



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MODULACIÓN DE LAS VÍAS MOLECULARES
DE UBIQUITINA Y SUMO POR
LA INFECCIÓN VIRAL**

JOSÉ DEL CARMEN GONZÁLEZ SANTAMARÍA

MADRID, 2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**MODULACIÓN DE LAS VÍAS MOLECULARES
DE UBIQUITINA Y SUMO POR
LA INFECCIÓN VIRAL**

Memoria presentada por José del Carmen González Santamaría,
Licenciado en Biología, para optar al grado de
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Dr. Carmen Rivas

Realizada en el Departamento de Biología Molecular y Celular
del Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones
Científicas



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO NACIONAL
DE BIOTECNOLOGÍA


Doña Carmen Rivas Vázquez, Científico titular del Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CERTIFICA que Don José del Carmen González Santamaría, Licenciado en Biología por la Universidad de Panamá, ha realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología, bajo mi dirección, la presente tesis doctoral titulada:

MODULACIÓN DE LAS VÍAS MOLECULARES DE UBIQUITINA
Y SUMO POR LA INFECCIÓN VIRAL

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, el 26 de abril del 2011.



Dr. Carmen Rivas Vázquez
Director de Tesis



Dr. Ignacio Palmero
Tutor de Tesis (VB)
Profesor Honorario
Departamento de Bioquímica, UAM

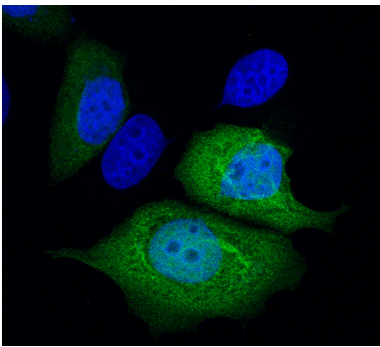
CORREO
ELECTRÓNICO:
cnb@cnb.csic.es

CAMPUS DE LA
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MADRID.
CANTOBLANCO.
28049 MADRID
TELÉFONO: 91 585 46 73
FAX: 91 585 47 00

Esta tesis doctoral se ha realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología, gracias a la beca otorgada por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Instituto para el Aprovechamiento de Recursos Humanos de Panamá y del proyecto BFU/2008-03784/BMC del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

A mis padres
A Leticia, Ximena y Valeria

Quiero agradecer en primer lugar a Carmen, mi directora de tesis por darme la oportunidad de aprender y convivir en su laboratorio todos estos años, que han sido realmente estimulantes e intensos. Su filosofía de trabajo y su empuje son un ejemplo para todos nosotros que iniciamos la difícil y sacrificada carrera de ser investigadores. A mis compañeros de laboratorio: Pedro por sus lecciones de informática y de moda, Laura por ser una gran compañera siempre alegre y jovial, Loly por su amabilidad y su permanente disponibilidad y Miky por su apoyo constante, sus consejos científicos y sus múltiples recetas de cocina. A los chicos de laboratorio 112: Lucas, Bea, Juan, Aneesh, Carmen, José Luis, Ana y Susana por suplirme amablemente de reactivos. A las chicas del servicio de microscopía confocal Silvia y Susana por su valiosa ayuda con las imágenes. A mis amigos y colegas Iciar, Jacinto y Pilar por su apoyo en los momentos críticos; a Marta, Alberto, Julia, José María, Ana e Isabel por su amistad y su valiosa ayuda con Ximena y Valeria. A Eduardo Ortega, Luz Romero, Bill Gerwick, Lisy Coley y Todd Capson por su apoyo durante la búsqueda de financiamiento para mis estudios de doctorado. Ya en el plano familiar, quiero agradecer a mi madre por su apoyo constante durante estos años, a mis hermanos Mary, Nacho e Iván. A la Fundación Tata por su apoyo financiero desinteresado, a mis suegros Antonio y Myriam, José Agustín, mi cuñado Rony, mi primo Roy y mis tíos Conrado y Aida. Quiero agradecer a todas aquellas personas que de una manera u otra han sido claves para el desarrollo de este trabajo. Y por supuesto, a mi amada esposa Leticia y mis dos princesas Ximena y Valeria, por su apoyo, amor y comprensión, que sin duda ha sido crucial para el éxito de esta misión.

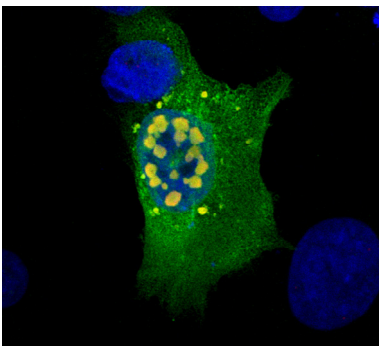


RESUMEN

Los virus modulan distintas vías de la célula huésped con el objetivo de favorecer su replicación viral. Un ejemplo lo encontramos en las vías de ubiquitina y SUMO, que son explotadas por los virus a través de una variedad de mecanismos. Estas mismas vías son empleadas por la célula para regular, entre otros, la expresión génica, la estabilidad genómica, la integridad cromosómica o la infección viral. En este trabajo se aborda el uso de ubiquitina y SUMO por parte de la célula y del virus.

La proteína E3 del virus vaccinia es una proteína multifuncional para la que no se había identificado hasta la fecha mecanismo de regulación a nivel post-traducciona. En este trabajo, hemos demostrado que la proteína E3 se modifica por SUMO e identificamos los residuos de lisina K40 y K99 de E3 como los principales aceptores de SUMO. Esta conjugación a SUMO regula negativamente la actividad transcripcional de E3 sobre el gen regulado por p53 PUMA-luc. Además, en este trabajo identificamos un dominio de interacción con SUMO (dominio SIM) en E3 que regula su interacción con SUMO, su estabilidad, su localización subcelular y su conjugación a SUMO. Demostramos también que E3 se ubiquitina y que esta modificación es modulada por USP7. Finalmente, mostramos que el dominio SIM modula la longitud de cadenas de ubiquitina conjugadas a la proteína viral. Estos hallazgos constituyen la primera demostración de que la proteína E3 de vaccinia explota la maquinaria de sumoilación y ubiquitinación de la célula y ponen de manifiesto la compleja relación entre ambas modificaciones post-traduccionales.

PTEN es un supresor de tumores cuya actividad se encuentra fuertemente regulada. Existen evidencias que indican que algunos supresores de tumores son regulados tras la infección viral, a través de un aumento en su expresión o induciendo modificaciones post-traduccionales que activan sus funciones, lo que limita la replicación de algunos virus. En este trabajo hemos identificado una nueva modificación post-traducciona de PTEN, que tiene lugar en respuesta a un estímulo, la infección viral. Dicha modificación, la sumoilación, parece competir con la mono-ubiquitinación por los mismos residuos de PTEN, por lo que dichas modificaciones posiblemente regulen actividades de PTEN en direcciones opuestas. De esta forma, mientras que la mono-ubiquitina inhibe la actividad fosfatasa de PTEN, SUMO la modula positivamente. Otra actividad modulada por SUMO pero, en este caso, de forma negativa, es la actividad transcripcional de p53 mediada por PTEN. Demostramos también que PTEN puede incluirse dentro del grupo de supresores de tumores con actividad antiviral. PTEN inhibe la replicación de VSV, a través de la activación de la vía de la PKR que resulta en la inducción de apoptosis. PTEN también modula la activación de la vía de la PI3k/Akt en respuesta a la infección con VSV. Finalmente mostramos que tanto SUMO como PML cooperan con la actividad antiviral de PTEN.

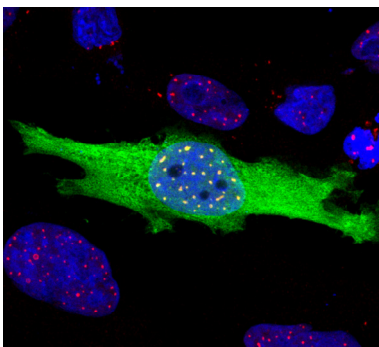


SUMMARY

Viruses are known to alter different cellular pathways in their benefit to improve their replication. This viral action is also exerted, through a variety of means, on cellular SUMO and ubiquitin pathways. Host cells use SUMO and ubiquitin pathways themselves in order to regulate their gene expression and genomic stability, but also as part of their anti-viral defense mechanisms. Here we have studied how both, viruses and cells, use SUMO and ubiquitin pathways in their own benefit.

Vaccinia virus (VACV) E3 protein is a multifunctional protein and host range factor, with no described post-translational regulation. Here we demonstrate that E3 interacts covalently with SUMO and identified lysine residues K40 and K99 in E3, as the main SUMO acceptors. SUMOylation has a negative effect on the E3 transactivation activity of the PUMA gene. We also demonstrate that E3 contains a SUMO interacting motif (SIM) that modulates the non-covalent interaction with SUMO, the covalent binding of E3 to SUMO, and the stability and subcellular localization of the viral protein. We also demonstrate that E3 binds to ubiquitin, an interaction regulated by USP7 that does not destabilize the wild type protein but triggers the degradation of an E3- Δ SIM mutant, likely due to the formation of longer ubiquitin chains. This report constitutes the first demonstration of the important role played by both, SUMO and ubiquitin, in the regulation of the VACV protein E3 and, as far as we know, the first example of a SIM domain regulating protein ubiquitination.

The cellular tumor suppressor PTEN is a dual protein/lipid phosphatase with a tightly regulated activity. Different published evidences suggest that some tumor suppressors are regulated in response to virus infection by increasing their expression or inducing their activity through post-translational modification, limiting the replication of some viruses. Here we demonstrate a new post-translational modification of PTEN, its SUMOylation, occurring in response to virus infection. SUMOylation competes with mono-ubiquitination for the same lysine residues in PTEN, suggesting that both modifications regulate PTEN activities in different directions. In this sense, while mono-ubiquitination inhibits the phosphatase activity of PTEN, SUMOylation increases its enzymatic activity. SUMO also inhibits the transcriptional activity of p53 mediated by PTEN. We also demonstrate that PTEN has antiviral activity, inhibiting VSV replication through activation of the PKR pathway and the consequent induction of apoptosis. PTEN also counteracts the activation of the PI3k/Akt pathway that normally ensures VSV infection. Finally, we demonstrate that both SUMO and PML cooperate with this antiviral activity of PTEN.



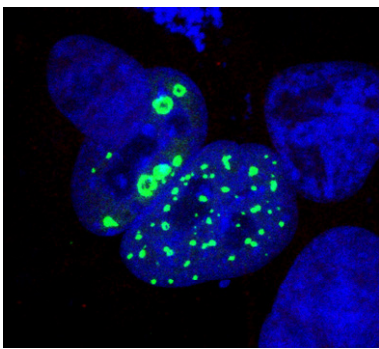
ÍNDICE

Abreviatuturas	1
Introducción	5
1. Ubiquitinación	7
1.1 Ubiquitina	7
1.2 Conjugación de ubiquitina a su sustrato	8
1.3 Funciones biológicas de la ubiquitinación	9
1.4 Deubiquitinasas	11
1.5 Relación funcional entre ubiquitina y SUMO	12
2. Regulación por SUMO	12
2.1 Las proteínas SUMO	12
2.2 Interacción covalente con SUMO	14
2.2.1 El proceso de conjugación de SUMO	14
2.2.2 Consecuencias moleculares de la sumoilación	15
2.2.3 Funciones biológicas de la sumoilación	16
2.3 Interacción no covalente con SUMO	17
3. La proteína E3 del virus vaccinia	18
3.1 El virus vaccinia	18
3.2 La proteína E3	18
4. La proteína supresora de tumores PTEN	19
4.1 Estructura de la proteína PTEN	19
4.2 Regulación de la proteína PTEN	20
4.2.1 Regulación transcripcional	20
4.2.2 Regulación post-transcripcional	21
4.2.3 Regulación post-traducciona	21
4.3 Funciones de PTEN	22
5. La proteína supresora de tumores PML	23
5.1 Estructura de la proteína PML	23
5.2 Funciones de PML y los PML-NB	23
5.3 Regulación de PML	25
6. Papel de las proteínas supresoras de tumores en la replicación viral	26
Objetivos	27
Materiales y métodos	31
1. Cultivo de células	33
2. Cultivo y manipulación de bacterias	33
3. Transfección celular	33
4. Virus y titulación por el método de formación de placas	34
5. Evaluación de la replicación viral	34

6. Plásmidos	34
7. Mutagénesis dirigida	35
8. Extracción y cuantificación de ADN plasmídico	36
9. Anticuerpos	36
10. Inmunoblot e inmunoprecipitación	36
11. Transcripción/traducción de proteínas <i>in vitro</i>	37
12. Conjugación de SUMO <i>in vitro</i>	37
13. Purificación de proteínas fusionadas a la etiqueta de Histidinas	37
14. Marcaje proteico <i>in vivo</i>	38
15. Ensayo de interacción por precipitación de proteínas de fusión con GST	38
16. Fraccionamiento subcelular	38
17. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	39
18. Ensayo de genes reportero	39
19. Programas informáticos	40
20. Análisis estadístico	40
Resultados	41
1. Regulación de la proteína E3 del virus vaccinia por SUMO y ubiquitina	43
1.1 <i>La proteína E3 co-localiza con SUMO1 en células infectadas con VACV</i>	43
1.2 <i>La proteína E3 interacciona con SUMO de forma covalente</i>	44
1.2.1 <i>Interacción covalente de E3 con SUMO1 y SUMO2 in vitro</i>	44
1.2.2 <i>Modificación de E3 por SUMO1 y SUMO2 in vivo</i>	45
1.2.3 <i>E3 producida por el virus es modificada por SUMO1 y SUMO2</i>	46
1.3 <i>Los residuos de lisina 40 y 99 de la proteína E3 son los principales sitios de conjugación a SUMO</i>	46
1.3.1 <i>La proteína E3 presenta dominios de unión covalente a SUMO</i>	46
1.3.2 <i>Los residuos de lisina K40 y K99 están implicados en la conjugación a SUMO</i>	47
1.4 <i>La conjugación de SUMO a E3 no afecta a la localización subcelular o a la estabilidad de la proteína</i>	49
1.5 <i>La complementación del VACV-ΔE3L no requiere la conjugación de SUMO a E3</i>	50
1.6 <i>La actividad transcripcional de E3 es regulada negativamente por SUMO</i>	51
1.7 <i>La proteína E3 contiene un motivo de interacción con SUMO (dominio SIM) que regula su estabilidad, su sumoilación y la localización subcelular</i>	53
1.7.1 <i>E3 presenta un dominio SIM que regula su estabilidad y su interacción no covalente con SUMO1</i>	53
1.7.2 <i>La conjugación de SUMO a E3 es regulada por el dominio SIM</i>	54

1.7.3 La localización subcelular de E3 es regulada por el dominio SIM	55
1.8 La proteína E3 es modificada por ubiquitina in vivo	56
1.9 La ubiquitinación de la proteína E3 es modulada por la deubiquitinasa USP7	57
1.10 El dominio SIM de E3 modula la formación de cadenas de ubiquitina que se conjugan a la proteína viral	59
2. Regulación de la proteína supresora de tumores PTEN por SUMO	60
2.1 La infección viral induce una modificación post-traducciona l de PTEN y altera su localización subcelular	60
2.1.1 Los virus promueven una modificación post-traducciona l de PTEN	60
2.1.2 La infección viral altera la localización subcelular de PTEN en MEFs	61
2.2 La proteína PTEN se modifica por SUMO y esta modificación se ve favorecida por la infección con VSV	62
2.2.1 PTEN se conjuga covalentemente a SUMO1 y SUMO2 in vitro	62
2.2.2 La proteína PTEN se modifica por SUMO1 y SUMO in vivo	63
2.2.3 La infección con VSV favorece la conjugación de SUMO2 a PTEN	63
2.3 Los residuos de lisina 266 y 289 de PTEN están implicados en la conjugación de SUMO	64
2.3.1 PTEN contiene dominios putativos de unión covalente a SUMO	64
2.3.2 Los residuos de lisina K266 y K289 de PTEN están implicados en la conjugación a SUMO	65
2.4 Los mutantes de PTEN en las lisinas K266 y K289 tienen una localización citoplasmática	67
2.4.1 El análisis por inmunofluorescencia revela que los mutantes de PTEN en las lisinas K266 y K289 se localizan en el citoplasma celular	67
2.4.2 El fraccionamiento subcelular revela que los mutantes de PTEN en las lisinas K266 y K289 se localizan en el citoplasma celular	68
2.5 El residuo de lisina K266 es susceptible de unir mono-ubiquitina	69
2.6 PTEN modula la replicación de VSV	70
2.7 El control de la replicación de VSV por PTEN se ve favorecido por SUMO	71
2.8 SUMO inhibe el efecto de PTEN sobre la actividad transcripcional de p53	72
2.9 La inhibición de la vía de Akt se ve favorecida por la sumoilación de PTEN	72
2.10 PTEN modula la respuesta celular frente a la infección con VSV	73
2.11 PTEN interacciona de forma no covalente con SUMO1	75
2.12 El reclutamiento de PTEN en los PML-NB tras la sobreexpresión de PML es independiente de la sumoilación o mono-ubiquitinación de PTEN	76
2.13 El reclutamiento de PTEN a los PML-NB es dependiente de la interacción de PML con SUMO	77

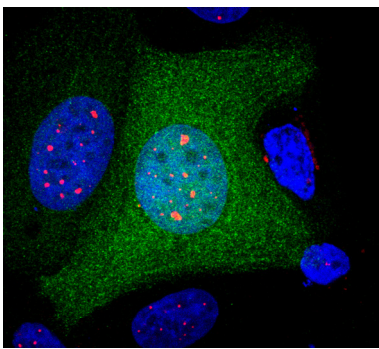
<i>2.14 PTEN coopera con PML en el control de la replicación viral</i>	78
Discusión	81
1. Regulación de la proteína E3 del virus vaccinia por SUMO y ubiquitina	83
2. Regulación de la proteína supresora de tumores PTEN por SUMO	86
Conclusiones	91
Bibliografía	95
Anexo	



ABREVIATURAS

A	acetilación
ADN	ácido dexosirribonucleico
APL	leucemia promielocítica aguda
ARN	ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina bovina sérica
C	citoplasma
CHX	ciclohexamida
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DUBs	deubiquitinasas
eIF2 α	factor eucariótico de inicio de la traducción 2 alfa
ERK	proteína quinasa activada por mitógenos
h	horas
HAUSP	proteasa específica de ubiquitina asociada a herpesvirus
hpi	horas tras la infección
hpt	horas tras el tratamiento
IFN	interferón
IB	inmunoblot
kb	kilobases
kDa	kilodalton
KSHV	herpesvirus del sarcoma de Kaposi
MEFs	fibroblastos embrionarios de ratón
miARNs	micro ARNs
mL	mililitros
moi	multiplicidad de infección
N	núcleo
NEM	N-etil maleimida
NF- κ B	factor nuclear kappa B
2'-5'OAS	2'-5'-oligoadenilato sintetasa
OTU	proteasas relacionadas con tumor de ovario
P	fosforilación
PCNA	antígeno nuclear de células proliferantes
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKR	proteína quinasa activada por el ARNdc
PI(2,4)P2	fosfatidilinositol-(2,4) difosfato

PI(3,4,5)P3	fosfatidilinositol-(3,4,5) trifosfato
PI3K	fosfatidilinositoil-3 quinasa
PML	proteína de la leucemia promielocítica
PML-NB	cuerpos nucleares de PML
PTEN	fosfatasa y homóloga a tensina delecionada en el cromosoma 10
RAR α	receptor alfa del ácido retinoico
SENP	proteasa específica de SUMO
SIM	dominio de interacción con SUMO
SP	super
STF	suero de ternera fetal
SV	virus sindbis
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
U	ubiquitinación
UCH	hidrolasas C-terminal ubiquitina
URL	unidades relativas de luminiscencia
USP	proteasa específica de ubiquitina
USP7	proteasa específica de ubiquitina 7
VACV	virus vaccinia
VHL	proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau
VSV	virus de la estomatitis vesicular
WT	salvaje



INTRODUCCIÓN

Como parásitos intracelulares obligados, los virus han desarrollado múltiples mecanismos para crear un ambiente celular que favorezca su supervivencia y replicación. Uno de estos mecanismos consiste en modular los sistemas de modificación post-traduccionales de la célula tales como la ubiquitinación y sumoilación. Se consideran dos posibles escenarios: virus que codifican proteínas que son modificadas directamente por ubiquitina y/o SUMO y virus que modifican la maquinaria de ubiquitinación y sumoilación de la célula, normalmente alterando la especificidad de los sustratos, para favorecer la replicación viral.

1. Ubiquitinación

1.1 Ubiquitina

La ubiquitina es una proteína globular de 76 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 8.5 kDa que se encuentra altamente conservada en las células eucariotas desde levaduras hasta humanos (Hershko y Ciechanover, 1998; Weissman, 2001). Es una proteína celular abundante, constituyendo alrededor del 0,1 al 5% del contenido proteico total, por lo que se asume que la ubiquitina tiene una expresión redundante (Kimura y Tanaka, 2010).

La ubiquitina se sintetiza como una proteína de fusión a las subunidades ribosomales L40 y S27 o como cadenas de poli-ubiquitina. Estos precursores de ubiquitina son procesados proteolíticamente por deubiquitininas, como las proteasas específicas de ubiquitina (USP), para generar unidades monoméricas funcionalmente idénticas (Weissman, 2001).

La conjugación de ubiquitina, normalmente a un residuo de lisina del sustrato, se denomina ubiquitinación. La ubiquitinación es una modificación post-traducciona reversible fundamental para regular los niveles de las proteínas de vida corta a través de su degradación vía proteasoma, en respuesta a diferentes cambios o estímulos en la célula (Hershko y Ciechanover, 1998). Pero, además, la ubiquitinación es importante para la regulación de otros procesos biológicos (Ulrich y Walden, 2010; Weissman, 2001). La ubiquitina contiene 7 residuos de lisinas en su secuencia (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y todos ellos pueden conjugar ubiquitina, dando lugar a 7 posibles tipos de enlace homotípicos y múltiples cadenas heterotípicas (Dikic et al., 2009; Ikeda et al., 2010). Como consecuencia, la modificación de proteínas por ubiquitina puede ser de dos tipos: mono-ubiquitinación o poli-ubiquitinación. A su vez la poli-ubiquitinación varía dependiendo de la longitud y el tipo de cadenas de ubiquitina formadas (Figura 1) (Dikic et al., 2009).

Desde un punto de vista funcional, la mono-ubiquitinación parece regular la localización y actividad de diversas proteínas en la célula (Hicke, 2001). Por otro lado, la poli-ubiquitinación a través del residuo K48 de la ubiquitina, es una señal ligada a la degradación de las proteínas vía proteasoma, mientras que la poli-ubiquitinación mediada por K63, no lo es

(Figura 1). La formación de polímeros de ubiquitina en las otras lisinas de la ubiquitina podría estar regulando distintas actividades celulares (Weissman, 2001).

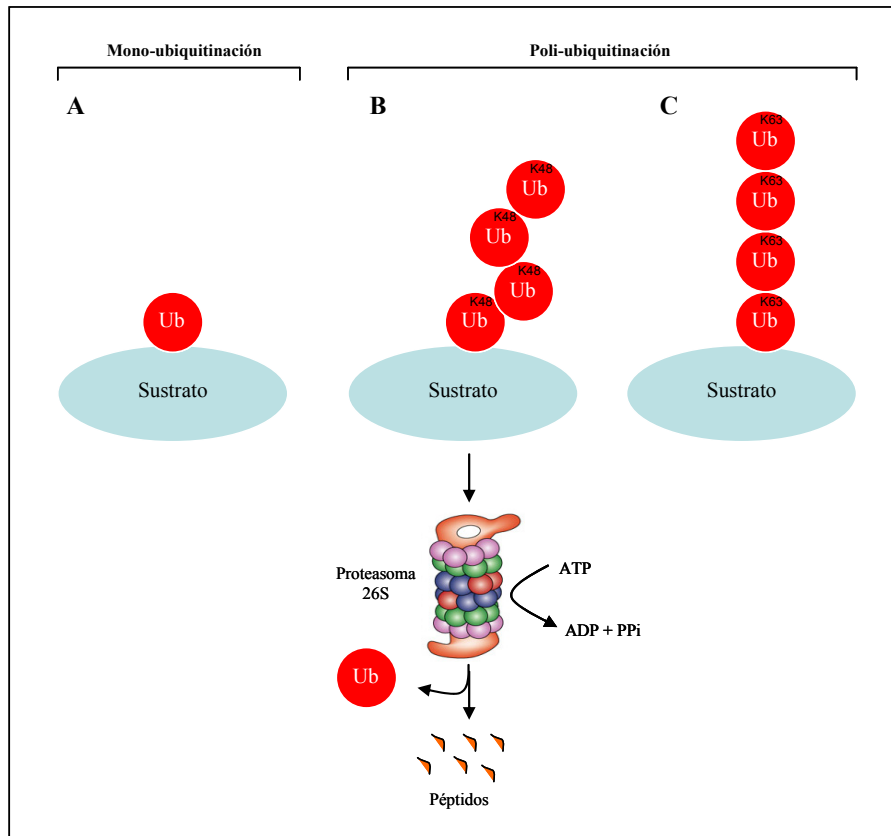


Figura 1. Tipos de ubiquitinación. La mono-ubiquitinación es la unión de una única molécula de ubiquitina a un residuo de lisina en el sustrato (A) mientras que la poli-ubiquitinación es la formación de cadenas de ubiquitina (B y C). La poli-ubiquitinación en la que interviene el residuo de lisina K48 de la ubiquitina (B) es una señal vinculada a la degradación del sustrato vía proteasoma. La poli-ubiquitinación mediada por la lisina K63 de la ubiquitina (C) está implicada en otros procesos celulares.

1.2 Conjugación de ubiquitina a su sustrato

La ubiquitinación es un proceso enzimático que implica al menos a tres tipos de proteínas (Figura 2). En un primer paso, la ubiquitina libre es activada por la enzima activadora de la ubiquitina (E1) en una reacción dependiente de adenosina trifosfato (ATP), formando un enlace tiol-éster entre un residuo de cisteína de E1 y la glicina del extremo C-terminal de la ubiquitina. A continuación, la proteína E1 transfiere la ubiquitina activada a un residuo de cisteína de la enzima conjugadora de ubiquitina (UBC, también conocida como E2). Finalmente, la ubiquitina es transferida por E2 al sustrato gracias a la acción de una proteína

ligasa de ubiquitina (E3), formándose un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y el grupo amino de un residuo de lisina del sustrato. La ubiquitinación es un proceso reversible, gracias a la acción de las deubiquitinasas (DUBs) que eliminan la ubiquitina del sustrato (Hershko y Ciechanover, 1998; Welchman et al., 2005).

En humanos se han identificado al menos 2 isoformas de E1, alrededor de 60 miembros de la familia de E2 y cientos de E3 ligasas, lo que sugiere que éstas regulan la especificidad del sustrato (Weissman, 2001; Wickliffe et al., 2009).

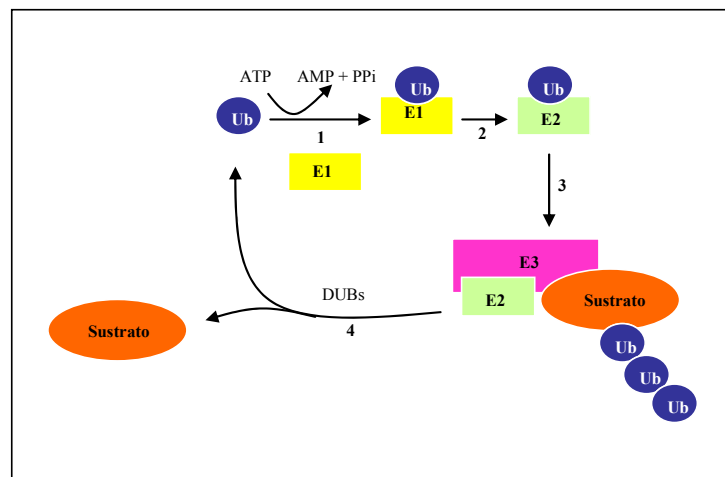


Figura 2. Conjugación de ubiquitina a su sustrato La ubiquitina libre es activada por la enzima activadora de ubiquitina E1 (1) en una reacción dependiente de ATP, y posteriormente es transferida a la proteína conjugadora de ubiquitina E2 (2). En la mayoría de los casos, el complejo E2-ubiquitina activada se une a la proteína E3 ligasa de ubiquitina, que finalmente transfiere la ubiquitina al sustrato (3). La ubiquitina es liberada del sustrato por las deubiquitinasas (DUBs) para su reciclaje (4).

1.3 Funciones biológicas de la ubiquitinación

La ubiquitinación ejerce diversas funciones reguladoras en la célula, y así participa en la degradación de proteínas, el tráfico de receptores, la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la progresión del ciclo celular, la transcripción génica, la inmunidad innata, la inflamación, la autofagia, la apoptosis y las infección virales y bacterianas (Ikeda et al., 2010; Ribet y Cossart, 2010).

La mayoría de las proteínas intracelulares son degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma (Rock et al., 1994). A diferencia de otros mecanismos de regulación, la degradación de proteínas es un proceso irreversible, que permite a la célula adaptarse a nuevas condiciones fisiológicas. El sistema ubiquitina-proteasoma juega un papel relevante en el control de calidad

de las proteínas sintetizadas, en relación a mutaciones, plegamiento inadecuado, daño por radicales libres o desnaturalización.

La reparación de lesiones en el ADN es otra de las funciones reguladas por la ubiquitinación. El ADN puede sufrir daños diversos y la ruta de reparación utilizada dependerá del tipo y magnitud del daño. Generalmente, el daño al ADN induce la activación de las rutas de reparación, que además provocan una parada cautelosa del ciclo celular para que los mecanismos de reparación resuelvan el problema y estos eventos se conocen como respuesta a daño al ADN (Ulrich y Walden, 2010). La mayoría de estas rutas de respuesta son controladas por el sistema ubiquitina-proteasoma. Un ejemplo lo constituye la degradación de la ácido ribonucleico (ARN) polimerasa II que interviene en la transcripción que se produce tras daño al ADN (Woudstra et al., 2002).

La ubiquitinación también juega un papel muy importante en la progresión del ciclo celular. En este sentido, la ubiquitinación de las ciclinas tipo A y B por la E3 ligasa APC/C induce su degradación vía proteasoma, provocando la salida de mitosis (Glutzer et al., 1991). Por otro lado, la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína p27 promueve una transición irreversible de la fase G1 a S del ciclo celular (Carrano et al., 1999).

Las actividades de algunos factores de transcripción también son reguladas por ubiquitinación. Es el caso del factor de transcripción factor nuclear kappa B (NF- κ B), que controla la apoptosis, inflamación, inmunidad y proliferación, y que es activado en respuesta a citoquinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleuquina-1 β (Silverman y Maniatis, 2001). En células no estimuladas, el NF- κ B se mantiene inactivo en el citoplasma por su asociación con la proteína inhibidora I κ B α , pero tras un estímulo positivo la quinasa I κ B induce la fosforilación de I κ B α , permitiendo la poli-ubiquitinación y posterior degradación de esta proteína (Chen et al., 1995; Scherer et al., 1995). Así, una vez liberado NF- κ B se transloca al núcleo para unirse a los promotores de los genes que regula (Silverman y Maniatis, 2001).

Por último, algunos virus modulan la maquinaria de ubiquitinación para favorecer su replicación. En determinados casos, los virus expresan proteínas con actividad E3 ligasa o reclutan E3 ligasas del hospedador para favorecer la degradación de proteínas de la célula infectada. Así, se describió que la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano de los tipos 16 y 18 promueve la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína supresora de tumores p53 a través del reclutamiento de la E3 ligasa celular E6-AP (Crook et al., 1991; Scheffner et al., 1993). En otros casos, los propios factores virales son sustratos de ubiquitinación (Randow y Lehner, 2009). Recientemente se ha demostrado que la ubiquitinación y deubiquitinación de la proteína NP del virus de la influenza tipo A es importante para la replicación de su genoma (Liao et al., 2010).

1.4 Deubiquitininasas

La conjugación de ubiquitina a su sustrato es un proceso reversible, mediado por la acción de las enzimas deubiquitininasas (DUBs). Diferentes líneas de evidencia sugieren que las DUBs son reguladoras importantes de la ubiquitinación, pues son responsables del procesamiento de los precursores de ubiquitina, de la eliminación de la ubiquitina de los sustratos y de mantener el proteasoma libre de cadenas de ubiquitina inhibitorias (Komander et al., 2009). Las DUBs actúan específicamente sobre el extremo C-terminal del último residuo de ubiquitina en las cadenas de ubiquitina. El genoma humano codifica unas 79 DUBs, que se dividen en cinco familias distintas: hidrolasas C-terminal de ubiquitina (UCHs), proteasas específicas de ubiquitina (USPs), proteasas dominio Machado-Joseph (MJD), otras relacionadas con el tumor de ovario (OTU) y la familia de enzimas que contienen el motivo JAMM.

Una de las deubiquitininasas mejor caracterizadas es la proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7/HAUSP), que fue inicialmente identificada como un factor de interacción con la proteína ICP0 del virus del herpes simplex tipo 1 (Meredith et al., 1994). Pero, además, esta DUB modula la ubiquitinación de proteínas celulares relevantes para el control de la proliferación, tales como p53, FOXO y la fosfatasa homóloga a tensina y delecionada en el cromosoma 10 (PTEN). El papel de USP7 en la regulación de p53 es complejo, ya que USP7 deubiquitina a p53 y a la E3 ligasa Mdm2 (o Hdm2 en humanos), que a su vez promueve la ubiquitinación de p53 regulando negativamente sus niveles. De esta forma, USP7 puede producir un efecto positivo o negativo sobre la estabilidad de p53, en función del sustrato sobre el que actúa (Li et al., 2002). Las proteínas FOXO (FOXO1, FOXO2, FOXO3 y FOXO4) son factores de transcripción con actividad supresora de tumores. La fosforilación de estas proteínas en respuesta al fosfatidilinositol-(3,4,5) trifosfato [PI(3,4,5)P3], promueve su exportación nuclear, su posterior ubiquitinación y la degradación vía proteasoma. Contrariamente, la mono-ubiquitinación de FOXO3 y FOXO4 provoca su retención en el núcleo, favoreciendo su actividad transcripcional y esta mono-ubiquitinación es revertida por USP7 (van der Horst et al., 2006).

La proteína supresora de tumores PTEN es otro de los sustratos de USP7. La mono-ubiquitinación de PTEN promueve su importación nuclear, mientras que su deubiquitinación determina su localización citoplasmática (Song et al., 2008).

Por todo lo anteriormente expuesto, USP7 representa una atractiva diana terapéutica y de hecho, en la actualidad se están desarrollando ensayos clínicos con inhibidores de esta DUB.

1.5 Relación funcional entre ubiquitina y SUMO

La sumoilación y la ubiquitinación son modificaciones post-traduccionales que regulan las funciones y actividades de sus sustratos. Tradicionalmente, la ubiquitinación se asoció a la degradación de proteínas, mientras que la sumoilación se relacionó con el control de otros procesos celulares. Sin embargo, estudios posteriores han revelado una posible relación funcional entre estos dos procesos. En este sentido, se observó que la sumoilación de algunas proteínas previene su ubiquitinación y posterior degradación. Como mencionamos anteriormente, el factor de transcripción NF- κ B se mantiene inactivo en el citoplasma a través de su interacción con su inhibidor I κ B α . Tras un estímulo adecuado (por ejemplo, TNF α), I κ B α se fosforila, posteriormente es ubiquitinado y finalmente degradado vía proteasoma. De esta forma, NF- κ B libre puede entrar al núcleo regulando la expresión de sus genes diana. Pero además, SUMO puede competir con ubiquitina para modificar el mismo residuo de lisina en I κ B α , de manera que la sumoilación de I κ B α produce la inhibición de las funciones dependientes de NF- κ B (Desterro et al., 1998). Otro ejemplo es el de la proteína Mdm2, una E3 ligasa que regula tanto la ubiquitinación de p53 como la suya propia. La estabilidad de Mdm2 es regulada por el sistema ubiquitina proteasoma y se ha propuesto que SUMO interfiere con la ubiquitinación de Mdm2 al modificar el mismo residuo de lisina dentro del dominio RING, previniendo así su degradación (Buschmann et al., 2000).

Sin embargo, también existe una relación cooperativa entre ambas modificaciones post-traduccionales. Recientemente se ha descrito que la sumoilación de algunas proteínas puede actuar como una señal de reclutamiento de E3 ligasas, lo que induce la ubiquitinación del sustrato sumoilado y su posterior degradación vía proteasoma (Geoffroy y Hay, 2009). La proteína RNF4 es una E3 ligasa con 4 dominios de interacción con SUMO (dominio SIM), que le permite unirse a sustratos sumoilados, especialmente a las cadenas de SUMO2/3, permitiendo la ubiquitinación de esos sustratos. De hecho se ha observado que RNF4 induce la ubiquitinación de la proteína de la leucemia promielocítica (PML) tras el tratamiento con arsénico, pero únicamente cuando esta proteína ha sido modificada por SUMO2/3 (Tatham et al., 2008).

2. Regulación por SUMO

2.1 Las proteínas SUMO

Las proteínas SUMO son proteínas tipo ubiquitina de un peso molecular aproximado de 11 kDa, aunque cuando se analizan en geles de poli-acrilamida-SDS producen un incremento de tamaño en la proteína a la que se conjugan de alrededor de 20 kDa. Las proteínas SUMO tienen

sólo un 18% de identidad de secuencia con la ubiquitina (Figura 3); sin embargo, y aunque poseen una estructura tridimensional muy parecida, la distribución de cargas totales es diferente (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

Las proteínas SUMO se encuentran altamente conservadas en las células eucariotas y son necesarias para la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana* (Johnson, 2004; Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). En levaduras existe una única proteína SUMO denominada Smt3 (Figura 3) y en mamíferos se han identificado 4 isoformas de SUMO, denominadas SUMO1, SUMO2, SUMO3 y SUMO4. La proteína SUMO1 se identificó mediante ensayos de doble híbrido por su interacción con las proteínas PML (Boddy et al., 1996), Rad51 y Rad52 (Shen et al., 1996) y Fas/APO-1 (Okura et al., 1996), e inicialmente se denominó PIC1, Ubl1 y sentrin, respectivamente. La existencia de las proteínas SUMO2 (sentrin2, Smt3b) y SUMO3 (sentrin3, Smt3a) se predijo a partir de secuencias de ADN y su posterior aislamiento reveló su capacidad de modificar sustratos (Lapenta et al., 1997; Kamitani et al., 1998a; Kamitani et al., 1998b).

Las proteínas SUMO2 y SUMO3 presentan un 95% de identidad y con frecuencia se denominan SUMO2/3; sin embargo, solo comparten un 50% de identidad con SUMO1 (Figura 3). Además, a diferencia de SUMO1, las proteínas SUMO2/3 pueden formar polímeros, pues poseen una lisina en el extremo amino terminal (N-terminal) que es susceptible de conjugar SUMO. Otra diferencia entre SUMO1 y SUMO2/3 es su disponibilidad como proteínas libres. Así, existe una fracción importante de proteínas SUMO2/3 libre, mientras que la proteína SUMO1 libre es prácticamente indetectable, por lo que se asume que la mayor parte de SUMO1 esta conjugada a sustratos (Johnson, 2004). En cuanto a la proteína SUMO4, se ha detectado ácido ribonucleico mensajero (*ARNm*) correspondiente con esta isoforma en tejidos de riñón, bazo y nódulos linfáticos pero hasta la fecha no se ha descrito la expresión de proteína endógena en dichos órganos. Sin embargo, empleando ensayos de sobreexpresión, se ha demostrado recientemente, que en condiciones de estrés SUMO4 es capaz de conjugarse a sus sustratos (Wei et al., 2008; Wilkinson y Henley, 2010).

Ubiquitina	MQIFVKTLLTGKTTILEVEPSDTEENV	26
SUMO1	MSD----QEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVIGQDSSEIHFVKVMTTHLKKL	47
SUMO2	MSE----EKPKEGVK--TEN---DHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKL	42
SUMO3	MAD----EKPKEGVK--TENN--DHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKL	43
Smt3	MSDSEVNQEAKPEVK--PEVKPETHINLKVS-DGSSEIFFKIKKTTPLRRL	48
Ubiquitina	KAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRITLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG	76
SUMO1	KESYCRQCGVPMNSIRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTGG	97
SUMO2	MKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPINETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGG	92
SUMO3	MKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPINETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGG	93
Smt3	MEAFAKRQCKEMDSLRFLLYDGIIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQTGG	98

Figura 3. Comparación de las secuencias de las proteínas SUMO y ubiquitina. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína de levadura Smt3 y de las proteínas humanas: ubiquitina, SUMO1, SUMO2 y SUMO3. Los residuos idénticos en todas las secuencias se representan en azul oscuro y los residuos compartidos por algunos miembros de la familia de proteínas SUMO y/o ubiquitina en celeste. Los residuos idénticos en al menos tres miembros de las proteínas SUMO, pero no en ubiquitina se representan en rosa.

2.2 Interacción covalente con SUMO

2.2.1 El proceso de conjugación de SUMO

La conjugación de SUMO a su sustrato ocurre en una reacción enzimática análoga a la ubiquitinación e implica la formación de un enlace isopeptídico entre el extremo carboxi terminal (C-terminal) de SUMO y el grupo amino de un residuo de lisina del sustrato (Figura 4). Las proteínas SUMO se expresan como precursores inmaduros que presentan extensiones en el extremo C-terminal, cuya longitud varía entre 2 y 11 aminoácidos, después del motivo glicina-glicina que marca el final de la proteína madura. Las proteínas SUMO son procesadas proteolíticamente por proteasas específicas de SUMO (SENP) dejando expuesto el motivo glicina-glicina del extremo C-terminal (Johnson, 2004). La activación de las proteínas SUMO maduras es mediada por el enzima activador de SUMO E1 (SAE1/SAE2), en una reacción dependiente de ATP, a través de la formación de un enlace tioéster entre la cisteína catalítica de SAE2 y la glicina del extremo C-terminal de SUMO. A continuación, SUMO es transferido desde el heterodímero SAE1/SAE2 a la enzima conjugadora de SUMO Ubc9 (E2) formando un enlace tioéster entre la cisteína activa de Ubc9 y el extremo C-terminal de SUMO. Por último, SUMO es transferido desde Ubc9 a un residuo de lisina del sustrato con la participación de una E3 ligasa de SUMO. SUMO se conjuga preferentemente a lisinas localizadas en la secuencia consenso Ψ KXD/E, en donde Ψ corresponde a un aminoácido hidrofóbico grande (como leucina, isoleucina o valina); K es la lisina a la que se conjuga SUMO; X es cualquier aminoácido; D es ácido aspártico y E es ácido glutámico (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). No obstante, es cada vez mayor el número de proteínas que a pesar de carecer de este motivo, son capaces de conjugarse a SUMO. Un dato importante es que al igual que la ubiquitinación, la conjugación de SUMO a su sustrato es una modificación reversible y se han descrito isopeptidasas como SENP1 que catalizan la de-conjugación de SUMO del sustrato (Wilkinson y Henley, 2010).

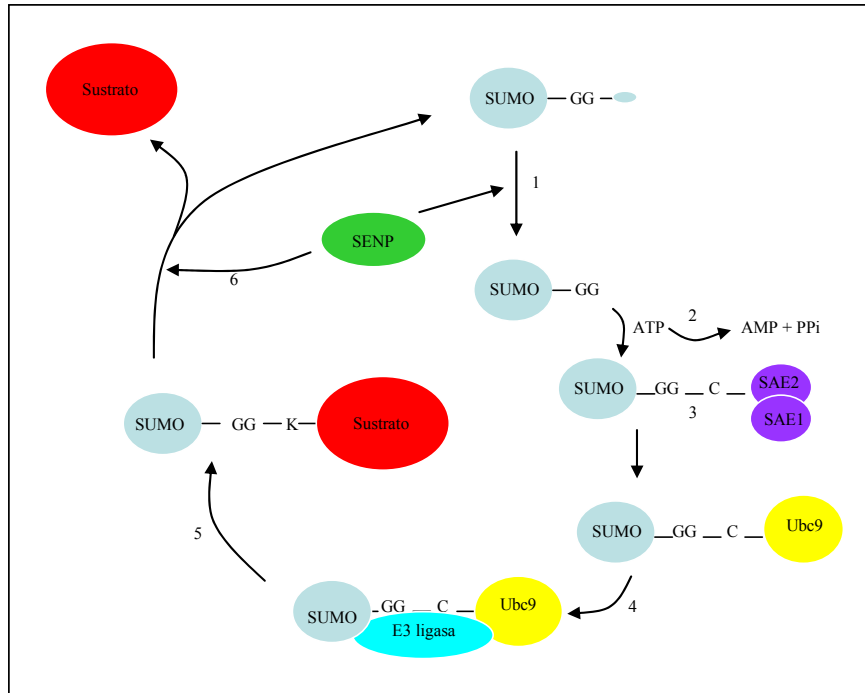


Figura 4. Proceso de conjugación de SUMO a su sustrato. Las proteínas SUMO se expresan como precursores inmaduros, que son procesados proteolíticamente por miembros de la familia de proteínas SENP (1). La proteína SUMO madura es activada por el heterodímero SAE1/SAE2 en una reacción dependiente de ATP (2), formando un enlace tioéster entre SAE2 y la glicina de SUMO (3). La proteína SUMO activada es entonces transferida a la enzima conjugadora de SUMO Ubc9, la cual cataliza la transferencia de SUMO al sustrato con ayuda de una E3 ligasa de SUMO (4,5). El proceso de sumoilación es revertido por la acción de miembros de la familia SENP (6).

2.2.2 Consecuencias moleculares de la sumoilación

Aunque es difícil predecir los efectos de la modificación de una proteína por SUMO, de forma general esta modificación post-traduccional afecta a las interacciones proteína-proteína. En este sentido, la sumoilación de una proteína puede tener distintas consecuencias (Figura 5). La sumoilación podría enmascarar el sitio de unión para otra proteína que interactúa con la proteína sustrato (Figura 5, modelo A). Un ejemplo de esta situación es la conjugación de SUMO a la proteína conjugadora de ubiquitina E2-25k. Dicha conjugación inhibe su interacción con la proteína E1, provocando así una disminución en los niveles de ubiquitinación de sus sustratos (Pichler et al., 2005). De manera contraria, la sumoilación de un sustrato puede generar nuevos sitios de unión para reclutar proteínas (Figura 5, modelo B). Es el caso de las proteínas RanGAP1, p300 y PCNA que, cuando son modificadas por SUMO pueden interactuar con RanBP2, HDAC6 y la helicasa de ADN Srs2, respectivamente (Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997; Girwood et al., 2003; Papouli et al., 2005). Finalmente, la conjugación de SUMO

puede inducir un cambio conformacional en el sustrato (Figura 5, modelo C). En este sentido, la proteína timina glicosidasa de ADN, sufre un cambio conformacional cuando es modificada por SUMO1, resultando en una pérdida de su capacidad para unirse al ADN (Hardeland et al., 2002).

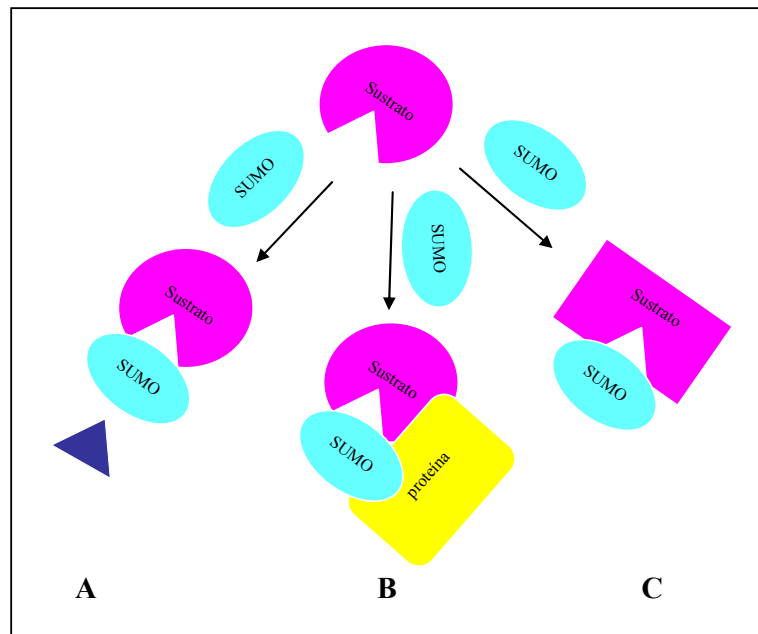


Figura 5. Consecuencias moleculares de la sumoilación. La conjugación de SUMO al sustrato puede tener tres consecuencias a nivel molecular. La sumoilación puede inhibir la interacción del sustrato con otra proteína, al enmascarar el sitio de unión (A). La conjugación de SUMO puede generar nuevos sitios de unión para reclutar otras proteínas (B). La sumoilación puede inducir un cambio conformacional del sustrato (C).

2.2.3 Funciones biológicas de la sumoilación

Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, la conjugación de SUMO puede afectar a diferentes propiedades del sustrato, incluyendo su estabilidad, actividad enzimática, localización subcelular o actividad transcripcional. De hecho, se ha demostrado que la sumoilación regula procesos tan diversos como el tráfico nuclear, la expresión génica, la estabilidad genómica, la integridad cromosómica, la localización subcelular, la formación de los cuerpos nucleares de PML y la infección viral, entre otros (Zhao, 2007).

Un dato interesante es que la mayoría de los sustratos de SUMO se localizan en el núcleo. Entre estos sustratos se encuentran factores de transcripción, represores, coactivadores, correpresores y proteínas remodeladoras de la cromatina (Liu y Shuai, 2008). La sumoilación de la mayoría de los factores de transcripción provoca su represión. Así, la conjugación de SUMO

inhibe la actividad transcripcional de los factores de transcripción Elk-1, Sp-3, SREBPs, STAT-1, SRF, c-myc, del receptor de andrógeno y del coactivador p300 (Liu y Shuai, 2008). Sin embargo, la sumoilación también puede favorecer la activación transcripcional como es el caso del factor activado por la β -catenina Tcf-4 (Yamamoto et al., 2003).

Otra función de la sumoilación es la descrita para la proteína PML. SUMO es necesario para la formación de los cuerpos nucleares de PML y el reclutamiento de proteínas asociadas a estas estructuras, como Sp100 y los reguladores transcripcionales Daxx, HDAC1, CBP, p53 o Sp3 (Zhao, 2007).

SUMO también participa en mecanismos de reparación del ADN. Así, la conjugación de SUMO a la proteína PCNA impide su actividad reparadora, pues favorece el reclutamiento de la helicasa de ADN Srs2 a la horquilla de replicación (Papouli et al., 2005). Adicionalmente, la sumoilación de la proteína timina glicosidasa de ADN, enzima implicada en reparación del ADN, eliminando residuos de uracilo o timina aberrantes, disminuye su afinidad por el ADN (Hardeland et al., 2002).

La sumoilación tiene un papel relevante en la infección viral, como lo demuestra el hecho de que muchos virus hayan desarrollado diversas estrategias para alterar la maquinaria de conjugación de SUMO. Globalmente se han observado dos situaciones distintas: existen virus cuyas proteínas virales son sustratos de sumoilación y esta modificación favorece la replicación viral (Boggio y Chiocca, 2006; Berndt et al., 2009). En otros casos, los virus regulan la conjugación de SUMO a proteínas de la célula huésped con el fin de inhibir los mecanismos antivirales de la célula y favorecer así su replicación (Chang et al., 2009; Kubota et al., 2008).

2.3 Interacción no covalente con SUMO

Recientemente se han identificado algunos sustratos de SUMO que, además, son capaces de unirse de forma no covalente a SUMO, a través del llamado dominio de interacción con SUMO (dominio SIM). El dominio SIM se caracteriza por tener un núcleo hidrofóbico que contiene la secuencia consenso Leucina/Valina/Isoleucina-X-Leucina/Valina/Isoleucina-Leucina/Valina/Isoleucina (L/V/I-X-L/V/I-L/V/I) (Kerscher, 2007). Algunos ejemplos de proteínas que presentan este dominio son p73 α , PML y Daxx (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). El dominio SIM favorece la conjugación a SUMO de algunos sustratos así como la formación de los complejos dependientes de SUMO (Lin et al., 2006; Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

3. La proteína E3 del virus vaccinia

3.1 El virus vaccinia

El virus vaccinia (VACV), también llamado virus de la vacuna, pertenece a la familia Poxviridae y al género Orthopoxvirus. Es un virus de gran tamaño con forma ovalada, con dos formas infectivas denominadas virus intracelular maduro y virus extracelular envuelto por una capa lipídica adicional. El virus contiene la ARN polimerasa, las proteínas implicadas en el procesamiento del ARNm y los factores de transcripción necesarios para la síntesis de las proteínas tempranas. El genoma del virus es una molécula lineal de ADN de doble cadena con un tamaño aproximado de 200 kilobases (kb) que contiene unos 200 genes. El ciclo vital es citoplasmático y consta de las siguientes etapas: entrada del virus, desencapsidación, expresión de genes tempranos (algunos de los cuales codifican factores de transcripción de genes virales intermedios), replicación del ADN, expresión de genes intermedios que codifican factores de transcripción que regulan genes virales tardíos, expresión de genes tardíos y morfogénesis (Condit et al., 2006; Moss, 2007).

3.2 La proteína E3

E3L es un gen temprano del VACV que codifica para dos polipéptidos de 20 y 25 kDa (proteína E3). E3 se localiza en el núcleo y citoplasma de las células infectadas o transfectadas (Yuwen et al., 1993). Esta proteína es antagonista del sistema del interferón (IFN), uno de los principales mecanismos de defensa de las células de mamíferos contra las infecciones virales. Esta función de E3L se demostró al comprobar que un mutante del VACV que carecían del gen E3L, era altamente sensible al tratamiento con IFN (Beattie et al., 1995). Se ha descrito además, que E3L es un gen necesario para la replicación eficaz del VACV en distintas líneas celulares y para la patogénesis del virus en modelos murinos (Beattie et al., 1996; Brandt y Jacobs, 2001; Brandt et al., 2005).

La proteína E3 contiene dos dominios: el de unión a Z-ADN en el extremo amino-terminal (N-terminal), entre los aminoácidos 4 al 72 (Kim et al., 2003) y el dominio de unión al ARN de doble cadena (ARNdc) en el extremo carboxi-terminal (C-terminal), entre los residuos aminoacídicos 100 y 190 (Chang y Jacobs, 1993). Aunque ambos dominios parecen ser necesarios para la patogénesis viral, sus funciones son diferentes. El dominio N-terminal está implicado en la inhibición directa de la quinasa activada por el ARNdc (PKR) inducida por el IFN, en la localización nuclear de la proteína y en su capacidad de unión al Z-ADN (Romano et al., 1998; Kim et al., 2003; Langland y Jacobs, 2004). Además, a través de este dominio la proteína E3 activa transcripcionalmente distintos genes celulares tales como IL-6, NF-AT o p53

e inhibe la apoptosis (Kwon y Rich, 2005). Adicionalmente, el dominio N-terminal está implicado en la inhibición de la adenosina deaminasa ADAR-1 y es necesario para la neurovirulencia y la invasión al cerebro *in vivo* (Liu et al., 2001; Brandt et al., 2005). El dominio de unión a ARNdc en el extremo C-terminal está implicado en la resistencia al IFN y en el fenotipo de amplio rango de hospedadores del virus (Beattie et al., 1996; Chang y Jacobs, 1993). La unión de E3 al ARNdc inhibe la activación de las proteínas inducidas por el IFN en respuesta al ARNdc, PKR y 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (2'-5'-OAS) (Chang et al., 1992; Rivas et al., 1998). Curiosamente, y a pesar de la gran cantidad de funciones descritas para esta proteína viral, hasta la fecha no se han demostrado modificaciones post-traduccionales que regulen su actividad.

4. La proteína supresora de tumores PTEN

La fosfatasa y homóloga a tensina delecionada en el cromosoma 10 (PTEN) es una proteína supresora de tumores que se descubrió como un gen delecionado en el cromosoma 10q23 y mutado en glioblastoma, cáncer de próstata y algunos tumores de mama (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). Posteriormente, se demostraron también mutaciones de esta proteína en tumores renales, melanoma, vejiga, pulmón y tiroides, lo que indicaba que PTEN es uno de los supresores tumorales más frecuentemente alterados en cáncer (Li y Ross, 2007; Keniry y Parsons, 2008; Salmena et al., 2008). La importancia de esta proteína es además evidenciada por el hecho de que mutaciones de PTEN en la línea germinal se asocian con una predisposición elevada para desarrollar el síndrome de Cowden, la enfermedad de Lhermitte-Duclos o el síndrome de Bannayan-Riley-Rubalcaba (Li y Ross, 2007; Salmena et al., 2008).

4.1 Estructura de la proteína PTEN

PTEN es un polipéptido de 403 aminoácidos que pertenece a la familia de proteínas tirosina fosfatasa (Figura 6). La proteína tiene dos grandes dominios estructurales: el dominio fosfatasa que contiene el sitio catalítico en el extremo N-terminal (aminoácidos 7 al 185); y el dominio C2 en el extremo C-terminal (aminoácidos 186 al 352), responsable de la unión a la membrana plasmática. En el extremo N-terminal hay una secuencia corta poli-básica que es un motivo de unión al fosfatidilinositol-4,5 difosfato [PI(4,5)P₂]. Por otro lado, en el extremo C-terminal hay unos 50 aminoácidos que incluyen un grupo de serinas y treoninas fosforilables que regulan la estabilidad de la proteína, dos secuencias PEST putativas y un dominio PDZ que media la interacción con diversas proteínas (Leslie y Downes, 2004). Asimismo, se ha demostrado su regulación por múltiples modificaciones post-traduccionales, tales como ubiquitinación, acetilación y fosforilación (Salmena et al., 2008).

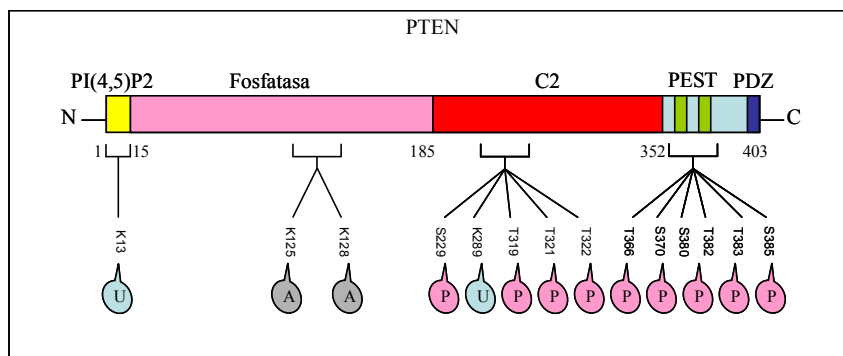


Figura 6. Esquema de los dominios presentes en la proteína supresora de tumores PTEN y algunas modificaciones post-traduccionales que regulan su actividad. En el extremo N-terminal de PTEN se encuentran el motivo de unión al PI(4,5)P2 (residuos 1 al 15, amarillo) y el dominio fosfatasa (residuos 22 al 185, rosa) donde reside la actividad catalítica de la proteína. El dominio C2 (residuos 190 al 351, rojo) media la interacción con la membrana. El extremo C-terminal contiene dos secuencias PEST putativas y existe un dominio PDZ que regula la interacción de PTEN con otras proteínas (residuos 401 al 403, azul). PTEN es regulado por modificaciones post-traduccionales. La fosforilación (P) de los residuos S370, S380, T382, T383 y S385 en el extremo C-terminal de la proteína modula su actividad supresora de tumores, su localización subcelular y su estabilidad. La fosforilación de los residuos S229, T319, T321 y T322 en el dominio C2 regula la localización de PTEN en la membrana plasmática. La acetilación (A) de PTEN en los residuos K125 y K128 reduce su actividad catalítica. PTEN es modificado por ubiquitina (U) en los residuos K13 y K289 y dicha modificación promueve su localización nuclear.

4.2 Regulación de la proteína PTEN

Considerando la importancia de PTEN, sus funciones deben estar finamente reguladas (Salmena et al., 2008). Los distintos mecanismos que regulan a PTEN incluyen: el silenciamiento epigenético, la regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traduccionales y la modulación de su localización subcelular (Wang y Jiang, 2008).

4.2.1 Regulación transcripcional

Dada la expresión ubicua de PTEN en diferentes tipos celulares y tejidos, en un principio se consideró que esta proteína se producía constitutivamente. No obstante, la secuenciación del promotor de PTEN permitió identificar posibles sitios de unión para el factor de transcripción de crecimiento temprano regulado 1, y se demostró que este factor regulaba la expresión de PTEN en respuesta al tratamiento con radiación (Virolle et al., 2001) o con el inhibidor de fosfatasa calcicolin A (Okamura et al., 2005). Por otro lado, la proteína PPAR γ se une a dos sitios del promotor de PTEN, regulando positivamente su expresión (Patel et al., 2001). Finalmente, la proteína p53 también se une al promotor de PTEN, regulando positivamente su expresión (Stambolic et al., 2001).

Asimismo, se ha demostrado la regulación negativa de PTEN a nivel transcripcional. En este sentido, la proteína quinasa quinasa 4 activada por mitógenos inhibe la expresión de PTEN al activar a la proteína NFκB, un supresor transcripcional de PTEN (Xia et al., 2007). De igual manera, el factor de crecimiento transformante β se une al promotor de PTEN y modula negativamente los niveles de PTEN (Chow et al., 2007). Al igual que el factor de transcripción c-Jun que modula negativamente los niveles de PTEN al unirse a un sitio tipo AP-1 en el promotor, lo que explica la correlación negativa que existe entre c-Jun y los niveles de PTEN en distintas líneas tumorales humanas (Hettinger et al., 2007).

4.2.2 Regulación post-transcripcional

Recientemente, se ha identificado un mecanismo que regula la traducción del ARNm de PTEN mediado por micro ARNs (miARNs). De esta manera se ha observado que los miARNs *miR-21*, *miR-22*, *miR-214*, *miR-205*, *mir-17-92*, *mir-106-25*, *mir-367-302b* y *mir-221-222* controlan los niveles de PTEN (He, 2010).

4.2.3 Regulación post-traducciona

La proteína PTEN puede ser regulada por distintas modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentran la fosforilación, acetilación, oxidación y ubiquitinación (Salmena et al., 2008). PTEN presenta en su extremo C-terminal una serie de residuos de serinas y treoninas fosforilables: las treoninas 366, 382 y 383 y las serinas 370, 380 y 385 regulan la estabilidad de la proteína y modulan su actividad catalítica alterando su capacidad de unión a la membrana plasmática (Torres y Pulido, 2001; Vásquez et al., 2000). Por otro lado, la interacción con la proteína PCAF induce la acetilación de PTEN en los residuos de lisina 125 y 128, lo que inhibe el control de PTEN sobre la ruta de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y sobre el ciclo celular (Okumura et al., 2006). De igual manera, la oxidación de PTEN por especies reactivas de oxígeno promueven la formación de enlaces di-sulfuro que afectan a la actividad catalítica de la proteína (Kwon et al., 2004; Lee et al., 2002; Leslie et al., 2003).

Se ha descrito también una regulación negativa de PTEN dependiente del proteasoma. En este sentido, se ha demostrado que la estabilidad de PTEN está comprometida en mutantes de fosforilación de la proteína (Torres y Pulido, 2001). Además, se observó que en células bronquiales humanas se inducía la degradación de PTEN vía proteasoma tras el tratamiento con sales de zinc (Wu et al., 2003). Posteriormente, se demostró que esta degradación era el resultado de su poli-ubiquitinación y que esta modificación era mediada por la E3 ligasa NEDD4-1 (Wang et al., 2007). Además, PTEN puede mono-ubiquitinarse. Se han identificado los residuos de lisina K13 y K289 en PTEN como los principales sitios de conjugación de

mono-ubiquitina, modificación que promueve su importación nuclear (Trotman et al., 2007). Recientemente, se ha descrito que la proteasa específica de ubiquitina USP7, regula negativamente dicha mono-ubiquitinación, y en consecuencia promueve su localización citoplasmática (Song et al., 2008).

4.3 Funciones de PTEN

PTEN es una fosfatasa dual no redundante cuyos sustratos pueden ser lípidos de la familia del fosfatidilinositol o proteínas fosforiladas en serinas o treoninas. Una de las primeras funciones descritas para PTEN fue la regulación negativa de la ruta de señalización de la PI3K (Stambolic et al., 1998; Haas-Kogan et al., 1998). En respuesta a estímulos positivos como el de los factores de crecimiento, la proteína PI3K fosforila al PI(4,5)P₂ y lo convierte a PI(3,4,5)P₃, que es un segundo mensajero que activa a la proteína Akt, lo que finalmente favorece la proliferación celular, progresión del ciclo celular, aumento en la síntesis de proteínas, supervivencia, angiogénesis y migración. PTEN, por su actividad fosfatasa, elimina el grupo fosfato en la posición 3' del anillo de inositol en el PI(3,4,5)P₃, y de esta forma regula negativamente los niveles del segundo mensajero e induce apoptosis, demostrándose la importancia de dicha actividad para su acción como proteína supresora de tumores (Chow y Baker, 2006; Salmena et al., 2008).

Sin embargo, PTEN tiene otras funciones nucleares que son independientes de su actividad fosfatasa. En este sentido, se ha descrito que PTEN regula positivamente la estabilidad del supresor de tumores p53, por interacción directa con esta proteína. Además, PTEN regula la actividad transcripcional de p53, modulando la unión específica de p53 al ADN (Freeman et al., 2003). Por otro lado, PTEN regula la acetilación de p53 en respuesta al daño en el ADN, a través de su interacción con la enzima nuclear acetiltransferasa de histona p300. Esta interacción, promovida a su vez por la acetilación de p53, es necesaria para el control de la parada del ciclo celular mediada por PTEN (Li et al., 2006). PTEN también es capaz de modular negativamente los niveles y la localización nuclear de la ciclina D1, promoviendo así una parada del ciclo celular (Radu et al., 2003). Otros autores demuestran también la implicación de la proteína PTEN en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. PTEN interacciona con la proteína CENP-C, que es una proteína centromérica y clave en la regulación de la segregación cromosómica durante la mitosis. La ausencia de PTEN en las células provoca la rotura de los centrosomas y la translocación aberrante de los mismos (Shen et al., 2007). Finalmente, PTEN regula positivamente los niveles de la proteína Rad51, proteína implicada en reparación del ADN (Shen et al., 2007).

Se ha descrito también una relación entre la ausencia de PTEN y la entrada en senescencia, en un modelo de cáncer de próstata murino. Estos estudios demostraron que la

pérdida completa de expresión de PTEN conducía a un aumento en los niveles de la proteína p53 y a una parada irreversible del crecimiento de las células, consistente con la entrada en senescencia. En ratones con delección de ambos genes, se producía la formación de tumores altamente invasivos, indicando que la senescencia era dependiente de la presencia de p53 (Chen et al., 2005).

5. La proteína supresora de tumores PML

El gen que codifica para PML fue identificado en la traslocación cromosómica t(15:17) en la leucemia promielocítica aguda (APL) (de The et al., 1991; Kakizuka et al., 1991). Esta traslocación produce una proteína de fusión oncogénica entre PML y el receptor alfa del ácido retinoico (RAR α), afectando a las funciones de ambas proteínas, incluidas la formación de los cuerpos nucleares de PML (PML-NB) y la actividad transcripcional del RAR α (Wang et al., 1998a).

5.1 Estructura de la proteína PML

Existen 7 isoformas distintas de la proteína PML, que resultan del empalme alternativo del ARNm (Fagioli et al., 1992). En el extremo N-terminal se encuentra un dominio RING (aminoácidos 45-105), la caja Beta 1 (aminoácidos 124-166), la caja Beta 2 (aminoácidos 184-230), el dominio C (aminoácidos 229-323) y el dominio exonucleasa (aminoácidos 600-750, solo en PML-I) (Salomoni et al., 2008).

5.2 Funciones de PML y los PML-NB

La proteína supresora de tumores PML es el principal componente de los denominados cuerpos nucleares de PML (PML-NB), detectados como estructuras punteadas intranucleares. Se denominaron así debido a que la presencia de PML es necesaria para la formación de dichas estructuras. Hoy se sabe que SUMO es también necesario para que PML pueda reclutar al resto de los componentes de estos cuerpos nucleares. Los PML-NB están presentes en la mayoría de las células de mamíferos y su cantidad varía entre 1 a 30 cuerpos por núcleo, dependiendo del tipo celular, la fase del ciclo y el estado de diferenciación (Figura 7) (Dellaire y Bazett-Jones, 2004). Los PML-NB se han relacionado con la regulación de diversas funciones celulares tales como la inducción de apoptosis y senescencia, la inhibición de la proliferación, estabilidad genómica y la respuesta antiviral (Salomoni et al., 2008).

Las primeras evidencias del papel de PML en la apoptosis, surgieron al analizar ratones deficientes en el gen *Pml*, observando que estos y sus células eran resistentes a estímulos

inductores de la apoptosis como la radiación γ y el CD95/Fas (Wang et al., 1998b). Asimismo, células derivadas de estos ratones como esplenocitos, timocitos, fibroblastos embrionarios y células hematopoyéticas son resistentes a la apoptosis inducida por ceramidas, TNF α , IFN, radiación ultravioleta y drogas quimioterapéuticas (Louria-Hayon et al., 2003; Wu et al., 2003; Bernardi et al., 2004). La participación de PML en la apoptosis puede ser dependiente o independiente de p53. Se ha observado que PML recluta a p53 a los PML-NB, promoviendo su acetilación y fosforilación. Además, PML se une e inhibe a Mdm2, el principal regulador negativo de p53 (Bernardi et al., 2004; Dellaire y Bazett-Jones, 2004). Sin embargo, PML también puede inducir la apoptosis de manera independiente de p53, mediante la autofosforilación y activación de la proteína CHK2 en respuesta al daño al ADN (Yang et al., 2006).

La senescencia es un mecanismo de supresión tumoral que implica la parada irreversible del ciclo celular y de la proliferación. Se ha descrito que la sobreexpresión de la isoforma PML-IV induce la senescencia replicativa en células primarias humanas y en fibroblastos embrionarios de ratón (Bischof et al., 2002; Mallette et al., 2004). Asimismo, PML es necesario en la senescencia inducida por la expresión del oncogen mutado H-ras V12 (Pearson et al., 2000).

La interacción entre los PML-NB y los virus de ADN o ARN ha sido ampliamente estudiada. Los primeros datos se obtuvieron al observar que la infección de células con el virus herpes simplex tipo 1 provocaba una destrucción de los PML-NB, y este efecto no se observaba al infectar con un virus mutante deficiente para la proteína ICP0, lo que permitió la rápida identificación de esta proteína como un factor necesario para la degradación de los PML-NB. Posteriormente, se demostró que ICP0 es una E3 ligasa de ubiquitina que promueve la degradación de la proteína PML modificada por SUMO1 (Tavalai y Stamminger, 2008). Adicionalmente, se demostró que la proteína LANA2 del herpesvirus del sarcoma de Kaposi (KSHV), destruye los PML-NB favoreciendo la modificación de PML por SUMO2 y ubiquitina, y la degradación de PML por un mecanismo dependiente del proteasoma (Marcos-Villar et al., 2009). El que los PML-NB fueran un objetivo para muchos virus sugería que PML o los PML-NB ejercían algún tipo de actividad antiviral. En este sentido, se ha descrito que la expresión de PML afecta la replicación de algunos virus de ARN, como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la influenza y algunos retrovirus (Chelbi-Alix et al., 1998; Regad et al., 2001a).

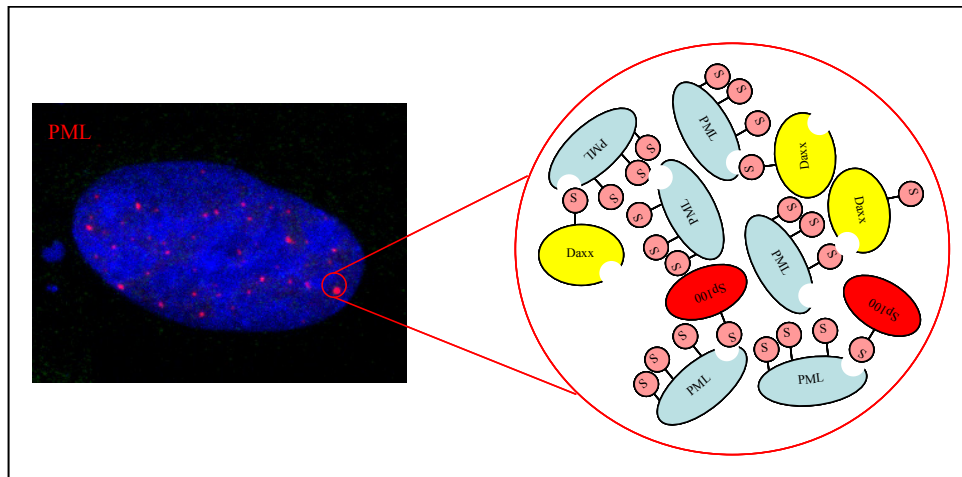


Figura 7. Estructura de los cuerpos nucleares de PML (PML-NB). Modelo de la estructura de los PML-NB mostrando cómo la proteína PML interacciona con otros componentes de los PML-NB tales como Sp100 y Daxx así como con otras moléculas de PML a través de SUMO. Estas interacciones son dependientes de la sumoilación de PML y de la presencia del dominio de interacción con SUMO (SIM) en PML.

5.3 Regulación de PML

En células normales la expresión de PML varía en función del tejido, tipo celular y estado de diferenciación. La transcripción del gen de *Pml* es regulada positivamente por el IFN α/β o γ y por p53 (Stadler et al., 1995; de Stanchina et al., 2004).

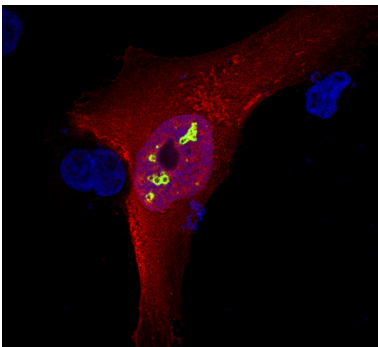
PML también es regulado a través de diferentes modificaciones post-traduccionales. Recientemente se ha demostrado que la proteína quinasa activada por mitógenos (ERK) fosforila a PML. Esta fosforilación induce la sumoilación de PML y la apoptosis en respuesta al tratamiento con trióxido de arsénico (Hayakawa et al., 2004). Por otro lado, la fosforilación de PML por la quinasa caseína-2, regula negativamente los niveles de PML favoreciendo la degradación vía ubiquitina-proteasoma (Scaglioni et al., 2006).

Una de las modificaciones post-traduccionales mejor estudiadas en PML es la sumoilación. PML se une directamente a SUMO y a la enzima conjugadora de SUMO Ubc9, promoviendo la conjugación de SUMO a los residuos de lisinas K65, K160 y K490 (Duprez et al., 1999). Se demostró que la sumoilación de PML es necesaria para la formación de los PML-NB, al observar que un mutante de PML para SUMO era incapaz de reclutar a los componentes clásicos de los PML-NB, como Sp100 o Daxx, entre otros (Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000). Por otro lado, muchas de las proteínas que se localizan en los PML-NB también son modificadas por SUMO, y además se ha descrito que el dominio RING de PML es necesario para la sumoilación eficaz de esta proteína (Shen et al., 2006), sugiriendo que PML podría actuar como una E3 ligasa de SUMO. Adicionalmente, PML posee un motivo de unión a

SUMO (dominio SIM) que es necesario para la formación de los PML-NB, pues le permite interactuar con otras proteínas modificadas por SUMO, incluida la propia PML (Shen et al., 2006).

6. Papel de las proteínas supresoras de tumores en la replicación viral

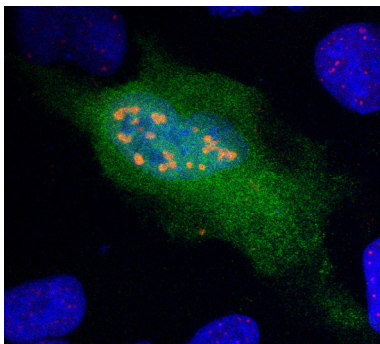
La conexión funcional entre las proteínas supresoras de tumores y la infección viral viene de muy antiguo. En este sentido, los principales supresores tumorales se han identificado como dianas de proteínas de virus oncogénicos (Lane et al., 1979). Además, recientemente se ha demostrado que algunos supresores tumorales tales como p53, PML, ARF y Rb, juegan un papel relevante en el control de la infección viral (Everett and Chelbi-Alix, 2007; García et al., 2006a; García et al., 2009; Muñoz-Fontela et al., 2005; Takaoka et al., 2003). Además, algunas de estas proteínas están reguladas por el sistema del interferón, que es uno de los principales mecanismos de defensa contra las infecciones virales. Todos estos datos sugieren que las proteínas supresoras de tumores podrían funcionar también como sensores frente a las infecciones virales.



OBJETIVOS

Los virus han desarrollado una variedad de mecanismos para evadir las defensas de la célula huésped con el objetivo de favorecer su replicación viral. Por otro lado, las células presentan múltiples estrategias para controlar y hacer frente a estos microorganismos. En este estudio abordamos ambos aspectos. Los objetivos de este trabajo son:

- 1- Estudiar cómo la modificación de proteínas virales por ubiquitina o SUMO altera la funcionalidad de las mismas.
- 2- Evaluar cómo los virus modulan los procesos de sumoilación y ubiquitinación de proteínas celulares.
- 3- Analizar las implicaciones de estas modificaciones post-traduccionales sobre la infección viral y en procesos patológicos.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de células

Las líneas celulares MCF-7 (células de tumor mamario), HEK-293 (células embrionarias de riñón humano), BSC40 (células epiteliales de riñón de mono verde africano), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), U251-MG (glioblastoma), HeLa (adenocarcinoma de cuello de útero) y BHK-21 (células de riñón de hamster) fueron crecidas en medio de Eagle modificado por Dubecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (STF) (Gibco), 5 mmol/L de L-Glutamina (Invitrogen), penicilina (5×10^4 U/mL) y estreptomycin (2 mg/mL (Invitrogen). Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) fueron aislados y cultivados a partir de ratones salvajes (WT), *Super PTEN* (con una copia extra del gen de PTEN) y *PTEN +/-*. Para extraer los MEFs se sacrificó a una hembra a los 13.5 días de gestación y se dispuso el útero en una placa de cultivo con tampón PBS con antibióticos y antimicóticos. Una vez individualizados los embriones, se eliminó la cabeza y los órganos rojos. El resto del embrión se disgregó con un bisturí en una placa en la que se había dispuesto 1 mL de tripsina 2x y se incubó a 37 °C durante 45 minutos. A continuación se añadió medio DMEM con 10 % de STF y se transfirieron las células a un frasco de cultivo de 75 cm². Al día siguiente se cambió el medio de cultivo y cuando las células alcanzaron la confluencia, se trataron con tripsina y se transfirieron a un frasco de 150 cm² donde fueron mantenidas hasta alcanzar la confluencia. Estas células se consideraron el pase 0. Las células se trataron con tripsina y se congelaron en medio de congelación constituido por 90 % de STF y 10 % de DMSO (Sigma).

2. Cultivo y manipulación de bacterias

La cepa DH5a de *Escherichia coli* fue crecida en medio LB líquido o en placas de agar con sus respectivos antibióticos. Las bacterias competentes y las transformaciones se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en “Current Protocols in Molecular Biology” (Earl y Moss, 1991).

3. Transfección celular

La transfección de las líneas celulares MCF-7, HEK-293, U251-MG y PC-3 se llevó a cabo usando el reactivo FuGENE (Roche). Para ello, las células se sembraron al 80 % de confluencia y se preparó una dilución del reactivo en medio DMEM sin suero. Tras 5 minutos de incubación se añadió el ADN en una proporción 3 de reactivo: 1 de ADN. Después de incubar la mezcla durante 30 minutos, se añadió sobre las células. Para la transfección de las células HeLa se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El reactivo y el ADN se diluyeron por separado en medio DMEM sin suero y se incubaron durante 5 minutos. Después de la

incubación, ambas soluciones se mezclaron. Esta solución se incubó durante 20 minutos y a continuación se añadió a las células sembradas a una densidad del 90 %. Tras 4 h de incubación con la mezcla de transfección, se cambió el medio a las células para evitar la toxicidad del reactivo.

4. Virus y titulación viral por el método de formación de placas

Los virus utilizados en los experimentos de infección fueron: cepa Indiana del virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus vaccinia (VACV), virus sindbis (SV) y el VACV que carecía del gen E3L (VACV- Δ E3L). La titulación se realizó por el método de formación de placas. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de los distintos virus en medio DMEM sin suero y con dichas diluciones se infectaron durante 1 hora y en duplicado monocapas de células BSC-40 crecidas en placas de 12 pocillos. Tras ese tiempo, el virus fue removido y se agregó a los pocillos una solución de agar al 0.9 % en medio DMEM con 2 % de STF. Una vez solidificado el agar, las células fueron incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas. Después de ese tiempo, la mezcla de agar-DMEM se retiró de los pocillos y se tiñeron las placas con cristal violeta al 0.1 %. El título viral se expresó como el número de partículas virales formadoras de placas por mL (ufp/mL).

5. Evaluación de la replicación viral

Las células empleadas en cada caso se infectaron con los virus indicados a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5 a 7.5 unidades formadoras de placa por célula (ufp/célula), según el experimento. Tras la destrucción completa de la monocapa celular se recogió el sobrenadante (VSV) o las células (VACV) y la cantidad de virus presente en dichas soluciones se cuantificaron en células BSC-40 o BHK-21 mediante el método de formación de placas.

6. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron: pCI-neo y pCI-neo-E3 (García et al., 2002), pSG5L-HA-PTEN (Addgene 10750) (Ramaswamy et al., 1999), pcDNA3.1 y pcDNA-His-lacZ (Invitrogen), pcDNA-His6-SUMO1 (Desterro et al., 1998), pcDNA-His6-SUMO2 (Vertegaal et al., 2006), pcDNA-Ubc9, pcDNA-His6-Ubiquitina (Treier et al., 1994), HA-PML (Dr. Jin-Hyun Ahn, Escuela universitaria de medicina de Sungkyunkwan, Corea del Sur), pcDNA-His-PML4-TKO y HA-PML- Δ SIM (Marcos-Villar et al., 2009), pcDNA-His-PML4 (Dr. Kun-Sang Chang, MD Anderson Cancer Center, Houston), Flag-SENP1, GFP-USP7 y

pcDNA-His6-ubiquitina-KO (Dr. Manuel S. Rodríguez, CIC BioGUNE, Universidad del País Vasco), PUMA-luc (Dr. Manuel Serrano, CNIO, Madrid) y pRL-V40 (Promega).

7. Mutagénesis dirigida

Para generar los plásmidos con mutaciones en sitios específicos, se utilizó el método descrito en el kit comercial “Quick change Site Directed Mutagenesis” (Stratagene). Se diseñaron oligonucleótidos (sentido y antisentido) de unos treinta pares de bases correspondientes a las regiones que se querían mutar y con las mutaciones puntuales deseadas. Estos oligonucleótidos fueron utilizados como cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como molde los plásmidos pCI-neo-E3 (Tabla 1) o pSG5L-HA-PTEN (Tabla 2). Los productos de PCR fueron confirmados por secuenciación.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de la proteína E3 del VACV.

Oligonucleótido	Secuencia
E3L-K40R-F	5'-CAACTTAATATGGAGAGGCGAGAAGTTAATAAAGC-3'
E3L-K40R-R	5'-GCTTTATTAACTTCTCGCCTCTCCATATTAAGTTG-3'
E3L-K99R-F	5'-GAGAGAGGATCATAGGTCTTTTGATGATGTTATTCCG-3'
E3L-K99R-R	5'-CGGAATAACATCATCAAAGACCTATGATCCTCTCTC-3'
E3L-119ATAA122-F	5'-GGTGCTAACCCCTGCCACCGCTGCTAATGAGTACTGCC-3'
E3L-119ATAA122-R	5'-GGCAGTACTCATTAGCAGCGGTGGCAGGGTTAGCACC-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de PTEN.

Oligonucleótido	Secuencia
PT-K266A-F	5'-CAGAACAAGATGCTAGCAAAGGACAAAATG-3'
PT-K266A-R	5'-CATTTTGTCTTTGCTAGCATCTTGTCTG-3'
PT-K289A-F	5'-GAGGAAACCTCAGAAGCAGTAGAAAATGGAAG-3'
PT-K289A-R	5'-CTTCCATTTTCTACTGCTTCTGAGGTTTCCTC-3'
PT-E291A-F	5'-CCTCAGAAAAAGTAGCAAATGGAAGTCTATG-3'
PT-E291A-R	5'-CATAGACTTCCATTTGCTACTTTTTCTGAGG-3'

8. Extracción y cuantificación del ADN plasmídico

Para las extracciones del ADN plasmídico se utilizaron dos procedimientos de acuerdo al volumen de cultivo de bacterias competentes empleado. Para volúmenes pequeños (3 a 5 mL) la extracción se realizó utilizando el kit comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit (250)” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para volúmenes de 250 a 500 mL la extracción del ADN se llevo a cabo usando el kit comercial “Plasmid Midi Kit (25)” (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el ADN se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

9. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-E3 de ratón (Bernie Moss, NIH, USA), anti-E3 de conejo (Biomedal), anti-VACV de conejo (generado contra VACV purificado, cepa WR), anti-SUMO1 de conejo (Invitrogen), anti-SUMO2 de conejo (Zymed laboratorios), anti-actina de ratón (MP Biomedicals), anti-GFP de ratón (Clontech), anti-PTEN de ratón y anti-PTEN de conejo (Cell Signaling), anti-PML de conejo de Santa Cruz Biotechnology, anti-PML de conejo de Novus Biologicals, anti-VSV y anti-eIF2 α de conejo (cedidos por el Dr. Mariano Esteban, CNB), anti-B23 de ratón (Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH de ratón (Applied Biosystems), anti-HA de rata (Roche), anti-HA de ratón (Covance), anti-eIF2a fosforilado de conejo (Bioscience) y los anti-PARP, anti-AKT total, anti-AKT foforilado en serina 473, anti-Ik β total, anti-Ik β foforilado en serina 32 y 36 fueron generados en conejo (Cell Signaling). Además, se emplearon los anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), anti-IgG de conejo conjugado a HRP, anti-IgG de rata conjugado a HRP (Amersham), anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 o Alexa 594 y anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488 o a Alexa 594 (Invitrogen).

10. Inmunoblot e inmunoprecipitación

Para el análisis por inmunoblot las células fueron lavadas con PBS, lisadas en tampón de carga para proteínas (125 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 5 % de SDS; 25 % de glicerol y 2 % de azul de bromofenol. Se añade 1:5 de volumen final de 1 M de DTT justo antes de usar) y hervidas durante 5 minutos. A continuación, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en tampón de electroforesis (3,028g/L de glicina y 1 g/L de SDS), transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF en tampón de transferencia (2,5 mM de Tris base; 19,2 mM de glicina; 0,37 g/L de SDS y 20 % de metanol) y finalmente incubadas con los correspondientes anticuerpos. Las membranas se lavaron en tampón TBST

(10 mM de Tris base, pH 7,4; 150 mM de NaCl y 0,05 % de Tween 20). Para el análisis de inmunoprecipitación, las células fueron lavadas en PBS y lisadas en el tampón RIPA (20 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM de EDTA y 1 % de Tritón X-100) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas y N-etil maleimida (NEM). Después de sonicar brevemente, los lisados fueron centrifugados para eliminar los restos celulares y el sobrenadante fue incubado con el anticuerpo apropiado durante toda la noche a 4°C. A continuación, se añadió al lisado una mezcla al 50 % de proteína A-sefarosa y se incubó a 4°C durante 2 horas. Después, la resina se lavó 5 veces con tampón RIPA. Finalmente, añadimos tampón de carga a la resina, se hirvió durante 5 minutos y los complejos de proteínas precipitadas se analizaron mediante inmunoblot.

11. Transcripción/traducción de proteínas *in vitro*

La transcripción/traducción *in vitro* de las proteínas E3 y PTEN fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 50 μL , utilizando 1 μg del ADN de los plásmidos pCI-neo-E3 o pSG5L-HA-PTEN, 40 μL de los reticulocitos de conejo del “TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System” (Promega) y 1 μL de “EasyTag Express Protein Labeling Mix [^{35}S]” (Perkin Elmer).

12. Conjugación de SUMO *in vitro*

La conjugación de SUMO *in vitro* se llevo a cabo utilizando las proteínas E3 y PTEN que habían sido transcritas y traducidas *in vitro* en presencia de metionina marcada radiactivamente, como se describe en el apartado anterior. Dichas proteínas se mezclaron, en un volumen final de 10 μL , con 0.3 μg de la enzima E1 recombinante (Biomol), un sistema de regeneración de ATP (50mM de Tris pH 7.6, 5mM de MgCl_2 , 2mM de ATP, 10mM de fosfato de creatinina, 3.5 U/mL de creatinina quinasa y 0.6 U/mL de pirofosfatasa inorgánica), 600 ng de Ubc9 y 10 μg de SUMO1 o SUMO2 y se incubaron a 30°C durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo las reacciones se pararon agregando tampón de carga de proteínas. Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS (10 y 12 %) y revelados por autorradiografía.

13. Purificación de proteínas fusionadas a la etiqueta de Histidinas

Células MCF-7 o HEK-293, crecidas en placas de 100 mm fueron transfectadas con distintas combinaciones de plásmidos: pCI-neo-E3 o pSG5L-HA-PTEN, junto con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 o pcDNA-His6-SUMO2; pCI-neo-E3 junto con pcDNA-His6-

ubiquitina o el vector vacío o bien pSG5L-HA-PTEN junto con pcDNA-His6-ubiquitina-KO o el vector vacío. Después de 36 h de transfección, las células fueron lisadas en 500 μ L del tampón G (6M de guanidina-HCl, 0.1M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.01M de Tris-HCl pH 8, 5mM de imidazol y 10mM de β -mercaptoetanol) y los extractos obtenidos se incubaron con 50 μ L de la resina de agarosa-Ni²⁺-NTA durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina de agarosa se lavó 4 veces con tampón U [8M de Urea, 100 mM tampón fosfato, pH 8.0 (1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 M Na_2HPO_4) y 1 M de Tris-HCl, pH 8.0] y finalmente se resuspendió en tampón de carga de proteínas. Una vez hervidas durante 5 minutos, las proteínas se analizaron empleando la técnica de inmunoblot.

14. Marcaje proteico *in vivo*

Las células en cultivo a marcar se lavaron con medio DMEM sin metionina y cisteína. A continuación, las células se incubaron en este medio durante 60 minutos. Tras esta incubación, se retiró el medio y se agregó medio fresco DMEM sin metionina y cisteína, suplementado con 50 μ Ci/mL de “EasyTag Express Protein Labeling Mix, [³⁵S]” (Perkin Elmer). Transcurrido 30 minutos de esta incubación, las células se recogieron en tampón de carga de proteínas. Los extractos de proteínas fueron separados por electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS y revelados por autorradiografía.

15. Ensayo de interacción por precipitación de proteínas de fusión con GST

Estos experimentos se realizaron usando extractos de proteínas obtenidos de células transfectadas con los plásmidos pCI-neo-E3 o pCI-neo-E3 Δ SIM e incubadas en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 o con proteína PTEN generada mediante transcripción-traducción *in vitro*. Dichos extractos se incubaron con GST o GST-SUMO1 inmovilizados en glutation sefarosa, durante toda la noche a 4 °C en tampón de unión (50 mM de Tris-HCl pH 7.8, 150 mM de NaCl, 0.5 mM de EDTA, 0.1 % (vol/vol) de Triton X-100, 0.1 % (vol/vol) de Nonidet P-40, 5 mM de MgCl_2 , 10 % (vol/vol) de glicerol, 50 μ M de ZnCl_2 y una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche). Tras la incubación, la resina de glutation sefarosa se lavó cuatro veces en tampón de unión, se resuspendió en tampón de carga de proteínas y se hirvió durante 5 minutos. Finalmente, las proteínas fueron separadas en geles de poli-acrilamida-SDS y analizadas por inmunoblot.

16. Fraccionamiento subcelular

Para separar las fracciones nuclear y citoplasmática de las células usamos el kit comercial “Nuclear/Cytosol Fractionation kit” (Biovision) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS, recogidas y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos. A continuación, las células se incubaron en 200 μ L del tampón CEB-A (suplementado con DTT e inhibidores de proteasas) durante 10 minutos en hielo. Tras esta incubación, agregamos 11 μ L del tampón B de extracción de citoplasma. Transcurrido 1 minuto en hielo, centrifugamos los tubos durante 5 minutos a 16000 g, transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo (fracción citoplasmática) y lo almacenamos a -70 °C. Los precipitados (conteniendo los núcleos) se resuspendieron en 100 μ L de tampón de extracción de núcleos. Repetimos este último paso cada 10 minutos al menos 4 veces. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 16000 g durante 10 minutos. Finalmente, los sobrenadantes (fracción nuclear) fueron transferidos a tubos nuevos y se almacenaron a -70 °C.

17. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio estériles dispuestos en placas de 24 pocillos y se trataron como correspondía a cada experimento. A continuación, las células se lavaron con PBS y se fijaron usando una solución de paraformaldehído al 2 % en PBS durante 30 minutos. Tras este tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron empleando una solución de Triton X-100 al 0.25 % en PBS durante 30 minutos. Las células se lavaron nuevamente con PBS y se bloquearon en una solución de albúmina bovina sérica (BSA) al 2 % en PBS. Posteriormente, las células se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos como indicaban los fabricantes. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 60 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en una solución 0.1 mg/mL de DAPI (Sigma) en PBS. Las preparaciones se montaron en portaobjetos con Prolong (Invitrogen) y las imágenes fueron analizadas con un microscopio confocal Lasser BioRad Radiante 2100. Los análisis de co-localización se llevaron a cabo con el programa Lasser Pix (Image Pro).

18. Ensayo de genes reportero

Células MCF-7 cultivadas en placas de 24 pocillos se co-transfectaron con el plásmido reportero PUMA-luc y los plásmidos indicados en cada caso. En todas las transfecciones se utilizó el vector vacío pCI-neo para mantener igual la cantidad de ADN total y en todos los

casos, para determinar la eficiencia de transfección, se co-transfectó el vector control pRL-V40 (Promega) o el pcDNA-His-lacZ (Invitrogen). La actividad luciferasa se determinó usando el Kit comercial “Dual Luciferase Reporter Assay” (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, 48 horas después de la transfección las células se lavaron en tampón PBS, se lisaron en 100 μ L del tampón de lisis y a continuación se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos. La actividad luciferasa se midió mezclando 20 μ L de los sobrenadantes con 100 μ L del reactivo del kit comercial. Las muestras se midieron en un luminómetro Orion (Berthold Detection Systems). Todos los experimentos se hicieron en triplicado y cada experimento fue repetido al menos tres veces.

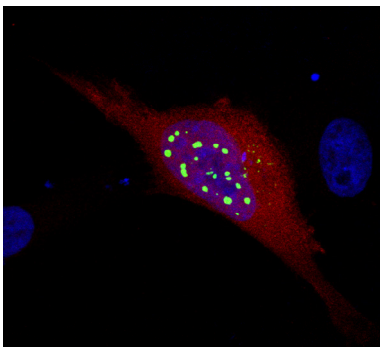
19. Programas informáticos

Para el análisis de los dominios de unión a SUMO de las proteínas E3 y PTEN utilizamos los siguientes programas bioinformáticas de predicción:

- SUMOplot Analysis Program (<http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot/login.asp>)
- SUMOsp 2.0 SUMOylation Site Prediction (<http://sumosp.biocuckoo.org>).

20. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevo a cabo utilizando la prueba paramétrica t de Student.



RESULTADOS

1. Regulación de la proteína E3 del virus vaccinia por SUMO y ubiquitina

1.1 La proteína E3 co-localiza con SUMO1 en células infectadas con VACV

Previamente se había demostrado que SUMO1 era reclutado a las factorías virales que se forman en las células infectadas con VACV (Palacios et al., 2005). Por otro lado, se había demostrado la interacción de SUMO1 con la proteína E3 de VACV, mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras (Rogan y Heaphy, 2000). Con estas evidencias, decidimos analizar la co-localización entre E3 y SUMO1 en las factorías virales. En primer lugar células MCF-7 fueron infectadas con VACV y 4 horas después de la infección, las células se tiñeron con los anticuerpos anti-VACV y anti-SUMO1. En células no infectadas, SUMO1 mostraba una localización nuclear con patrón punteado (Figura 8A). Por el contrario, en las células infectadas con VACV, SUMO1 era reclutado a las factorías virales (Figura 8A). Cuando las células infectadas se tiñeron con los anticuerpos anti-E3 y anti-SUMO1, el análisis por microscopía confocal reveló una clara co-localización de ambas proteínas en las factorías virales (Figura 8B).

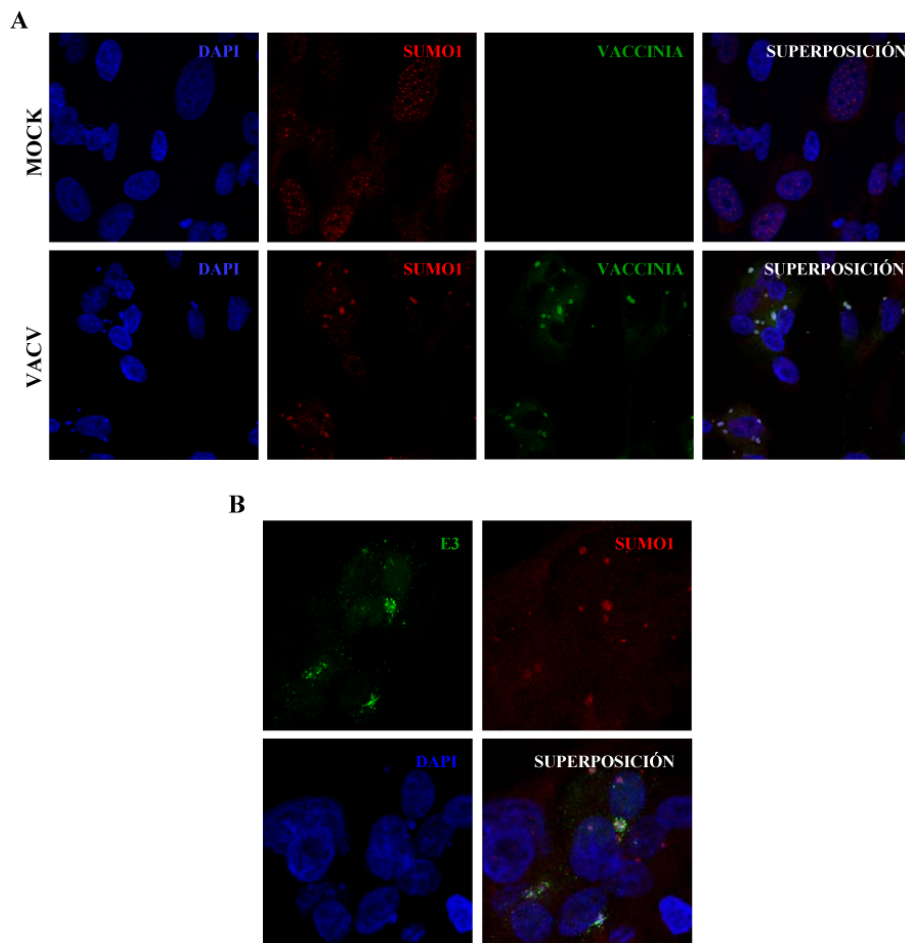


Figura 8. La proteína E3 de VACV co-localiza con SUMO1 en las factorías virales. **A.** SUMO1 es reclutado a las factorías virales. Células MCF-7 fueron infectadas con la cepa WR de VACV durante 4 h. Tras ese tiempo, las células se fijaron y tiñeron con DAPI y con los anticuerpos anti-SUMO1 y anti-VACV. **B.** SUMO1 co-localiza con E3 en las factorías virales. Células MCF-7 fueron infectadas con VACV y a las 4 h de iniciada la infección fueron fijadas y teñidas con DAPI y con los anticuerpos anti-SUMO1 y anti-E3. Las imágenes se analizaron por microscopía confocal.

1.2 La proteína E3 interacciona con SUMO de forma covalente

1.2.1 Interacción covalente de E3 con SUMO1 y SUMO2 *in vitro*

Con el objetivo de analizar si E3 interacciona con SUMO de forma covalente, llevamos a cabo un ensayo de sumoilación *in vitro* empleando la proteína E3 sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina como sustrato. La proteína E3 sintetizada *in vitro* se detectó como dos bandas de alrededor de 15 y 22 kDa (Figura 9A). Cuando se agregó SUMO1 a la reacción de sumoilación, aparecieron unas bandas adicionales de alto peso molecular, que corresponden con E3-SUMO1 (Figura 9A, flechas). Cuando se añadió SUMO2 a la reacción de sumoilación, se observaron numerosas bandas de alto peso molecular (Figura 9A). Para reconfirmar que dichas bandas corresponden con E3 sumoilado, la proteína E3-SUMO2, se incubó en una reacción de desumoilación en presencia de GST o GST-SENP1. La incubación de la proteína E3-SUMO2 con SENP1 provocó la desaparición de las bandas de alto peso molecular correspondientes con E3-SUMO2 (Figura 9B), demostrando que la proteína E3 sintetizada *in vitro* se conjuga covalentemente a SUMO.

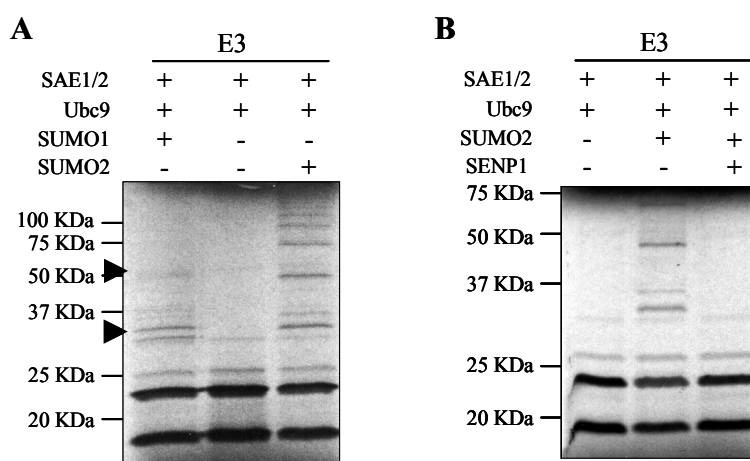


Figura 9. La proteína E3 interacciona covalentemente con SUMO1 y con SUMO2 *in vitro*. **A.** Conjugación de SUMO1 y SUMO2 a E3 *in vitro*. E3 sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina fue utilizada como sustrato en un ensayo de sumoilación *in vitro* en presencia de SUMO1 o SUMO2. **B.** Desumoilación de la proteína E3 por la

desumoilasa SENP1. La proteína E3 sintetizada *in vitro* y conjugada a SUMO2 fue incubada con GST o GST-SENP1 como se indica.

1.2.2 Modificación de E3 por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*

Para analizar si E3 se sumoila también *in vivo*, células HEK-293 fueron co-transfectadas con plásmidos que codifican para E3 (pCI-neo-E3) junto con pcDNA o pCI-neo-E3 junto con Ubc9 (pcDNA-Ubc9) y SUMO1 (pcDNA-His6-SUMO1) o SUMO2 (pcDNA-His6-SUMO2) y los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina, purificadas por afinidad a columnas de níquel, fueron analizadas por inmunoblot usando el anticuerpo anti-E3. Como esperábamos, el análisis de los extractos obtenidos a partir de las células co-transfectadas con pCI-neo-E3 y pcDNA revelaba 2 bandas de alrededor de 15 y 22 kDa (Figura 10A). Sin embargo, cuando se co-transfectó pcDNA-His6-SUMO1 junto con E3, en los extractos purificados se detectaron bandas de alto peso molecular del tamaño esperado correspondientes con E3-SUMO1 (Figura 10A, flechas). Además, el análisis de los extractos obtenidos a partir de células transfectadas con pcDNA-His6-SUMO2 reveló la presencia de bandas de alto peso molecular que se corresponden con E3-SUMO2, tal y como se demostró al analizar por inmunoblot los extractos purificados (Figura 10B).

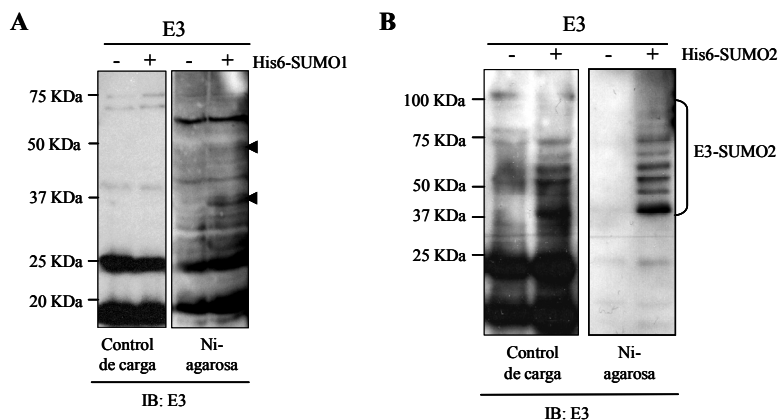


Figura 10. E3 es modificada covalentemente por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3 junto con pcDNA o pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas con columnas de níquel, se analizaron por inmunoblot (IB) usando el anticuerpo anti-E3 (A). Células HEK-293 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3 junto con pcDNA o pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas con columnas de níquel, se analizaron por inmunoblot (IB) usando el anticuerpo anti-E3 (B).

1.2.3 E3 producida por el virus es modificada por SUMO1 y SUMO2

Para demostrar que la proteína E3 producida por el virus también es modificada por SUMO, células HEK-293 transfectadas con pcDNA, con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 o con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 fueron infectadas con VACV. Los extractos de proteína total o las proteínas purificadas unidas a histidina se analizaron por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. Después de la purificación de los complejos de proteínas unidas a histidinas, identificamos conjugados correspondientes con E3-SUMO1 (Figura 11A, flechas) y bandas de E3-SUMO2 (Figura 11B) únicamente en aquellas células transfectadas con pcDNA-His6-SUMO1 o pcDNA-His6-SUMO2, respectivamente. Estos resultados demuestran que la proteína E3 producida por el virus es modificada por SUMO1 y SUMO2.

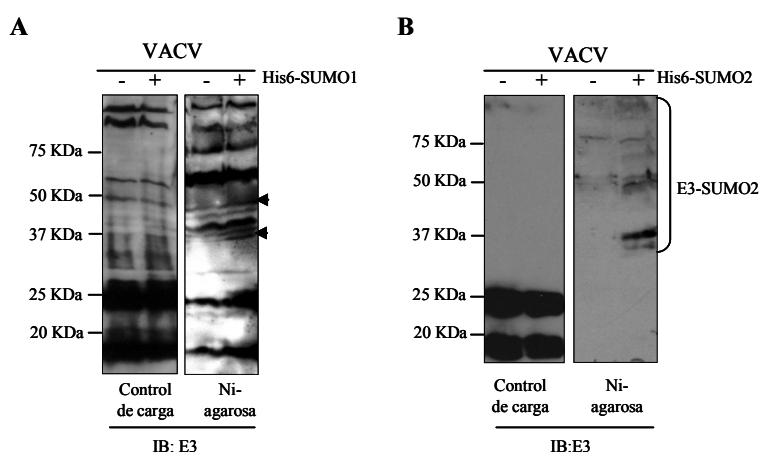


Figura 11. La proteína E3 producida por el virus es modificada por SUMO1 y SUMO2. Células HEK-293 fueron transfectadas con pcDNA, con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 (A) o con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 (B) e infectadas con VACV. Transcurridas 5 h de la infección los extractos de proteínas totales o las proteínas unidas a histidina, purificadas usando columnas de níquel, fueron analizados por inmunoblot (IB) con el anticuerpo anti-E3.

1.3 Los residuos de lisina 40 y 99 de la proteína E3 son los principales sitios de conjugación a SUMO

1.3.1 La proteína E3 presenta dominios de unión covalente a SUMO

Una vez determinado que la proteína E3 de VACV es modificada por SUMO, decidimos identificar la región de E3 implicada en esta modificación post-traduccional. La mayoría de las proteínas modificadas por SUMO, se caracterizan por tener un residuo de lisina dentro de la secuencia consenso Ψ KxE (donde Ψ es un residuo hidrofóbico, K es la lisina

modificada, x es cualquier aminoácido y E es ácido glutámico). El análisis de la secuencia aminoacídica de E3 usando los programas de predicción SUMOplot y SUMOsp, reveló una secuencia consenso para la conjugación de SUMO en la posición 39EKRE42 y otro dominio no conservado que podría conjugar a SUMO en la posición 98HKSF101 (Figura 12A, en rojo). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína E3 demostró, además, que el residuo de lisina K40 está altamente conservado dentro de los poxvirus (Figura 12B, panel izquierdo). Adicionalmente, y en base a su localización en la estructura de la proteína E3, este residuo parece estar expuesto (Figura 12B, panel derecho, en amarillo).

A

MSKIYIDERS	NAEIVCEAIK	TIGIEGATAA	QLTRQLNMEK	REVNKALYDL	QRSAMVYSSD	DIPPRWFMTT
80	90	100	110	120	130	140
EADKPDADAM	ADVIIDDVSR	EKSMREDHKS	FDDVIPAKKI	IDWKGANPVT	VINEYCQITR	RDWSFRIESV
150	160	170	180	190		
GPSNSPTFYA	CVDIDGRVFD	KADGKSKRDA	KNNAAKLAVD	KLLGYVIIRF		

B

Vaccinia E3	31	QLTRQLNMEKREVNKALYDL	50
Cantagalo virus	31	QLTRQLNMEKRRKVNKALYDL	50
Orf virus	24	QIAKELGISKHEANRQLYRL	43
Taterapox virus	31	QLTRQLNMEKREVNKALYDL	50
Lumpyskin virus	30	EISRRLNIEKSNVNKQLYKL	49
Camelpox virus	31	QLTRQLNMEKREVNKALYDL	50
Cowpox virus	31	QLTRQLNMEKREVNKALYDL	50
Swinepox virus	31	EISKKIEKEKSSINRQLYAL	50
Variola virus	31	QLTRQLNMEKREVNKALYDL	50
Yaba-like disease virus	33	SLSNRLKINKKKINQLYKL	52
Deerpox virus	36	EIARQLNVEKSYINRQLYKL	55

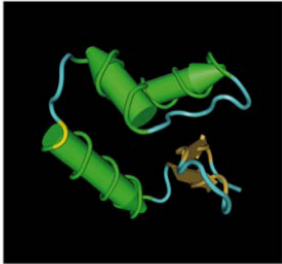


Figura 12. La proteína E3 presenta dominios de unión covalente a SUMO. **A.** Análisis de la secuencia aminoacídica de E3 mostrando los dominios putativos de unión a SUMO (en rojo) en las posiciones 39EKRE42 y 98HKSF101, usando los programas de predicción SUMOplot y SUMOsp. **B.** Alineamiento de parte de la secuencia aminoacídica de la proteína E3 de distintos poxvirus que muestra la conservación del residuo de lisina K40 (panel izquierdo). Estructura de la proteína E3 de VACV mostrando la localización de la lisina K40 (en amarillo) (panel derecho).

1.3.2 Los residuos de lisina K40 y K99 están implicados en la conjugación a SUMO.

Con el objetivo de analizar si los residuos de lisina identificados con los programas de predicción estaban implicados en la conjugación de SUMO, decidimos generar unas mutaciones puntuales en los residuos K40 y K99 de E3, introduciendo arginina en dichas posiciones (E3-K40R y E3-K99R). Adicionalmente, generamos un doble mutante de E3 en dichos residuos de lisina (E3-K40RK99R) y realizamos un ensayo de sumoilación *in vitro* usando los diferentes mutantes de E3 como sustrato. La conjugación de SUMO1 al mutante E3-K40R se veía

claramente reducida, como lo demuestran los bajos niveles de las bandas de E3-SUMO1 detectadas en el análisis (Figura 13A, panel izquierdo). La conjugación de SUMO1 al mutante E3-K99R era similar a la detectada para la proteína E3 salvaje (E3-WT) (Figura 12A, panel izquierdo). Sin embargo, la modificación por SUMO1 de la proteína doble mutante E3-K40RK99R era casi indetectable (Figura 13A, panel izquierdo). Se obtuvieron resultados similares en los experimentos de conjugación de SUMO2 *in vitro* usando como sustrato los mutantes de E3 (Figura 13A, panel derecho).

Para determinar si estos residuos de lisina estaban implicados en la conjugación de SUMO *in vivo*, células HEK293 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R junto con pCDNA, con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 o con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 y los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas fueron analizados por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. La principal banda de E3-SUMO1 detectada en células co-transfectadas con SUMO1 y E3-WT, no fue detectada en las células transfectadas con el mutante E3-K40RK99R (Figura 13B, panel izquierdo). Asimismo, se observó una clara reducción en la conjugación de SUMO2 al mutante E3-K40RK99R en comparación con la detectada con la proteína E3-WT (Figura 13B, panel derecho). Todos estos resultados indican que estos dos residuos de lisina están implicados en la modificación de E3 por SUMO.

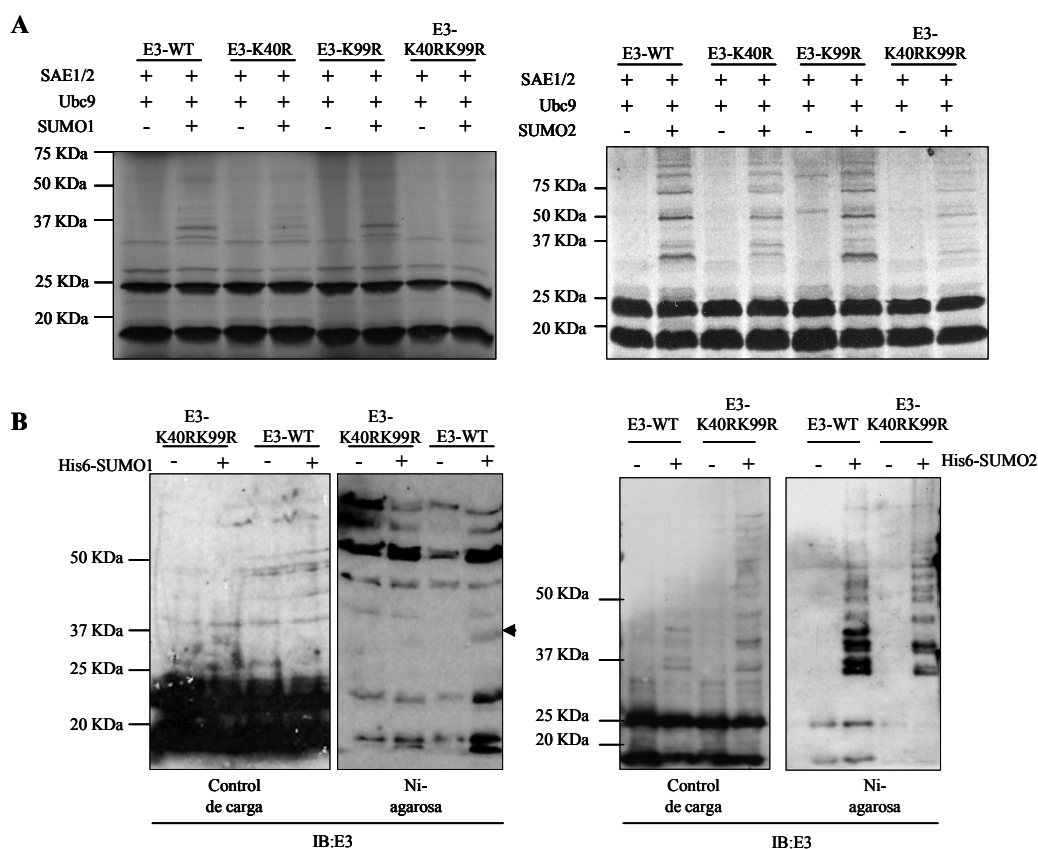
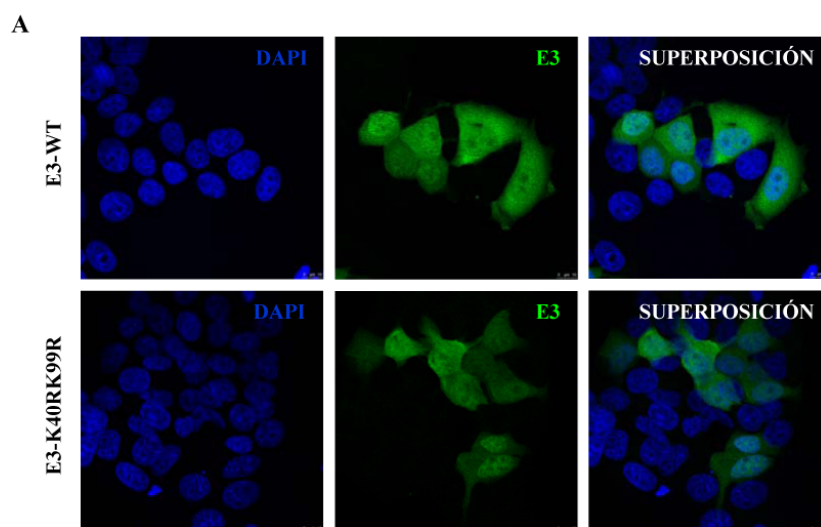


Figura 13. Los residuos de lisina 40 y 99 de la proteína E3 son los principales sitios de conjugación a SUMO. A. Las proteínas E3 salvaje y las mutantes en las posiciones indicadas, sintetizadas *in vitro* en presencia de [35 S]-metionina fueron usadas en ensayos de sumoilación *in vitro* en presencia de SUMO1 (panel izquierdo) o SUMO2 (panel derecho). Los productos de la reacción fueron separados en geles de poli-acrilamida-SDS (12 %) y visualizados por autorradiografía. B. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R junto con pcDNA, con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 (panel izquierdo) o con pcDNA-Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 (panel derecho), y los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas fueron analizados por inmunoblot (IB) con el anticuerpo anti-E3.

1.4 La conjugación de SUMO a E3 no afecta a la localización subcelular o a la estabilidad de la proteína

La conjugación covalente de SUMO a su sustrato puede regular la localización subcelular o la estabilidad de la proteína. Con el objetivo de analizar si la proteína E3 mutante con capacidad reducida de conjugar a SUMO tiene afectada su localización subcelular, células MCF-7 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para E3-WT o el mutante E3-K40RK99R y 36 horas después de la transfección las células fueron teñidas con el anticuerpo anti-E3. El análisis por microscopía confocal no reveló diferencias significativas en la localización subcelular de ambas proteínas (Figura 14A).

Posteriormente, analizamos la estabilidad de las proteínas E3-WT y E3-K40RK99R. Para ello, células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R, tratadas con ciclohexamida (CHX) y a diferentes tiempos tras el tratamiento (hpt), analizamos los niveles de la proteína E3 mediante inmunoblot. No detectamos diferencias en la estabilidad de las proteínas E3-WT y E3-K40RK99R (Figura 14B). En su conjunto, estos datos indican que la conjugación de SUMO a E3 no regula ni la localización subcelular ni la estabilidad de la proteína viral.



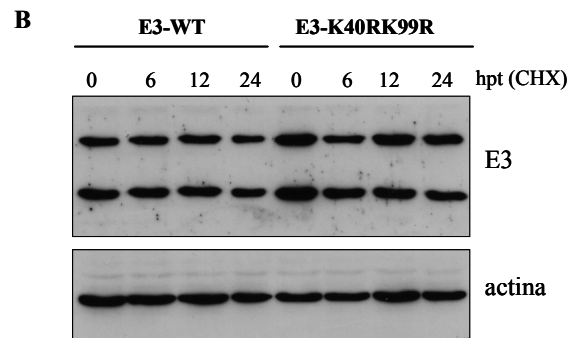


Figura 14. La localización subcelular y la estabilidad de E3 no se ven afectadas por la conjugación a SUMO. A. Células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R y 48 h después de la transfección, las células fueron fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-E3 y con DAPI. Las imágenes fueron analizadas por microscopía confocal. **B.** Células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R y tratadas con ciclohexamida (CHX) durante los tiempos indicados. Transcurrido dicho tiempo, las células fueron lisadas y las proteínas analizadas por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3.

1.5 La complementación del VACV- Δ E3L no requiere la conjugación de SUMO a E3

El VACV que carece del gen E3L (VACV- Δ E3L) no es capaz de replicar en células HeLa, pero puede ser complementado por la expresión temporal de E3 desde un vector (Chang et al., 1995). Para analizar el papel de la conjugación de SUMO en la complementación del VACV- Δ E3L, células HeLa fueron transfectadas con pcDNA, pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R y 48 horas después de la transfección las células fueron infectadas con VACV- Δ E3L a una multiplicidad de infección (moi) de 7.5 ufp por célula. Transcurridas 24 horas de infección analizamos la producción de partículas del VACV, y a las 16 horas analizamos la síntesis de proteínas virales. El título del VACV obtenido de las células transfectadas con E3-K40RK99R fue significativamente más alto que el obtenido de las células transfectadas con pcDNA, pero similar al título viral obtenido en las células transfectadas con E3-WT (Figura 15A). Por otro lado, el análisis mostró, que la síntesis de proteínas virales en las células infectadas con VACV- Δ E3L se reanudó tras la expresión de E3-WT y fue similar a la observada tras la expresión de E3-K40RK99R (Figura 15B). Todos estos resultados indican que la complementación del VACV- Δ E3L no requiere la conjugación de SUMO a E3.

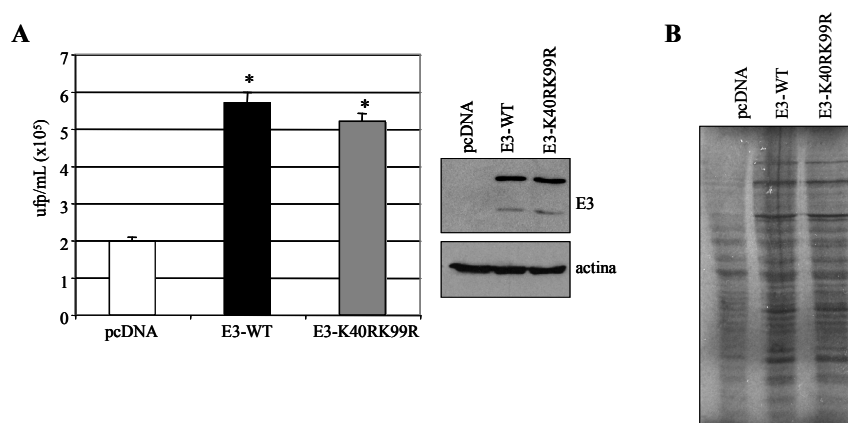


Figura 15. La reconstitución del VACV-ΔE3L no requiere la conjugación de SUMO a E3. **A.** Células HeLa fueron transfectadas con los plásmidos pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R y 48 h después infectadas con VACV-ΔE3L a una multiplicidad de infección (moi) de 7.5 ufp por célula. Las células infectadas fueron recogidas después de 24 h y la producción viral fue cuantificada en células BHK-21 por el método de placas. Los resultados mostrados son el promedio de triplicados ± desviación estándar. Resultados similares se obtuvieron en al menos tres experimentos. **B.** Células HeLa fueron transfectadas con pcDNA, pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-K40RK99R y después de 48 h de transfección las células fueron infectadas con VACV-ΔE3L a una moi de 7.5 pfu por célula durante 16 h. Después, las células fueron incubadas con [³⁵S]-metionina durante 30 minutos y las proteínas sintetizadas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS (12 %) y autorradiografía.

1.6 La actividad transcripcional de E3 es regulada negativamente por SUMO

Se ha descrito que la conjugación de SUMO a su sustrato puede modificar su actividad transcripcional (Liu y Shuai, 2008). Por otro lado, se ha demostrado que el extremo N-terminal de E3 es capaz de estabilizar el Z-ADN en la región promotora de algunos genes, entre ellos p53, provocando la transactivación de los mismos (Kwon y Rich, 2005). Para estudiar el efecto de SUMO sobre la actividad transcripcional de E3, células MCF-7 fueron transfectadas con el plásmido reportero de un gen regulado por p53, PUMA-luc, junto con cantidades crecientes de pCI-neo-E3-WT y se analizaron los niveles de expresión de luciferasa en cada caso. La expresión de E3-WT induce la transactivación de PUMA-luc de manera dosis-dependiente (Figura 16A). Cuando E3 se co-transfectó junto con SUMO1 y Ubc9, el análisis de la actividad transcripcional de E3 reveló una ligera, aunque significativa reducción en la transactivación de PUMA-luc (Figura 16B), sugiriendo que SUMO1 tiene un efecto negativo en la actividad transcripcional de la proteína E3. Para confirmar estos resultados, analizamos la actividad transcripcional de E3-WT y E3-K40RK99R tras la co-transfección con la desumoilasa SENP1. La co-transfección de SENP1 incrementó significativamente la transactivación de PUMA-luc, inducida por la expresión de E3-WT (Figura 16C). Sin embargo, cuando se transfectó el mutante E3-K40RK99R, la co-transfección con SENP1 no produjo ningún efecto significativo

sobre la transactivación del promotor (Figura 16C). Todos estos resultados indican que la conjugación de SUMO a E3 modula negativamente su actividad transcripcional sobre el promotor de PUMA-luc.

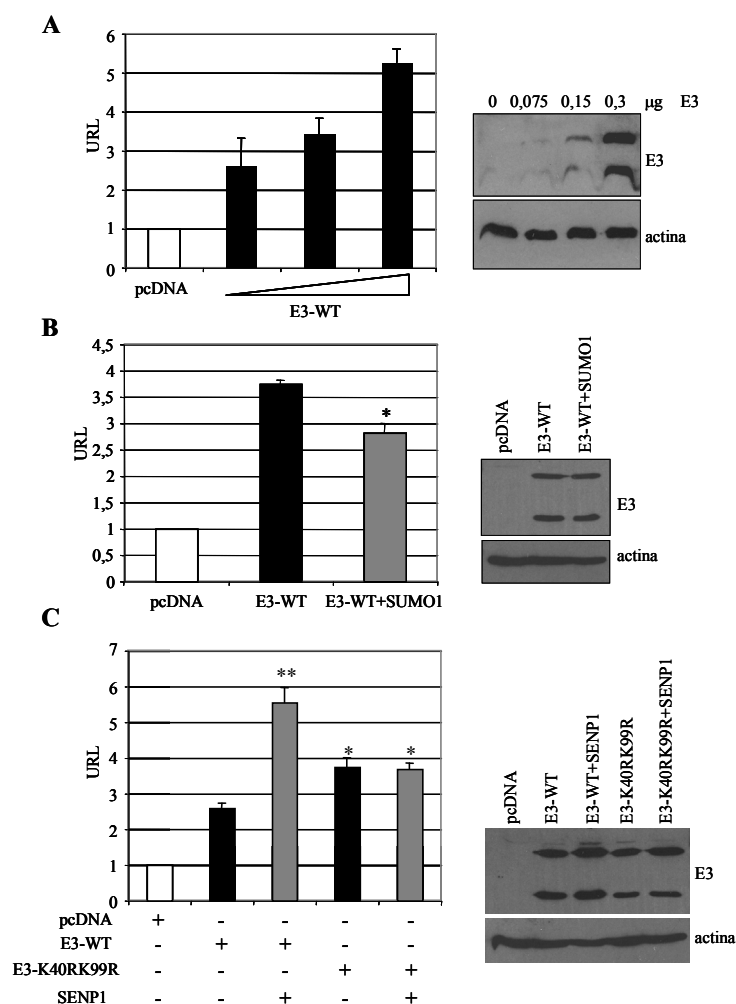


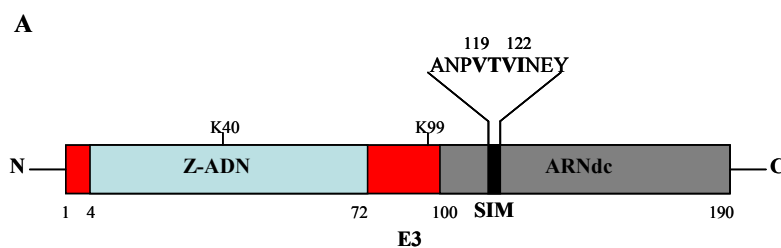
Figura 16. La conjugación de SUMO a E3 regula negativamente su actividad transcripcional. **A.** Células MCF7 fueron transfectadas en triplicado con cantidades crecientes de pCI-neo-E3-WT junto con el vector reportero PUMA-luc y a las 48 h de la transfección las células fueron recogidas y procesadas para medir los niveles de luciferasa (URL: unidades relativas de luminiscencia). **B.** Celulas MCF-7 fueron transfectadas con pcDNA o con pCI-neo-E3-WT en presencia o ausencia de SUMO, junto con el vector reportero PUMA-luc y las muestras fueron procesadas como se describió en el apartado anterior. **C.** Células MCF-7 fueron transfectadas con pcDNA, pCI-neo-E3-WT, pCI-neo-E3-WT y SENP1, pCI-neo-E3-K40RK99R o pCI-neo-E3-K40RK99R y SENP1, junto con el vector reportero PUMA-luc y las muestras fueron procesadas como se describió anteriormente. En los paneles de la derecha se presentan los niveles expresión de E3 en cada experimento. Se obtuvieron los mismos resultados en al menos tres experimentos diferentes. Los datos presentados son el promedio \pm desviación estándar para un experimento. Los resultados fueron analizados usando la prueba t de Student, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$.

1.7 La proteína E3 contiene un motivo de interacción con SUMO (dominio SIM) que regula su estabilidad, su sumoilación y la localización subcelular

1.7.1 E3 presenta un dominio SIM que regula su estabilidad y su interacción no covalente con SUMO1.

Recientemente se ha demostrado que ciertas proteínas celulares y virales que son modificadas por SUMO, también pueden interaccionar de manera no covalente con esta proteína, a través de un motivo de interacción con SUMO (dominio SIM). El dominio SIM está constituido por un núcleo hidrofóbico flanqueado por aminoácidos ácidos, siguiendo la secuencia consenso Leu/Val/Ile-X-Leu/Val/Ile-Leu/Val/Ile (Hecker et al., 2006; Song et al., 2004). Después de analizar la secuencia aminoacídica de E3, encontramos un posible dominio SIM en la posición 119VTVI122 (Figura 17A). Con el objetivo de investigar la funcionalidad de este dominio SIM, llevamos a cabo mutagénesis dirigida y reemplazamos las valinas 119 y 121 y el residuo de isoleucina 122 por alaninas, para generar la proteína mutante E3- Δ SIM. Basándonos en resultados previos con hDaxx o IEp86 (Berndt et al., 2009; Lin et al., 2006), esperábamos que estas mutaciones bloquearan las funciones del dominio SIM. Sorprendentemente, al analizar los niveles de expresión por inmunoblot de células transfectadas con E3- Δ SIM, observamos que la proteína mutante era prácticamente indetectable (Figura 17B); sin embargo, en presencia del inhibidor del proteasoma MG132, la cantidad de proteína detectada era significativa (Figura 17B). Estos resultados indican que el dominio SIM de la proteína E3 es necesario para la estabilidad de la proteína viral.

Para comprobar la posible implicación del dominio SIM en la interacción no covalente con SUMO1, decidimos analizar si la proteína mutante en el dominio SIM era capaz de unirse a SUMO1 en un ensayo de interacción con GST-SUMO1. La proteína E3-WT se unía eficientemente a GST-SUMO1, pero no a GST (Figura 17C). Sin embargo, la proteína E3- Δ SIM fue incapaz de unirse a GST-SUMO1, demostrando la funcionalidad del dominio SIM en esta interacción (Figura 17C).



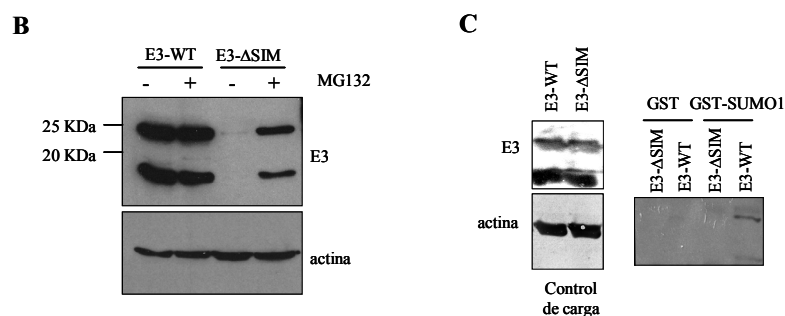


Figura 17. La proteína E3 presenta un dominio SIM que regula su estabilidad y la interacción no covalente con SUMO1. A. El análisis de la secuencia aminoacídica de E3 reveló la presencia de un putativo dominio SIM entre los residuos 119 al 122. B. Células HEK-293 fueron transfectadas con los vectores pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-ΔSIM y tratadas o no con el inhibidor del proteasoma MG132 durante 24 h. Los niveles de la proteína E3 detectada en cada caso se analizaron por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. C. Células HEK-293 fueron transfectadas con los vectores de E3-WT o E3-ΔSIM y tratadas con MG132 durante 24 h. Los extractos de proteínas obtenidas fueron incubados con GST o GST-SUMO1, y posteriormente se analizaron por IB con anticuerpo anti-E3.

1.7.2 La conjugación de SUMO a E3 es regulada por el dominio SIM

Se ha observado que la sumoilación de algunas proteínas es dependiente de la presencia del dominio SIM, sugiriendo que la unión no covalente a SUMO podría representar un mecanismo general para la selección y modificación del sustrato (Lin et al., 2006). Para comprobar si la conjugación de SUMO a E3 requiere la unión con SUMO a través del dominio SIM, primero llevamos a cabo un ensayo de sumoilación *in vitro* de la proteína mutante E3-ΔSIM en comparación con la proteína E3-WT. La eficiencia de la conjugación de SUMO1 y SUMO2 a la proteína E3-ΔSIM se redujo dramáticamente en comparación con la detectada cuando usamos la proteína E3-WT como sustrato (Figura 18A). A continuación, decidimos analizar el efecto del dominio SIM en la conjugación de SUMO a E3 *in vivo*. Para ello, células HEK-293 fueron co-transfectadas con los vectores pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-ΔSIM junto con pcDNA o con Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 y tras 24 horas de transfección las células fueron tratadas con MG132. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas fueron analizados por inmunoblot usando el anticuerpo anti-E3. Las bandas de E3-SUMO2 solo se detectaron en las células que expresan E3-WT, y no así en las células transfectadas con el mutante pCI-neo-E3-ΔSIM, sugiriendo que el dominio SIM en la proteína E3 está implicado en la conjugación de SUMO *in vivo* (Figura 18B). Todos estos resultados demuestran que la presencia de dominio SIM es necesaria para la sumoilación eficiente de E3, tanto *in vitro* como *in vivo*.

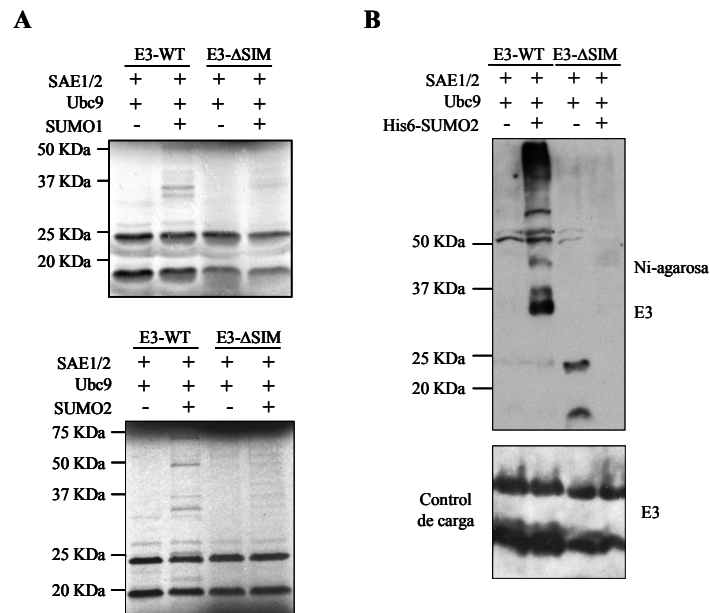


Figura 18. El dominio SIM regula la sumoilación de la proteína E3. **A.** Las proteínas E3-WT y E3-ΔSIM sintetizadas *in vitro* en presencia de [35 S]-metionina fueron utilizadas como sustrato en un ensayo de sumoilación *in vitro* en presencia de SUMO1 (panel superior) o SUMO2 (panel inferior). Los productos de la reacción fueron visualizados por autorradiografía. **B.** Células HEK-293 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3-ΔSIM junto con pcDNA o con Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas (Ni-agarosa) fueron analizados por inmunoblot usando el anticuerpo anti-E3.

1.7.3 La localización subcelular de E3 es regulada por el dominio SIM

Estudios previos indican que el dominio SIM es también capaz de regular la localización subcelular de algunas proteínas (Cho et al., 2009). Para comprobar si la localización subcelular de la proteína mutante E3-ΔSIM estaba alterada, analizamos mediante inmunofluorescencia la localización de las proteínas E3-WT y E3-ΔSIM, después del tratamiento de las células con MG132. Observamos que la proteína E3-WT se localizaba tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células transfectadas, mientras que la proteína mutante E3-ΔSIM mostraba un patrón exclusivamente citoplasmático, lo que indica que el dominio SIM de E3 es necesario para la localización nuclear de la proteína (Figura 19).

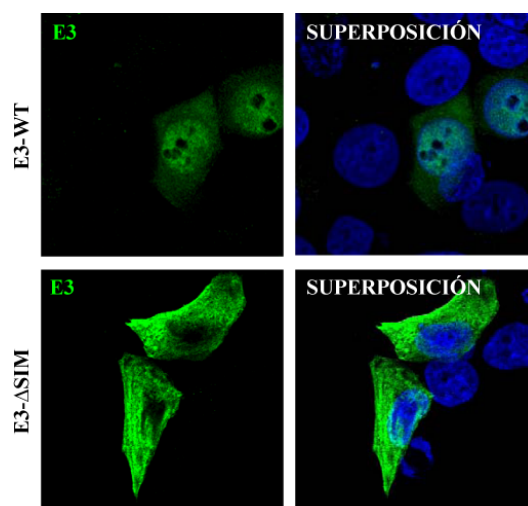


Figura 19. El dominio SIM regula la localización subcelular de la proteína E3. Células MCF-7 fueron transfectadas con los vectores pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3- Δ SIM y tratadas con MG132 durante 24 h. Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-E3 y DAPI. La localización de E3 fue analizada por microscopía confocal.

1.8 La proteína E3 es modificada por ubiquitina in vivo

La degradación de la proteína mutante E3- Δ SIM por un mecanismo dependiente del proteasoma sugería que E3 podía interactuar con ubiquitina. Con el objetivo de evaluar si la proteína E3 puede ubiquitinarse, células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-WT en presencia o ausencia de pcDNA-His6-ubiquitina y 48 horas después de la transfección, analizamos los extractos de proteínas totales por inmunoblot. En las células co-transfectadas con ubiquitina, se observaron bandas adicionales de alto peso molecular (Figura 20A). Interesantemente, los niveles de proteína E3 no fueron significativamente afectados por la expresión de ubiquitina, lo que indica que la ubiquitinación de la proteína E3-WT no induce su degradación (Figura 20A). Para demostrar que las bandas de alto peso molecular corresponden a proteína E3 conjugada a ubiquitina, purificamos las proteínas unidas a histidinas a partir de células MCF-7 transfectadas como se describió en el apartado anterior. El análisis por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3 de las proteínas unidas a histidina, demostró que las bandas de alto peso molecular efectivamente correspondían a formas ubiquitinadas de E3 (Figura 20B). Resultados similares se obtuvieron con los extractos de proteínas purificadas a partir de células transfectadas con ubiquitina y posteriormente infectadas con VACV (Figura 20C), lo que indica que la proteína E3 producida por el virus también puede ser modificada por ubiquitina.

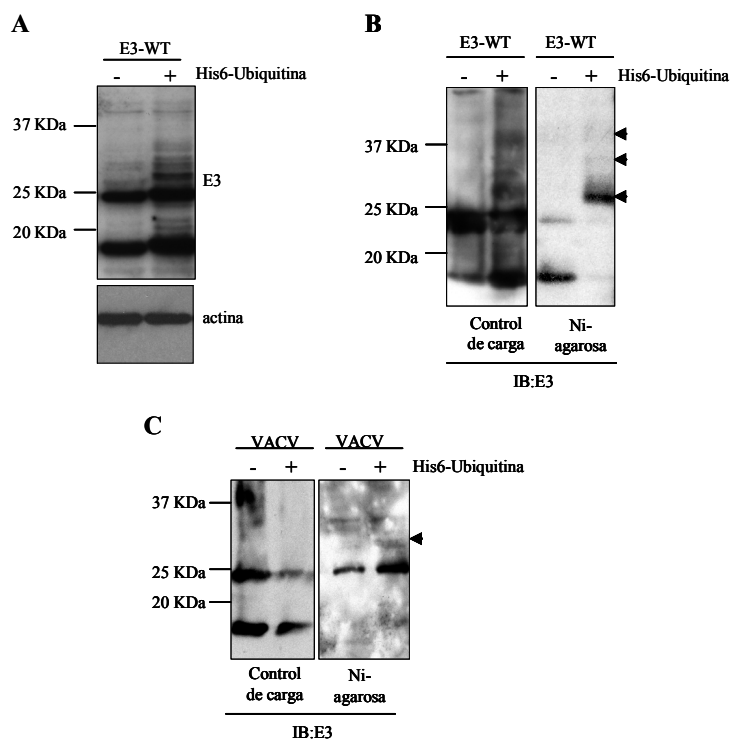


Figura 20. La proteína E3 se conjuga a ubiquitina *in vivo*. **A.** Células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-WT en presencia o ausencia de pcDNA-His6-Ubiquitina. Tras 48 h de transfección, los extractos de proteínas fueron analizados por inmunoblot usando el anticuerpo anti-E3. **B-C.** Células MCF-7 se transfectaron como se indicó en el apartado anterior (**B**) o se transfectaron con pcDNA-His6-Ubiquitina y posteriormente se infectaron con VACV durante 6 h (**C**). Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina, purificadas por afinidad con columnas de Ni-agarosa, fueron analizados por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. Las flechas indican las formas de E3 conjugadas a ubiquitina.

1.9 La ubiquitinación de la proteína E3 es modulada por la deubiquitinasa USP7

La eliminación de la ubiquitina del sustrato es modulada por unas enzimas denominadas deubiquitininas. Una de las deubiquitininas mejor caracterizadas es la proteasa específica de ubiquitina 7 (USP7/HAUSP), implicada en la regulación de las rutas de respuesta a estrés, silenciamiento epigenético y en la progresión de la infección de algunos virus de ADN. Para comprobar si la ubiquitinación de la proteína E3 era regulada por USP7, células MCF-7 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT y GFP o GFP-USP7 en presencia o ausencia de pcDNA-His6-ubiquitina y 36 horas después de la transfección se analizaron los extractos de proteínas por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. Las bandas correspondientes con E3 conjugada a ubiquitina observadas en las células co-transfectadas con E3 y ubiquitina, no se detectaron al expresar GFP-USP7 (Figura 21A), lo que indica que USP7 es un modulador de la ubiquitinación de la proteína E3.

Posteriormente, decidimos analizar la interacción entre las proteínas E3 y USP7, co-transfectando E3 y GFP-USP7 en células HEK-293 e inmunoprecipitando los complejos. Observamos que el anticuerpo anti-E3, pero no el anticuerpo control, coimmunoprecipitó a GFP-USP7, demostrando la interacción entre ambas proteínas (Figura 21B). Por otro lado, la co-transfección de GFP-USP7 con E3-ΔSIM aumentó los niveles de la proteína mutante que se detectaban en ausencia del inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 21C), sugiriendo que USP7 también modula la ubiquitinación del mutante E3-ΔSIM, regulando su degradación.

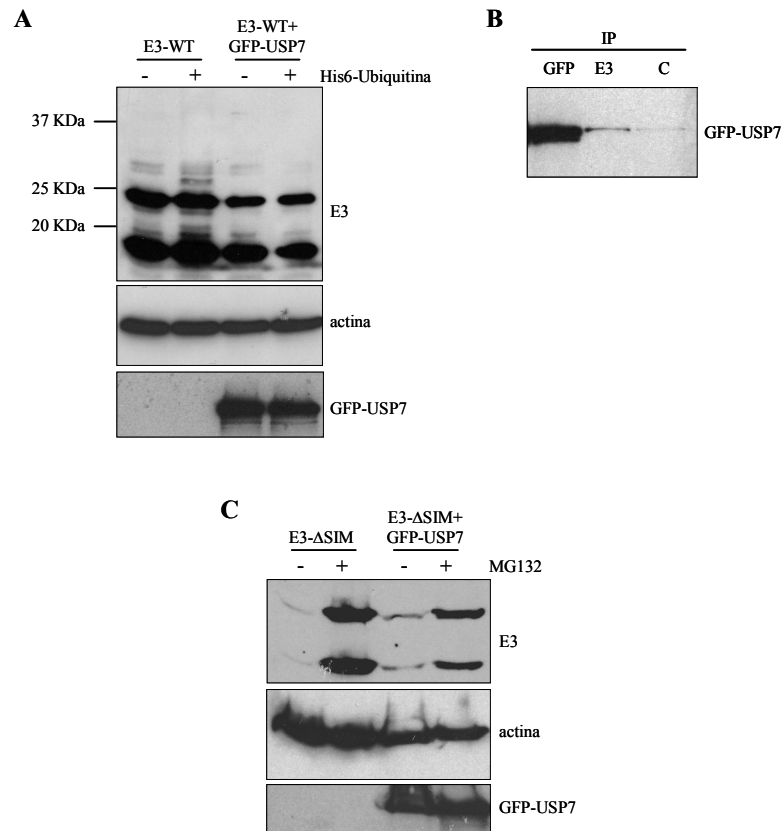


Figura 21. La deubiquitinasa USP7 modula la conjugación de E3 a ubiquitina. **A.** Células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-WT en presencia o ausencia de GFP-USP7 y en presencia o ausencia de ubiquitina. Los extractos de proteínas se analizaron por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. **B.** La proteína E3 interacciona con USP7. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT y GFP-USP7. Los extractos se sometieron a inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-GFP, anti-E3 o anti-HA como control negativo y los complejos proteicos se analizaron mediante inmunoblot usando el anticuerpo anti-GFP como se indica. **C.** Células MCF-7 fueron transfectadas con pCI-neo-E3-ΔSIM en presencia o ausencia de GFP-USP7. A continuación, las células fueron tratadas o no con MG132 durante 24 h y los extractos de proteínas fueron analizados por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3.

1.10 El dominio SIM de E3 modula la formación de cadenas de ubiquitina que se conjugan a la proteína viral

Existen evidencias que indican que el tipo de enlace y/o longitud de las cadenas de ubiquitina podrían funcionar como señales específicas para controlar distintos procesos celulares (Ikeda et al., 2010). Con el objetivo de caracterizar mejor la ubiquitinación de la proteína E3, células MCF-7 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3- Δ SIM junto con pcDNA o pcDNA-His6-ubiquitina. Las células se trataron con MG132 y 36 horas después de la transfección, los extractos de proteínas unidas a histidinas se purificaron empleando columnas de níquel y se analizaron por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3. En las células co-transfectadas con el mutante E3- Δ SIM y ubiquitina observamos la aparición de numerosas bandas de alto peso molecular, correspondientes a formas de E3-ubiquitina, en comparación con las bandas de menor peso molecular detectadas en las células transfectadas con la proteína E3-WT (Figura 22). Estos resultados indican que el dominio SIM de la proteína E3 modula la conjugación de ubiquitina a la proteína viral.

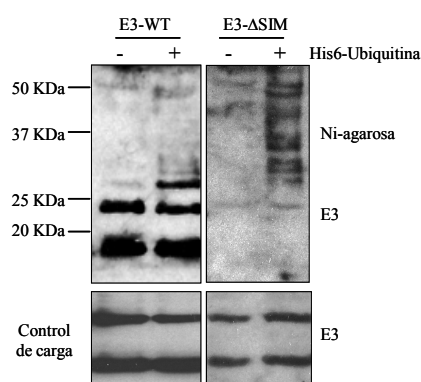


Figura 22. El dominio SIM de la proteína E3 regula la longitud de las cadenas de ubiquitina. Células MCF-7 fueron co-transfectadas con pCI-neo-E3-WT o pCI-neo-E3- Δ SIM y pcDNA o pcDNA-His6-ubiquitina. Las células fueron tratadas con MG132 y 36 h después de la transfección las proteínas unidas a histidinas purificadas empleando columnas de níquel (Ni-agarosa) fueron analizadas por inmunoblot con el anticuerpo anti-E3.

2. Regulación de la proteína supresora de tumores PTEN por SUMO

2.1 La infección viral induce una modificación post-traduccional de PTEN y altera su localización subcelular

2.1.1 Los virus promueven una modificación post-traduccional de PTEN

Estudios previos indican que algunas proteínas implicadas en supresión tumoral sufren modificaciones post-traduccionales o su expresión es regulada tras la infección con virus (Pampin et al., 2006; Takaoka et al., 2003). Para investigar el efecto de la infección viral sobre PTEN, infectamos fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) provenientes de ratones salvajes (WT) con VSV a una moi de 5 ufp/célula y los extractos de proteínas obtenidos se analizaron mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-PTEN. En las células no infectadas, como era esperable, la proteína PTEN fue detectada como una banda situada por encima del marcador de peso molecular de 50 kDa (Figura 23A). En las células infectadas con VSV detectamos además una banda adicional de alrededor de 70 kDa (Figura 23A, flecha). Resultados similares fueron obtenidos tras el análisis de los extractos de proteínas obtenidos a partir de MEFs infectados con los virus VSV, SV y VACV (Figura 23B). Estos resultados sugerían que la infección viral podía estar induciendo la modificación post-traduccional de PTEN. Con el objetivo de examinar si esta banda adicional que era reconocida por el anticuerpo anti-PTEN también se detectaba en células humanas, infectamos células MCF-7 con VSV a una moi de 5 ufp/célula y analizamos los extractos de proteínas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-PTEN. La infección viral inducía la aparición de bandas adicionales de alrededor de 65-70 kDa (Figura 23C). Todos estos resultados sugieren que la infección viral favorece la modificación post-traduccional de PTEN.

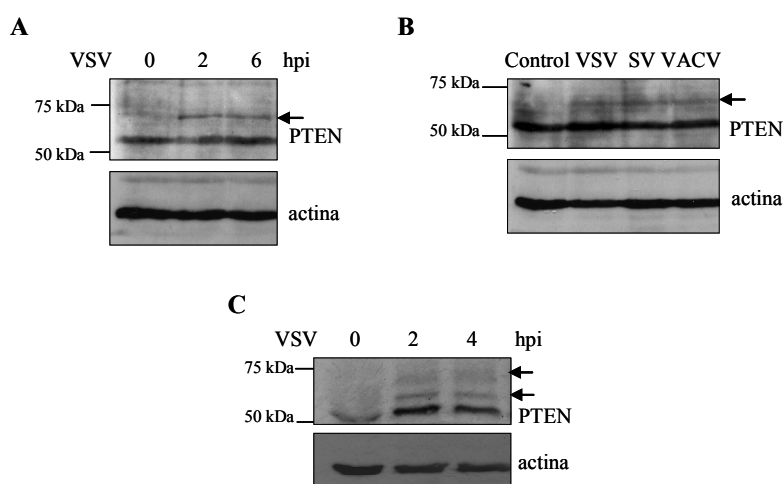


Figura 23. La infección con virus induce una modificación post-traducciona de PTEN. **A.** MEFs WT se infectaron con VSV a una moi de 5 ufp/célula y los extractos de proteínas obtenidos a los distintos tiempos de iniciada la infección (hpi) fueron analizados mediante IB con el anticuerpo anti-PTEN. **B.** MEFs WT se infectaron con los virus VSV, SV y VACV a una moi de 5 ufp/célula y los extractos de proteínas obtenidos a las 4 horas de iniciada la infección fueron analizados mediante IB con el anticuerpo anti-PTEN. **C.** Células MCF-7 se infectaron con VSV a una moi de 5 ufp/célula y los extractos de proteínas obtenidos a los tiempos indicados fueron analizados mediante IB con al anticuerpo anti-PTEN. Las bandas que podrían corresponder con modificaciones post-traduccionales de PTEN se indican con una flecha.

2.1.2 La infección viral altera la localización subcelular de PTEN en MEFs

Con el objetivo de analizar si la localización subcelular de PTEN se veía alterada por la infección viral, MEFs WT se infectaron con VSV a una moi de 5 ufp/célula y 5 horas después de la infección las células se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-PTEN y con DAPI. En las células no infectadas el análisis por microscopía confocal reveló que PTEN mostraba una localización predominantemente nuclear aunque también se detectaba PTEN en el citoplasma celular (Figura 24). En las células infectadas PTEN se detectaba principalmente en el núcleo pero además parte de la señal de PTEN se detectaba en la membrana plasmática (Figura 24). Estos resultados indican que la infección con VSV promueve el traslado de PTEN a la membrana citoplasmática.

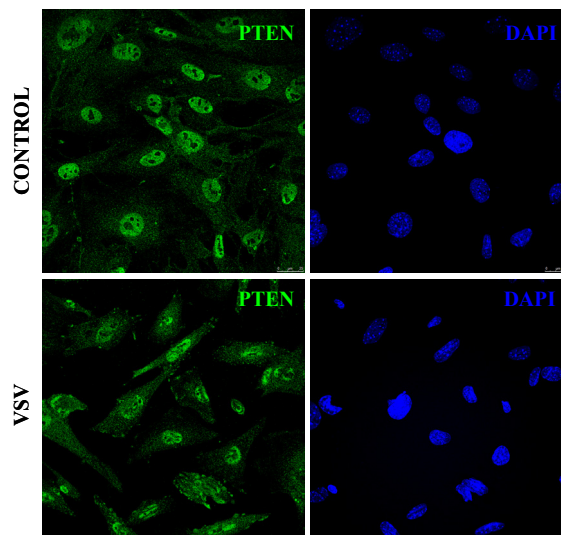


Figura 24. La infección con VSV altera la localización de PTEN en MEFs. MEFs WT se infectaron con VSV a una moi de 5 pfu/célula y 5 h después de iniciada la infección las células fueron fijadas y teñidas con el anticuerpo anti-PTEN y con DAPI. Las imágenes se analizaron por microscopía confocal.

2.2. La proteína PTEN se modifica por SUMO y esta modificación se ve favorecida por la infección con VSV

2.2.1 PTEN se conjuga covalentemente a SUMO1 y SUMO2 *in vitro*

PTEN es regulado por distintas modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, acetilación y ubiquitinación (Salmena et al., 2008). El peso molecular de la banda adicional detectada en los análisis mediante inmunoblot de los extractos de proteínas obtenidos a partir de células infectadas con los virus, no correspondía con ninguna de las modificaciones de PTEN previamente descritas. Dicha banda se correspondía con una proteína de 15-20 kDa mayor a la proteína PTEN sin modificar lo que nos llevó a especular en la posibilidad de que se tratara de una forma sumoilada de PTEN. Para probar esta hipótesis, llevamos a cabo un ensayo de sumoilación *in vitro* usando como sustrato la proteína PTEN sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina. Como era esperable, en ausencia de SUMO la proteína PTEN se detectó como una banda situada por encima del marcador de peso molecular de 50 kDa (Figura 25A). Cuando se añadió SUMO1 a la reacción de sumoilación se detectaron unas bandas adicionales que presentaban un tamaño aproximado de entre 65 y 75 kDa, que se corresponden con proteínas PTEN-SUMO1 (Figura 25A). Cuando se añadió SUMO2 a la reacción de sumoilación, detectamos unas bandas de peso molecular similar al observado con SUMO1 junto con otras bandas de mayor peso molecular, que se corresponden con proteínas PTEN-SUMO2 (Figura 25A). Con el objetivo de reconfirmar que dichas bandas se corresponden con PTEN conjugado a SUMO, llevamos a cabo un ensayo de desumoilación *in vitro* en presencia de la desumoilasa SENP1. Para ello, proteína PTEN sintetizada *in vitro* y conjugada a SUMO1 (PTEN-SUMO1) como describimos en el apartado anterior, fue incubada en una reacción de desumoilación con GST o GST-SENP1. Cuando la proteína PTEN-SUMO1 fue incubada con GST-SENP1, observamos la desaparición de las formas de PTEN modificadas por SUMO1 (Figura 25B), demostrando que la proteína PTEN sintetizada *in vitro* es modificada por SUMO.

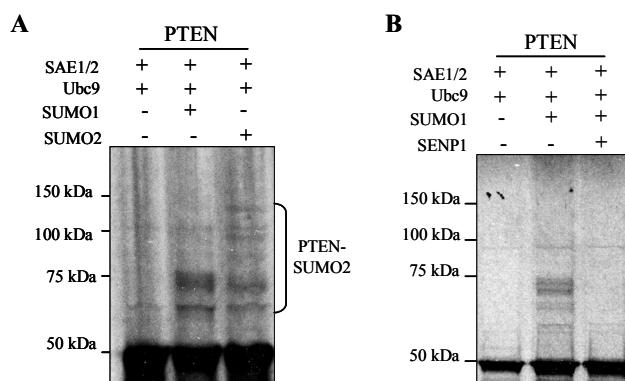


Figura 25. La proteína PTEN se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vitro*. A. La proteína PTEN sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina fue utilizada como sustrato en un ensayo de sumoilación *in vitro* en presencia de SUMO1 y SUMO2. B. SENP1 modula la sumoilación de PTEN. La proteína PTEN sintetizada *in vitro* y conjugada a SUMO1 fue incubada con GST o GST-SENP1 en un ensayo de desumoilación como se indica.

2.2.2 La proteína PTEN se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*

Para evaluar si PTEN se modifica por SUMO *in vivo*, células HEK-293 fueron co-transfectadas con HA-PTEN y pcDNA-His6, HA-PTEN, Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 o HA-PTEN, Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2, y los extractos de proteínas totales o las proteínas unidas a histidina fueron analizados mediante inmunoblot usando el anticuerpo anti-HA. El análisis de las proteínas totales o unidas a histidina en las células transfectadas con pcDNA-His6-SUMO1 reveló la aparición de unas bandas que se corresponden con PTEN-SUMO1 y que no se detectaban en las células transfectadas con el vector vacío (Figura 26). Dichas bandas se observaban también cuando evaluamos los extractos de células transfectadas con pcDNA-His6-SUMO2, y se corresponden con PTEN-SUMO2 (Figura 26). Estos resultados demuestran que PTEN se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*.

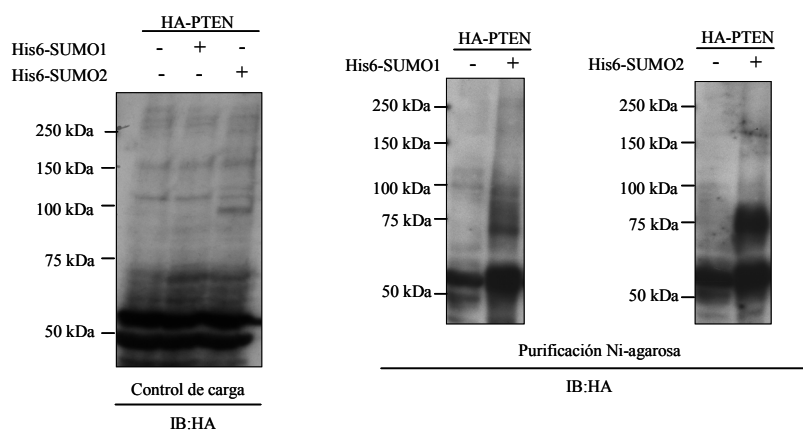


Figura 26. La proteína PTEN se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con HA-PTEN y pcDNA, HA-PTEN, Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 o HA-PTEN, Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 y los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina fueron analizadas por inmunoblot con el anticuerpo anti-HA.

2.2.3 La infección con VSV favorece la conjugación de SUMO2 a PTEN

Para determinar si la modificación post-traduccional de PTEN que se induce tras la infección con virus es la conjugación de SUMO, células HEK-293 fueron co-transfectadas con HA-PTEN junto con Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 y 24 horas después de la transfección las

células fueron infectadas con VSV a una moi de 5 ufp/célula. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina de las células recogidas a las 0, 2 o 4 horas de la infección se analizaron por inmunoblot con el anticuerpo anti-HA. La intensidad de las bandas correspondientes con PTEN-SUMO2 detectadas en las células co-transfectadas con pcDNA-His6-SUMO2 incrementaban de manera dependiente del tiempo de infección transcurrido (Figura 27). Estos resultados demuestran que la infección viral favorece la sumoilación de PTEN.

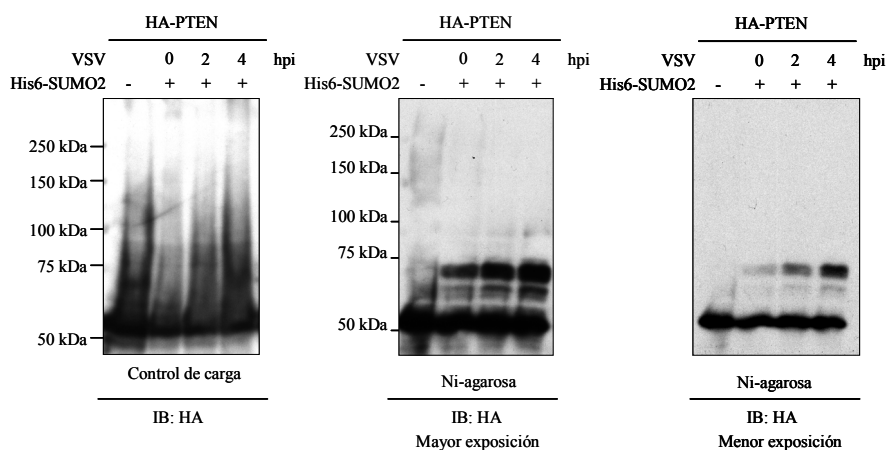


Figura 27. La infección con VSV favorece la conjugación de SUMO2 a PTEN. Células HEK-293 fueron co-transfectadas con HA-PTEN junto con Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 y 24 h después de la transfección las células se infectaron con VSV a una moi de 5 ufp/célula durante 0, 2 y 4 h. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina purificadas se analizaron mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-HA. El panel de la derecha muestra un tiempo de exposición menor.

2.3 Los residuos de lisina 266 y 289 de PTEN están implicados en la conjugación de SUMO

2.3.1 PTEN contiene dominios putativos de unión covalente a SUMO

Después de comprobar que PTEN puede conjugarse a SUMO, decidimos identificar los residuos de lisina implicados en esta modificación post-traducciona. Como mencionamos en el apartado 1.3.1, SUMO preferentemente se conjuga de forma covalente a una secuencia consenso presente en el sustrato. El análisis con los programas de predicción de sitios de conjugación a SUMO reveló que PTEN contiene algunos dominios putativos de unión a SUMO (Figura 28A, en rojo). Además, la comparación de la secuencia aminoacídica de PTEN revelaba que alguna de las lisinas incluidas en dichos dominios como la K266 se encontraba altamente conservada desde peces hasta el hombre (Figura 28B, panel izquierdo). Además, basándonos en

la estructura conocida de la proteína este residuo parece estar dispuesto hacia el exterior de la misma (Figura 28B, panel derecho).

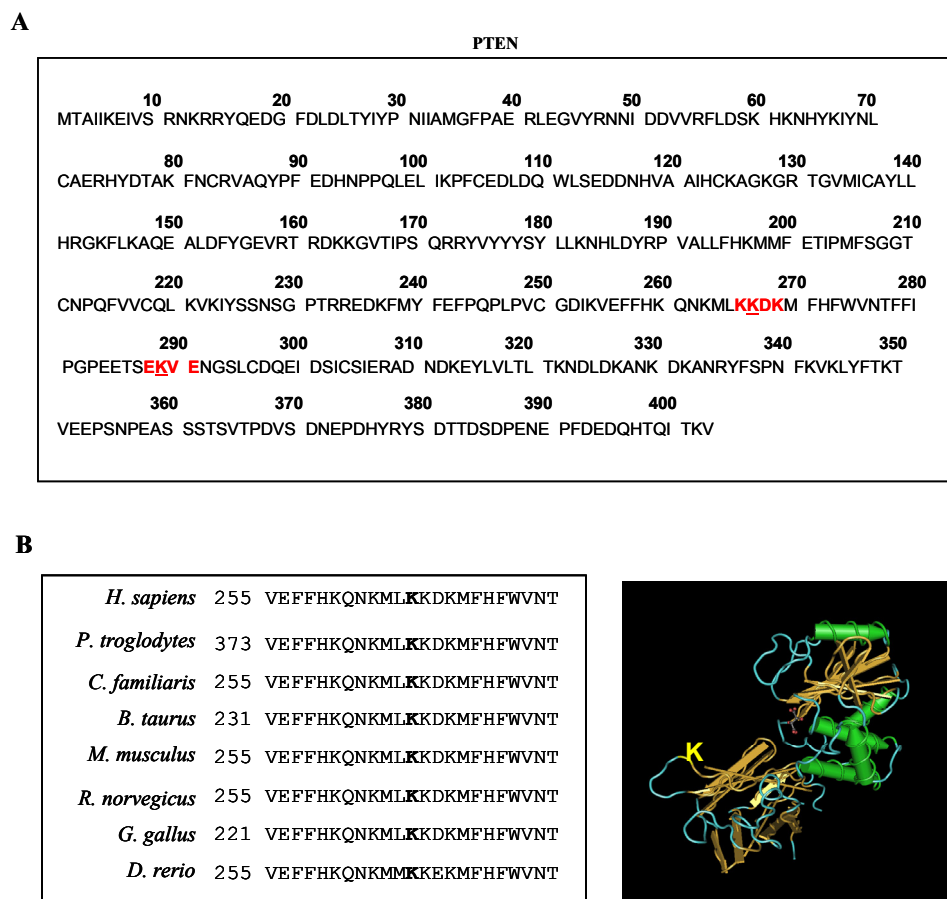


Figura 28. La proteína PTEN contiene dominios de unión a SUMO. **A.** Análisis de la secuencia aminoacídica de PTEN mostrando los putativos dominios de unión a SUMO (en rojo) detectados con el programa de predicción SUMOplot. **B.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PTEN mostrando la conservación del residuo de lisina K266 desde peces hasta el hombre (panel izquierdo). Localización del residuo de lisina K266 (en amarillo) en la estructura de PTEN (panel derecho).

2.3.2 Los residuos de lisina K266 y K289 de PTEN están implicados en la conjugación a SUMO

Para determinar si los residuos de lisinas identificados con el programa de predicción estaban implicados en la sumoilación de PTEN, generamos unas mutaciones puntuales en los residuos K266 y K289 introduciendo alanina en dichas posiciones (K266A y K289A). Dado que la lisina K289 se ha identificado como un residuo de conjugación a monoubiquitina, generamos además un mutante en un residuo que se incluía dentro del putativo dominio de conjugación a

SUMO, adyacente a la lisina 289 y manteniendo la lisina intacta, el mutante E291A. Además, generamos los dobles mutantes K266AK289A y K266AE291A, y a continuación realizamos un ensayo de sumoilación *in vitro* usando los diferentes mutantes de PTEN como sustrato. La conjugación de SUMO1 se veía afectada por la mutación de la lisina K266, como lo indican los bajos niveles de la banda de PTEN-SUMO1 detectada tras el análisis del mutante K266A (Figura 29A). Por el contrario, la conjugación de SUMO1 al mutante K289A o al E291A era similar a la detectada para la proteína PTEN salvaje (PTEN-WT) (Figura 29A). La sumoilación del doble mutante K266AE291E fue similar a la del mutante sencillo K266A. En contraste, la sumoilación *in vitro* del doble mutante K266AK289A se redujo dramáticamente (Figura 29A). Estos resultados sugerían que las lisinas 266 y 289 estaban implicadas en la sumoilación de PTEN.

Con el fin de determinar si estos residuos de lisina estaban también implicados en la conjugación de SUMO *in vivo*, células HEK-293 fueron transfectadas con HA-PTEN-WT, HA-PTEN-K266A, HA-PTEN-K289A o HA-PTEN-K266AK289A junto con pcDNA, Ubc9 y pcDNA-His-SUMO1 o Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO2 y los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina fueron analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-HA. Observamos una reducción en la modificación tanto por SUMO1 como por SUMO2 de los dos mutantes simples analizados, y esta modificación fue prácticamente indetectable en el caso del doble mutante K266AK289A (Figura 29B). Todos estos resultados indicaban que los residuos de lisina K266 y K289 están implicados en la conjugación de SUMO a PTEN.

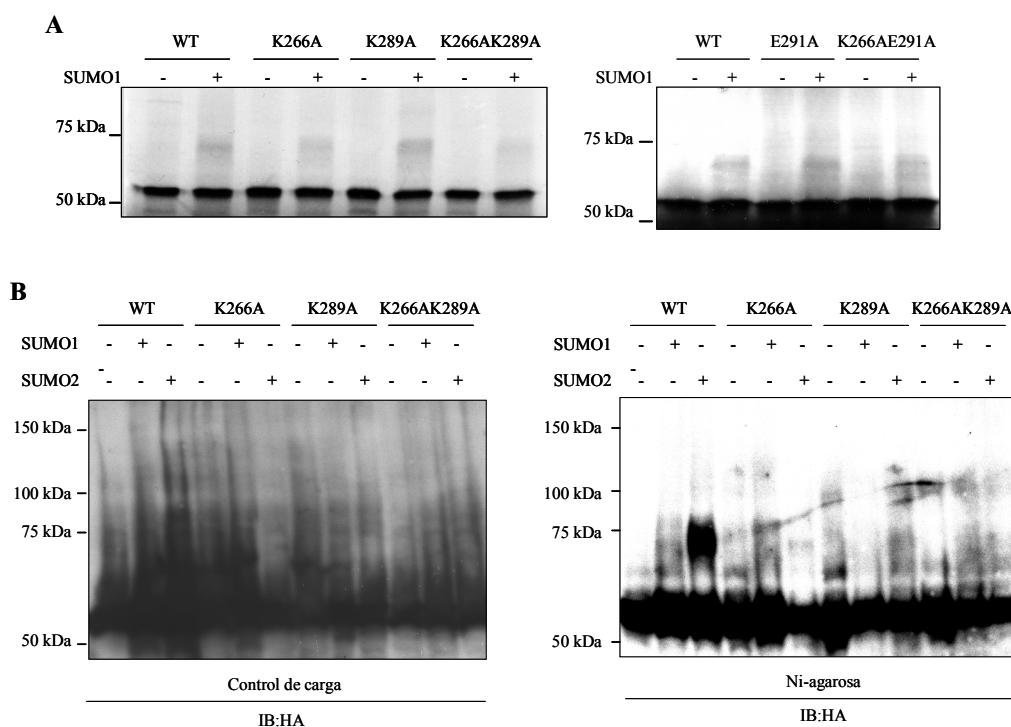
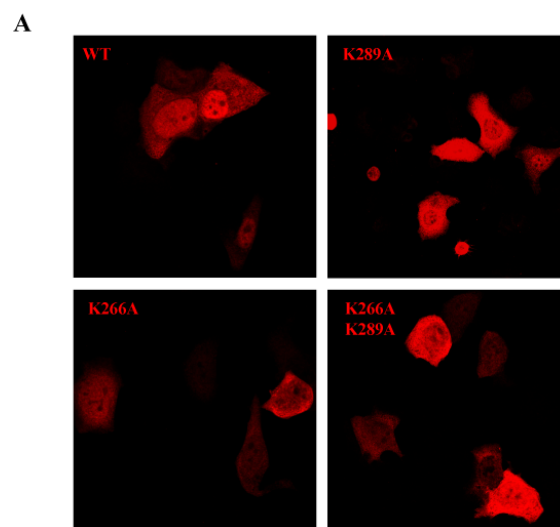


Figura 29. Los residuos de lisina K266 y K289 de PTEN están implicados en la conjugación a SUMO. **A.** Las proteínas PTEN-WT y los mutantes en las posiciones indicadas sintetizados *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina fueron usadas como sustrato en ensayos de sumoilación *in vitro* en presencia de SUMO1. Los productos de la reacción fueron separados en geles de poli-acrilamida-SDS y visualizados por autorradiografía. **B.** Células HEK293 fueron co-transfectadas con HA-PTEN-WT o los mutantes HA-PTEN-K266A, HA-PTEN-K289A o HA-PTEN-K266AK289A, junto con pcDNA, Ubc9 y pcDNA-His6-SUMO1 o Ubc9 y pcDNA.His6-SUMO2. Los extractos de proteína total o las proteínas unidas a histidina fueron analizadas por inmunoblot con el anticuerpo anti-HA.

2.4 Los mutantes de PTEN en las lisinas K266 o K289 tienen una localización citoplasmática.

2.4.1 El análisis por inmunofluorescencia revela que los mutantes de PTEN en las lisinas K266 o K289 se localizan en el citoplasma celular

La conjugación de SUMO al sustrato puede alterar su localización subcelular (Zhao, 2007). Con el fin de determinar si la mutación de las lisinas implicadas en la conjugación a SUMO alteraba la localización subcelular de PTEN, células MCF-7 fueron transfectadas con los plásmidos HA-PTEN-WT o los mutantes indicados y 36 horas después de la transfección las células se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo anti-HA y con DAPI. El análisis por microscopía confocal reveló que la proteína PTEN-WT era principalmente nuclear, aunque también podía detectarse en el citoplasma celular. Sin embargo, los mutantes simples K266A, K289A y el doble mutante K266AK289A mostraban una localización predominantemente citoplasmática (Figura 30A, panel superior). Este resultado se corroboró tras el análisis de más de 200 células (Figura 30A, panel inferior) y tras la visualización mediante microscopía confocal de la proteína PTEN-WT o los distintos mutantes de PTEN expresados en la línea celular PC3 (Figura 30B).



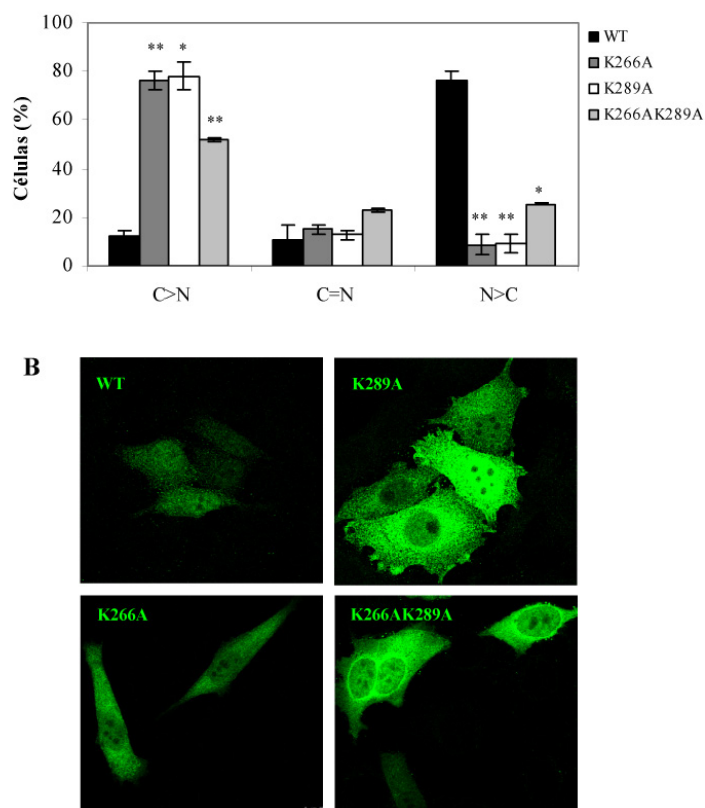


Figura 30. El análisis mediante microscopía confocal revela que los mutantes de PTEN en las lisinas K266 o K289 son citoplasmáticos. **A.** Células MCF-7 fueron transfectadas con HA-PTEN-WT, HA-PTEN-K266A, HA-PTEN-K289A o HA-PTEN-K266AK289A y 36 h después de la transfección las células se fijaron y tiñeron con el anticuerpo anti-HA y con DAPI. Las imágenes se analizaron por microscopía confocal (panel superior). Recuento del número de células que mostraban una localización citoplasmática (C>N), citoplasmática/nuclear (C=N) y nuclear (N>C), n= 200 células. Prueba t-Student: *, p<0.005, **, p<0.0005 (panel inferior). **B.** Células PC-3 fueron transfectadas con PTEN-WT y los mutantes indicados y 36 h después de la transfección las células se fijaron y tiñeron con el anticuerpo anti-HA y con DAPI. Las imágenes fueron analizadas por microscopía confocal.

2.4.2 El fraccionamiento subcelular revela que los mutantes de PTEN en las lisinas K266 o K289 se localizan en el citoplasma celular

Con el objetivo de confirmar los resultados anteriores, células MCF-7 fueron transfectadas con HA-PTEN-WT o con los distintos mutantes de PTEN y 36 horas después de la transfección se llevó a cabo la técnica de fraccionamiento subcelular con el fin de analizar por separado y mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-HA, las fracciones proteicas citoplasmáticas y nucleares. En las células transfectadas con PTEN-WT observamos que PTEN se encontraba mayoritariamente en la fracción nuclear (Figura 31), mientras que los mutantes K266A, K289A y K266AK289A eran predominantemente citoplasmáticos (Figura 31). Todos estos resultados demuestran que las lisinas K266 y K289 de PTEN regulan su localización.

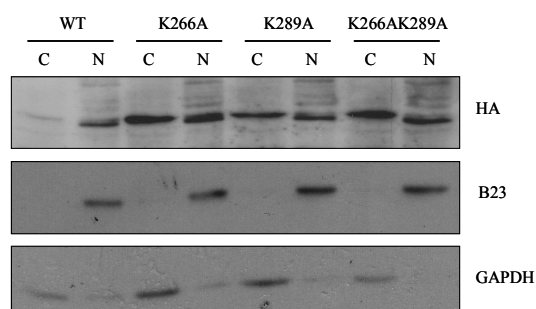


Figura 31. La técnica de fraccionamiento subcelular revela que los mutantes de PTEN en las lisinas K266 o K289 presentan una localización citoplasmática. Células MCF-7 fueron transfectadas con HA-PTEN-WT o los mutantes HA-PTEN-K266A, HA-PTEN-K289A o HA-PTEN-K266AK289A y 36 h después de la transfección se realizó el fraccionamiento subcelular de las mismas con el fin de obtener las fracciones citoplasmáticas (C) y nucleares (N) y los extractos de proteínas obtenidos se analizaron mediante inmunoblot con los anticuerpos anti-HA, anti-B23 (control nuclear) y anti-GAPDH (control citoplasmático).

2.5 El residuo de lisina K266 de PTEN es susceptible de unir mono-ubiquitina

Previamente se habían identificado a los residuos de lisina K13 y K289 de PTEN como residuos susceptibles de conjugar mono-ubiquitina, modificación que regulaba su importe al núcleo (Trotman et al., 2007). Dado que al menos uno de estos residuos (K289) parece estar implicado también en la conjugación de SUMO, decidimos analizar si los mutantes de PTEN en las lisinas capaces de conjugar SUMO también tenían alterada su capacidad de conjugar mono-ubiquitina. Para ello, llevamos a cabo un ensayo de mono-ubiquitinación *in vitro* usando ubiquitina mutante (ubiquitina-KØ) que no permite la formación de cadenas de ubiquitina, y como sustrato PTEN-WT o los distintos mutantes sintetizados *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina. La mono-ubiquitinación del mutante K266A se redujo ligeramente, en comparación con la proteína WT (Figura 32). Esta reducción fue mucho mayor cuando empleamos la proteína doble mutante K266AK289A como sustrato (Figura 32). Estos resultados sugerían que ambos residuos K266 y K289 jugaban un papel en la conjugación de la mono-ubiquitina.

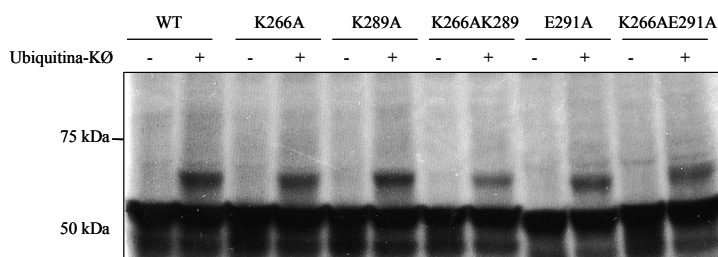


Figura 32. El residuo de lisina K266 está implicado en la mono-ubiquitinación de PTEN. Ensayo de mono-ubiquitinación *in vitro* en presencia de ubiquitina-K \emptyset empleando como sustrato PTEN-WT o los distintos mutantes de PTEN sintetizados *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina.

2.6 PTEN modula la replicación de VSV

Diversos estudios han revelado que algunas proteínas supresoras de tumores juegan un papel relevante en el control de la infección viral (García et al., 2006a; García et al., 2009, Takaoka et al., 2003). Con el fin de estudiar si PTEN puede ejercer algún control sobre la replicación viral, utilizamos MEFs heterocigotos para PTEN (PTEN +/-), MEFs derivados de ratones WT y MEFs provenientes de ratones con una copia extra del gen de PTEN con todas sus secuencias reguladoras (PTEN SP). Los MEFs con diferentes niveles de PTEN (Figura 33A) fueron infectados con VSV a una moi de 5 ufp/célula y a distintos tiempos de iniciada la infección analizamos la síntesis de proteínas virales mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-VSV. La síntesis de proteínas de VSV se veía reducida de forma dependiente de la dosis de PTEN (Figura 33B). Para confirmar estos resultados, analizamos la producción viral tras la infección de los distintos MEFs con VSV, a una moi de 5 ufp/célula durante 24 horas. La evaluación de los sobrenadantes de las diferentes células reveló que el título viral se reduce de manera dependiente de los niveles de PTEN (Figura 33C).

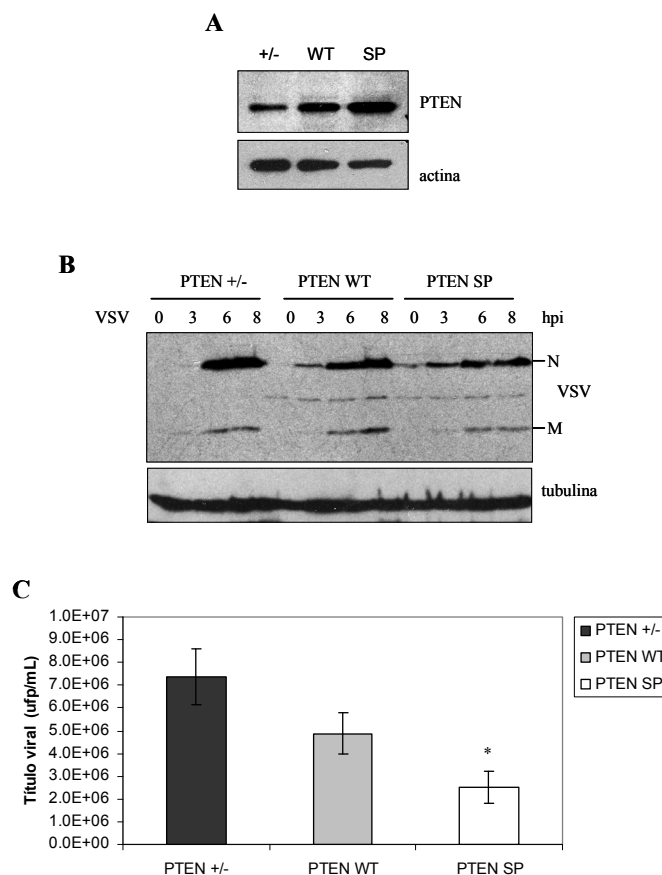


Figura 33. La síntesis de proteínas y el título de VSV son inhibidos de manera dependiente de la dosis de PTEN. **A.** Niveles de la proteína PTEN detectados en los MEFs PTEN +/-, PTEN WT y PTEN SP. **B.** MEFs PTEN +/-, WT y SP fueron infectados con VSV a una moi de 5 ufp/célula y la síntesis de proteínas virales fue analizada mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-VSV que reconoce las proteínas M y N del virus. **C.** MEFs PTEN +/-, WT y SP fueron infectados con VSV a una moi de 5 ufp/célula y la cantidad de virus presente en los sobrenadantes fue cuantificada por el método de formación de placas. Prueba t-Student: *, p<0.05.

2.7 El control de la replicación de VSV por PTEN se ve favorecido por SUMO

Dado que los residuos de lisina K266 y K289 parecen estar implicados en la sumoilación y la ubiquitinación de PTEN, cualquier análisis funcional que se realice con los mutantes en estas posiciones es de difícil interpretación. Con el fin de estudiar el efecto de SUMO sobre la actividad antiviral de PTEN, decidimos, por tanto, transfectar PTEN junto con pcDNA, Ubc9 y SUMO1, Ubc9 y SUMO2 o SENP1 en las células carentes de PTEN U251-MG y 36 horas después de la transfección las células fueron infectadas con VSV a una moi de 5 ufp/célula. Transcurridas 24 horas de iniciada la infección se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción viral en cada caso empleando la técnica de formación de placas. Observamos una reducción en el título viral en aquellas células transfectadas con PTEN con respecto al detectado en las células transfectadas con pcDNA (Figura 34), y esta reducción se incrementó significativamente tras la expresión de SUMO1 o SUMO2 (Figura 34). Por el contrario, en las células que expresaban SENP1, el título viral era similar al observado en las células control (Figura 34). Estos resultados indicaban que la conjugación de SUMO favorece la actividad antiviral de PTEN.

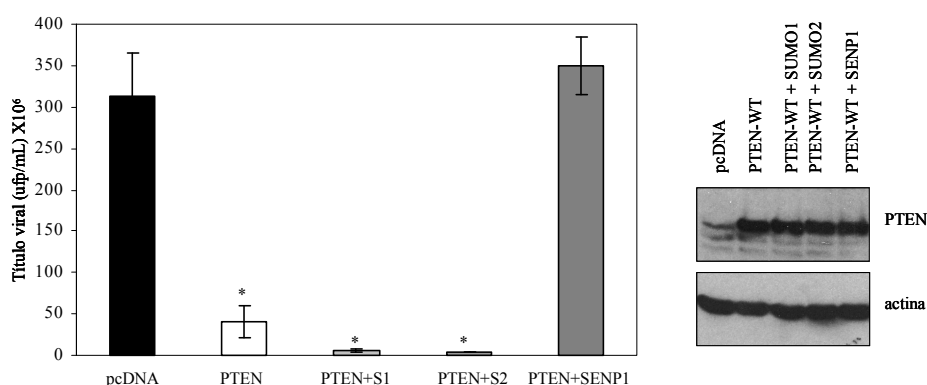


Figura 34. La conjugación de SUMO a PTEN favorece el control de la replicación de VSV. Células U251MG fueron transfectadas con pcDNA, PTEN-WT y pcDNA, PTEN, Ubc9 y SUMO1, PTEN, Ubc9 y SUMO2 o PTEN y SENP1 y 36 h después de la transfección las células se infectaron con VSV a una moi de 5 ufp/célula. Después de 24 h de infección los sobrenadantes se recogieron y el título viral fue cuantificado por la técnica de formación de placas. El panel de la derecha muestra los niveles de las proteínas PTEN en cada caso. Prueba t de Student: *, P<0.05.

2.8 SUMO inhibe el efecto de PTEN sobre la actividad transcripcional de p53

PTEN promueve la actividad transcripcional de p53 (Mayo et al., 2002). Con el fin de determinar si SUMO modula el efecto que PTEN ejerce sobre la actividad transcripcional de p53, transfectamos células MCF-7 con el vector reportero Mdm2-luc junto con pcDNA, PTEN y pcDNA, PTEN, Ubc9 y SUMO1 o PTEN, Ubc9 y SUMO2 y 36 h después de la transfección, las células se lisaron y se analizaron los niveles de luciferasa producidos en cada caso. Como se esperaba, la transfección de PTEN inducía la transactivación del gen reportero (Figura 35). Dicha transactivación se veía reducida tras la co-expresión de SUMO1 o SUMO2 (Figura 35). Estos resultados sugerían que SUMO modula negativamente la actividad de PTEN sobre p53.

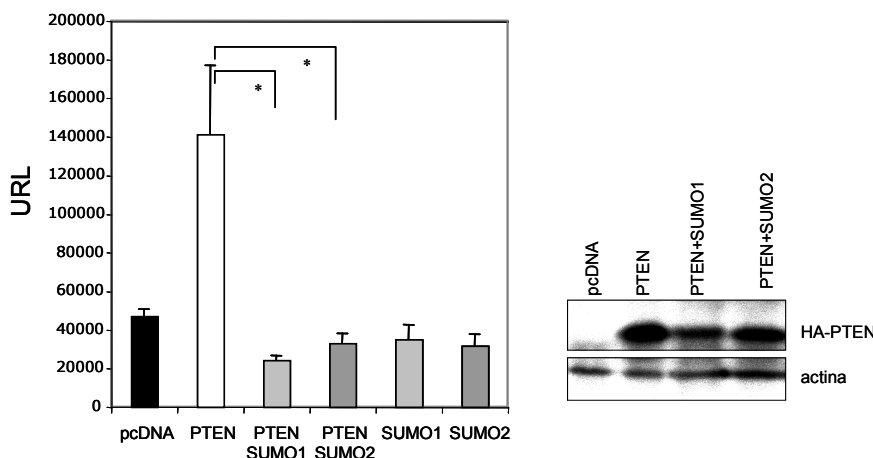


Figura 35. La conjugación de SUMO modula negativamente el efecto de PTEN sobre la actividad transcripcional de p53. Células MCF-7 se transfectaron con el reportero Mdm2-luc junto con pcDNA, PTEN y pcDNA, PTEN, Ubc9 y SUMO1 o PTEN, Ubc9 y SUMO2 y se cuantificaron los niveles de luciferasa producidos en cada caso. En el panel de la derecha se presentan los niveles de PTEN en las células transfectadas. Se obtuvieron los mismos resultados en al menos tres experimentos diferentes. Los datos presentados son el promedio \pm desviación estándar para un experimento dado. Los resultados fueron analizados usando la prueba t de Student, *, $P < 0.05$.

2.9 La inhibición de la vía de Akt se ve favorecida por la sumoilación de PTEN

Una de las funciones de PTEN mejor conocidas es la inhibición de la vía de Akt a través de su actividad fosfatasa (Haas-Kogan et al., 1998; Maehama y Dixon, 1998; Stambolic et al., 1998). Para determinar cómo contribuía SUMO a la inhibición de la vía de Akt ejercida por PTEN, células MCF-7 se transfectaron con PTEN y pcDNA, PTEN, Ubc9 y SUMO1, PTEN, Ubc9 y SUMO2, Ubc9 y SUMO1 o Ubc9 y SUMO2 y a las 24 horas de la transfección las células se incubaron en medio sin suero durante 24 horas. Tras ese tiempo, las células se

trataron con insulina durante 30 minutos y los niveles de Akt fosforilado se analizaron mediante inmunoblot. No se detectaron diferencias significativas entre los niveles de Akt fosforilado detectados en las células transfectadas con pcDNA y las transfectadas con Ubc9 y SUMO1 o con Ubc9 y SUMO2 (Figura 36). Como se esperaba, en las células transfectadas con PTEN WT, observamos una reducción en los niveles de Akt fosforilado, si los comparamos con los detectados en las células que habían sido transfectadas con el vector vacío (Figura 36). En las células que habían sido transfectadas con PTEN y con Ubc9 y SUMO1 o SUMO2, encontramos una mayor inhibición de la vía (Figura 36). Estos resultados indican que la sumoilación de PTEN favorece la actividad fosfatasa de la proteína.

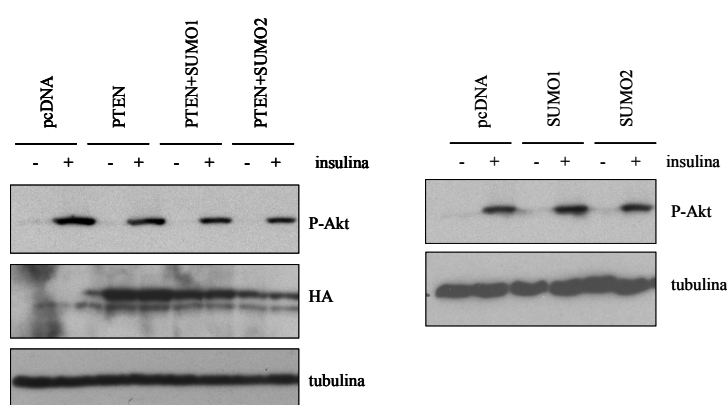


Figura 36. La sumoilación de PTEN favorece la actividad fosfatasa de la proteína. Células MCF-7 se transfectaron con pcDNA, PTEN y pcDNA, PTEN, Ubc9 y SUMO1 o PTEN, Ubc9 y SUMO2 y a las 24 h de la transfección las células se incubaron en medio sin suero durante 24 h. A continuación, las células se trataron con insulina (10 µg/mL) durante 30 minutos y los niveles de Akt fosforilado (P-Akt) se analizaron mediante inmunoblot.

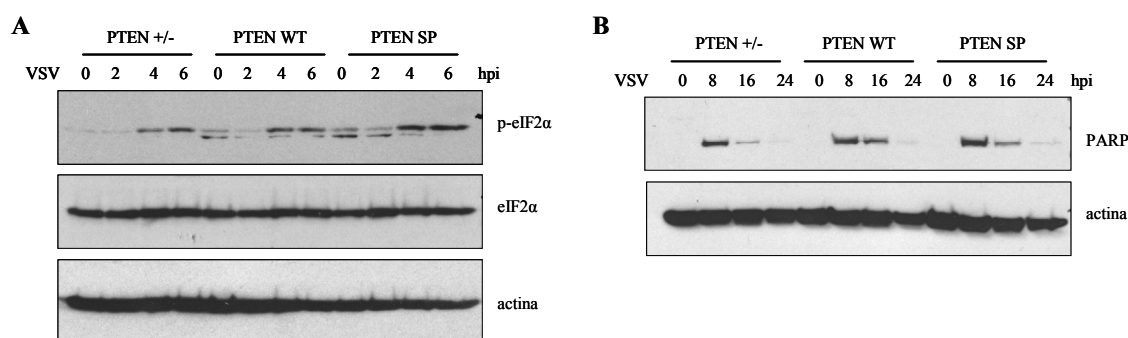
2.10 PTEN modula la respuesta celular frente a la infección con VSV

La quinasa activada por el ARNdc PKR, es un elemento fundamental de la defensa celular frente a la infección viral (García et al., 2006b). La infección con VSV da lugar a la activación de PKR que a su vez provoca la fosforilación del factor eucariótico de inicio de la traducción 2 alfa (eIF2 α), bloqueando la síntesis de proteínas celulares y virales e induciendo apoptosis. Para analizar si PTEN ejerce algún control sobre esta vía, infectamos MEFs PTEN +/-, WT y SP con VSV a una moi de 5 ufp/célula y a distintos tiempos analizamos la fosforilación del factor eIF2 α por inmunoblot. A las 4 horas de iniciada la infección se detectó la fosforilación de eIF2 α en todos los casos. Sin embargo, se observaron ligeras diferencias en los niveles del factor eIF2- α fosforilado. A mayor expresión de PTEN mayor eran los niveles detectados (Figura 37A). Estos resultados sugieren que PTEN modula positivamente la

activación de la ruta de la PKR en respuesta a la infección viral. A continuación, analizamos los niveles de PARP activado, uno de los principales sustratos de caspasa-3 y marcador de apoptosis (Lazebnik et al., 1994; Nicholson et al., 1995). Se detectó PARP activado a las 8 horas de iniciada la infección en todas las células, pero como ocurría en el caso anterior, el nivel de PARP activado era mayor cuanto mayor era el nivel de expresión de PTEN de las células empleadas (Figura 37B). Estos resultados sugieren que PTEN modula positivamente la inducción de apoptosis celular en respuesta a la infección con VSV.

Otra de las vías que se activa en respuesta a la infección con VSV es la vía molecular de NF- κ B, un factor de transcripción que regula una variedad de genes, muchos de ellos implicados en la respuesta inmune. Decidimos, por tanto, analizar la activación de esta vía tras la infección de MEFs +/-, WT y SP con VSV a una moi de 5 ufp/célula, mediante inmunoblot usando los anticuerpos anti-I κ B y anti-I κ B fosforilado, a distintos tiempos tras la infección. Como se observa en la figura 37C, no observamos diferencias significativas en la activación de esta vía independientemente de los niveles de PTEN.

Existen evidencias de que los virus modulan también la vía de Akt para favorecer la replicación viral (Schabbauer et al., 2008; Saeed et al., 2008). Con el objetivo de analizar el papel de PTEN en la activación de la vía de Akt en el contexto de la infección viral, MEFs PTEN +/-, WT y SP fueron infectados con VSV a una moi de 5 ufp/célula y, a los tiempos indicados, analizamos la activación de la ruta mediante inmunoblot usando el anticuerpo anti-Akt fosforilado. Aproximadamente una hora después de iniciada la infección de las células PTEN +/-, observamos una activación de la ruta que iba seguida de una ligera inhibición de la misma 4 horas después de la infección (Figura 37D). Esta cinética de inhibición de la ruta de Akt fue observada también en los MEFs WT y en los SP (Figura 37D), pero los niveles de Akt fosforilado detectados fueron claramente menores cuanto mayor era el nivel de expresión de PTEN de las células empleadas. Estos resultados indicaban que la activación de la vía de Akt en respuesta a la infección con VSV era inhibida por PTEN.



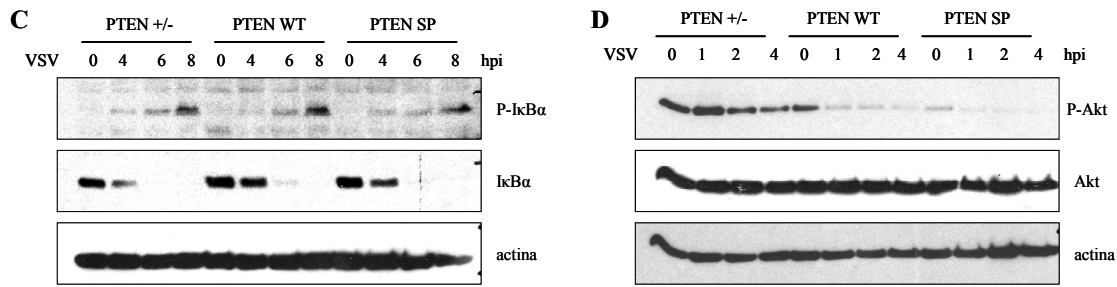


Figura 37. PTEN modula la activación de distintas vías moleculares que forman parte de la respuesta celular antiviral. **A.** MEFs PTEN +/-, WT y SP fueron infectados con VSV a una moi de 5 ufp/célula y a los tiempos indicados evaluamos los niveles P-eIF2 α y eIF2 α mediante IB. **B.** Los distintos MEFs se infectaron como describimos en apartado anterior y a los tiempos indicados, analizamos los niveles de PARP activado por IB. **C.** Los distintos MEFs se infectaron como describimos en apartado anterior y a los tiempos indicados, analizamos los niveles de P-IkBa e IkBa mediante IB. **D.** MEFs PTEN +/-, WT y SP se infectaron como describimos anteriormente y a los tiempos indicados analizamos los niveles de Akt fosforilado (P-Akt) por IB.

2.11 PTEN interacciona de forma no covalente con SUMO1

Recientemente se ha observado que muchos de los sustratos de SUMO interaccionan de forma no covalente con SUMO a través del denominado dominio SIM. Análisis de la secuencia aminoacídica de PTEN revelaba la presencia de diversos dominios SIM putativos por lo que decidimos estudiar la capacidad de PTEN de interaccionar de forma no covalente con SUMO1. La proteína PTEN se sintetizó *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina y a continuación se llevó a cabo un ensayo de interacción *in vitro* con GST o GST-SUMO1. PTEN era detectado unido a GST-SUMO1 pero no unido a GST (Figura 38), lo que indicaba que PTEN interaccionaba con SUMO1 de forma no covalente.

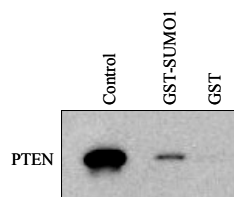
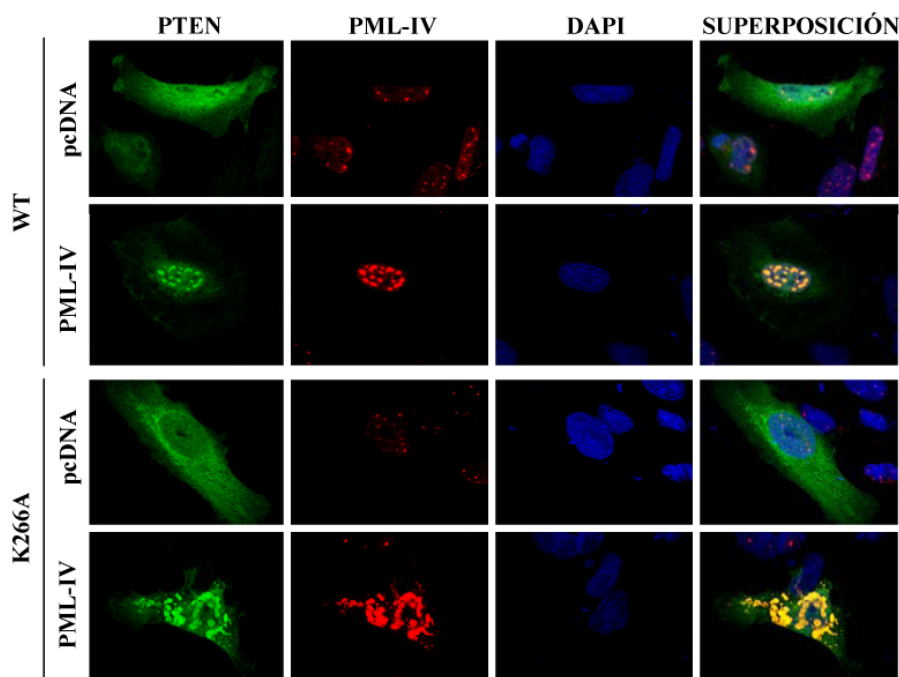


Figura 38. PTEN interacciona de forma no covalente con SUMO1. Proteína PTEN sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina fue incubada con GST o GST-SUMO1 como se indica.

2.12 El reclutamiento de PTEN a los PML-NB tras la sobreexpresión de PML es independiente de la sumoilación o monoubiquitinación de PTEN

Hallazgos previos indican que la sobreexpresión de PML promueve la localización nuclear de PTEN y una co-localización con PML (Song et al., 2008). Por otro lado, algunas proteínas que se sumoilan o interaccionan de forma no covalente con SUMO son reclutadas a los PML-NB (Shen et al., 2006). Decidimos entonces estudiar si la translocación de PTEN a los PML-NB era dependiente de la sumoilación de PTEN. Células U251-MG que carecen de PTEN fueron transfectadas con PTEN WT o los distintos mutantes de PTEN junto con pcDNA o PML-IV y 36 horas después de la transfección las células fueron fijadas y teñidas con anti-PTEN, anti-PML y DAPI. El análisis por microscopía confocal reveló que en las células en las que no se sobreexpresaba PML-IV, PTEN se localizaba disperso en el núcleo y citoplasma celular (Figura 39). Sin embargo, cuando se sobreexpresaba PML-IV, la proteína PTEN-WT se detectaba en el núcleo, centrada principalmente en los PML-NB (Figura 39), como se había descrito previamente. El análisis de los mutantes K266A, K289A y el doble mutante K266AK289A reveló que se comportaban igual que la proteína WT. En las células co-transfectadas con pcDNA, la localización subcelular de todos los mutantes era predominantemente citoplasmática (Figura 39). Sin embargo, la sobreexpresión de PML promovía el reclutamiento de PTEN a los PML-NB, sugiriendo que la modificación de PTEN por SUMO o monoubiquitina no es necesaria para su translocación a los PML-NB.



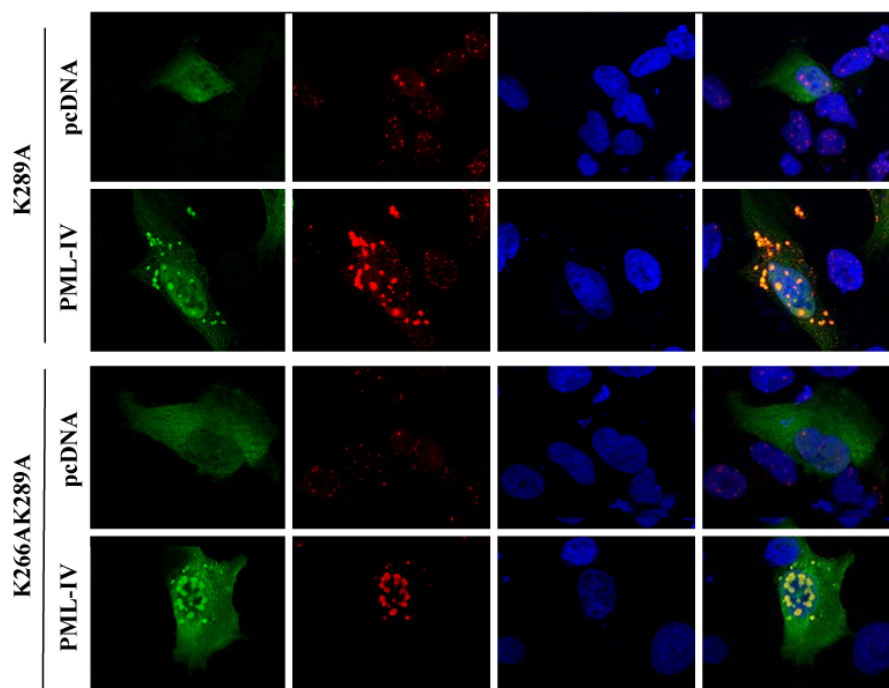


Figura 39. El reclutamiento de PTEN a los PML-NB tras la sobreexpresión de PML es independiente de la sumoilación o monoubiquitinación de PTEN. Células U251-MG fueron transfectadas con PTEN WT o los mutantes indicados junto con pcDNA o PML-IV y después de 36 h de transfección, las células se fijaron y se tiñeron con anti-PTEN, anti-PML-IV y DAPI. Las imágenes se analizaron por microscopía confocal.

2.13 El reclutamiento de PTEN a los PML-NB es dependiente de la interacción de PML con SUMO

Previamente hemos demostrado que PTEN es capaz de interactuar de manera no covalente con SUMO. Adicionalmente, la integridad de los PML-NB depende de la sumoilación de esta proteína en los residuos de lisina K65, K160 y K490 así como de su interacción no covalente con SUMO1 (Duprez et al., 1999; Shen et al., 2006). Con el fin de estudiar si la translocación de PTEN a los PML-NB era dependiente de la conjugación de SUMO a PML, células U251-MG fueron transfectadas con PTEN WT junto con pcDNA, PML-WT, PML-3KR (mutante de PML en los tres residuos de lisina implicados en la conjugación de SUMO) y PML- Δ SIM (mutante en el dominio SIM de la proteína PML). Tras 36 horas de transfección, las células se fijaron y tiñeron con anti-PTEN, anti-PML y DAPI. En las células co-transfectadas con pcDNA, PTEN mostraba una localización difusa entre el núcleo y el citoplasma (Figura 40). Cuando se sobreexpresaba PML-WT, observamos una translocación de PTEN a los PML-NB (Figura 40). Esta translocación no se detectaba cuando PTEN se co-transfectaba con PML-3KR

o PML- Δ SIM (Figura 40). Estos resultados indicaban que es necesaria la interacción de PML con SUMO para que pueda reclutar a PTEN a los PML-NB.

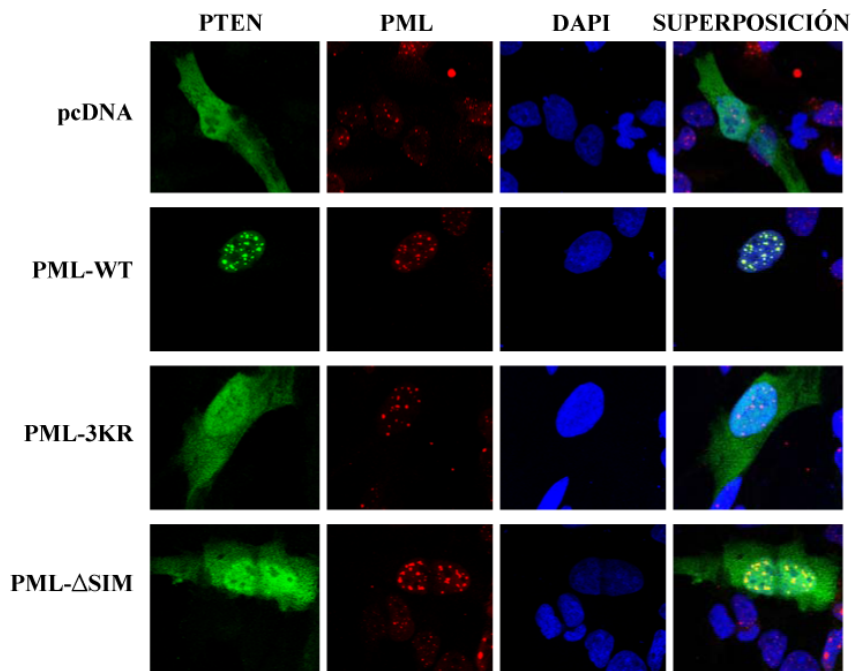


Figura 40. El reclutamiento de PTEN a los PML-NB es dependiente de la interacción de PML con SUMO. Células U251-MG fueron transfectadas con PTEN WT junto con pcDNA, PML-WT, PML-3KR o PML- Δ SIM y 36 horas después de la transfección las células fueron fijadas y teñidas con anti-PTEN, anti-PML y DAPI. Las imágenes se analizaron por microscopía confocal

2.14 PTEN coopera con PML en el control de la replicación viral

Nuestros resultados mostraban que diversas actividades de PTEN favorecen el control de la replicación de VSV por la célula. Previamente se había demostrado además que el supresor de tumores de PML también colabora en el control de la replicación de VSV (Chelbi-Alix et al., 1998). Decidimos entonces, estudiar cómo la sobreexpresión de ambos factores afecta a la replicación de VSV. Para ello, células U251-MG fueron transfectadas con pcDNA, PML, PTEN o PTEN y PML y tras 36 horas de transfección, las células fueron infectadas con VSV a una moi de 5 ufp/célula. Transcurridas 24 horas de iniciada la infección se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción viral en cada caso. En las células transfectadas con PML o PTEN observamos una importante reducción de la producción viral con respecto a la detectada en las células transfectadas con el vector vacío (Figura 41). Dicha producción viral se veía reducida aún más cuando se co-transfectaban ambos supresores de tumores (Figura 41), lo que indica que PTEN coopera con PML en el control de la replicación de VSV.

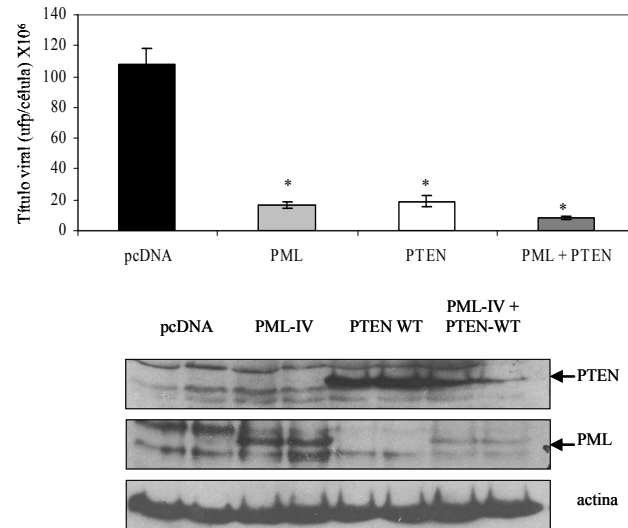
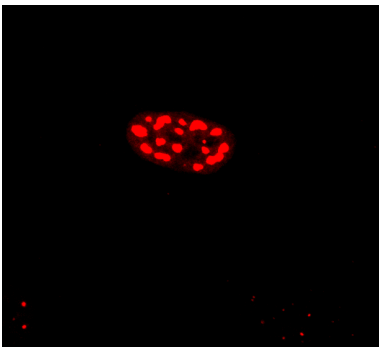


Figura 41. PTEN coopera con PML en el control de la replicación de VSV. Células U251-MG fueron transfectadas con pcDNA, PML, PTEN o PML y PTEN y 36 h después de la transfección las células fueron infectadas con VSV a una moi de 5 uflp/célula y tras 24 h de infección se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas.



DISCUSIÓN

1. Regulación de la proteína E3 del virus vaccinia por SUMO y ubiquitina

La proteína E3 es conocida por su papel en la resistencia al interferón, como un determinante de la patogénesis y del fenotipo de amplio rango de hospedadores del virus y como una molécula moduladora de la apoptosis y de la expresión de genes de la célula hospedadora a nivel transcripcional (Kwon et al., 2005; Langland y Jacobs, 2002; Langland et al., 2006; Ludwing et al., 2005). E3 se une a ARNdc y esta interacción media o incrementa su unión a ISG15 y PKR, respectivamente (Guerra et al., 2008; Sharp et al., 1998). E3 puede también unirse a SUMO1 en un ensayo de dos híbridos en levaduras, aunque esta interacción no fue evaluada a nivel bioquímico (Rogan y Heaphy, 2000). En base a estos datos y a la observación de que SUMO1 es reclutado a las factorías virales en respuesta a la infección con VACV (Palacios et al., 2005), nos propusimos analizar la relación existente entre E3 y SUMO. Nuestros resultados demuestran que E3 co-localiza con SUMO1 en las factorías virales y que la proteína E3 es modificada por SUMO1 y SUMO2 *in vitro* e *in vivo*. Además, demostramos que la sumoilación de E3 ocurre tanto en células transfectadas como en células infectadas, lo que indica que la modificación de E3 por SUMO es independiente de la infección del virus. El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de E3 identificó varias lisinas como posibles residuos aceptores de SUMO. Aunque los residuos de lisina a los que SUMO se conjuga suelen situarse dentro de la secuencia consenso Ψ KXD/E, se ha descrito que la selección de lisina es promiscua ya que la sustitución de lisina por arginina en sitios preferentes de modificación por SUMO puede conducir a la modificación de residuos secundarios (Eladad et al., 2005; Lin et al., 2006). La mutación de la secuencia consenso en E3 (la lisina K40) redujo, pero no inhibió totalmente, la sumoilación de E3. Sin embargo, cuando los residuos de lisina K40 y K99 de E3 fueron mutados simultáneamente, la sumoilación del doble mutante se redujo claramente tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados indicaban, por tanto, que los residuos de lisina situados en las posiciones K40 y K99 de E3 son sitios preferentes de conjugación de SUMO. Las consecuencias de la modificación por SUMO dependen del sustrato modificado. La sumoilación regula las funciones de muchas proteínas virales al modular su interacción con otras proteínas y alterar su localización subcelular, como se demostró para la proteína A40R de VACV (Palacios et al., 2005). Ni la localización subcelular ni la estabilidad de la proteína E3 se veían afectadas por la mutación de las lisinasceptoras de SUMO. Además, la expresión transitoria del mutante de E3 con sumoilación reducida, permitió reconstituir la replicación del VACV- Δ E3L en células HeLa, lo que indica que la modificación de E3 por SUMO no es necesaria para la replicación viral. Previamente, se había descrito algún otro ejemplo de proteína viral cuya sumoilación no afectaba a la replicación del virus. Este es el caso de la proteína IE2 de HCMV (Lee y Ahn, 2004). Sin embargo, la sumoilación de IE2 era necesaria para su función de transactivación (Ahn et al., 2001; Hofmann et al., 2000). La

sumoilación regula la actividad transcripcional de diversas proteínas pero, al contrario de lo que ocurre con IE2, su efecto más habitual es inhibir la transactivación ejercida por el sustrato (Verger et al., 2003). La proteína E3 activa la transcripción del gen humano p53 a través de su unión al Z-ADN (Kwon y Rich, 2005). Nuestros resultados muestran la activación transcripcional del gen reportero regulado por p53 PUMA-luc de manera dependiente de la dosis de E3. Esta transactivación se redujo significativamente tras la co-transfección de SUMO1 y se aumentó tras la co-transfección de SENP1. Además, la mutación de las lisinas que conjugan SUMO potenció la actividad transcripcional de E3 sobre este gen. En su conjunto, estos resultados revelan que la conjugación de SUMO a E3 inhibe su capacidad de transactivar el gen PUMA y sugieren que la conjugación a SUMO regula negativamente la unión de E3 a secuencias Z-ADN.

Recientemente se ha descrito que existen proteínas que son sustratos conocidos de SUMO y que además pueden interactuar con esta molécula de manera no covalente, a través del motivo de interacción con SUMO (dominio SIM) (Kerscher, 2007). E3 contiene en su extremo C-terminal una región hidrofóbica con un posible dominio SIM [L/V/I]-x-[L/V/I][L/V/I]. El análisis del mutante de E3 en dicho dominio SIM era incapaz de interactuar de forma no covalente con SUMO, al contrario que la proteína salvaje y, además, tenía afectada su capacidad para sumoilarse *in vitro* e *in vivo*. Estos resultados demuestran que la sumoilación eficiente de E3 requiere la existencia de una interfase SUMO-SIM, como se ha descrito para un número creciente de sustratos de SUMO (Kerscher, 2007; Lin et al., 2006; Minty et al., 2000; Takahashi et al., 2005). Además, observamos que la mutación del dominio SIM de E3 desestabiliza la proteína e induce su degradación por un mecanismo dependiente del proteasoma. El análisis de la localización subcelular de la proteína E3 mutante en el dominio SIM, en presencia del inhibidor del proteasoma, reveló que esta proteína muestra, además, una localización predominantemente citoplasmática, en contraste con la localización núcleo-citoplasmática observada para la proteína salvaje. Aunque existe una correlación entre la localización citoplasmática de la proteína E3-ΔSIM y su degradación mediada por el proteasoma, un mutante citoplasmático de E3 previamente descrito, no se describió como una proteína inestable (Chang et al., 1995), lo que sugiere que la degradación de la proteína no es consecuencia de su localización citoplasmática. Se ha demostrado que las interacciones no covalentes con SUMO pueden regular el reclutamiento de proteínas a los cuerpos nucleares de PML (Matunis et al., 2006; Shen et al., 2006) o la actividad transcripcional (Kuo et al., 2005; Rosendorff et al., 2004). Este es el primer caso donde se muestra que la interacción no covalente con SUMO regula la estabilidad de una proteína.

En un modelo clásico, la ubiquitinación se relacionaba con la degradación mediada por el proteasoma. Como el mutante de E3 en el dominio SIM se degradaba a través del proteasoma, decidimos analizar si la proteína E3 puede ser ubiquitinada. Nuestros resultados

demuestran que E3 puede unirse a ubiquitina, aunque esta modificación no conduce a la degradación de la proteína E3 salvaje. Se han descrito virus que se encuentran relacionados con la maquinaria de ubiquitinación a través de distintos mecanismos, pero se han identificado pocas proteínas virales que sean sustrato para la ubiquitina. La conjugación con ubiquitina induce la degradación de algunas proteínas virales, como es el caso de LMP2a del virus de Epstein-Barr (Ikeda et al., 2000), E7 (Kamio et al., 2004) y E2 (Bellanger et al., 2001) del virus del papiloma humano y la proteína p28 de poxvirus (Nerenberg et al., 2005). Sin embargo, algunas funciones virales requieren la conjugación de ubiquitina sin que implique un recambio del sustrato. Algunos ejemplos son la ubiquitinación de las proteínas Gag del virus de inmunodeficiencia humana (Demirov et al., 2002; Garrus et al., 2001), Vp40 del virus Ebola (Yasuda et al., 2003) o la proteína M de Rhadinovirus (Ingham et al., 2004), implicada en la regulación del proceso de salida de la célula de estos virus. Recientemente, se ha descrito que los poxvirus explotan la maquinaria de ubiquitinación al expresar proteínas virales que actúan como E3 ligasas o regulando las E3 ligasas de ubiquitina de la célula (Nerenberg et al., 2005; Satheshkumar et al., 2009; van Buuren et al., 2008). Además, se ha demostrado que el proteasoma y la ubiquitina son necesarios para la infección de poxvirus (Teale et al., 2009).

Actualmente se conocen siete clases de DUBs que actúan revertiendo la ubiquitinación del sustrato y una de estas clases es la de proteasas específicas de ubiquitina (USP). Una de las USP mejor estudiada es la USP7 o proteasa específica de ubiquitina asociada a herpesvirus (HAUSP). Las proteínas ICP0 del virus herpes simplex tipo 1 y EBNA1 del virus Epstein-Barr interactúan con USP7, quien revierte la ubiquitinación y degradación de p53, EBNA1 e ICP0 (Canning et al., 2004; Everett et al., 1999; Holowaty y Frappier, 2004; Li et al., 2002). Nuestros resultados demuestran que USP7 también interactúa con E3 y modula su interacción con ubiquitina. Para explicar la degradación de la proteína E3 mutante en el dominio SIM exploramos varias hipótesis. La primera fue analizar si USP7 no podía revertir la ubiquitinación del mutante de E3 en el dominio SIM. Sin embargo, nuestros resultados indicaban que USP7 incrementaba la estabilidad del mutante, lo que sugería que esta hipótesis no era la correcta. La ubiquitina posee 7 lisinas que pueden actuar como sitios de conjugación para otras moléculas de ubiquitina, lo que originará que los sustratos puedan ser modificados por distintos tipos de cadenas de ubiquitina (Peng et al., 2003; Pickart y Fushman, 2004). En este sentido, las consecuencias de la poli-ubiquitinación parecen depender de la longitud de la cadena de ubiquitina y el tipo de enlace utilizado para formar los polímeros. Es por ello tentador especular con la posibilidad de que las diferencias observadas entre la estabilidad de la proteína E3 salvaje y la mutante en el dominio SIM, se deban a diferencias en la longitud de las cadenas de ubiquitina. El análisis de la interacción entre E3 WT y E3- Δ SIM con ubiquitina mostró que, mientras que la modificación de E3-WT con ubiquitina era muy limitada, la interacción de ubiquitina con E3- Δ SIM daba lugar a la formación de cadenas muy largas de ubiquitina. Estos

resultados sugieren que el dominio SIM actúa como un modulador de la longitud de la cadena de ubiquitinas unidas a E3. Se ha demostrado la existencia de mecanismos de entrecruzamiento entre los sistemas de sumoilación y ubiquitinación (Geoffroy y Hay, 2009). Nuestros resultados con la proteína E3 de vaccinia constituyen un nuevo ejemplo de cómo SUMO puede tener un efecto profundo sobre el estado de ubiquitinación de las proteínas. Además, demostramos por primera vez que la proteína E3 de vaccinia se modifica por SUMO y ubiquitina e interacciona con SUMO, mecanismos que posiblemente favorezcan la multifuncionalidad de esta proteína viral.

2. Regulación de la proteína supresora de tumores PTEN por SUMO

PTEN es uno de los genes supresores de tumores más frecuentemente mutados en cáncer (Keniry y Parsons, 2008; Li et al., 1997; Li y Ross, 2007; Steck et al., 1997). Su importancia como supresor de tumores viene apoyada, además, por la existencia de distintos síndromes autosómicos dominantes caracterizados por desórdenes del desarrollo, problemas neurológicos, múltiples tumores benignos y alto riesgo de cáncer de endometrio, de tiroides y de mama, en los que se han identificado mutaciones de PTEN en la línea germinal. Funcionalmente PTEN es una fosfatasa no redundante de proteínas y lípidos de la membrana plasmática. PTEN contrarresta la señalización molecular de la vía de la PI3K (Stambolic et al., 1998; Maehama y Dixon, 1998), modulando negativamente los niveles de PI(3,4,5)P3, un segundo mensajero que promueve la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular (Stambolic et al., 1998; Haas-Kogan et al., 1998; Maehama y Dixon, 1998). Además, PTEN lleva a cabo otras funciones biológicas que son independientes de su actividad fosfatasa de lípidos pero dependientes de su actividad fosfatasa de proteínas o de la interacción proteína-proteína, como la regulación de la migración celular, de la transición del ciclo celular o de la integridad cromosómica (Tamura et al., 1998; Hlobilkova et al., 2000; Weng et al., 2001; Raftopoulou et al., 2004; Shen et al., 2007). Debido a su relevancia, PTEN se encuentra fuertemente regulado. A nivel post-traducciona, se ha descrito que PTEN puede fosforilarse, acetilarse y ubiquitinarse (Okumura et al., 2006; Torres y Pulido, 2001; Trotman et al., 2007; Vásquez et al., 2000; Wang et al., 2007). Nuestros resultados revelan que la infección con virus induce la aparición de una forma de PTEN con un peso molecular de alrededor de 15-20 kDa mayor que la proteína sin modificar lo que suponemos debe de corresponder con una modificación post-traducciona de PTEN. Esta variación en el peso molecular de la proteína modificada nos llevó a descartar inicialmente que se debiera a la ubiquitinación, la acetilación o la fosforilación de PTEN y nos planteamos la hipótesis de que PTEN se estuviera sumoilando. Ensayos de sumoilación *in vitro* demuestran que PTEN podía conjugarse con SUMO1 y que el tamaño de dichos conjugados era similar al que presentaba la banda adicional detectada tras la

infección viral. Demostramos, además, que PTEN se modificaba *in vivo* por SUMO1 y SUMO2 y que la infección viral incrementaba la cantidad de proteína sumoilada. La modificación con SUMO1 de PTEN no daba lugar a una banda definida si no que se detectaba como una banda ancha, lo que podría indicar la presencia de modificaciones adicionales en la proteína sumoilada. El análisis bioinformático reveló la presencia de varios posibles dominios de conjugación a SUMO en la proteína. El análisis de los mutantes generados en los distintos dominios nos permitió identificar las lisinas K266 y K289 en PTEN como sitios de conjugación a SUMO. Como uno de estos residuos, la lisina K289, se había identificado previamente como un sitio de conjugación a mono-ubiquitina y esta modificación regulaba su importación nuclear (Trotman, et al., 2007), decidimos evaluar la localización subcelular de los mutantes de PTEN para la conjugación a SUMO. Como se había descrito previamente, la mutación del residuo 289 inducía la exportación de PTEN al citoplasma celular. De forma similar, la mutación de la lisina 266 en PTEN induce su exportación al citoplasma. Estos resultados nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis: si la inhibición de la mono-ubiquitinación induce la localización citoplasmática de PTEN, es posible que la exportación de PTEN al citoplasma que se observa cuando mutamos el residuo 266, se deba también a una reducción en la mono-ubiquitinación de la proteína. El análisis de mono-ubiquitinación *in vitro* reveló que la lisina 266 también era susceptible de unir mono-ubiquitina. Estos resultados indican que SUMO y mono-ubiquitina compiten por los mismos residuos en PTEN, como se ha demostrado para otros sustratos. La proteína I κ B- α mantiene inactivo el factor de transcripción NF- κ B en el citoplasma a través de su interacción con esta proteína. Ante un estímulo positivo, I κ B- α es fosforilado y posteriormente ubiquitinado en el residuo de lisina K21, lo que promueve su degradación vía proteasoma. Sin embargo, el residuo K21 también puede conjugarse con SUMO, modificación que previene la degradación de la proteína, regulando negativamente la expresión de los genes dependiente de NF- κ B (Desterro et al., 1998). Otro ejemplo es el de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL) o el del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA). SUMO y ubiquitina compiten para conjugarse al mismo residuo de lisina de VHL y PCNA, regulando en sentidos inversos la estabilidad y distribución subcelular de la proteína y afectando en sentidos opuestos a la resistencia de las células a daño al ADN, respectivamente (Cai et al., 2010; Hoege et al., 2002).

Trabajos desarrollados durante los últimos años han demostrado que algunos de los principales supresores de tumores de la célula desarrollan también una actividad importante para el control de la infección viral y podrían actuar como sensores frente a estos patógenos (Everett and Chelbi-Alix, 2007; García et al., 2006a; García et al., 2009; Muñoz-Fontela et al., 2005; Takaoka et al., 2003). Existen diversas evidencias que apuntan a que PTEN podría formar parte de este grupo de supresores tumorales. La expresión de la proteína X del virus de la hepatitis B modula la activación transcripcional de PTEN mediada por p53, lo que induce una disminución

en los niveles del supresor de tumores PTEN (Chung et al., 2003). Además, los niveles de PTEN incrementan significativamente en células infectadas con el virus del papiloma humano tipo 6 o tipo 11, lo que podría ser interpretado como un mecanismo de defensa del hospedador para reducir la proliferación celular e inducir la muerte de las células infectadas con el virus (Sun and Seinberg, 2002). Finalmente, estudios realizados inyectando VSV en la próstata de ratones control y ratones con PTEN delecionado específicamente en próstata, revelaron que VSV replicaba mejor en próstatas de ratones transgénicos que en la de animales salvajes, debido a la deficiencia en la respuesta del interferón de los animales transgénicos (Moussavi et al., 2010). Nuestros resultados empleando fibroblastos primarios de ratón revelan que cuanto mayor son los niveles de PTEN menor es la replicación de VSV. Además, la reintroducción de PTEN en células tumorales que no expresan la proteína limita parcialmente la replicación viral. En su conjunto estos resultados demuestran que PTEN modula la replicación de VSV.

Existen varias vías moleculares que se activan en la célula en respuesta a la infección con VSV, con el fin de controlar la infección viral. Estos mecanismos incluyen la activación de la vía de NF- κ B o la vía de la proteína quinasa activada por el ARNdc (PKR). Aunque no encontramos diferencias significativas en la activación de la ruta de NF- κ B en los distintos MEFs, independientemente de los niveles de PTEN, sí encontramos diferencias en la activación de la vía de la PKR. El ARNdc que se produce durante la infección viral activa PKR. PKR activada induce, entre otras, la fosforilación de eIF2 α , conduciendo así a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y virales y a la inducción de apoptosis. Los niveles del eIF2 α fosforilado que se detectaron en los MEFs fueron aumentando en función de los niveles de PTEN que expresaban las células. De la misma forma, los niveles de PARP activado detectados correlacionaban positivamente con los niveles de PTEN. Estos resultados indicaban una mayor activación de la ruta de PKR y, consecuentemente, una mayor apoptosis en aquellas células con mayores niveles de PTEN, mecanismo que podría favorecer el control de la replicación viral. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la inactivación de PTEN en células de melanoma humanas reduce la fosforilación de eIF2- α y que la reconstitución de células de glioblastoma o de cáncer de próstata que carecen de PTEN con este supresor de tumores induce la activación de PKR y la fosforilación de eIF2- α , y que esta activación es necesaria para la inducción de apoptosis y supresión tumoral mediadas por PTEN (Mounir et al., 2009).

Otra vía molecular que se supone importante para la infección viral es la vía de PI3K/Akt. Existen diversos ejemplos de virus ADN tales como el virus de Epstein-Barr, el virus de Herpes simplex tipo 1 o SV40, y virus ARN tales como el virus de la Hepatitis C, el Ebola y el virus respiratorio sincitial, que inducen o activan dicha ruta durante la infección (Buchkovich et al., 2008; Cooray, 2004; Ehrhardt and Ludwig, 2009), con el fin de beneficiarse de las propiedades anti-apoptóticas de esta ruta (Cooray, 2004). Sin embargo, el papel de la vía de la

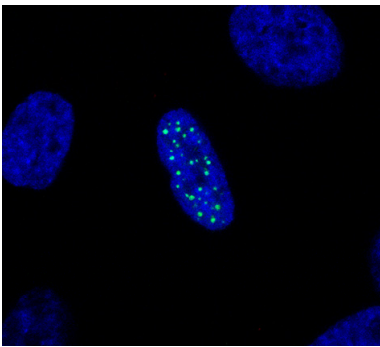
PI3K/Akt para la replicación de otros virus no está tan claro. Un ejemplo lo tenemos en los diversos resultados contradictorios que existen sobre el papel de esta ruta sobre la infección con VSV. Se ha descrito que la inhibición de distintos sustratos de esta vía potencian la replicación de VSV (Alain et al., 2010; Minami et al., 2007), que la actividad quinasa de PI3K es importante para la entrada del virus (Le Blanc et al., 2005) y que la actividad de Akt es esencial para la replicación del virus (Sun et al., 2008). Otros por el contrario, han descrito que el tratamiento con inhibidores de la ruta no afectan a la replicación de VSV (Connor et al., 2002; Dunn et al., 2009) y otro trabajo describe una mayor replicación de VSV tras la inhibición de la ruta (Schabbauer et al., 2008). Como PTEN es un regulador negativo de la vía PI3K-Akt (Stambolic et al., 1998; Haas-Kogan et al., 1998; Maehama y Dixon, 1998), decidimos analizar el estado de activación de la misma a distintos tiempos de iniciada la infección con VSV en los MEFs con distintos niveles de PTEN. El análisis de los MEFs heterocigotos para PTEN mostró que aunque inicialmente se produce una activación de la vía de PI3K/Akt en respuesta a la infección viral, ésta va seguida de una inhibición y que dicha inhibición es totalmente dependiente de los niveles de PTEN. Estos resultados, así como la observación de que PTEN se traslada a la membrana citoplasmática en respuesta a la infección con VSV, nos lleva a postular la hipótesis de que PTEN se activa en respuesta a la infección viral y se mueve hacia la membrana donde inhibiría la activación de esta ruta.

El análisis de la activación de la ruta de PI3K/Akt en respuesta a la insulina tras la co-expresión de Ubc9 y SUMO1 o SUMO2 junto con PTEN sugiere que la modificación con SUMO modula positivamente la actividad fosfatasa de PTEN. Este efecto de SUMO es opuesto al descrito para la mono-ubiquitina ya que la mono-ubiquitinación de PTEN inhibe su actividad fosfatasa *in vitro* (Maccario et al., 2010). Por tanto, podría existir un mecanismo de regulación de las actividades de la proteína a través de modificaciones post-traduccionales transitorias en función de un estímulo dado. De la misma forma, la co-expresión de Ubc9 y SUMO1 o SUMO2 incrementó el control de la replicación de VSV ejercida por PTEN, mientras que la co-expresión de la desumoilasa SENP1 revirtió este efecto, sugiriendo que la conjugación de SUMO a PTEN favorece la actividad antiviral de la proteína. Estos resultados, por tanto, apuntarían a que la modificación de PTEN por SUMO forma parte del mecanismo de defensa de las células frente a la infección viral. Recientemente se demostró que la actividad antiviral de otra proteína celular se veía potenciada por SUMO. La proteína TRIM5 α , un factor que limita la replicación de algunos retrovirus, interacciona con SUMO y esta interacción es necesaria para que la proteína pueda ejercer su actividad antiviral (Arriagada et al., 2011).

SUMO también puede modular la actividad transcripcional de distintos sustratos, normalmente inhibiéndola (Gill, 2003; Gil, 2005; Verger et al., 2003). Por ello, analizamos el efecto de SUMO sobre la activación transcripcional de p53 mediada por PTEN. Nuestros

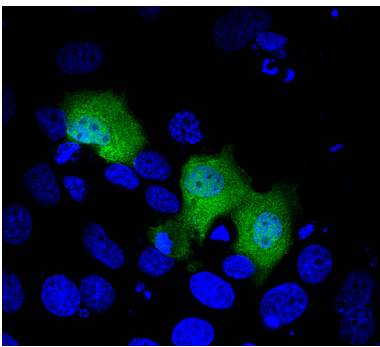
resultados indican que la coexpresión de Ubc9 y SUMO1 o SUMO2 inhibe la actividad transcripcional de p53 mediada por PTEN.

Existen evidencias de que PTEN se desplaza a los PML-NB tras la sobre-expresión de PML (Song et al., 2008). Nuestros experimentos de sobre-expresión de PML revelaron que PTEN se moviliza hacia los PML-NB de manera dependiente de la sumoilación de PML y de la interacción de PML con SUMO de forma no covalente, pero de manera independiente de la sumoilación de PTEN. Sin embargo, dado que las interacciones no covalentes con SUMO pueden regular el reclutamiento de proteínas a los cuerpos nucleares de PML (Matunis et al., 2006; Shen et al., 2006) y que, como hemos demostrado en este trabajo, PTEN es capaz de interactuar con SUMO de forma no covalente, es posible que el reclutamiento de los mutantes de PTEN en las lisinas susceptibles de conjugar SUMO a los PML-NB sea a través de los dominios putativos SIM de PTEN. No podemos, por tanto, descartar a SUMO como uno de los factores implicados en la movilización de PTEN hacia los PML-NB. Dado que PML pertenece a ese grupo de supresores de tumores capaces de controlar la infección viral y en concreto la replicación de VSV (Regad y Chelbi-Alix, 2001b) y que PTEN es reclutado a estas estructuras tras la sobre-expresión de PML, decidimos evaluar si la co-expresión de ambos supresores de tumores favorecía el control de la replicación de VSV que se observaba tras la expresión de cada uno de ellos por separado. La evaluación del título viral de células que co-expresaban PML y PTEN, demostró que estas proteínas cooperan en el control de la infección con VSV. En su conjunto, estos hallazgos revelan cómo la interacción de los virus con la célula huésped modula la maquinaria post-traducciona del hospedador y establece una nueva relación funcional entre las proteínas supresoras de tumores y el control de la infección viral.



CONCLUSIONES

1. La proteína E3 del virus vaccinia se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vitro* e *in vivo* y los residuos de lisina K40 y K99 están implicados en esta modificación post-traducciona.
2. La conjugación de SUMO a E3 no afecta ni a la localización subcelular ni a la estabilidad de la proteína y no es necesaria para la replicación viral.
3. La sumoilación de E3 regula negativamente su actividad transcripcional.
4. La proteína E3 presenta un dominio SIM que regula su estabilidad, interacción no covalente con SUMO, la conjugación a SUMO y su localización subcelular.
5. E3 se modifica por ubiquitina y esta modificación está modulada por USP7. Además, la longitud de las cadenas de ubiquitina que se conjugan a E3 está regulada por el dominio SIM.
6. La infección viral induce una modificación post-traducciona del supresor de tumores PTEN y su desplazamiento hacia la membrana citoplasmática.
7. PTEN se sumoila *in vitro* e *in vivo* y esta modificación es favorecida por la infección viral. Los residuos de lisina K266 y K289 están implicados en la conjugación de SUMO y mono-ubiquitina y los mutantes en estas posiciones presentan una localización citoplasmática.
8. PTEN inhibe la replicación de VSV a través de la activación de la vía de PKR y la inducción de apoptosis y modula la activación de la vía de PI3K/Akt en respuesta a la infección con VSV.
9. La conjugación de SUMO a PTEN ejerce un efecto negativo sobre su capacidad de regular la actividad transcripcional de p53, pero potencia la actividad fosfatasa de PTEN y su actividad antiviral.
10. PTEN interacciona con SUMO de manera no covalente y la sobreexpresión de PML induce el desplazamiento de PTEN a los PML-NB de forma independiente de la sumoilación y mono-ubiquitinación de PTEN pero dependiente de la interacción covalente y no covalente de PML con SUMO. PML y PTEN cooperan para inhibir la replicación de VSV.



BIBLIOGRAFÍA

Ahn, J. H., Y. Xu, et al. (2001). Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. J Virol **75**(8): 3859-3872.

Alain, T., X. Lun, et al. (2010). Vesicular stomatitis virus oncolysis is potentiated by impairing mTORC1-dependent type I IFN production. Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1576-1581.

Arriagada, G., L. N. Muntean, et al. (2011). SUMO-Interacting Motifs of Human TRIM5alpha are Important for Antiviral Activity. PLoS Pathog **7**(4): e1002019.

Beattie, E., K. L. Denzler, et al. (1995). Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. J Virol **69**(1): 499-505.

Beattie, E., E. B. Kauffman, et al. (1996). Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. Virus Genes **12**(1): 89-94.

Bellanger, S., C. Demeret, et al. (2001). Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. J Virol **75**(16): 7244-7251.

Bernardi, R., P. P. Scaglioni, et al. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. Nat Cell Biol **6**(7): 665-672.

Berndt, A., H. Hofmann-Winkler, et al. (2009). Importance of covalent and noncovalent SUMO interactions with the major human cytomegalovirus transactivator IE2p86 for viral infection. J Virol **83**(24): 12881-12894.

Bischof, O., O. Kirsh, et al. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. EMBO J **21**(13): 3358-3369.

Boddy, M. N., K. Howe, et al. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. Oncogene **13**(5): 971-982.

Boggio, R. and S. Chiocca (2006). Viruses and sumoylation: recent highlights. Curr Opin Microbiol **9**(4): 430-436.

Brandt, T., M. C. Heck, et al. (2005). The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response. Virology **333**(2): 263-270.

Brandt, T. A. and B. L. Jacobs (2001). Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. J Virol **75**(2): 850-856.

Buchkovich, N. J., Y. Yu, et al. (2008). The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. Nat Rev Microbiol **6**(4): 266-275.

Buschmann, T., S. Y. Fuchs, et al. (2000). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. Cell **101**(7): 753-762.

Cai, Q. and E. S. Robertson (2010). Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. PLoS One **5**(9).

Canning, M., C. Boutell, et al. (2004). A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. J Biol Chem **279**(37): 38160-38168.

Carrano, A. C., E. Eytan, et al. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. Nat Cell Biol **1**(4): 193-199.

Chang, H. W. and B. L. Jacobs (1993). Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. Virology **194**(2): 537-547.

Chang, H. W., L. H. Uribe, et al. (1995). Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. J Virol **69**(10): 6605-6608.

Chang, H. W., J. C. Watson, et al. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4825-4829.

Chang, T. H., T. Kubota, et al. (2009). Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery. PLoS Pathog **5**(6): e1000493.

Chelbi-Alix, M. K., F. Quignon, et al. (1998). Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. J Virol **72**(2): 1043-1051.

Chen, Z., J. Hagler, et al. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev **9**(13): 1586-1597.

Chen, Z., L. C. Trotman, et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature **436**(7051): 725-730.

Cho, G., Y. Lim, et al. (2009). SUMO interaction motifs in Sizn1 are required for promyelocytic leukemia protein nuclear body localization and for transcriptional activation. J Biol Chem **284**(29): 19592-19600.

Chow, J. Y., K. T. Quach, et al. (2007). RAS/ERK modulates TGFbeta-regulated PTEN expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. Carcinogenesis **28**(11): 2321-2327.

Chow, L. M. and S. J. Baker (2006). PTEN function in normal and neoplastic growth. Cancer Lett **241**(2): 184-196.

Chung, T. W., Y. C. Lee, et al. (2003). Hepatitis B Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. Cancer Res **63**(13): 3453-3458.

Condit, R. C., N. Moussatche, et al. (2006). In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. Adv Virus Res **66**: 31-124.

Connor, J. H. and D. S. Lyles (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F

translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. J Virol **76**(20): 10177-10187.

Cooray, S. (2004). The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. J Gen Virol **85**(Pt 5): 1065-1076.

Crook, T., J. A. Tidy, et al. (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. Cell **67**(3): 547-556.

de Stanchina, E., E. Querido, et al. (2004). PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. Mol Cell **13**(4): 523-535.

de The, H., C. Lavau, et al. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. Cell **66**(4): 675-684.

Dellaire, G. and D. P. Bazett-Jones (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. Bioessays **26**(9): 963-977.

Demirov, D. G., A. Ono, et al. (2002). Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 955-960.

Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. Mol Cell **2**(2): 233-239.

Dikic, I., S. Wakatsuki, et al. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. Nat Rev Mol Cell Biol **10**(10): 659-671.

Dunn, E. F., R. Fearn, et al. (2009). Akt inhibitor Akt-IV blocks virus replication through an Akt-independent mechanism. J Virol **83**(22): 11665-11672.

Duprez, E., A. J. Saurin, et al. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. J Cell Sci **112** (Pt 3): 381-393.

Earl, P. L. y. M., B. (1991). Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. Current protocols in molecular biology. F. M. a. c. Ausubel. NY, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Ehrhardt, C. and Ludwig, S. (2009). A new player in deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. Cellular Microbiol. **11**(6): 863-871.

Eladad, S., T. Z. Ye, et al. (2005). Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. Hum Mol Genet **14**(10): 1351-1365.

Everett, R. D., M. Meredith, et al. (1999). The ability of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 to bind to a ubiquitin –specific protease contributes to its role in the activation of gene expression and stimulation of virus replication. J. Virol. **73**(1): 417-426.

Everett, R. D. and M. K. Chelbi-Alix (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. Biochimie **89**(6-7): 819-830.

Fagioli, M., M. Alcalay, et al. (1992). Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. Oncogene **7**(6): 1083-1091.

Freeman, D. J., A. G. Li, et al. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. Cancer Cell **3**(2): 117-130.

Garcia, M. A., M. Collado, et al. (2006a). Antiviral action of the tumor suppressor ARF. EMBO J **25**(18): 4284-4292.

Garcia, M. A., J. Gil, et al. (2006b). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 1032-1060.

Garcia, M. A., P. Gallego, et al. (2009). Activation of NF- κ B pathway by virus infection requires Rb expression. PLoS One **4**(7): e6422.

Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. Cell **107**(1): 55-65.

Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 947-956.

Geoffroy, M. C. and R. T. Hay (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 564-568.

Gill, G. (2003). Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. Curr Opin Genet Dev **13**(2): 108-113.

Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. Curr Opin Genet Dev **15**(5): 536-541.

Girdwood, D., D. Bumpass, et al. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. Mol Cell **11**(4): 1043-1054.

Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature **349**(6305): 132-138.

Guerra, S., A. Caceres, et al. (2008). Vaccinia virus E3 protein prevents the antiviral action of ISG15. PLoS Pathog **4**(7): e1000096.

Haas-Kogan, D., N. Shalev, et al. (1998). Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. Curr Biol **8**(21): 1195-1198.

Hardeland, U., R. Steinacher, et al. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. EMBO J **21**(6): 1456-1464.

Hayakawa, F. and M. L. Privalsky (2004). Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. Cancer Cell **5**(4): 389-401.

He, L. (2010). Posttranscriptional regulation of PTEN dosage by noncoding RNAs. Sci Signal **3**(146): pe39.

Hecker, C. M., M. Rabiller, et al. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. J Biol Chem **281**(23): 16117-16127.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). The ubiquitin system. Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Hettinger, K., F. Vikhanskaya, et al. (2007). c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. Cell Death Differ **14**(2): 218-229.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 195-201.

Hlobilkova, A., P. Gulberg, et al. (2000). Cell cycle arrest by the PTEN tumor suppressor is target cell specific and may require protein phosphatase activity. Exp Cell Res **256**(2): 571-577.

Hoegge, C., B. Pfander, et al. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. Nature **419**(6903): 135-141.

Hofmann, H., S. Floss, et al. (2000). Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. J Virol **74**(6): 2510-2524.

Holowaty, M. N. and L. Frappier (2004). HAUSP/USP7 as an Epstein-Barr virus target. Biochem Soc Trans **32**(Pt 5): 731-732.

Ikeda, F., N. Crosetto, et al. (2010). What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? Cell **143**(5): 677-681.

Ikeda, M., A. Ikeda, et al. (2000). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. Virology **268**(1): 178-191.

Ingham, R. J., G. Gish, et al. (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. Oncogene **23**(11): 1972-1984.

Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, et al. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the

PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. J Cell Biol **147**(2): 221-234.

Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. Annu Rev Biochem **73**: 355-382.

Kakizuka, A., W. H. Miller, Jr., et al. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell **66**(4): 663-674.

Kamio, M., T. Yoshida, et al. (2004). SOCS1 [corrected] inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein. Oncogene **23**(17): 3107-3115.

Kamitani, T., H. P. Nguyen, et al. (1998a). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. J Biol Chem **273**(6): 3117-3120.

Kamitani, T., K. Kito, et al. (1998b). Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. J Biol Chem **273**(18): 11349-11353.

Keniry, M. and R. Parsons (2008). The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. Oncogene **27**(41): 5477-5485.

Kerscher, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. EMBO Rep **8**(6): 550-555.

Kim, Y. G., M. Muralinath, et al. (2003). A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 6974-6979.

Kimura, Y. and K. Tanaka (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. J Biochem **147**(6): 793-798.

Komander, D., M. J. Clague, et al. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. Nat Rev Mol Cell Biol **10**(8): 550-563.

Kubota, T., M. Matsuoka, et al. (2008). Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7,

leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. J Biol Chem **283**(37): 25660-25670.

Kuo, H. Y., C. C. Chang, et al. (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 16973-16978.

Kwon, J., S. R. Lee, et al. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16419-16424.

Kwon, J. A. and A. Rich (2005). Biological function of the vaccinia virus Z-DNA-binding protein E3L: gene transactivation and antiapoptotic activity in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(36): 12759-12764.

Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature **278**(5701): 261-263.

Langland, J. O. and B. L. Jacobs (2002). The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. Virology **299**(1): 133-141.

Langland, J. O. and B. L. Jacobs (2004). Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L. Virology **324**(2): 419-429.

Langland, J. O., J. C. Kash, et al. (2006). Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the vaccinia virus E3L proteins. J Virol **80**(20): 10083-10095.

Lapenta, V., P. Chiurazzi, et al. (1997). SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family. Genomics **40**(2): 362-366.

Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, et al. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature **371**(6495): 346-347.

Le Blanc, I., Luyett, P.P., et al. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. Nat Cell Biol **7**(7): 653-664.

Lee, H. R. and J. H. Ahn (2004). Sumoylation of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus Towne strain is not required for virus growth in cultured human fibroblasts. J Gen Virol **85**(Pt 8): 2149-2154.

Lee, S. R., K. S. Yang, et al. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H2O2. J Biol Chem **277**(23): 20336-20342.

Leslie, N. R., D. Bennett, et al. (2003). Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. EMBO J **22**(20): 5501-5510.

Leslie, N. R. and C. P. Downes (2004). PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. Biochem J **382**(Pt 1): 1-11.

Li, A.G., Piluso, L.G., et al. (2006). Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. Mol. Cell **23**(4): 575-587.

Li, J., C. Yen, et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science **275**(5308): 1943-1947.

Li, L. and A. H. Ross (2007). Why is PTEN an important tumor suppressor? J Cell Biochem **102**(6): 1368-1374.

Li, M., D. Chen, et al. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. Nature **416**(6881): 648-653.

Li, T., R. Santockyte, et al. (2006). Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. J Biol Chem **281**(47): 36221-36227.

Liao, T. L., C. Y. Wu, et al. (2010). Ubiquitination and deubiquitination of NP protein regulates influenza A virus RNA replication. EMBO J **29**(22): 3879-3890.

Lin, D. Y., Y. S. Huang, et al. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. Mol Cell **24**(3): 341-354.

Liu, B. and K. Shuai (2008). Regulation of the sumoylation system in gene expression. Curr Opin Cell Biol **20**(3): 288-293.

Liu, Y., K. C. Wolff, et al. (2001). Vaccinia virus E3L interferon resistance protein inhibits the interferon-induced adenosine deaminase A-to-I editing activity. Virology **289**(2): 378-387.

Louria-Hayon, I., T. Grossman, et al. (2003). The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. J Biol Chem **278**(35): 33134-33141.

Ludwig, H., J. Mages, et al. (2005). Role of viral factor E3L in modified vaccinia virus ankara infection of human HeLa Cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes. J Virol **79**(4): 2584-2596.

Maccario, H., N. M. Perera, et al. (2010). Ubiquitination of PTEN (phosphatase and tensin homolog) inhibits phosphatase activity and is enhanced by membrane targeting and hyperosmotic stress. J Biol Chem **285**(17): 12620-12628.

Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem **273**(22): 13375-13378.

Mahajan, R., C. Delphin, et al. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. Cell **88**(1): 97-107.

Mallete, F. A., S. Goumard, et al. (2004). Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. Oncogene **23**(1): 91-99.

Marcos-Villar, L., F. Lopitz-Otsoa, et al. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein LANA2 disrupts PML oncogenic domains and inhibits PML-mediated transcriptional repression of the survivin gene. J Virol **83**(17): 8849-8858.

Matunis, M. J., E. Coutavas, et al. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1457-1470.

Matunis, M. J., X. D. Zhang, et al. (2006). SUMO: the glue that binds. Dev Cell **11**(5): 596-597.

Mayo, L. D., J. E. Dixon, et al. (2002). PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. J Biol Chem **277**(7): 5484-5489.

Meredith, M., A. Orr, et al. (1994). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 binds strongly and specifically to a 135-kDa cellular protein. Virology **200**(2): 457-469.

Minami, K., Y. Tambe, et al. (2007). Suppression of viral replication by stress-inducible GADD34 protein via the mammalian serine/threonine protein kinase mTOR pathway. J Virol **81**(20): 11106-11115.

Minty, A., X. Dumont, et al. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. J Biol Chem **275**(46): 36316-36323.

Moss, B. (2007). Poxviridae: the viruses and their replication. Fields virology. D. M. Knipe, Howley, P.M. . Philadelphia, PA, Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 2905-2946

Mounir, Z., J. L. Krishnamoorthy, et al. (2009). Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2alpha phosphorylation pathway. Sci Signal **2**(102): ra85.

Moussavi, M., L. Fazli, et al. (2010). Oncolysis of prostate cancers induced by vesicular stomatitis virus in PTEN knockout mice. Cancer Res **70**(4): 1367-1376.

Munoz-Fontela, C., M. A. Garcia, et al. (2005). Resistance to viral infection of super p53 mice. Oncogene **24**(18): 3059-3062.

Nerenberg, B. T., J. Taylor, et al. (2005). The poxviral RING protein p28 is a ubiquitin ligase that targets ubiquitin to viral replication factories. J Virol **79**(1): 597-601.

Nicholson, D. W., A. Ali, et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature **376**(6535): 37-43.

Okamura, H., K. Yoshida, et al. (2005). PTEN expression elicited by EGR-1 transcription factor in calyculin A-induced apoptotic cells. J Cell Biochem **94**(1): 117-125.

Okumura, K., M. Mendoza, et al. (2006). PCAF modulates PTEN activity. J Biol Chem **281**(36): 26562-26568.

Okura, T., L. Gong, et al. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. J Immunol **157**(10): 4277-4281.

Palacios, S., L. H. Perez, et al. (2005). Quantitative SUMO-1 modification of a vaccinia virus protein is required for its specific localization and prevents its self-association. Mol Biol Cell **16**(6): 2822-2835.

Pampin, M., Y. Simonin, et al. (2006). Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. J Virol **80**(17): 8582-8592.

Papouli, E., S. Chen, et al. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. Mol Cell **19**(1): 123-133.

Patel, L., I. Pass, et al. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. Curr Biol **11**(10): 764-768.

Pearson, M., R. Carbone, et al. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. Nature **406**(6792): 207-210.

Peng, J., D. Schwartz, et al. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. Nat Biotechnol **21**(8): 921-926.

Pichler, A., P. Knipscheer, et al. (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. Nat Struct Mol Biol **12**(3): 264-269.

Pickart, C. M. and D. Fushman (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. Curr Opin Chem Biol **8**(6): 610-616.

Radu, A., V. Neubauer, et al. (2003). PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. Mol Cell Biol **23**(17): 6139-6149.

Raftopoulou, M., S. Etienne-Manneville, et al. (2004). Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. Science **303**(5661): 1179-1181.

Ramaswamy, S., N. Nakamura, et al. (1999). Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2110-2115.

Randow, F. and P. J. Lehner (2009). Viral avoidance and exploitation of the ubiquitin system. Nat Cell Biol **11**(5): 527-534.

Regad, T., A. Saib, et al. (2001a). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. EMBO J **20**(13): 3495-3505.

Regad, T. and M. K. Chelbi-Alix (2001b). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. Oncogene **20**(49): 7274-7286.

Ribet, D. and P. Cossart (2010). "Pathogen-mediated posttranslational modifications: A re-emerging field." Cell **143**(5): 694-702.

Rivas, C., J. Gil, et al. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. Virology **243**(2): 406-414.

Rock, K. L., C. Gramm, et al. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. Cell **78**(5): 761-771.

Rogan, S. and S. Heaphy (2000). The vaccinia virus E3L protein interacts with SUMO-1 and ribosomal protein L23a in a yeast two hybrid assay. Virus Genes **21**(3): 193-195.

Romano, P. R., F. Zhang, et al. (1998). Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. Mol Cell Biol **18**(12): 7304-7316.

Rosendorff, A., D. Illanes, et al. (2004). EBNA3C coactivation with EBNA2 requires a SUMO homology domain. J Virol **78**(1): 367-377.

Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, et al. (2008). Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. PLoS Pathog **4**(8): e1000141.

Salmena, L., A. Carracedo, et al. (2008). Tenets of PTEN tumor suppression. Cell **133**(3): 403-414.

Salomoni, P., B. J. Ferguson, et al. (2008). New insights into the role of PML in tumour suppression. Cell Res **18**(6): 622-640.

Satheskumar, P. S., L. C. Anton, et al. (2009). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. J Virol **83**(6): 2469-2479.

Scaglioni, P. P., T. M. Yung, et al. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. Cell **126**(2): 269-283.

Schabbauer, G., J. Luyendyk, et al. (2008). TLR4/CD14-mediated PI3K activation is an essential component of interferon-dependent VSV resistance in macrophages. Mol Immunol **45**(10): 2790-2796.

Scheffner, M., J. M. Huibregtse, et al. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell **75**(3): 495-505.

Scherer, D. C., J. A. Brockman, et al. (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha

requires site-specific ubiquitination. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11259-11263.

Sharp, T. V., F. Moonan, et al. (1998). The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. Virology **250**(2): 302-315.

Shen, T. H., H. K. Lin, et al. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. Mol Cell **24**(3): 331-339.

Shen, W. H., A. S. Balajee, et al. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. Cell **128**(1): 157-170.

Shen, Z., P. E. Pardington-Purtymun, et al. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. Genomics **36**(2): 271-279.

Silverman, N. and T. Maniatis (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. Genes Dev **15**(18): 2321-2342.

Song, J., L. K. Durrin, et al. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14373-14378.

Song, M. S., L. Salmena, et al. (2008). The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. Nature **455**(7214): 813-817.

Stadler, M., M. K. Chelbi-Alix, et al. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. Oncogene **11**(12): 2565-2573.

Stambolic, V., D. MacPherson, et al. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. Mol Cell **8**(2): 317-325.

Stambolic, V., A. Suzuki, et al. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell **95**(1): 29-39.

Steck, P. A., M. A. Pershouse, et al. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. Nat Genet **15**(4): 356-362.

Sun, S. and B. M. Steinberg (2002). PTEN is a negative regulator of STAT3 activation in human papillomavirus-infected cells. J Gen Virol **83**(Pt 7): 1651-1658.

Sun, X., S. Belouzard, et al. (2008). Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. J Biol Chem **283**(10): 6418-6427.

Takahashi, H., S. Hatakeyama, et al. (2005). Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein. J Biol Chem **280**(7): 5611-5621.

Takaoka, A., S. Hayakawa, et al. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature **424**(6948): 516-523.

Tamura, M., J. Gu, et al. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. Science **280**(5369): 1614-1617.

Tatham, M. H., M. C. Geoffroy, et al. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. Nat Cell Biol **10**(5): 538-546.

Tavalai, N. and T. Stamminger (2008). New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. Biochim Biophys Acta **1783**(11): 2207-2221.

Teale, A., S. Campbell, et al. (2009). Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. J Virol **83**(5): 2099-2108.

Torres, J. and R. Pulido (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. J Biol Chem **276**(2): 993-998.

Treier, M., L. M. Staszewski, et al. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is

mediated by the delta domain. Cell **78**(5): 787-798.

Trotman, L. C., X. Wang, et al. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. Cell **128**(1): 141-156.

Ulrich, H. D. and H. Walden (2010). Ubiquitin signalling in DNA replication and repair. Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 479-489.

van Buuren, N., B. Couturier, et al. (2008). Ectromelia virus encodes a novel family of F-box proteins that interact with the SCF complex. J Virol **82**(20): 9917-9927.

van der Horst, A., A. M. de Vries-Smits, et al. (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. Nat Cell Biol **8**(10): 1064-1073.

Vazquez, F., S. Ramaswamy, et al. (2000). Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. Mol Cell Biol **20**(14): 5010-5018.

Verger, A., J. Perdomo, et al. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. EMBO Rep **4**(2): 137-142.

Vertegaal, A. C., J. S. Andersen, et al. (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. Mol Cell Proteomics **5**(12): 2298-2310.

Virolle, T., E. D. Adamson, et al. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. Nat Cell Biol **3**(12): 1124-1128.

Wang, X. and X. Jiang (2008). Post-translational regulation of PTEN. Oncogene **27**(41): 5454-5463.

Wang, X., L. C. Trotman, et al. (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. Cell **128**(1): 129-139.

Wang, Z. G., L. Delva, et al. (1998a). Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway.

Science **279**(5356): 1547-1551.

Wang, Z. G., D. Ruggero, et al. (1998b). PML is essential for multiple apoptotic pathways. Nat. Genet **20**(3): 266-272.

Wei, W., P. Yang, et al. (2008). A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. Biochem Biophys Res Commun **375**(3): 454-459.

Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 169-178.

Welchman, R. L., C. Gordon, et al. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 599-609.

Weng, L. P., J. L. Brown, et al. (2001). PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. Hum Mol Genet **10**(6): 599-604.

Wickliffe, K., A. Williamson, et al. (2009). The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. Chem Rev **109**(4): 1537-1548.

Wilkinson, K. A. and J. M. Henley (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. Biochem J **428**(2): 133-145.

Woudstra, E. C., C. Gilbert, et al. (2002). A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. Nature **415**(6874): 929-933.

Wu, W., X. Wang, et al. (2003). Zinc-induced PTEN protein degradation through the proteasome pathway in human airway epithelial cells. J Biol Chem **278**(30): 28258-28263.

Wu, W. S., Z. X. Xu, et al. (2003). Promyelocytic leukemia protein sensitizes tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting the NF-kappaB survival pathway. J Biol Chem **278**(14): 12294-12304.

Xia, D., H. Srinivas, et al. (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. J Biol Chem **282**(6): 3507-3519.

Yamamoto, H., M. Ihara, et al. (2003). Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. EMBO J **22**(9): 2047-2059.

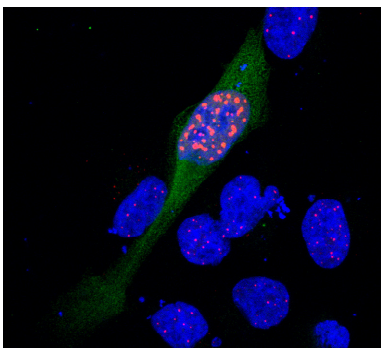
Yang, S., J. H. Jeong, et al. (2006). Promyelocytic leukemia activates Chk2 by mediating Chk2 autophosphorylation. J Biol Chem **281**(36): 26645-26654.

Yasuda, J., M. Nakao, et al. (2003). Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. J Virol **77**(18): 9987-9992.

Yuwen, H., J. H. Cox, et al. (1993). Nuclear localization of a double-stranded RNA-binding protein encoded by the vaccinia virus E3L gene. Virology **195**(2): 732-744.

Zhao, J. (2007). Sumoylation regulates diverse biological processes. Cell Mol Life Sci **64**(23): 3017-3033.

Zhong, S., P. Salomoni, et al. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. Nat Cell Biol **2**(5): E85-90.



ANEXO

Publicaciones

Producto de este trabajo de tesis se encuentra en revisión el manuscrito:

González-Santamaría, J., Campagna, M., García, M.A., Marcos-Villar, L., Gallego, P., González, D., Esteban, M. and Rivas, C. Regulation of Vaccinia virus E3 protein by SUMO. *En revisión en Journal of Virology (Segunda revisión)*.

Y se está preparando el manuscrito:

González-Santamaría, J., Ortega, A., Campagna, M., Marcos-Villar, L., Gallego, P., González, D., Serrano, M. and Rivas, C. Regulation of PTEN tumour suppressor protein by SUMO.

Otros trabajos en los que el aspirante a Doctor ha contribuido:

Marcos-Villar, L., Campagna, M., Lopitz-Otsoa, F., Gallego, P., **González-Santamaría, J.**, González, D., Rodríguez, M.S. and Rivas, C. **2011**. Covalent modification by SUMO is required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA2 to disrupt PML oncogenic domains. *Journal of General Virology*, 92: 188-194.

Campagna, M., Herranz, D., García, M.A., Marcos-Villar, L., **González-Santamaría, J.**, Gallego, P., Gutiérrez, S., Collado, M., Serrano, M., Esteban, M. and Rivas, C. **2011**. SIRT1 stabilizes PML promoting its sumoylation. *Cell Death & Differentiation*, 18: 72-79.

Marcos-Villar, L., Lopitz-Otsoa, F., Gallego, P. Muñoz-Fontela, C., **González-Santamaría, J.**, Campagna, M. Shou-Jiang, G., Rodríguez, M. and Rivas, C. **2009**. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein LANA2 disrupts PML oncogenic domains and inhibits PML-mediated transcriptional repression of the survivin gene. *Journal of Virology*, 83: 8849-8858.

García, M.A., Gallego, P., Campagna, M., **González-Santamaría, J.**, Martínez, G., Marcos-Villar, L., Vidal, A., Esteban, M. and Rivas, C. **2009**. Activation of NF- κ B pathway by virus infection requires Rb expression. *Plos One*, 4 (7): e6422.