ISG.," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 18, no. 5–6, pp. 409–417, 2007.
- [81] K. J. Ritchie and D.-E. Zhang, "ISG15: the immunological kin of ubiquitin.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 237–246, Apr. 2004.
- [82] M. Groettrup, C. Pelzer, G. Schmidtke, and K. Hofmann, "Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 33, no. 5, pp. 230–237, May 2008.
- [83] J. Geng and D. J. Klionsky, "The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series.," *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 9, pp. 859–864, Sep. 2008.
- [84] M. Hochstrasser, "Origin and function of ubiquitin-like proteins," vol. 458, no. March, 2009.
- [85] L. S. Lu and E. T. H. Yeh, "Ubiquitin-Like Proteins," in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 2013, pp. 467–472.
- [86] P. B. Meluh and D. Koshland, "Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 6, no. 7, pp. 793–807, Jul. 1995.
- [87] Z. Shen, P. E. Pardington-Purtymun, J. C. Comeaux, R. K. Moyzis, and D. J. Chen, "UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52

- proteins.," *Genomics*, vol. 36, no. 2, pp. 271–279, Sep. 1996.
- [88] T. Okura *et al.*, "Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin.," *J. Immunol.*, vol. 157, no. 10, pp. 4277–4281, Nov. 1996.
- [89] M. N. Boddy, K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon, and P. S. Freemont, "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*, vol. 13, no. 5, pp. 971–982, Sep. 1996.
- [90] R. Mahajan, C. Delphin, T. Guan, L. Gerace, and F. Melchior, "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2.," *Cell*, vol. 88, no. 1, pp. 97–107, Jan. 1997.
- [91] M. J. Matunis, E. Coutavas, and G. Blobel, "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex.," *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 6 Pt 1, pp. 1457–1470, Dec. 1996.
- [92] F. Melchior, "Sumo — N Onclassical U Biquitin," *Yeast*, pp. 591–626, 2000.
- [93] P. Bayer *et al.*, "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1.," *J. Mol. Biol.*, vol. 280, no. 2, pp. 275–286, Jul. 1998.
- [94] E. Mossessova and C. D. Lima, "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast.," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 865–876, May 2000.
- [95] Y. Liang, C. Lee, Y. Yao, C. Lai, and M. L. Schmitz, "SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 26509, pp. 1–15, 2016.
- [96] D. Guo *et al.*, "A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes.," *Nat. Genet.*, vol. 36, no. 8, pp. 837–841, Aug. 2004.
- [97] G. Rosas-Acosta, M. A. Langereis, A. Deyrieux, and V. G. Wilson, "Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein.," *Virology*, vol. 331, no. 1, pp. 190–203, Jan. 2005.
- [98] A. C. O. Vertegaal, J. S. Andersen, S. C. Ogg, R. T. Hay, M. Mann, and A. I. Lamond, "Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 5, no. 12, pp. 2298–2310, Dec. 2006.
- [99] S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, and W. J. Cook, "Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution.," *J. Mol. Biol.*, vol. 194, no. 3, pp. 531–544, Apr. 1987.
- [100] S. Martin, K. A. Wilkinson, A. Nishimune, and J. M. Henley, "Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 12, pp. 948–959, Dec. 2007.
- [101] R. Geiss-friedlander and F. Melchior, "Concepts in sumoylation: a decade on,"

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 12, pp. 947–956, 2007.
- [102] S. Jentsch and I. Psakhye, “Control of nuclear activities by substrate-selective and protein-group SUMOylation.,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 47, no. August, pp. 167–86, 2013.
- [103] S. Mu, A. Ledl, and D. Schmidt, “SUMO : a regulator of gene expression and genome integrity,” no. 2004, pp. 1998–2008, 2008.
- [104] L. Cappadocia, A. Pichler, and C. D. Lima, “Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 22, no. 12, pp. 968–975, 2015.
- [105] A. Carbia-Nagashima *et al.*, “RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia.,” *Cell*, vol. 131, no. 2, pp. 309–323, Oct. 2007.
- [106] A. Werner, A. Flotho, and F. Melchior, “The RanBP2/RanGAP1 \*SUMO1/Ubc9 Complex Is a Multisubunit SUMO E3 Ligase,” *Mol. Cell*, vol. 46, no. 3, pp. 287–298, 2012.
- [107] J. H. Hurley, S. Lee, and G. Prag, “Ubiquitin-binding domains.,” *Biochem. J.*, vol. 399, no. 3, pp. 361–372, Nov. 2006.
- [108] P. Bellare, E. C. Small, X. Huang, J. A. Wohlschlegel, J. P. Staley, and E. J. Sontheimer, “A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway.,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 444–451, May 2008.
- [109] J. J. P. Perry, J. A. Tainer, and M. N. Boddy, “A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin.,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 33, no. 5, pp. 201–208, May 2008.
- [110] C. S. Seu and Y. Chen, “Identification of SUMO-binding motifs by NMR.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 497, pp. 121–138, 2009.
- [111] P. Knipscheer *et al.*, “Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination.,” *Mol. Cell*, vol. 31, no. 3, pp. 371–382, Aug. 2008.
- [112] K. Kaur, H. Park, N. Pandey, Y. Azuma, and R. N. De Guzman, “Identification of a New SUMO-Interacting Motif in PIASy,” *J. Biol. Chem.*, vol. 1, p. jbc.M117.789982, 2017.
- [113] G. Gill, “SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?,” *Genes Dev.*, vol. 18, no. 17, pp. 2046–2059, Sep. 2004.
- [114] A. Sapetschnig *et al.*, “Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1.,” *EMBO J.*, vol. 21, no. 19, pp. 5206–5215, Oct. 2002.
- [115] J. Savare, N. Bonneaud, and F. Girard, “SUMO represses transcriptional activity of the Drosophila SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 2660–2669, Jun. 2005.
- [116] A. Valin and G. Gill, “Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO.,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 6, pp. 1393–1396, Dec. 2007.
- [117] A. Verger, J. Perdomo, and M. Crossley, “Modification with SUMO. A role in

- transcriptional regulation.," *EMBO Rep.*, vol. 4, no. 2, pp. 137–142, Feb. 2003.
- [118] S.-H. Yang and A. D. Sharrocks, "SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression.," *Mol. Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 611–617, Feb. 2004.
- [119] J. Ouyang and G. Gill, "SUMO engages multiple corepressors to regulate chromatin structure and transcription.," *Epigenetics*, vol. 4, no. 7, pp. 440–444, Oct. 2009.
- [120] J. Heideker, J. J. P. Perry, and M. N. Boddy, "Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases.," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 8, no. 4, pp. 517–524, Apr. 2009.
- [121] K. M. Lee and M. J. O'Connell, "A new SUMO ligase in the DNA damage response.," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 5, no. 1, pp. 138–141, Jan. 2006.
- [122] X. Zhao and G. Blobel, "A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 13, pp. 4777–4782, Mar. 2005.
- [123] K. Miyazono, Y. Kamiya, and K. Miyazawa, "SUMO amplifies TGF-beta signalling.," *Nature cell biology*, vol. 10, no. 6, England, pp. 635–637, Jun-2008.
- [124] S.-H. Yang, E. Jaffray, B. Senthinathan, R. T. Hay, and A. D. Sharrocks, "SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways.," *Cell Cycle*, vol. 2, no. 6, pp. 528–530, 2003.
- [125] V. Dorval and P. E. Fraser, "SUMO on the road to neurodegeneration.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 6, pp. 694–706, Jun. 2007.
- [126] J. Navascues, R. Bengoechea, O. Tapia, I. Casafont, M. T. Berciano, and M. Lafarga, "SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons," *J. Struct. Biol.*, vol. 163, no. 2, pp. 137–146, 2008.
- [127] K. A. Wilkinson, A. Nishimune, and J. M. Henley, "Analysis of SUMO-1 modification of neuronal proteins containing consensus SUMOylation motifs.," *Neurosci. Lett.*, vol. 436, no. 2, pp. 239–244, May 2008.
- [128] E. J. Song *et al.*, "The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome.," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 13, pp. 1434–1447, Jul. 2010.
- [129] S. A. Wagner *et al.*, "A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 10, p. M111.013284, Oct. 2011.
- [130] G. Xu, J. S. Paige, and S. R. Jaffrey, "Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 8, pp. 868–873, Aug. 2010.
- [131] J. M. P. Desterro, L. P. Keegan, E. Jaffray, R. T. Hay, M. A. O'Connell, and M. Carmo-Fonseca, "SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity," *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 11, pp. 5115–5126, Nov. 2005.

- [132] P. Richard, V. Vethantham, and J. L. Manley, "Roles of Sumoylation in mRNA Processing and Metabolism," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 963, pp. 15–33, 2017.
- [133] B. Pozzi *et al.*, "SUMO conjugation to spliceosomal proteins is required for efficient pre-mRNA splicing," *Nucleic Acids Res.*, pp. 1–17, 2017.
- [134] I. A. Hendriks and A. C. O. Vertegaal, "A comprehensive compilation of SUMO proteomics," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 9, pp. 581–595, 2016.
- [135] M. Li, S. Pokharel, J. T. Wang, X. Xu, and Y. Liu, "RECQ5-dependent SUMOylation of DNA topoisomerase I prevents transcription-associated genome instability," *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–13, 2015.
- [136] S.- Ligases, N. Kotaja, U. Karvonen, O. A. Ja, and J. J. Palvimo, "PIAS Proteins Modulate Transcription Factors by Functioning as," vol. 22, no. 14, pp. 5222–5234, 2002.
- [137] M. Ihara, H. Yamamoto, and A. Kikuchi, "SUMO-1 Modification of PIASy , an E3 Ligase , Is Necessary for PIASy-Dependent Activation of Tcf-4," vol. 25, no. 9, pp. 3506–3518, 2005.
- [138] A. Pawellek *et al.*, "Characterisation of the biflavonoid hinokiflavone as a pre-mrna splicing modulator that inhibits senp," *Elife*, vol. 6, pp. 1–36, 2017.
- [139] B. Pozzi, P. Mammi, L. Bragado, and L. E. Giono, "When SUMO met splicing When SUMO met splicing," *RNA Biol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–7, 2018.
- [140] E. Emmott and I. Goodfellow, "Identification of protein interaction partners in mammalian cells using SILAC-immunoprecipitation quantitative proteomics.," *J. Vis. Exp.*, no. 89, Jul. 2014.
- [141] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–57, 2009.
- [142] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2009.
- [143] D. Hanahan, "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.," *J. Mol. Biol.*, vol. 166, no. 4, pp. 557–580, Jun. 1983.
- [144] D. J. Warren, "Preparation of highly efficient electrocompetent Escherichia coli using glycerol/mannitol density step centrifugation.," *Anal. Biochem.*, vol. 413, no. 2, pp. 206–207, Jun. 2011.
- [145] J. P. Garee, R. Meyer, and S. Oesterreich, "Co-repressor activity of scaffold attachment factor B1 requires sumoylation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 408, no. 4, pp. 516–522, 2011.
- [146] J. F. Caceres and A. R. Krainer, "Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains," *Embo J*, vol. 12, no. 12. pp. 4715–4726, 1993.
- [147] A. M. Tintaru *et al.*, "Structural and functional analysis of RNA and TAP binding

- to SF2/ASF.," *EMBO Rep.*, vol. 8, no. 8, pp. 756–762, 2007.
- [148] D. Cazalla, J. Zhu, L. Manche, E. Huber, A. R. Krainer, and J. F. Cáceres, "Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 19, pp. 6871–6882, 2002.
- [149] I. A. Hendriks *et al.*, "Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018.
- [150] P. Cramer *et al.*, "Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer.," *Mol. Cell*, vol. 4, no. 2, pp. 251–258, Aug. 1999.
- [151] J. R. Sanford *et al.*, "Splicing factor SFRS1 recognizes a functionally diverse landscape of RNA transcripts," *Genome Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 381–394, 2009.
- [152] N. Huynh *et al.*, "Allosteric interactions direct binding and phosphorylation of ASF/SF2 by SRPK1," *Biochemistry*, vol. 48, no. 48, pp. 11432–11440, 2009.
- [153] S. Cho, A. Hoang, S. Chakrabarti, N. Huynh, D. Huang, and G. Ghosh, "The SRSF1 linker induces semi-conservative ESE binding by cooperating with the RRMs," vol. 39, no. 21, pp. 9413–9421, 2011.
- [154] V. Tripathi *et al.*, "SRSF1 regulates the assembly of pre-mRNA processing factors in nuclear speckles," *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, pp. 3694–3706, 2012.
- [155] V. Tripathi *et al.*, "The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation," vol. 39, no. 6, pp. 925–938, 2014.
- [156] B. M. Merrill, K. L. Stone, F. Cobiánchi, H. Wilson, and K. R. Williams, "Phenylalanines That Are Conserved among Several RNA-binding Proteins Form Part of a Nucleic Acid-binding Pocket in the A1 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein \*," vol. 263, no. 7, pp. 3307–3313, 1988.
- [157] F. McNicoll and M. Müller-McNicoll, "A Quantitative Heterokaryon Assay to Measure the Nucleocytoplasmic Shuttling of Proteins," *Bio-protocol*, vol. 8, no. 17, p. e2472, 2018.
- [158] A. Nayak and S. Müller, "SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond.," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 7, p. 422, 2014.
- [159] P. Sharma, S. Yamada, M. Lualdi, M. Dasso, and M. R. Kuehn, "Senp1 is essential for desumoylating Sumo1-modified proteins but dispensable for Sumo2 and Sumo3 deconjugation in the mouse embryo.," *Cell Rep.*, vol. 3, no. 5, pp. 1640–1650, May 2013.
- [160] M. Bekes, J. Prudden, T. Srikumar, B. Raught, M. N. Boddy, and G. S. Salvesen, "The dynamics and mechanism of SUMO chain deconjugation by SUMO-specific proteases.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 12, pp. 10238–10247, Mar. 2011.
- [161] J. Mikolajczyk, M. Drag, M. Bekes, J. T. Cao, Z. Ronai, and G. S. Salvesen, "Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 36, pp. 26217–

26224, Sep. 2007.

- [162] Y. Itahana, E. T. H. Yeh, and Y. Zhang, "Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 12, pp. 4675–4689, Jun. 2006.
- [163] T. Van Nguyen *et al.*, "SUMO-specific protease 1 is critical for early lymphoid development through regulation of STAT5 activation.," *Mol. Cell*, vol. 45, no. 2, pp. 210–221, Jan. 2012.
- [164] X. Kang *et al.*, "SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development.," *Mol. Cell*, vol. 38, no. 2, pp. 191–201, Apr. 2010.
- [165] M. Haindl, T. Harasim, D. Eick, and S. Muller, "The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing.," *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 3, pp. 273–279, Mar. 2008.
- [166] C. Yun *et al.*, "Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases.," *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 4, pp. 589–595, Nov. 2008.
- [167] H. Dou, C. Huang, M. Singh, P. B. Carpenter, and E. T. H. Yeh, "Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex.," *Mol. Cell*, vol. 39, no. 3, pp. 333–345, Aug. 2010.
- [168] X. Liu, W. Chen, Q. Wang, L. Li, and C. Wang, "Negative regulation of TLR inflammatory signaling by the SUMO-deconjugating enzyme SENP6.," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 6, p. e1003480, 2013.
- [169] A. J. Garvin *et al.*, "The deSUMOylase SENP7 promotes chromatin relaxation for homologous recombination DNA repair.," *EMBO Rep.*, vol. 14, no. 11, pp. 975–983, Nov. 2013.
- [170] A. R. Weber, D. Schuermann, and P. Schär, "Versatile recombinant SUMOylation system for the production of SUMO-modified protein," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, 2014.