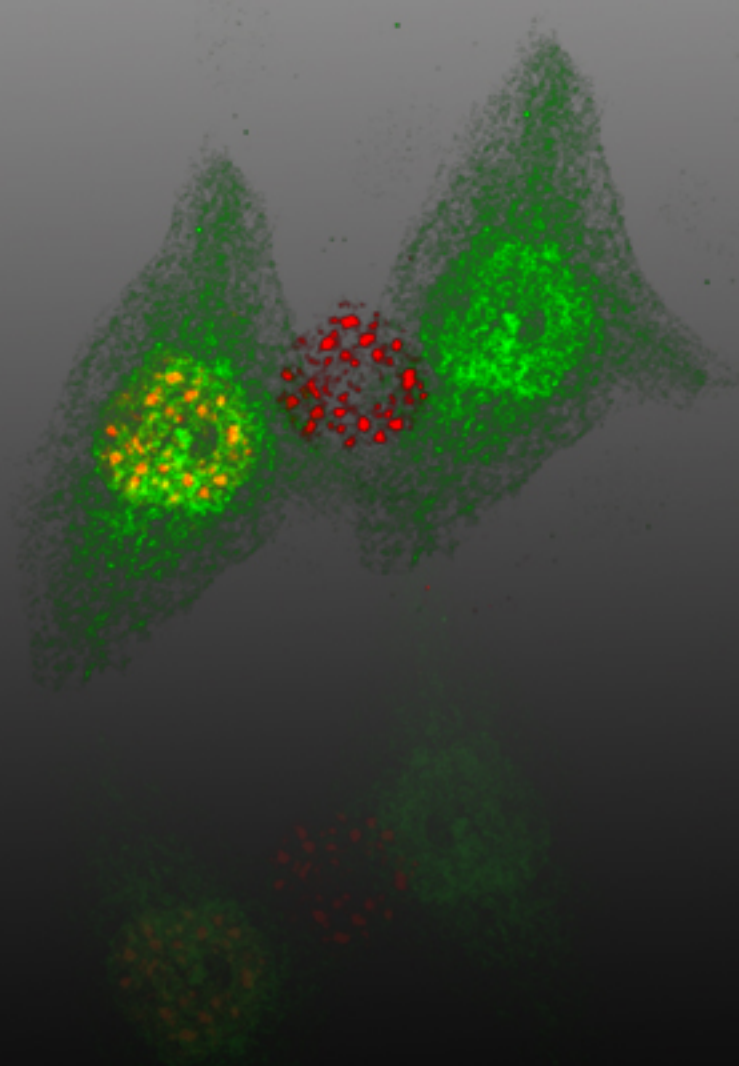


**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Bioquímica**

## **TESIS DOCTORAL**

**Nuevas localizaciones de la metionina  
adenosiltransferasa I/III e implicación  
de la región C-terminal en su  
distribución subcelular**



**Edel Raidel Reytor Saavedra**  
**Madrid 2009**



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**Nuevas localizaciones de la metionina  
adenosiltransferasa I/III e implicación de la  
región C-terminal en su distribución subcelular**

**Edel Raidel Reytor Saavedra**

Licenciado en Química

Director de Tesis: Dra. María de los Ángeles Pajares Tarancón

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid

CSIC-UAM

2009





*Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias al disfrute de una beca de la Red de Metabolismo y Nutrición (RCMN-C03/08 y PI05/0563) del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III, y a un contrato del programa I3P para Postgraduados del CSIC. El trabajo experimental ha sido financiado por proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (BMC2002-0243 y BFU2005-00050) y por la Red de Metabolismo y Nutrición (RCMN-C03/08)*





MINISTERIO  
DE CIENCIA E  
INNOVACIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"ALBERTO SOLS"

María de los Ángeles Pajares Tarancón  
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"  
CSIC-UAM  
Arturo Duperier, 4.  
28029 Madrid

Dña. MARÍA DE LOS ÁNGELES PAJARES TARANCÓN, Investigador Científico del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), y Profesora Honoraria del Departamento de Bioquímica de la UAM,

CERTIFICA:

que D. EDEL RAIDEL REYTOR SAAVEDRA, licenciado en Química por la Universidad Central de Las Villas (Cuba), cuya titulación ha sido homologada por las autoridades españolas al título español de Licenciado en Ciencias Químicas, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo de investigación titulado:

**"Nuevas localizaciones de la metionina adenosiltransferasa I/III e implicación de la región C-terminal en su distribución subcelular"**

Considero, además, que el mencionado trabajo reúne la originalidad y calidad científica requeridas para poder optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Lo que hago constar a los efectos oportunos.

En Madrid, a 9 de enero de 2009.

Fdo: Dra. María de los Ángeles Pajares Tarancón

C/Arturo Duperier, nº 4  
28029 MADRID  
ESPAÑA  
TEL. 91 585 4400  
FAX: 91 585 4401



*A mis padres, Isabel y Eduardo*  
*A mis hijas, Claudia y Paula*  
*A Mónica*

“...un axioma científico viene a ser una forma eminentemente gráfica  
y poética de un axioma de la vida humana...”

José Martí



## *Agradecimientos*





Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de muchas personas. Aún sabiendo que corro el riesgo de olvidar a alguien (si fuese así le pido perdón), no quería dejar de mencionar a aquéllos que han colaborado para que esta tesis saliese adelante.

En primer lugar, mi agradecimiento infinito a la Dra. María de los Ángeles Pajares Tarancón, directora de este trabajo. La Dra. Pajares me dio la oportunidad de regresar al mundo científico cuando, por circunstancias personales, lo había abandonado. Desde entonces no he dejado de aprender de la que considero es una excelente investigadora y, a la vez, profesora. Su rigor científico, sus consejos, su dedicación y, también, su paciencia, han posibilitado que haya podido terminar este trabajo. No cabe duda que estos casi 6 años a su lado han representado para mí una importante etapa de crecimiento personal y profesional que le agradezco sinceramente.

Creo también justo reconocer el papel que han jugado en mi formación muchas personas con los que inicie mi carrera científica en una etapa anterior a mi llegada al IIB. Me gustaría dar las gracias a Mayté, Febles, Pepe, Eduviges, Laura, Reinaldo, Duniesky, Enrique y Carlos, así como al Dr. Carpio y al Dr. Boué. Con estos excelentes profesionales y amigos coincidí durante los 6 años que trabajé en el CIGB (Cuba). También quiero agradecer al Dr. Martínez Escribano, del INIA, el haberme acogido en su laboratorio durante 1 año. Allí asimilé, con la inestimable ayuda del Dr. Félix Gil, muchas de las técnicas de Biología Molecular que ahora he empleado en mi tesis doctoral.

Por otra parte, para llevar a cabo este trabajo he tenido la suerte de contar con la ayuda de investigadores de reconocida experiencia. Quiero dar las gracias a la Dra. Pérez-Sala (CIB) por su asesoría científica y el haberse ocupado directamente de mi formación en las técnicas de fraccionamiento celular e inmunofluorescencia. A la Dra. García Ruiz (CBM-UAM), por enseñarme el método de preparación *in situ* de la matriz nuclear. A la Dra. Pérez-Miguelsanz (UCM), por su colaboración en el desarrollo del estudio inmunohistoquímico. Al Dr. Álvarez (Hospital La Paz) y la Dra. Sánchez Góngora (IIB), por los experimentos preliminares que dieron pie a este trabajo. Al grupo del Dr. Feliú (UAM), por la ayuda en el aislamiento de los hepatocitos de rata. A la Dra. Aurora Sánchez (IIB) por facilitarme el anticuerpo anti-TBP y al Dr. Labzenik (*Cold Spring Harbor Laboratory*) por cederme los plásmidos con las construcciones de las EGFP multiméricas. Así mismo, al Dr. Martín (IIB) le agradezco sus consejos, al Dr. Víctor Ruiz (IIB) su apoyo en este último año en el que he tenido el privilegio de intercambiar con él productivas charlas científicas, y al Dr. Martínez del Pozo (UCM) por haberme recomendado para llevar a cabo esta labor.

A todos mis compañeros de laboratorio muchas gracias, en especial al Dr. Francisco Garrido (Paco). Con Paco he tenido el privilegio de aprender de su larga experiencia investigadora y también de su conocimiento de la cultura y las tradiciones de este gran país. Tiene la virtud de hacer fácil lo difícil, de estar siempre dispuesto a echarme una mano y de crear, con un humor inteligente, un ambiente de trabajo muy cómodo en el que es imposible enfadarse. Mi agradecimiento a Claudia, la última persona que se ha incorporado al laboratorio y que no ha dejado de animarme y ayudarme en estos últimos meses. Tampoco puedo olvidarme de los que ya no están: de Miguel, con el que compartí 3 años de buenos momentos; de Ainhoa, la chica más dulce y cariñosa que ha pasado por el laboratorio; y de Gabino, Roberto y Rocío, con los que ha sido un placer coincidir.

En este instituto he tenido la inmensa dicha de haber recibido la ayuda de muchas personas. Me gustaría destacar muy especialmente a los doctores Mercedes Mirasierra (Merche) y Antonio Fernández (Toño) así como a la futura doctora Patricia García (Patri). Aparte de ser excelentes profesionales, de los que aprendí mucho, en ellos he encontrado unos verdaderos amigos. Merche, gracias por tu sensatez, por tu cariño, y sobre todo, por escucharme y animarme cuando más lo necesitaba. Toño, te agradezco tu implicación en todo lo relacionado al diseño gráfico de esta memoria. También, tu incondicionalidad y el transmitirme cosas más importantes que softwares, hardwares y F1. Patri, mil gracias porque a pesar de tus preocupaciones siempre has estado ahí para echar una mano y alentarme con tu humor andaluz. De la misma manera quiero agradecer a mi gran amigo portugués, el Dr. Tiago Brandao, su amabilidad y buenas sugerencias y a la Dra. Carmen Fernández, su apoyo y confianza. A la recién estrenada Dra. María Abad, le agradezco su ternura y simpatía. Su contribución en todo el proceso de tramitación de esta tesis, así como en su diseño a doble página, ha sido muy valiosa. A mi amiga, la Dra. Noelia Valle, mi gratitud por su colaboración en el apartado de transporte nuclear y por haber sido un gran apoyo. Igualmente, mi agradecimiento a otros colegas del IIB que han estado pendientes de mi hacer en estos años: Toño, Brenda, Garci, Christian, Paloma, Marisa, Lucía, Daniel, Leticia, Bárbara, Camino, Natacha, Marina, Alberto y muchos más.

No puedo dejar de mencionar a muchas personas integrantes del personal de servicio que han colaborado directa o indirectamente en mi trabajo, de forma tal que en muchos casos su implicación ha sido total. Doy las gracias al servicio de secuenciación dirigido por la Dra. Gemma Tarduchy, a la que agradezco especialmente su ayuda en el desarrollo de la PCR a tiempo real. También a Conchi por su generosidad y cariño, y a Diana y Eva por su inestimable ayuda. En el servicio de microscopía confocal quiero destacar la labor que ha tenido Dolores

(Lola) en mi formación en el manejo del microscopio, su disposición a ayudarme y sus interesantes conversaciones han hecho que las numerosas horas de observación hayan sido más llevaderas. Al resto del personal de servicios: Dani, Guti, Javi, Nani, Carlos, Javier, Ricardo, Alejandra, Fernando y muchos otros, gracias por vuestra ayuda.

Indudablemente, hubiese sido imposible llegar al término de este trabajo sin el apoyo incondicional de mi familia y amigos de fuera de este instituto. A estos últimos, a Lucía (que mucho tiene que ver con mi llegada al IIB), Manuel, Cristina, Fernando, Raquel, César, Gema, Pablo, Virginia, Karina, Jorge y Rosa les agradezco su aliento y preocupación por el estado de mi tesis.

Mi familia ha sido ese gran apoyo al que acudí en cada momento y al que les debo el haber llegado hasta aquí. Quiero empezar dando las gracias a mis suegros, Pedro y Angelita, unos verdaderos padres que he tenido la suerte de encontrar a este lado del océano. Su apoyo ha sido decisivo en todo este tiempo y aún más desde la llegada de Paula hace ocho meses, justo cuando el trabajo era más intenso. De la misma forma a mis cuñados Maxi y Ángeles, les agradezco el haberse ocupado y preocupado para que me sintiera bien. Gracias por el cariño que me habéis ofrecido y por los buenos momentos que hemos compartido.

A mis padres, Isabel y Eduardo, porque creo que es uno de sus sueños y me complace el poder hacerlo realidad. No puedo dejar de agradecerles el enorme esfuerzo y sacrificio que han hecho durante tantos años con el fin de garantizar mi formación. De ellos, al igual que de mi hermano Eduardo he recibido mucho empuje y confianza para seguir adelante. A pesar de la distancia física de estos últimos años, nunca antes los había sentido tan cerca.

A mis pequeñas, Claudia y Paula, les agradezco eso: el existir. Vuestras sonrisas, juegos e historias han sido el remedio más eficaz para los momentos de desánimo que tiene este trabajo.

Por último, a Mónica. Sin ella no hubiese llegado hasta aquí. Gracias por tu complicidad, porque eres la que más te ha tocado sufrir la parte más dura de este trabajo: mis ausencias y mis decepciones. Gracias por estar siempre ahí para soportarme y, también, para alentarme. Gracias por esa energía y esa fuerza que me has infundado. Esta tesis también es tuya.

¡Gracias a todos!



*Resumen*



La metionina adenosiltransferasa (MAT) es la única enzima conocida que cataliza la biosíntesis de la S-adenosil-L-metionina (SAM), el principal donante de grupos metilo en la célula. Esta enzima presenta una alta conservación evolutiva y se ha encontrado en prácticamente todos los organismos secuenciados hasta la fecha. En mamíferos existen tres isoformas de la MAT. Dos de ellas están conformadas por una misma subunidad catalítica (MAT $\alpha$ 1) organizada como un dímero (MAT III) o un tetrámero (MAT I), y son conocidas como la MAT hepática. En nuestro trabajo hemos intentado profundizar en el conocimiento de la distribución tisular y subcelular de ambas isoenzimas, utilizando para ello muestras animales así como distintas líneas celulares. Los resultados mostraron que MAT I/III es ubicua pues, conjuntamente a los altos niveles tradicionalmente observados en hígado, se detectó una expresión notable en páncreas y pulmón, así como, en menor cuantía, en la práctica totalidad de los tejidos analizados. También hemos demostrado por vez primera que MAT I/III no sólo se localiza en el citosol, sino que también está presente en el núcleo, donde aparece unida a la matriz nuclear y en los *speckles*. Este patrón de distribución subcelular parece depender del tipo de célula estudiado, siendo mayoritariamente citosólico en hepatocitos y nuclear en el resto.

El análisis de la secuencia y estructura de la proteína nos llevó a analizar en detalle el papel de la región C-terminal en su distribución. Con la ayuda de una batería de proteínas de fusión y de mutantes, hemos detectado en esa región la existencia de dos señales conformacionales que se solapan parcialmente, una asociada a la localización nuclear y otra a la retención en el citoplasma. Además, hemos observado que la enzima nuclear es capaz de formar oligómeros y, por tanto, de tener actividad biológica. Sin embargo, tanto su transporte al núcleo como su unión a la matriz del mismo son independientes de la actividad de síntesis de SAM. Finalmente, la acumulación nuclear de oligómeros activos correlacionó con un aumento de la trimetilación en la lisina 27 de la histona H3, una modificación asociada a la represión génica, y que podría relacionar a esta enzima con ese importante proceso biológico.

En general, nuestro trabajo aporta datos que ayudan a ampliar el conocimiento de la función de la MAT I/III, y que podrían servir de punto de partida para el entendimiento de algunas patologías asociadas a su deficiencia.





*Abstract*



Methionine adenosyltransferase (MAT) is the only known enzyme that catalyzes the biosynthesis of S-adenosyl-L-methionine (SAM), the main cellular methyl donor. This enzyme exhibits a high conservation level during evolution, and has been found in virtually all organisms sequenced to date. There are three MAT isoforms in mammals, two of them known as the hepatic isoenzymes. These are composed by the same catalytic subunit (MAT $\alpha$ 1) associated as dimers (MAT III) or tetramers (MAT I). Our work provides new knowledge of the tissue and subcellular distribution of MAT I/III, using animal samples as well as various cell lines. The results demonstrate an almost ubiquitous distribution of these isoenzymes that, in addition, to the high levels traditionally seen in liver show a remarkable expression in pancreas and lung and, minimal amounts, in the rest of the tissues analyzed. This work also presents the first data proving that MAT I/III localizes both in the cytosol and the nucleus. In this last compartment the protein appears linked to the nuclear matrix and the *speckles*. This subcellular distribution pattern depends on the cell type under study, being mostly cytosolic in hepatocytes and nuclear in the rest.

Analysis of the sequence and structure of the protein led us to analyze the role of its C-terminal region in the subcellular distribution. With the aid of a battery of fusion proteins and mutants, we found two partly overlapping conformational signals in this region, one of them involved in nuclear localization and the other in cytoplasmic retention. In addition, we have demonstrated that the nuclear enzyme is capable of forming oligomers and, therefore, to synthesize SAM. However, both nuclear transport and matrix binding are independent of this biological activity. Finally, the accumulation of nuclear active oligomers correlated with an increase in histone H3 trimethylation at lysine 27, a modification associated with gene repression, thus providing a link between MAT I/III and this important biological process.

In general, our work provides new data to get deeper insight the knowledge of the role of this enzyme in pathology, and specifically in those associated with its deficiency.



*Índice*



<b>1. Abreviaturas</b>	7
<b>2. Introducción</b>	11
<b>2.1 Metabolismo de la metionina</b>	11
2.1.1 S-adenosil-L-metionina (SAM)	11
2.1.2 Metionina adenosiltransferasa (MAT)	11
2.1.3 La MAT en mamíferos	12
2.1.3.1 Distribución tisular y subcelular	13
2.1.3.2 Regulación de la expresión y de la actividad MAT	14
2.1.3.3 Deficiencia en la síntesis de SAM y su relación con determinadas patologías	15
2.1.4 Estructura de la MAT I de rata	17
2.1.5 Ciclo de la metionina	19
<b>2.2 Transporte nuclear</b>	22
2.2.1 El núcleo celular	22
2.2.2 Mecanismo de transporte activo a través del complejo del poro nuclear	22
2.2.3 La familia de las carioferinas $\beta$ como receptores del transporte nuclear	25
2.2.4 Señales del transporte nuclear de proteínas	27
2.2.5 Regulación del transporte nuclear de proteínas	29
<b>3. Objetivos</b>	33
<b>4. Materiales y Métodos</b>	37
<b>4.1 Animales</b>	37
<b>4.2 Cultivos celulares</b>	37
4.2.1 Bacterias	37
4.2.2 Células eucariotas	37
4.2.2.1 Transfecciones	38
4.2.2.2 Tratamientos utilizados	38
<b>4.3 Plásmidos</b>	38
<b>4.4 Construcciones. Estrategias de clonaje</b>	39
<b>4.5 Obtención de mutantes del C-terminal de la MAT<math>\alpha</math>1 de rata</b>	40
<b>4.6 Anticuerpos primarios utilizados</b>	41
<b>4.7 Microscopía confocal de fluorescencia</b>	42
<b>4.8 Preparación <i>in situ</i> de la matriz nuclear</b>	43
<b>4.9 Aislamiento de RNA, RT-PCR y PCR a tiempo real</b>	43
<b>4.10 Inmunohistoquímica</b>	44
<b>4.11 Preparación de los extractos celulares</b>	45
4.11.1 Fracción soluble de <i>E. coli</i>	45
4.11.2 Fracción citosólica y nuclear	45
4.11.3 Fracción soluble del clon CHO-K1 MAT-EGFP Tet-On	46
4.11.4 Extracto celular para el análisis del nivel de metilación de la histona H3	46
<b>4.12 Coinmunoprecipitación</b>	46

<b>4.13 Cromatografía analítica de exclusión molecular</b>	47
<b>4.14 Electroforesis SDS-PAGE, inmunotransferencia y Dot-Blot</b>	47
<b>4.15 Determinación de actividad MAT</b>	47
<b>4.16 Determinación de la concentración de proteínas</b>	47
<b>4.17 Modelos estructurales</b>	48
<b>5. Resultados</b>	51
<b>5.1 Distribución de MAT<math>\alpha</math>1 en tejidos de rata</b>	51
<b>5.2 Localización subcelular de MAT<math>\alpha</math>1</b>	54
5.2.1 Caracterización de las proteínas de fusión a MAT $\alpha$ 1	54
5.2.2 Determinación de la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1 mediante microscopía confocal de fluorescencia	56
5.2.3 Influencia del nivel de expresión en la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1	58
5.2.4 Determinación de la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1 mediante fraccionamiento celular	59
<b>5.3 Identificación y localización de señales que determinan la distribución subcelular de MAT<math>\alpha</math>1</b>	61
5.3.1 Estudio de la secuencia primaria de MAT $\alpha$ 1 en busca de NLS y NES	61
5.3.2 Estudio del transporte al núcleo de MAT $\alpha$ 1 utilizando proteínas truncadas	63
5.3.3 Evaluación de la capacidad del C-terminal de MAT $\alpha$ 1 como NLS	67
5.3.4 Obtención y estudio de mutantes simples de residuos básicos en el C-terminal de MAT $\alpha$ 1	68
5.3.4.1 Estado oligomérico y actividad biológica de los mutantes simples de FLAG-MAT	69
5.3.4.2 Localización subcelular de los mutantes simples de MAT-EGFP y FLAG-MAT	70
5.3.5 Localización subcelular de mutantes dobles de FLAG-MAT	72
<b>5.4 Estudio de la función de MAT<math>\alpha</math>1 en el núcleo</b>	73
5.4.1 Localización de MAT $\alpha$ 1 en la matriz nuclear y en los <i>speckles</i>	74
5.4.2 Determinación del estado oligomérico de la MAT $\alpha$ 1 nuclear	74
5.4.3 Impacto de la presencia en el núcleo de MAT $\alpha$ 1 en las metilaciones nucleares	76
<b>6. Discusión</b>	81
<b>6.1 Distribución tisular y subcelular de MAT<math>\alpha</math>1</b>	81
<b>6.2 Estudio del C-terminal de MAT<math>\alpha</math>1 y su implicación en su distribución subcelular</b>	84
<b>6.3 Función nuclear de MAT<math>\alpha</math>1</b>	88
<b>7. Conclusiones</b>	95
<b>8. Bibliografía</b>	99
<b>9. Anexos</b>	115



# ***1. Abreviaturas***



- BSA:** Albúmina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)
- C:** Fracción citosólica
- CIP:** Cóctel de inhibidores de proteasas
- cMAT:** Metionina adenosiltransferasa de *E. coli*
- CRS:** Señal de retención citoplasmática (*Cytoplasmatic Retention Signal*)
- DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DTT:** Ditioneitol
- Dox:** Doxiciclina
- EGFP:** Proteína verde fluorescente mejorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)
- FBS:** Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- H3K4me3:** Histona H3 trimetilada en lisina 4
- H3K9me3:** Histona H3 trimetilada en la lisina 9
- LMB:** Leptomicina B
- 5MC:** 5-metil-citosina
- MAT:** Metionina adenosiltransferasa
- MAT $\alpha$ 1:** Subunidad catalítica  $\alpha$ 1 de la MAT
- MAT $\alpha$ 2:** Subunidad catalítica  $\alpha$ 2 de la MAT
- mRNA:** ARN mensajero
- MTA:** 5'-metil-tioadenosina
- N:** Fracción nuclear
- NES:** Señal de exportación nuclear (*Nuclear Export Signal*)
- NLS:** Señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*)
- ORF:** Marco abierto de lectura (*Open reading frame*)
- PMSF:** Fluoruro de metilfenilsulfonio
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- SAM:** S-adenosil-L-Metionina
- SD:** Desviación estándar (*Standard Deviation*)
- TBP:** Proteína de unión a la caja TATA (*TATA Binding Protein*)
- TA:** Temperatura ambiente
- UA:** Unidades arbitrarias
- UV:** Ultravioleta
- WT:** Salvaje (*Wild Type*)



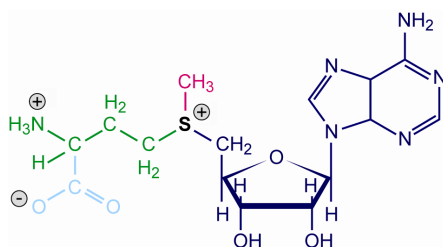
## ***2. Introducción***



## 2.1 Metabolismo de la metionina

### 2.1.1 S-adenosil-L-metionina (SAM)

La metionina es un aminoácido esencial para la célula donde, además de utilizarse para la síntesis de proteínas y la transaminación, es el precursor de uno de los metabolitos más importantes: la S-adenosil-L-metionina (SAM). Desde su descubrimiento (Cantoni, 1953), el número de reacciones en las que se ha visto involucrada la SAM no ha cesado de crecer, de forma que se estima que participa en casi tantas reacciones como el ATP (Fontecave et al., 2004; Roje, 2006). Esa gran reactividad se debe a su estructura, organizada alrededor de un átomo de azufre en forma de catión sulfonio trivalente (Figura 1). Así, la SAM puede donar, según sea el caso, varios de sus grupos, entre ellos: el propilamino (previa descarboxilación) para la síntesis de algunas poliaminas (Raina et al., 1976), el adenosilo (en forma del radical 5'-deoxiadenosilo) para las reacciones catalizadas por proteínas dependientes de radicales SAM (Fontecave et al., 2001; Sofia et al., 2001) y el metilo para las reacciones de transmetilación (Cantoni, 1975). La mayoría de estas últimas (~150) son dependientes de este metabolito, lo que le convierte en el principal donante celular de grupos metilo. Por ello, la gama de sustratos que reciben grupos metilos procedentes de la SAM es muy amplia, desde DNA, RNA, fosfolípidos, proteínas (principalmente histonas) hasta una gran variedad de moléculas pequeñas (Chiang et al., 1996). Todo esto significa que la SAM es una molécula decisiva en una gran cantidad de procesos biológicos (crecimiento celular, diferenciación, expresión genética, etc) lo que ha llevado a explorar su posible uso terapéutico en varias patologías entre las que están la cirrosis alcohólica, la artritis ósea, la depresión y el Alzheimer (Bottiglieri, 2002; Mato and Lu, 2007).



**Figura 1. Estructura de la SAM.** Se muestran en distintos colores los grupos sulfonio (negro), metilo (rosa), adenosilo (azul), propilamino (verde) y carboxilo (azul celeste)

### 2.1.2 Metionina adenosiltransferasa (MAT)

La biosíntesis de la SAM se produce a partir de metionina y ATP en una reacción que cataliza la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT; EC.2.5.1.6) y que, además, provoca la formación de pirofosfato (PPi) y fosfato inorgánico (Pi) (Mudd, 1962; Mudd,

1963). El mecanismo catalítico discurre en dos etapas consecutivas: en una primera se produce un ataque nucleofílico ( $S_N2$ ) del átomo de azufre de la metionina al carbono C5' localizado en la ribosa del ATP, lo cual lleva a la formación de SAM y tripolifosfato (PPPi). A continuación se produce, en la segunda etapa, la hidrólisis del PPPi a PPI y Pi. Esta última reacción es irreversible y hace que en condiciones fisiológicas la reacción global de la MAT también lo sea. La enzima requiere de la presencia de cationes divalentes para la catálisis, generalmente  $Mg^{2+}$ , y en muchas MATs la presencia de cationes monovalentes como el  $K^+$  aumenta considerablemente la velocidad de reacción (Markham et al., 1987).

La familia de enzimas con actividad MAT se ha encontrado en prácticamente todos los organismos secuenciados hasta la fecha, por lo que su función se considera esencial para la vida. La excepción son algunos parásitos que parece obtienen la SAM de sus huéspedes (Stephens et al., 1998; Merali and Clarkson, 2004). Además, la comparación de secuencias entre las MATs de bacteria y eucariota ha demostrado que es una proteína altamente conservada evolutivamente pues el 30 % de los residuos son idénticos (Sanchez-Perez et al., 2004). Solamente se ha encontrado una clase divergente de MAT en arquea, pero, a pesar de ello, los residuos del centro activo están conservados (Graham et al., 2000). Además, la similitud entre las estructuras resueltas hasta hoy, correspondientes a las MATs de *E.coli*, rata y humano, sugiere que la estructura global de esta enzima tampoco ha cambiado mucho en términos evolutivos.

### 2.1.3 La MAT en mamíferos

En tejidos de mamíferos se han identificado tres isoenzimas de la MAT designadas como MAT I, MAT II y MAT III (Sullivan and Hoffman, 1983; Kotb et al., 1997). Los genes encargados de la codificación de estas proteínas son tres: *MAT1A* (Horikawa et al., 1989) y *MAT2A* (Horikawa et al., 1990) para las subunidades catalíticas  $\alpha1$  y  $\alpha2$ , respectivamente, y *MAT2B* (LeGros et al., 2000) para la subunidad reguladora  $\beta$ . Entre las subunidades  $\alpha1$  y  $\alpha2$  existe una identidad aminoacídica de un 85%, mientras que la subunidad  $\beta$  no presenta una homología significativa con éstas y sí con varias enzimas que catalizan la reacción de reducción de azúcares unidos a desoxitimidina-difosfato (dTDP).

Las tres isoenzimas son oligómeros: MAT I es un homotetrámero y MAT III un homodímero de la subunidad  $\alpha1$ , mientras que MAT II es un heterooligómero compuesto por las subunidades  $\alpha2$  y  $\beta$ , en una estequiometría que, aunque no ha sido resuelta aún, se cree sea la de un tetrámero del tipo  $(\alpha2\beta)_2$ .



Tanto MAT I y como MAT II presentan una  $K_m$  baja para la metionina, de  $\sim 100 \mu\text{M}$  y  $\sim 30 \mu\text{M}$ , respectivamente. Este parámetro es más alto para MAT III ( $\sim 1 \text{ mM}$ ), aunque la presencia de DMSO puede llegar a disminuirlo  $\sim 50$  veces. Del análisis de estos valores se puede concluir que en condiciones fisiológicas, donde la concentración de metionina es de  $\sim 60 \mu\text{M}$ , serían MAT I y MAT II las que contribuirían en mayor medida a la síntesis de la SAM. Por su parte, este metabolito a concentraciones fisiológicas es capaz de modular la actividad de estas isoenzimas de forma distinta pues inhibe fuertemente a MAT II y ligeramente a MAT I, mientras que es capaz de activar a MAT III (Cabrero et al., 1987; Kotb and Geller, 1993). En el caso de la subunidad  $\beta$  su función parece relacionarse con la regulación de la actividad de MAT II, ya que su unión a la subunidad  $\alpha 2$  provoca una disminución de la  $K_m$  para la metionina y además hace más sensible a esta isoenzima a la inhibición por SAM (Halim et al., 1999).

### 2.1.3.1 Distribución tisular y subcelular

La MAT II se considera ubicua, ya que se ha detectado en todos los tejidos examinados hasta la fecha (Okada et al., 1981; Oden and Clarke, 1983; Kotb and Kredich, 1985; Mitsui et al., 1988; Ito et al., 2000), aunque en el hígado adulto la expresión es escasa (Horikawa et al., 1993). Los estudios inmunohistoquímicos realizados en cortes de riñón, hígado y colon han mostrado la localización predominante de la subunidad  $\alpha 2$  en túbulos distales (Horikawa et al., 1993), células estelares (Shimizu-Saito et al., 1997) y células epiteliales secretoras de mucus (Ito et al., 2000), respectivamente. Análogamente, la expresión de la subunidad  $\beta$  ha sido observada en los tejidos extrahepáticos, siendo también sus niveles muy bajos en hígado (Martinez-Chantar et al., 2003). Por su parte, la subunidad  $\alpha 1$  (o MAT I/III) es conocida como la MAT hepática, porque solamente se había detectado en hígado adulto (Okada et al., 1981; Gil et al., 1996), fundamentalmente en las células parenquimales o hepatocitos donde su expresión es elevada (Shimizu-Saito et al., 1997). Sin embargo, más recientemente se ha comprobado su presencia en páncreas, específicamente en las células acinares (Lu et al., 2003).

La MAT está considerada una enzima citoplasmática. Los primeros estudios realizados con el objetivo de conocer su distribución en el interior de la célula encontraron una elevada actividad MAT en el citosol y poca o nula en otras fracciones subcelulares (Sheid and Bilik, 1968; Allsop and Watts, 1975; Rassin and Gaull, 1975). Además, un análisis inmunohistoquímico realizado en cortes de tejido de hígado de rata, empleando anticuerpos específicos frente a las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , detectó la presencia de ambas en

el citoplasma de los hepatocitos (Horikawa et al., 1993). En el caso de la subunidad  $\beta$ , también se ha visto, mediante inmunofluorescencia, su localización en el citoplasma de células Huh7 transitoriamente transfectadas con esta proteína (Martinez-Chantar et al., 2003).

### 2.1.3.2 Regulación de la expresión y de la actividad MAT

La expresión de los genes *MAT1A* y *MAT2A* está regulada durante el desarrollo hepático (Okada et al., 1980; Horikawa et al., 1993; Gil et al., 1996). En hígado de rata se ha observado alrededor del nacimiento un cambio de expresión de *MAT2A* a *MAT1A* tanto a nivel del RNA mensajero (mRNA) como de proteína (Gil et al., 1996). Así, la subunidad  $\alpha 2$  es la forma predominante en hígado fetal mientras que la subunidad  $\alpha 1$  lo es en hígado adulto, de ahí que se piense que en un individuo adulto sano MAT II tenga una contribución pequeña al metabolismo de la metionina en ese órgano. Se ha comprobado que la alta expresión hepática de *MAT1A* se debe a la hipometilación de su promotor, que sin embargo está hipermetilado en tejidos extrahepáticos donde su expresión es muy baja. La situación contraria fue observada con *MAT2A*, la cual presenta altos niveles en tejidos extrahepáticos y bajos en hígado (Torre et al., 2000). También, en el caso específico del promotor de *MAT1A* su activación puede producirse por determinadas señales hormonales como los glucocorticoides (Gil et al., 1997).

Además del control transcripcional, se conocen formas de regulación específica para la enzima MAT I/III a través de modificaciones postraduccionales mediadas por el glutatión y por especies reactivas del oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), y del nitrógeno, como el óxido nítrico (NO). En el caso del  $\text{HO}^{\bullet}$  y el NO, se ha visto que provocan la inactivación de MAT I/III mediante hidroxilación y nitrosilación, respectivamente, de la cisteína localizada en la posición 121 (C121) y que el glutatión en su forma reducida (GSH) puede revertir ese efecto (Avila et al., 1997; Sanchez-Gongora et al., 1997; Ruiz et al., 1998). A su vez, el glutatión en su forma oxidada (GSSG) es capaz de provocar la inhibición de la enzima mediante la formación de un puente disulfuro por subunidad y, también, en este caso el efecto se modula por el GSH (Pajares et al., 1992). Este mecanismo se ha relacionado con los estadios iniciales de varias enfermedades hepáticas como la cirrosis alcohólica en la que existe una disminución importante de la actividad MAT I/III y sin embargo la expresión del gen *MAT1A* no está alterada (Alvarez et al., 1993). Por otra parte, el examen de la secuencia de la subunidad  $\alpha 1$  de rata mediante programas de predicción de sitios de fosforilación muestra la presencia de varios residuos

potenciales de sufrir este tipo de modificación. Sin embargo, hasta la fecha solamente se ha demostrado que la treonina en la posición 342 (T342) puede ser fosforilada por la proteína quinasa C (PKC) *in vitro* (Pajares et al., 1994), desconociéndose si esta reacción ocurre *in vivo* y, por lo tanto, si podría tener alguna relevancia en la regulación de MAT I/III.

### **2.1.3.3 Deficiencia en la síntesis de SAM y su relación con determinadas patologías**

Existen diferentes tipos de enfermedades en las que se ha detectado una disminución de los niveles de SAM. En el caso del hígado, el patrón de expresión de las isoformas de la MAT puede alterarse en determinadas circunstancias como son la exposición a sustancias hepatotóxicas (como el alcohol), el cáncer, la enfermedad de Wilson o en los estadios tempranos de regeneración (Delgado et al., 2008; Mato et al., 2008). En muchas de estas situaciones se ha detectado la existencia de un estrés oxidativo mediado por la producción de radicales libres, que provocan la peroxidación lipídica y la desorganización de la membrana plasmática y mitocondrial, y también una disminución en los niveles de glutatión reducido (GSH), principal agente neutralizante de estas especies reactivas. En modelos animales así como en algunos pacientes, además de una disminución del contenido de SAM hepático, se ha observado la acumulación de metionina en el plasma (hipermetioninemia) y un cambio en la expresión de las isoenzimas, pasando a ser MAT II la forma predominante. Esto ha llevado a asociar la expresión de esta isoforma a situaciones de estrés oxidativo, al crecimiento y la desdiferenciación hepática (Cai et al., 1996; Huang et al., 1998; Avila et al., 2000). Además, el efecto beneficioso que se ha encontrado en la supervivencia de determinados pacientes, como por ejemplo aquellos afectados por cirrosis alcohólica o colestasis intrahepática, cuando se les administró SAM (Lieber, 1999; Mato et al., 1999) indica que MAT II no puede suplir totalmente a MAT I/III, por lo que el déficit de esta última provocaría la aparición de determinadas patologías.

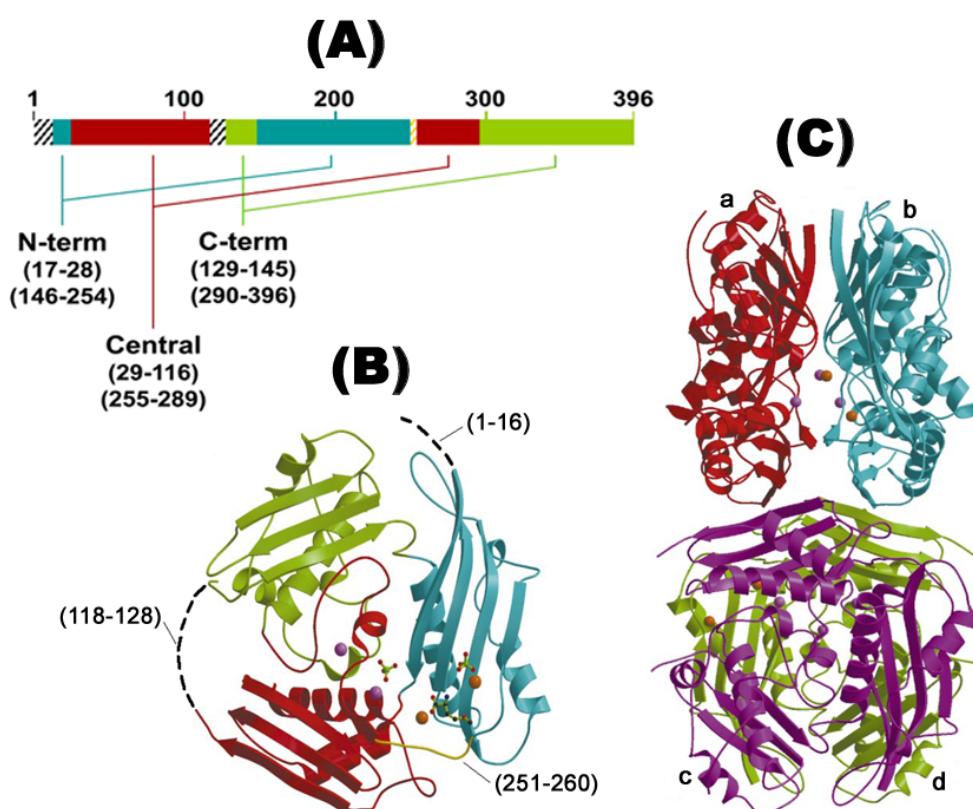
La importancia de MAT I/III en el mantenimiento de la función hepática quedó clara con el desarrollo de un ratón *knockout* (KO) para *MAT1A* (Lu et al., 2001). Estos animales presentan una inducción de la expresión de *MAT2A* con el fin de compensar la ausencia de MAT I/III e intentar mantener los niveles de SAM. No obstante, la baja capacidad de MAT II produce hipermetioninemia, así como una disminución en los niveles de SAM hepático, haciendo que estos ratones sean propensos a desarrollar esteatosis, hiperplasia y hepatocarcinoma. Los estudios de expresión génica mostraron que la eliminación de *MAT1A* trae consigo la alteración de la expresión de una gran variedad de genes involucrados en procesos tan diversos como la comunicación celular, el crecimiento,

el desarrollo y el metabolismo (Martinez-Chantar et al., 2002; Santamaria et al., 2003; Chen et al., 2004; Santamaria et al., 2006). Por su parte, el análisis proteómico mostró que ~80% de las proteínas que alteraron su expresión, eran enzimas del metabolismo fundamentalmente de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Además, se detectó que varias proteínas asociadas a la generación de especies reactivas, como el citocromo P450E1, estaban aumentadas, mientras que otras involucradas en la función mitocondrial, como la prohibitina 1 y la citocromo c oxidasa I y II, estaban disminuidas. Este tipo de alteración justifica el estrés oxidativo espontáneo que sufren estos animales y que recuerda a varias de las enfermedades hepáticas asociadas a la deficiencia de SAM.

En humanos, a diferencia de lo observado en el ratón *MAT1A* KO, la deficiencia de MAT I/III (OMIM 250850) normalmente no produce trastornos clínicos de importancia, aunque los individuos afectados presentan una hipermetioninemia persistente (Chou, 2000). La causa de esta deficiencia son las mutaciones que se producen en el gen *MAT1A* y que provocan una reducción o abolición de la actividad enzimática. La mayoría de las mutaciones descritas hasta la fecha se transmiten de forma autosómica recesiva, sin embargo existe una (R264H) en que la herencia es dominante (Chamberlin et al., 1997). Por otra parte, en dos pacientes se ha visto retardo mental y alteraciones neurológicas como la pérdida de la mielina en el axón neuronal (desmielinización) y, coincidentemente, éstos presentaban los valores de actividad MAT I/III más bajos. El tipo de mutación que se les detectó conduce a la producción de formas truncadas de la enzima de 349 ó 350 residuos por subunidad (mutantes 350X y 351X, respectivamente) que cuando se expresaron en *E. coli* fueron inactivas (Chamberlin et al., 1996). Además, el tratamiento con SAM a uno de los pacientes afectados por este trastorno neurodegenerativo revirtió la progresión de la enfermedad (Surtees et al., 1991). Apoyándose en este hecho, Chamberlin *et al.* planteó la posibilidad de que la desmielinización observada en estos casos se debía a que la disminución del contenido de SAM causado por la deficiencia en MAT I/III producía una caída en la concentración de aquellos productos metilados importantes para la función cerebral, entre los que están la creatina, la fosfatidilcolina y la esfingomielina, estas dos últimas constituyentes estructurales importantes (~30%) de la mielina (Chamberlin et al., 1996). Esta hipótesis no ha podido ser verificada aún por lo que, de momento, sigue sin explicarse por qué en algunos casos la deficiencia de MAT I/III, en teoría una enzima exclusivamente hepática, puede llegar a afectar la función cerebral.

### 2.1.4 Estructura de la MAT I de rata

La estructura de la MAT I de rata (396 aminoácidos) ha sido resuelta por nuestro grupo utilizando la cristalografía de rayos X (pdb 1QM4) (Gonzalez et al., 2000; Gonzalez et al., 2003). El cristal, de forma tetragonal, se obtuvo a partir de la enzima recombinante purificada y plegada a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*. Los datos de la estructura se obtuvieron a una resolución de 2.7 Å y se corresponde con un homotetrámero organizado como un dímero de dímeros, cada uno girado 90° respecto al otro (Figura 2C).



**Figura 2. Estructura de la MAT I de rata.** (A) Se representa la distribución por segmentos de cada uno de los dominios a lo largo de la secuencia primaria de MAT $\alpha$ 1. (B) Se observa la organización de los dominios dentro de la estructura del monómero. En azul aparece el dominio N-terminal, en rojo el central y en verde el C-terminal. Las zonas discontinuas representan las regiones flexibles: en amarillo la que es visible en el mapa de densidad electrónica y en negro las que no han sido resueltas aún. (C) **Estructura del tetrámero.** Se muestran en colores distintos los cuatro monómeros (a, b, c y d). Los dímeros a-b y c-d se encuentran girados 90° entre sí. Los dos centros activos del dímero están opuestos entre sí en la zona de interacción entre subunidades. (Adaptado de González et al., 2000)

Cada monómero se compone de tres dominios estructurales conectados por bucles flexibles y formados por regiones no consecutivas de la secuencia: el dominio N-terminal (residuos 17-28 y 146-254), el dominio central (residuos 29-116 y 255-289) y el dominio C-terminal (residuos 129-145 y 290-396) (Figura 2A). Dichos dominios están formados por hélices  $\alpha$  y cadenas  $\beta$  que siguen un patrón de repetición  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  (Figura 2B). Entre

ellos no se ha encontrado una conservación significativa a nivel de secuencia pero sí se ha observado la existencia de una simetría pseudo-ternaria. La unión entre los monómeros para formar el dímero es fuerte y se produce a través de las láminas  $\beta$  que cada subunidad (situadas de forma invertida una respecto a la otra) orienta hacia el interior. De esta forma, crean una gran superficie plana e hidrofóbica por donde se producen las interacciones de unión, dejando a las hélices  $\alpha$  orientadas al exterior y por tanto expuestas al solvente (Figura 2C). Por su parte, la interacción entre los dímeros para formar el tetrámero es mucho más débil que la existente entre monómeros y se produce a través de la lámina  $\beta$  del dominio central. Dicha interacción se reduce a unos pocos contactos de carácter polar, lo que explica la menor estabilidad del tetrámero frente al dímero.

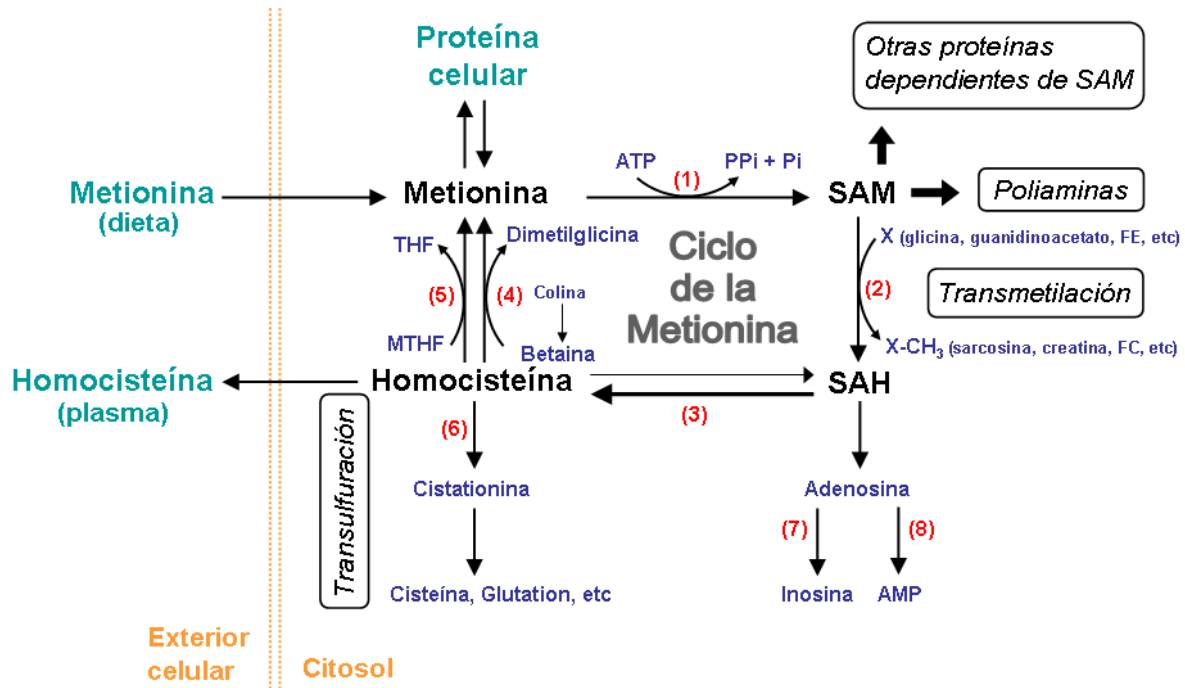
En una cavidad localizada en la zona de contactos entre los monómeros se encuentra el centro activo de la enzima, a cuya formación contribuyen residuos de ambas subunidades. En total son 4 centros activos, dos por cada dímero. La utilización de análogos de la metionina así como la cristalización de la enzima en forma de un complejo ternario (MAT + Metionina o análogo + ATP) permitió la identificación de los residuos implicados en la unión de sustratos e iones, entre los que destaca la fenilalanina en la posición 251 (F251), localizada en el pequeño bucle flexible (F251-A260) que une el dominio N-terminal al dominio central (Figura 2B). Se observó que el análogo de la metionina se encontraba apilado sobre el anillo aromático de la F251 y que, además, cuando se mutaba este residuo la enzima era incapaz de sintetizar SAM pero mantenía su actividad tripolifosfatasa. Por su parte, en la unión del ATP a la enzima participan residuos de ambas subunidades, entre ellos los residuos 267 al 286 (bucle-P) identificado previamente mediante fotoafinidad como el sitio de unión del ATP (Deigner et al., 1995).

La importancia que tienen las cisteínas en el mantenimiento de la actividad y en el grado de asociación entre los monómeros ha quedado más clara a la luz de la información obtenida de la estructura de MAT I. En ella se puede observar que las cisteínas C35, C57, C61, C69 y C105 están localizadas en la zona de contacto entre dímeros, por lo que no sorprende que el cambio de cualquiera de estos residuos produzca una alteración en la proporción dímero/tetrámero (Mingorance et al., 1996). Además, teniendo en cuenta que la C35 y la C61 se encuentran en disposición de formar un puente disulfuro intrasubunidad, es comprensible que la formación del mismo pueda bloquear el equilibrio de interconversión entre ambas isoformas (Sanchez-Perez et al., 2003). En ese sentido, es importante señalar que el residuo C61 es exclusivo de MAT I/III, por lo que la acumulación de la forma dimérica observada en ciertas patologías como la cirrosis

(Cabrero et al., 1988) podría, entre otras posibilidades, deberse a que el ambiente oxidante que presentan estas células favorezca la formación del puente disulfuro a nivel del dímero bloqueando su asociación a tetrámeros. Por otra parte, el residuo C121, también exclusivo de la MAT hepática, se encuentra situado en el bucle (A118-Q128) que une el dominio central al C-terminal, justo en la zona de acceso al centro activo. Sin embargo ese bucle no es visible en el mapa de densidad electrónica (Figura 2B), lo que indica una elevada movilidad. Se ha sugerido que las distintas conformaciones que puede adoptar este bucle regulan la actividad enzimática, comportándose como una tapa móvil, abriendo o cerrando la entrada al centro activo. Así, su modificación por nitrosilación o hidroxilación, podrían provocar la estabilización del bucle en una conformación cerrada impidiendo la entrada de los sustratos al centro activo, lo que explicaría la inactivación de la enzima observada en condiciones de estrés oxidativo.

### 2.1.5 Ciclo de la metionina

La reacción catalizada por la MAT forma parte del ciclo de la metionina y, a su vez, constituye su paso limitante. La figura 3 muestra un esquema de este ciclo según ocurre en el hígado de mamíferos, un órgano donde se expresan todas las enzimas pertenecientes al metabolismo de este aminoácido y que, en el caso de los humanos, llega a producir diariamente entre 6 y 8 g de SAM (Finkelstein, 1990; Mato et al., 1997). Este metabolito puede servir como sustrato en diversas rutas a las que nos hemos referido en el apartado 2.1.1, sin embargo en el hígado, la mayoría es utilizado en las reacciones de transmetilación. Entre las metiltransferasas (EC. 2.1.1.x), son tres las que mayor consumo de SAM realizan: la glicina-N-metiltransferasa (GNMT; EC 2.1.1.20), la guanidinoacetato N-metiltransferasa (GAMT; EC 2.1.1.3) y la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT; EC 2.1.1.18). La primera cataliza la reacción reversible de metilación de la glicina para producir sarcosina, un compuesto cuya función biológica se desconoce, de ahí que se crea que su síntesis es una forma de regulación del nivel de SAM. La segunda se encarga de la síntesis de creatina a partir de guanidinoacetato, y la última de la generación de fosfatidilcolina (FC) partiendo de fosfatidiletanolamina (FE). Como producto de la transmetilación se genera la S-adenosilhomocisteína (SAH) que es hidrolizada por la SAH hidrolasa (SAHH; EC 3.3.1.1) a homocisteína y adenosina en una reacción que, aunque reversible, está favorecida termodinámicamente hacia la formación de SAH. Debido a que



**Figura 3. El ciclo de la metionina en el hígado de mamíferos.** Se muestra un esquema del ciclo de la metionina en el citosol del hepatocito. En color negro aparecen los metabolitos centrales del ciclo y en azul los sustratos y productos de las reacciones. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; PPI: pirofosfato; Pi: fosfato inorgánico; X: molécula aceptora de grupos metilo; THF: tetrahidrofolato; MTHF: 5-metiltetrahidrofolato; FE: fosfatidiletanolamina; FC: fosfatidilcolina; AMP: adenosina monofosfato. Las enzimas que catalizan las reacciones están numeradas en rojo: 1- Metionina adenosiltransferasa (MAT); 2- Metiltransferasas dependientes de SAM; 3- SAH-hidrolasa; 4- Betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT); 5- Metionina sintasa (MS); 6- Cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS); 7- Adenosina deaminasa (ADA); 8- Adenosina kinasa (ADK). Dentro de los rectángulos se indican algunas rutas asociadas al ciclo y en verde se ha representado la metionina proveniente de la dieta, las proteínas celulares que consumen (síntesis) o aportan (degradación) metionina al ciclo y la homocisteína que puede ser exportada al plasma.

este metabolito es un fuerte inhibidor de las metiltransferasas, la célula ejerce una estricta regulación sobre su concentración de manera que, en condiciones normales, la relación SAM/SAH (índice de metilación) se mantiene prácticamente constante. Por ello, en dependencia de los requerimientos celulares, tanto la homocisteína como la adenosina deben ser eliminadas coordinadamente. La adenosina por la acción de dos enzimas: la adenosina deaminasa (ADA; EC 3.5.4.4) que la transforma en inosina y la adenosina kinasa (ADK; 2.7.1.21) que la convierte en adenosina monofosfato (AMP). Por su parte, la homocisteína puede ser eliminada de varias formas: la exportación al plasma sanguíneo, la remetilación y consiguiente regeneración de metionina, o la utilización por la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS; EC 4.2.1.22). Esta última cataliza la síntesis de cistationina en una reacción irreversible e iniciadora de la ruta de transulfuración hepática que conduce a la formación de cisteína y glutatión (entre otros derivados de cistationina). En el caso de la remetilación, son dos las enzimas que pueden llevar a cabo la reacción: la metionina sintasa (MS; EC 2.1.1.13), que obtiene el grupo metilo del 5-metiltetrahidrofolato (MTHF)



conectando así el ciclo de la metionina al de los folatos, y la betaína homocisteína metiltransferasa, (BHMT; EC 2.1.15) que efectúa la metilación a partir de la betaína procedente del catabolismo de la colina. En este último caso se produce la recuperación de uno de los equivalentes de metilación utilizados en la síntesis de la colina.

La regulación del ciclo se efectúa a varios niveles (Finkelstein, 2007) e intervienen, entre otros, productos directos del mismo (SAM y SAH) así como de rutas asociadas (glutation). Como hemos explicado anteriormente la SAH actúa sobre las metiltransferasas, el glutatión sobre la MAT I/III y la SAM lo hace activando la CBS e inhibiendo la BHMT y la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (EC 1.1.1.68), la enzima que sintetiza el MTHF (Finkelstein et al., 1975; Jencks and Mathews, 1987; Ou et al., 2007).

Aunque las reacciones involucradas en el metabolismo de la metionina ocurren en el citosol, algunas de las enzimas implicadas en el mismo se han encontrado en otros compartimentos. En especial, la GNMT y de SAHH han sido encontradas en el núcleo celular (Yeo and Wagner, 1994; Radomski et al., 1999) donde, aparentemente, la primera desempeña una función distinta relacionada con la regulación de los genes de la familia del citocromo P450 (Raha et al., 1994; Bhat and Bresnick, 1997), mientras que la segunda podría estar realizando la misma función (eliminación de la SAH) pero específicamente durante la metilación del *cap* en el pre-mRNA (Radomski et al., 2002). Estas dos enzimas no son casos aislados, cada vez es más común encontrar en la literatura la presencia de enzimas en un compartimento distinto a aquel donde se desarrolla la ruta metabólica a la que pertenecen. Un buen ejemplo lo encontramos en las enzimas que intervienen en la glicólisis: hexoquinasa (HK; EC 2.7.1.1), lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27), gliceraldehido 3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH; EC 1.2.1.12) y la enolasa 1 (ENO1; EC 4.2.1.11). En realidad estas enzimas son proteínas multifacéticas (*moonlighting*). En el citosol cada una desempeña su función enzimática dentro del metabolismo intermediario, lo cual garantiza a la célula la obtención del ATP a partir de glucosa. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias cualquiera de ellas pueden translocarse al núcleo e intervenir en otros procesos celulares, como pueden ser la regulación de la transcripción de determinados genes y la apoptosis (Kim and Dang, 2005). Evidentemente como cualquier otra proteína nuclear, estas enzimas necesitan ser transportadas al núcleo mediante una de las vías de transporte nuclear con que cuenta la célula.

## 2.2 Transporte nuclear

### 2.2.1 El núcleo celular

La célula eucariota ha desarrollado un sistema de organización subcelular basado en compartimentos intracelulares aislados por membranas, entre los que se encuentra el núcleo (Pennisi, 2004). Su separación física del citoplasma mediante una doble capa lipídica, conocida como la envoltura nuclear, ha permitido que dentro de este orgánulo se preserve la mayoría del material genético celular en forma de cromatina. Esto ha llevado a que aumentase la protección del DNA frente a agentes desestabilizadores y por ende a un incremento de la estabilidad genética. Al mismo tiempo, esta compartimentación ha posibilitado que procesos que estaban “mezclados” en procariotas, como son la síntesis de proteínas y la transcripción, se ejecuten en eucariotas separadamente en el citosol y en el núcleo, respectivamente.

Inicialmente se pensaba que la organización interna del núcleo se reducía al nucleolo y los cromosomas, los dominios subnucleares más visibles y a la vez más estudiados. Sin embargo, en los últimos años se han empezado a identificar un importante número de nuevas estructuras granulares, que han revelado una organización mucho más compleja en el interior de este orgánulo (Spector, 2001; Spector, 2006). Estos nuevos compartimentos se encuentran asociados a la matriz nuclear, una red de filamentos que dan soporte a la arquitectura nuclear y que pueden visualizarse fácilmente si se elimina la cromatina y sus proteínas asociadas (Nickerson et al., 1997). Un buen ejemplo de este tipo de estructuras subnucleares son los *speckles*, pequeñas motas irregulares de ~1.5  $\mu\text{m}$  cuya función se cree está relacionada con el ensamblado, modificación y almacenamiento de los factores necesarios para el procesamiento del pre-mRNA (Lamond and Spector, 2003; Handwerger and Gall, 2006).

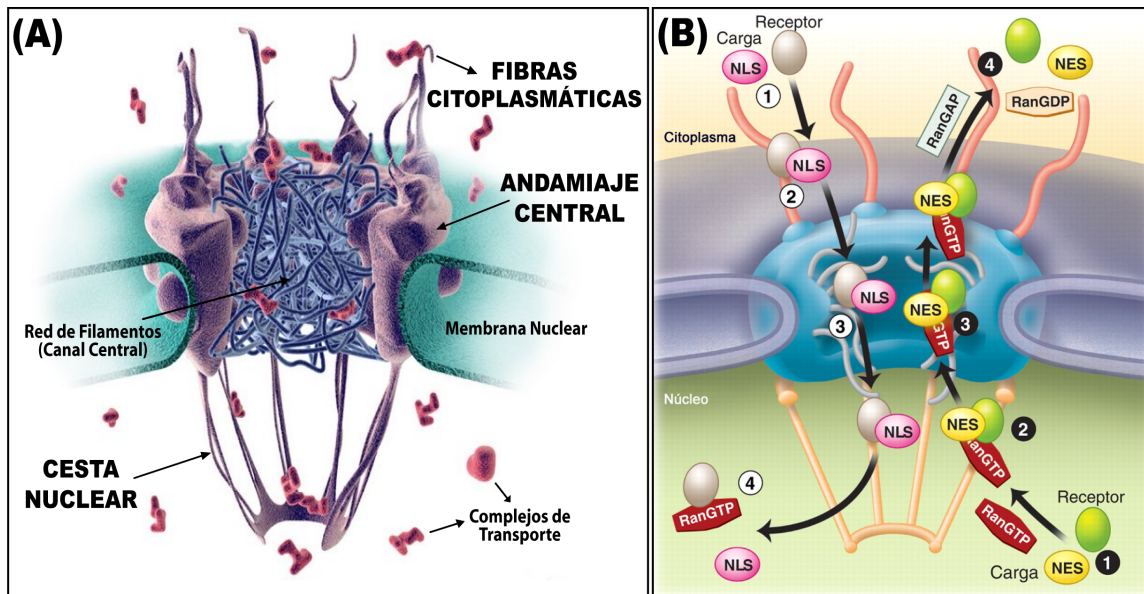
### 2.2.2 Mecanismo de transporte activo a través del complejo del poro nuclear

La separación física entre núcleo y citoplasma ha requerido la presencia de un sistema de transporte que garantice a la célula el éxito y la coordinación de sus funciones básicas. De esta forma, miles de macromoléculas (carga) son intercambiadas controladamente entre ambos compartimentos. En este sistema juegan un papel fundamental el complejo del poro nuclear (NPC) y los transportadores. El primero

constituye el espacio físico por donde se produce el intercambio de moléculas y los segundos son los encargados de llevar la carga a través del NPC.

El NPC es una estructura supramolecular de gran tamaño con simetría octogonal, de ~60 MDa en levaduras y ~125 MDa en vertebrados, que atraviesa la doble capa lipídica de la envoltura nuclear creando un canal que comunica el interior del núcleo con el citoplasma (Allen et al., 2000). Está compuesto por varias copias de ~30 tipos de proteínas conocidas como nucleoporinas o Nups (Cronshaw et al., 2002; Tran and Wentz, 2006), que conforman tres estructuras claramente definidas: las fibras citoplasmáticas, la cesta nuclear y el andamiaje central (Figura 4A). Las dos primeras están implicadas en la “captura” del complejo transportador-carga en la entrada del poro y, también, en su disociación una vez efectuado el transporte. Por su parte, el andamiaje central consiste en un conjunto de anillos internos y externos que dan soporte a toda la arquitectura del NPC. De él parte una nube de filamentos desordenados y de gran movilidad que rellenan el canal central formando una barrera selectiva (o tamiz molecular) para regular el tráfico (Alber et al., 2007a; Alber et al., 2007b). De esta forma, aquellas moléculas menores de 9 nm (40-60 kDa) podrían atravesar el poro por simple difusión, mientras que el resto necesitarían de un mecanismo de transporte activo mediado por receptores específicos. Estudios recientes apuntan a una ruta independiente para el paso de pequeñas moléculas e iones. Su transporte podría realizarse por pequeños canales situados alrededor del andamiaje central en lugar del canal central, por el que viajarían fundamentalmente los complejos de transporte (Kramer et al., 2007; Naim et al., 2007; Kramer et al., 2008).

Los receptores de transporte se clasifican según la dirección en la que transportan la carga como importinas (hacia el núcleo) o exportinas (hacia el citoplasma). Ambos reconocen secuencias específicas expuestas en la superficie de la carga, los primeros las conocidas como señales de localización nuclear (NLS) y los segundos las señales de exportación nuclear (NES). Una vez unido a la carga, el receptor realiza el transporte activo de la misma a través del NPC, en el que las nucleoporinas que conforman la red de filamentos del canal central (FG-Nups) juegan un papel esencial. Estas proteínas se caracterizan por presentar grandes regiones desestructuradas compuestas por motivos repetidos ricos en fenilalanina y glicina (motivos FG). A través de los mismos se establecen una serie de interacciones hidrofóbicas con los receptores de transporte que posibilitan la translocación del complejo a través del NPC (Rout and Wentz, 1994; Denning et al., 2003; Alber et al., 2007b; Kramer et al., 2008).



**Figura 4. Complejo del poro nuclear (NPC).** (A) **Arquitectura.** En mayúscula se destacan las tres estructuras más importantes: fibras citoplasmáticas, andamiaje central y cesta nuclear. En minúscula aparecen la red de filamentos (FG-Nups) del canal central, la membrana nuclear y los complejos de transporte (Adaptado de Patel et al., 2007) (B) **Mecanismo de transporte activo.** Se muestran algunos de los componentes que intervienen en el ciclo Ran y las cuatro etapas en las que ocurre la importación (números con fondo blanco) o la exportación (números con fondo negro): 1- Formación del complejo de transporte (carga-receptor) 2- Anclaje del complejo a las fibras citoplasmáticas (importación) o nucleares (exportación) 3- Translocación a través del canal central mediante interacción con los filamentos FG-Nups 4- Ruptura del complejo de transporte y liberación de la carga (Adaptado de Terry et al., 2007).

Todo este proceso implica además a proteínas del ciclo Ran, encargado de asegurar mediante la regulación de la interacción carga-receptor la direccionalidad de las rutas de importación y exportación más conocidas de la célula (Azuma and Dasso, 2000). Ran es una proteína soluble, muy abundante y conservada en eucariotas que pertenece a la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas (Bischoff and Ponstingl, 1991b; Melchior et al., 1993; Dasso, 2002). Se encuentra en altas concentraciones en el núcleo en forma de RanGTP, mientras que en el citoplasma la forma predominante es RanGDP (Gorlich et al., 1996; Izaurralde et al., 1997). Durante la importación (Figura 4B), la unión de la importina a la carga en el citoplasma está favorecida por los bajos niveles de RanGTP. Sin embargo, en el núcleo el efecto es el contrario: la elevada concentración de RanGTP facilita su unión a la importina provocando la liberación de la carga del complejo. A continuación la importina asociada a RanGTP se transloca al citoplasma. Allí la hidrólisis del GTP libera RanGDP del complejo, lo que permite la iniciación de otro ciclo de importación. En el caso de la exportación (Figura 4B), el mecanismo se regula a la inversa: cuando la exportina se une al RanGTP en el núcleo se incrementa la afinidad por la carga, mientras que la hidrólisis del GTP en el citoplasma provoca la disociación del complejo de transporte. La elevada concentración de RanGDP en el citoplasma se asegura mediante la

acción de una proteína localizada en las fibras citoplasmáticas denominada RanGAP (proteína activadora de la actividad GTPasa de Ran) que, conjuntamente con otros factores, provoca la hidrólisis del GTP (Bischoff et al., 1994; Mahajan et al., 1997). El mantenimiento de los altos niveles de RanGTP en el núcleo depende de un factor asociado a la cromatina: RCC1 o RanGEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina; Bischoff and Ponstingl, 1991a). Este permite el intercambio GDP/GTP en la RanGDP que es transportada al núcleo por NTF2 (factor de transporte nuclear 2; Paschal and Gerace, 1995; Ribbeck et al., 1998). De esta forma se asegura el mantenimiento de un gradiente RanGTP/RanGDP entre el núcleo y el citoplasma, imprescindible para garantizar la direccionalidad del transporte.

### **2.2.3 La familia de las carioferinas $\beta$ como receptores del transporte nuclear**

La mayoría del transporte núcleo-citoplasmático de proteínas, ribonucleoproteínas y ácidos nucleicos (exceptuando el mRNA) está mediado por receptores pertenecientes a una familia de proteínas denominada como carioferinas  $\beta$ , o también familia de las importinas y exportinas. Hasta la fecha se han descrito 14 miembros en levaduras y unos 20 miembros en vertebrados (Mosammamarast and Pemberton, 2004). A pesar de presentar una baja homología entre ellos (~20 % identidad), estos receptores se caracterizan por presentar tres regiones que garantizan su función (Vetter et al., 1999; Bayliss et al., 2000; Chook and Blobel, 2001; Bednenko et al., 2003). La primera está localizada en su dominio N-terminal y es la responsable de la unión a RanGTP. La segunda está implicada en la unión de la carga a transportar y habitualmente está situada en el dominio C-terminal. Finalmente, la tercera se encarga de la interacción con las FG-Nups y está conformada por zonas de ambos dominios. Cada integrante de la familia presenta una estructura en superhélice compuesta por la repetición de ~20 motivos denominados HEAT. A su vez, estos están constituidos por repeticiones de unos 40 aminoácidos formando dos hélices antiparalelas separadas por un corto giro (Cingolani et al., 1999; Chook and Blobel, 1999). Este tipo de estructura es muy flexible posibilitándole al receptor la adopción de diferentes conformaciones. Además, se ha visto que la carga puede unírsele por más de un sitio y que, en algunos casos, dicha unión puede estar mediada por una molécula adaptadora. Estas propiedades le confieren a los receptores una gran versatilidad en cuanto al reconocimiento de distintas secuencias de transporte, lo que explica por qué una importina (o exportina) es capaz de transportar más de una carga (Fukuhara et al., 2004; Conti et al., 2006).

El primer receptor de transporte identificado, y hasta la fecha el mejor caracterizado, es la importina  $\beta 1$  (Gorlich et al., 1994; Harel and Forbes, 2004). A diferencia de la mayoría de los miembros de la familia de carioferinas  $\beta$  que se unen directamente a la molécula a transportar, la importina  $\beta 1$  requiere generalmente de la presencia de una proteína adaptadora. Los adaptadores más estudiados pertenecen a la familia de las importinas  $\alpha$  de las que, a día de hoy, se conoce un único miembro en levadura y seis en humanos (Goldfarb et al., 2004). Cada importina  $\alpha$  presenta un dominio amino terminal muy flexible (IBB) que, además de servir de sitio de unión a la región carboxilo terminal de la importina  $\beta 1$ , es capaz de regular la interacción con la carga mediante un mecanismo de autoinhibición (Cingolani et al., 1999; Kobe, 1999; Harreman et al., 2003). Al igual que las carioferinas  $\beta$ , esta familia de adaptadores presentan una arquitectura modular compuesta por 10 repeticiones de motivos tipo armadillo (ARM) de  $\sim 40$  aminoácidos cada uno (Conti et al., 1998; Kobe, 1999). Estos motivos se organizan conformando una superhélice alargada en cuya superficie interna se encuentra un bolsillo que sirve de sitio de unión a secuencias ricas en aminoácidos básicos, conocidas como NLS clásicas (véase apartado 2.2.4).

Existen varias rutas para el transporte nuclear que utilizan diferentes receptores de la familia de las carioferinas  $\beta$ . La más estudiada, la denominada ruta de importación clásica podría ser utilizada por  $\sim 50\%$  de las proteínas que entran al núcleo (Lange et al., 2007). En ella, una proteína que contenga este tipo de señal es transportada al núcleo por el heterodímero compuesto por importina  $\beta 1$  y el adaptador importina  $\alpha$ . Otra vía muy conocida, en este caso de exportación de proteínas, es la que utiliza la exportina CRM1 (Fornerod et al., 1997), la cual reconoce señales de exportación ricas en leucinas (véase apartado 2.2.4). También, en los últimos años se han realizado progresos importantes en el estudio de la ruta de importación mediada por la importina  $\beta 2$  o transportina (Chook and Blobel, 1999; Lee et al., 2006; Cansizoglu and Chook, 2007; Cansizoglu et al., 2007; Imasaki et al., 2007). Este receptor se une directamente a la carga a través de un tipo de señal denominada como PY-NLS, debido a que presentan un dominio característico PY (prolina-tirosina) en su extremo carboxilo terminal (véase apartado 2.2.4). Hasta la fecha son más de 20 las proteínas identificadas como sustratos de la importina  $\beta 2$  (todas proteínas de unión a RNA) y se han propuesto alrededor de 80 más como candidatas a usar esta vía de importación (Lee et al., 2006)

## 2.2.4 Señales del transporte nuclear de proteínas

Las señales relacionadas con la exportación o importación de proteínas son muy variables en cuanto a composición, número y organización dentro de la molécula a transportar. Se caracterizan por ser constituyentes permanentes de la carga, no perdiéndose durante el transporte. Además, pueden localizarse en cualquier sitio dentro de la cadena polipeptídica, requiriendo de su exposición en la superficie para posibilitar el acceso y reconocimiento por parte del receptor específico.

Hasta la fecha se han descrito tres tipos de señales (dos de importación y una de exportación) cuya composición responde a patrones específicos:

- **NLS clásicas:** Son las más conocidas y estudiadas. Están formadas por uno (NLS monopartitas) o dos (NLS bipartitas) agrupamientos de residuos predominantemente básicos (lisinas y argininas), que son reconocidos por la importina  $\alpha$  (Dingwall and Laskey, 1991). Las monopartitas están constituidas por un grupo de 3 a 5 residuos básicos, siendo su prototipo la NLS del antígeno grande del virus SV40 (PKKKRKV), primera señal de transporte al núcleo identificada (Kalderon et al., 1984). Por su parte, las bipartitas contienen un segundo grupo más pequeño de aminoácidos básicos, separados del primero por una secuencia compuesta por alrededor de 10 a 12 residuos sin una homología significativa. Se ha visto que ambos agrupamientos básicos son necesarios para el funcionamiento de la señal y que uno de ellos, normalmente el más cercano al extremo carboxilo terminal, es muy similar a una NLS monopartita. El ejemplo más representativo de señal bipartita es la perteneciente a la nucleoplasmina (KRPAATKKAGQAKKKK; Robbins et al., 1991).
- **PY-NLS:** Son secuencias de entre 20 a 40 residuos a las que se une la importina  $\beta 2$ . La baja homología existente entre las NLS de este tipo había sido el principal escollo en la búsqueda de una secuencia consenso. Sin embargo, recientes estudios empleando métodos bioquímicos, bioinformáticos y cristalográficos (Lee et al., 2006; Imasaki et al., 2007) han encontrado la existencia de tres reglas que cumplen las NLS reconocidas por la importina  $\beta 2$ . En primer lugar, se caracterizan por ser regiones desordenadas estructuralmente; en segundo lugar, exhiben un carácter básico global y por último, presentan dos dominios que son esenciales para la interacción con el receptor. El primero, denominado dominio PY, está localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la señal. Está conformado por los residuos PY (prolina seguida de tirosina) precedidos, a una distancia de 3 a 5 residuos no relevantes, por un residuo básico (K, R o H). El

segundo dominio está localizado hacia el extremo amino terminal y puede ser de dos tipos: enriquecido en residuos básicos o en hidrofóbicos. El caso más estudiado de este tipo de señal se conoce como M9NLS (NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY). Descrita por vez primera en la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (hnRNP A1, (Siomi and Dreyfuss, 1995), permitió la posterior identificación de la importina  $\beta$ 2 (Siomi and Dreyfuss, 1995; Pollard et al., 1996).

- NES ricas en leucinas: Son secuencias cortas, que contienen unos 4 aminoácidos hidrofóbicos, fundamentalmente leucinas, a las que se une la exportina CRM1. Los tres primeros residuos están generalmente separados entre sí por 2 a 3 aminoácidos, mientras que el último está separado por sólo uno (Bogerd et al., 1996; la Cour et al., 2004; Kutay and Guttinger, 2005). Desde que se identificó la primera secuencia de este tipo (LPPLERLTL) en la proteína viral HIV-1 Rev (Fischer et al., 1995), se han identificado una gran variedad de proteínas que contienen este tipo de señal (la Cour et al., 2003)

Al margen de estas tres categorías existen numerosos ejemplos de proteínas que utilizan señales “atípicas”, entendiéndose como tales aquellas que no responden a un patrón determinado (Christophe et al., 2000). Es el caso de la importación nuclear de la proteína de unión a lípidos PLSCR1, cuya secuencia GKISKHWTGI constituye una NLS no convencional que interacciona con la región aminoterminal (ARM 1 a 4) de la importina  $\alpha$  (Chen et al., 2005). También se han descrito NLS ricas en serinas y treoninas (LRSVSTGSSRPSK), en el caso del receptor de mineralocorticoides (Walther et al., 2005), y con una elevada proporción de residuos ácidos, en la proteína FAF1 (Frohlich et al., 1998) y en la DNA topoisomerasa I (Mo et al., 2000).

Existen además las señales conformacionales, que están compuestas por residuos que, pudiendo estar muy alejados dentro de la secuencia primaria de la proteína, coinciden espacialmente en una misma región de su estructura tridimensional. Algunos ejemplos en los que se ha descrito este tipo de señal son: las histonas centrales o *core* (Baake et al., 2001), la proteína ORF29p del virus zoster de la varicela (Stallings and Silverstein, 2005), la variante citotóxica (PE5) de la ribonucleasa pancreática humana (Rodriguez et al., 2006) y los factores de transcripción STAT1 y STAT2 (Fagerlund et al., 2002). En este último ejemplo se presenta la particularidad de que la señal aparece después de la homo- o heterodimerización de los factores, constituyéndose como resultado de la contribución de residuos provenientes de ambas subunidades.

Finalmente, se conocen proteínas que carecen de señales de importación o exportación, y que realizan su transporte nuclear mediante la unión o acoplamiento a otra



proteína que sí las posee (mecanismo de *piggy-back*). Es el caso de la importación nuclear de la prolactina (PRL) que se une a una ciclofilina (CypB), la cual contiene en su extremo aminoterminal una NLS monopartita (Rycyzyn et al., 2000). También se ha propuesto este mecanismo en la importación del factor de transcripción pancreático PTF-1 (Sommer et al., 1991), la subunidad p46 de la DNA primasa de ratón (Mizuno et al., 1996) y las subunidades HapC y HapE del complejo de transcripción AnCF de *A. nidulans* (Steidl et al., 2004), así como en la exportación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B (Arenzana-Seisdedos et al., 1997).

### 2.2.5 Regulación del transporte nuclear de proteínas

El transporte de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma varía en función de las señales recibidas en cada momento del ciclo celular. Para ello, la célula cuenta con un sistema de regulación muy riguroso que involucra a los tres componentes esenciales de la maquinaria de transporte: el NPC, los receptores y la carga. Según sobre qué componente se actúe existirá un mayor o menor efecto sobre el tráfico nuclear (Terry et al., 2007), lo que posibilita una gran capacidad de adaptación a las necesidades celulares.

Las claves de la regulación a nivel del NPC radican en los recientes resultados que describen a este complejo macromolecular como una estructura dinámica y no como un simple canal estático por donde circulan los complejos de transporte (Tran and Wentz, 2006). Este dinamismo está fundamentado en al menos tres propiedades observadas en esta estructura. Una es la capacidad de adopción de distintas conformaciones durante su funcionamiento (Beck et al., 2004). Otra está constituida por el papel activo que juegan las Nups en el transporte, las cuales, según las circunstancias, pueden alterar su composición, distribución, afinidad y tiempo de residencia y asociación en el NPC (Griffis et al., 2003; Pyhtila and Rexach, 2003; Rabut et al., 2004; Paulillo et al., 2005). Por último está la capacidad de reorganización y aumento de la permeabilidad del poro durante la división celular (Feldherr and Akin, 1993; Dultz et al., 2008). Aunque aún se desconocen los mecanismos exactos por los que proceden, se cree que todas estas alteraciones son formas de regulación a gran escala de la interacción con los receptores.

El transporte nuclear también puede ser regulado mediante el control de los niveles de expresión de los transportadores, lo que afectaría al paso de conjuntos de cargas. Ensayos realizados *in vivo* han puesto de manifiesto que existe una relación directa entre el nivel de expresión de las carioferinas  $\beta$  y la velocidad del transporte nuclear (Timney et al., 2006; Yang and Musser, 2006). En humanos, los miembros de la familia de la importina  $\alpha$

muestran una distribución específica de tejido (Kohler et al., 1997) y, recientemente, se ha demostrado en ratón que el cambio coordinado detectado en la expresión de estos miembros es clave en la diferenciación neuronal (Yasuhara et al., 2007). Finalmente, en el ciclo celular existe una modulación de la interacción entre la importina  $\beta$ 1 y la importina  $\alpha$ . De esta forma la eficiencia de importación disminuye durante las fases S temprana, G2 y G1 del ciclo en comparación con otras fases (Yasuhara et al., 2004).

La célula puede controlar el transporte nuclear de una carga individual mediante una serie de mecanismos que actúan alterando la accesibilidad a la señal de transporte o variando la afinidad en el reconocimiento al receptor (Gasiorowski and Dean, 2003; Poon and Jans, 2005; Pouton et al., 2007). El mecanismo más conocido es la modificación post-traduccional, en especial la fosforilación, dentro o en el entorno de la señal. La fosforilación puede actuar aumentando o inhibiendo el transporte. Es el caso del antígeno grande del virus SV40 cuya NLS está flanqueada por las dianas de las kinasas CKII y cdc2. La fosforilación por CKII aumenta la importación nuclear alrededor de 50 veces (Rihs et al., 1991), mientras que la producida por cdc2 provoca una caída del 70% en la acumulación nuclear (Jans et al., 1991). Además de la fosforilación, el transporte nuclear puede ser regulado por otras modificaciones post-traduccionales como son: la metilación (Smith et al., 2004), la ubiquitinación (Trotman et al., 2007), la S-nitrosilación (Hara et al., 2005), la acetilación (Thevenet et al., 2004), la ADP-ribosilación (Kanai et al., 2007) y la sumoilación (Chen et al., 2006).

Por último, el enmascaramiento de la señal mediante interacciones inter- o intra-moleculares, así como la retención de la carga a través de su unión a estructuras o factores nucleares o citoplasmáticos, son otras formas de regulación del transporte. Tanto NF- $\kappa$ B como la p53 recurren al enmascaramiento inter-molecular. En el primer caso la señal es ocultada por la asociación al inhibidor I $\kappa$ B (Beg et al., 1992), mientras que en el segundo ocurre como resultado de una homotetramerización (Stommel et al., 1999). Por su parte, los factores de transcripción de levadura Yap1p y Pap1 bloquean sus respectivas NESs mediante la formación de puentes disulfuro intra-moleculares en respuesta al estrés oxidativo (Kudo et al., 1999; Kuge et al., 2001). En el caso de p53, se ha descrito un mecanismo por el cual es secuestrada en el citosol por su unión a un factor de retención citoplasmático denominado PARC (Nikolaev et al., 2003).

### ***3. Objetivos***



1. Establecer la distribución tisular de MAT $\alpha$ 1.
2. Determinar la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1.
3. Identificar los determinantes moleculares que definen la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1.
4. Analizar el estado de asociación así como la capacidad de síntesis de S-adenosil-L-metionina de MAT I/III en las nuevas localizaciones descritas.



## ***4. Materiales y Métodos***





## 4.1 Animales

Para los experimentos realizados en esta memoria se utilizaron ratas macho Wistar adultas de ~200 g de peso, que fueron tratadas de acuerdo a las normas establecidas por la legislación vigente para el manejo de animales de laboratorio.

## 4.2. Cultivos celulares

### 4.2.1 Bacterias

En nuestro trabajo hemos empleado las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y BL21 (DE3). La primera fue empleada para los trabajos de clonaje, mutagénesis dirigida y amplificación de plásmidos, y la segunda para la expresión de proteínas recombinantes. El medio de cultivo utilizado fue LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) o kanamicina (50  $\mu$ g/ml), según el caso. Para el cultivo en placas se añadió 1.5% (p/v) de agar.

### 4.2.2 Células eucariotas

En la siguiente tabla aparecen las líneas celulares utilizadas en este trabajo:

Línea	Características/Origen	Referencia
CHO-K1	Ovario hamster chino	ATCC, N°: CCL-61
CHO-K1 Tet-On	CHO-K1 establemente transfectada con el transactivador transcripcional reverso de la tetraciclina (rtTA)	BD Biosciences
COS-7	Riñón de mono verde africano	ATCC, N°: CRL-1651
N2a	Neuroblastoma de cerebro de ratón	ATCC, N°: CCL-131
H35	Hepatoma de rata	ATCC, N°: CRL-1548
HEK 293T	Riñón humano fetal	ATCC, N°: CRL-11268

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> utilizando medio DMEM (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) al 10% (v/v) y 2 mM glutamina (Gibco). En el caso de la línea celular CHO-K1 Tet-On, así como con los clones estables que se obtuvieron a partir de la misma, se utilizó el mismo medio sustituyendo el suero por otro libre de tetraciclina (BD Biosciences) y, también, de algunos de sus derivados como la doxiciclina (Dox, BD Biosciences). De esta forma se evitó la inducción no deseada de la proteína de interés.

El cultivo de la línea HEK 293T se realizó en placas de cultivo que fueron previamente tratadas 5 minutos con 7.5 mg/ml de poli-ornitina (Sigma) en PBS 1X para facilitar la adhesión celular.

La obtención de hepatocitos de rata adulta se realizó según el procedimiento modificado de perfusión con colagenasa (Hue et al., 1975) en el laboratorio del Dr. J.E Feliz (UAM).

#### **4.2.2.1 Transfecciones**

Las transfecciones transitorias se realizaron por duplicado y un mínimo de seis veces. Se empleó el método del fosfato cálcico (Jordan et al., 1996) en células con aproximadamente un 70-80 % de confluencia, sembradas 24 horas antes. Las mismas se mantuvieron entre 12-16 horas en contacto con el precipitado DNA-fosfato cálcico, momento en que se lavaron con PBS 1X y se incubaron con medio fresco durante 24 horas. El DNA utilizado en las transfecciones fue purificado utilizando el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Las cantidades utilizadas por  $\sim 1 \cdot 10^6$  células sembradas fueron: 25  $\mu\text{g}$  (H35), 20  $\mu\text{g}$  (CHO-K1), 15  $\mu\text{g}$  (COS-7) y 7.5  $\mu\text{g}$  (HEK 293T).

Para la obtención de los clones estables de MAT-EGFP se utilizó una placa de 10 mm (p100) con células CHO-K1 Tet-On a  $\sim 80$  % de confluencia. La placa se cotransfectó con 10  $\mu\text{g}$  del plásmido pTRE-tight-MAT-EGFP y 1  $\mu\text{g}$  del marcador lineal de selección pTK-Hyg (BD Biosciences), utilizando el método del fosfato cálcico. La selección de los clones estables se realizó mediante adición de 1 mg/ml Higromicina B (BD Biosciences) a partir de las 48 horas. El análisis de los mismos se efectuó mediante inmunotrasferencia de los extractos citosólicos luego de haber sido cultivados durante 48 horas a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Dox (BD Biosciences).

#### **4.2.2.2 Tratamientos utilizados**

En el caso de la leptomicina B (BD Biosciences), el tratamiento se realizó a una concentración de 10 ng/ml durante 6 horas en células CHO-K1, N2a, H35 y COS-7 transitoriamente transfectadas con la proteína de fusión MAT-EGFP.

### **4.3 Plásmidos**

Los plásmidos utilizados en este estudio, algunas de sus características y su utilización se han resumido en la tabla siguiente:

Nombre	Comentario	Uso	Referencia
pTRE-tight-EGFP	Permite fusión al N-terminal de EGFP (proteína verde fluorescente mejorada)	Expresión regulable en células CHO-K1 Tet-On	BD Biosciences
pEGFP-N1	Permite fusión al N-terminal de EGFP	Expresión en células CHO-K1, N2a, COS-7, HEK 293T y H35	
pFLAG-CMV4	Permite fusión al C-terminal del epítipo FLAG	Expresión en células CHO-K1, N2a, COS-7, HEK 293T, H35 y también en <i>E. coli</i>	Sigma
pEGFP5X	Permite fusión al N-terminal de EGFP pentamérica	Expresión en células CHO-K1	Faleiro y Lazebnik (2000)
pEGFP-NLS-EGFP3X	Permite fusión al N-terminal de EGFP trimérica unida a 3 copias de NLS del antígeno T del SV40		
pT7-7	-	Expresión regulable en <i>E. coli</i>	Tabor y Richardson (1992)
pSSRL-BlueT2	ORF de MAT $\alpha$ 1 de rata clonado en pBluescript SK+	Trabajos de clonaje de MAT $\alpha$ 1 en otros vectores	Mingorance <i>et al.</i> (1996)
pSSRL-T7N	MAT $\alpha$ 1 clonada en pT7-7	Expresión regulable de MAT $\alpha$ 1 en <i>E. coli</i>	Alvarez <i>et al.</i> (1994)

#### 4.4 Construcciones. Estrategias de clonaje

El ORF de la MAT $\alpha$ 1 de rata (1191 pb) fue clonado en varios vectores. Con la excepción de la construcción pT7-7-MAT-EGFP, el resto se realizaron a partir del pSSRL-BlueT2 (Mingorance *et al.*, 1996). Para el clonaje en el vector pEGFP-N1 se emplearon las dianas *Xho I/Hind III* dando lugar a la construcción pMAT-EGFP. La utilización del sitio *Hind III* en la posición 1177 del ORF de la enzima provocó que se perdiesen sus dos últimos aminoácidos en la fusión a EGFP. En la obtención del vector pTRE-tight-MAT-EGFP fue necesario mutagenizar previamente el pSSRL-BlueT2 con el objetivo de eliminar la primera base (T) del codón de parada de MAT $\alpha$ 1 (secuencia sentido del par de primers empleados: 5'-GAAGCTTGTGTTTAGAGCCTCGAGTG-3'). A continuación se realizó el clonaje *Kpn I/BamH I* en el vector pTRE-tight-EGFP. La construcción pFLAG-MAT se obtuvo mediante clonación *EcoR I/BamH I* en el vector pFLAG-CMV4. Con el fin de preservar el marco de lectura de la enzima, fue necesario introducir a través de mutagénesis, previa al clonaje, una base (A) entre las posiciones 976 y 977 de pFLAG-CMV4 (secuencia sentido del par de primers utilizados: 5'-CAAGCTTGCGGCACGCGAATTCATC-3'). Por último, la construcción pT7-7-MAT-EGFP se realizó a partir del pTRE-tight-MAT-EGFP. El casete MAT-EGFP fue introducido en el pT7-7 empleando los sitios *Nde I/EcoR I*.

Tres fragmentos ( $\Delta$ ) pertenecientes al C-terminal de MAT $\alpha$ 1 de rata fueron clonados en el vector pEGFP5X. Los mismos se corresponden con las posiciones 937-

1188, 1051-1188 y 1176-1188 del ORF de la enzima y fueron nombrados, de acuerdo a las posiciones aminoacídicas que abarcan, como:  $\Delta(313-396)$ ,  $\Delta(351-396)$  y  $\Delta(393-396)$  respectivamente. El clonaje del fragmento  $\Delta(393-396)$  se realizó mediante el anillamiento de oligos. Para ello se sintetizaron dos oligos complementarios a la región de interés (1176-1188), incluyendo un ATG introducido delante de la posición 1176. A cada uno de ellos se le añadió la secuencia CTAG en el 5' (complementaria al sitio de corte *Nhe I*), y se fosforilaron en ese extremo. La secuencia de ambos fue: 5'-CTAGATGAAGCTTG TGTGGCG-3' y 5'-CTAGCGCAAACACAAGCTTCAT-3'. Para el anillamiento se resuspendieron en 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA y se mezclaron cantidades iguales (1.5  $\mu$ g) de cada uno. Luego de calentar la mezcla durante 3 minutos a 95 °C se realizó un enfriamiento controlado a razón de -1.5 °C por minuto hasta alcanzar los 25 °C. En este punto se procedió a ligar la mezcla en el vector pEGFP5X previamente digerido con *Nhe I*, para obtener finalmente el vector p $\Delta(393-396)$ -EGFP5X. Las otras dos construcciones se prepararon mediante amplificación por PCR a partir del pSSRL-BlueT2. Se diseñaron dos primers sentido: 5'-CAGCTAGCATGCGGAGAGTCCTTGTTTCAGGT-3', para la amplificación de  $\Delta(313-396)$ , y 5'-CAGCTAGCATGAACAAGAACTTTGACCTCCGG-3', para  $\Delta(351-396)$ . En el diseño de los mismos fue necesario introducir justo delante de la posiciones 937 ó 1188 (según el fragmento a clonar) un ATG y, precediendo a éste, un sitio *Nhe I*. El primer antisentido utilizado en cada caso fue el mismo (5'-CAGCTAGCGCAAACACAAGCTTCTTGGGGA-3') y en su diseño se introdujeron a continuación de la posición 1188 dos pares de bases (GC), para el mantenimiento del marco de lectura, seguidas de un sitio *Nhe I*. Una vez amplificados, los fragmentos fueron clonados *Nhe I* en pEGFP5X, obteniéndose las construcciones p $\Delta(313-396)$ -EGFP5X y p $\Delta(351-396)$ -EGFP5X.

#### 4.5 Obtención de mutantes del C-terminal de la MAT $\alpha$ 1 de rata

Todas las mutaciones fueron realizadas con el sistema *QuikChange Site-Direct Mutagenesis Kit* (Stratagene) y comprobadas mediante secuenciación automática del DNA. A continuación se relacionan los primers empleados para la obtención los mutantes simples (sólo la cadena sentido y en letra negrilla las bases cambiadas):

Mutante	Secuencia (5'→3')
R313A	GGCTGGGCTCTGCGCCAGAGTCCTTGTTTC
K340A	CCTACGGAACCTCCGCCAAGACTGAGCGAGAG
K341A	CTACGGAACCTCCAAGGCCACTGAGCGAGAGC
R344A	CCAAGAAGACTGAGGCAGAGCTACTAGAGG

Mutante	Secuencia (5'→3')
R357A	CAAGA <u>ACTTTGACCTCGCCCCGGGTGTTATTGTC</u>
R363A	CCGGGTGTTATTGT <u>CGCCGACTTGGATCTGAAG</u>
K368A	GGGACTTGGATCTGG <u>CCAAGCCCATCTACCAG</u>
K369A	GACTTGGATCTGAAG <u>GCCCCCATCTACCAGAAG</u>
K374A	GCCCCATCTACCAG <u>GCCACTGCATGCTATGG</u>
F251D	CCAAGTGGGCGGGATGTCATCGGA
T342A	GA <u>ACTTCCAAGAAGGCTGAGCGAGAGCTAC</u>
T342D	GGA <u>ACTTCCAAGAAGGATGAGCGAGAGCTAC</u>
K392A*	CCTGGGAGGT <u>CCCCGCCAAGCTTCGAATTC</u>
K393A*	GGGAGGT <u>CCCCAAGGCCCTTCGAATTCTGC</u>
K392A**	CCTGGGAGGT <u>CCCCGCCAAGCTTGTGTTTTAG</u>
K392A**	GGGAGGT <u>CCCCAAGGCCCTTGTGTTTTAGAGC</u>
R313X**	GGCTGGGCTCTGCTAGAGAGTCTTGTC
N351X**	GAGCTACTAGAGGTTGTGTGA <u>AGA</u> ACTTTGACCTCCG
K393X**	GGGAGGT <u>CCCCAAGTAGCTTGTGTTTTAG</u>

\*Sólo para mutantes en pMAT-EGFP      \*\*Sólo para mutantes en pFLAG-MAT

Los mutantes dobles se realizaron en pFLAG-MAT. En el caso de la obtención de K340A-K393A y K341A-K393A se empleó el mutante K393A como molde con los primers diseñados para K340A y K341A, respectivamente. El resto de primers empleados se resumen en la siguiente tabla (sólo cadena sentido). En letra cursiva se destaca el mutante sobre el cual se realizó la mutagénesis:

Mutante	Secuencia (5'→3')
<i>K340A-K341A</i>	CTACGGA <u>ACTTCCGCCG</u> CCACTGAGCGAGAGC
<i>K340A-R344A</i>	CCG <u>CCAAGACTGAGGCAGAGCTACTAGAGG</u>
<i>K368A-K369A</i>	GACTTGGATCTGG <u>CCGCC</u> CCCCATCTACCAGAAG

## 4.6 Anticuerpos primarios utilizados

En nuestro trabajo hemos utilizado los siguientes anticuerpos primarios:

Nombre	Descripción	Dilución (v/v)	Referencia
Suero anti-MAT I/III	Suero de conejo específico frente a la MAT $\alpha$ 1 de rata	1: 20 000 (WB)* 1: 1 000 (IF)**	Mingorance <i>et al.</i> (1996)
Suero pre-inmune	Suero obtenido del mismo conejo antes de su inmunización para obtener el suero anti-MAT I/III	1: 20 000 (WB) 1: 1 000 (IF)	
anti-FLAG	Anticuerpo monoclonal (clon M2) que reconoce el epítipo FLAG (DYKDDDDK)	1: 5 000 (WB) 1: 1 000 (IF) 40 $\mu$ l resina (IP)***	Sigma
anti-Tubulina $\alpha$	Anticuerpo monoclonal (clon DM1A) que reconoce la Tubulina $\alpha$ , utilizada como marcador específico de la fracción citosólica	1: 10 000 (WB)	
anti-GFP	Anticuerpo monoclonal (clon JL-8) que reconoce a EGFP	1: 1 000 (WB)	BD Biosciences
Suero anti-GFP	Suero de conejo específico frente a EGFP	1: 2 000 (WB)	
anti-SC35	Anticuerpo monoclonal (clon $\alpha$ SC35) que reconoce al factor de <i>splicing</i> SC35, utilizado como marcador específico de los <i>speckles</i> nucleares	1: 1 000 (IF)	

Nombre	Descripción	Dilución (v/v)	Referencia
anti-TBP	Anticuerpo policlonal que reconoce el factor de transcripción TBP. Utilizado como marcador específico de la fracción nuclear.	1: 1 000 (IF)	Santa Cruz
anti-c-Jun	Anticuerpo policlonal contra el factor de transcripción c-Jun. Utilizado como marcador específico de la fracción nuclear	1: 1 000 (IF)	
anti-H3K4me3	Anticuerpo contra la lisina 4 trimetilada de la histona H3	1: 2 000 (WB)	Millipore
anti-H3K9me3	Anticuerpo contra la lisina 9 trimetilada de la histona H3	1: 20 000 (WB)	
anti-H3K27me3	Anticuerpo contra la lisina 27 trimetilada de la histona H3	1: 1 000 (WB)	
anti-5MC	Anticuerpo contra la 5-metil-citosina	1: 1 000 (IF)	Calbiochem

\*WB: Inmunotransferencia      \*\*Immunofluorescencia      \*\*\*Inmunoprecipitación

## 4.7 Microscopía confocal de fluorescencia

Todas las imágenes fueron obtenidas como secciones ópticas ( $\sim 0.4 \mu\text{m}$ ) en un microscopio confocal *TCS SPII* (Leica Microsystems) empleando un objetivo 63x/1.3 NA. Para la visualización de más de un fluorocromo en la misma muestra, ambos fueron excitados secuencialmente (no simultáneamente) para evitar interferencias entre canales. Los núcleos fueron teñidos usando  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Hoechst 33342 (Molecular Probes) durante 1 hora en cultivo antes de la fijación o de la observación *in vivo*. Con la ayuda del programa del equipo LCS Lite se determinó la colocalización entre las señales correspondientes al Hoechst 33342 y el resto de los fluoróforos empleados. También se utilizó este software para calcular la intensidad de la señal fluorescente correspondiente al núcleo y al citosol. Este análisis se realizó a una media de 100 células por construcción.

La observación *in vivo* se realizó en placas de 35 mm (p35) con fondo de cristal (MatTek Corporation) conteniendo el clon estable CHO Tet-On MAT-EGFP o células transitoriamente transfectadas con las construcciones realizadas en los vectores pEGFP-N1, pEGFP5X y pNLS-EGFP3X.

Para la observación indirecta o inmunofluorescencia, las células fueron sembradas en cubres de vidrio de 12 mm. Una vez transfectadas transitoriamente con las construcciones realizadas en pFLAG-CMV4 se fijaron con 2 % (v/v) de formaldehído (10 minutos), se lavaron con PBS 1X (5 minutos) y se permeabilizaron con 0.3 % (v/v) de Triton X-100 (10 minutos). A continuación se bloquearon con 10 % (v/v) de FBS en PBS 1X durante 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo correspondiente a la dilución apropiada en 0.5% (v/v) de SFB en PBS 1X durante 1 hora. Luego de realizar 3 lavados con PBS 1X se volvieron a incubar, esta vez, con el anticuerpo secundario apropiado marcado con el fluoróforo Alexa fluor 488 o Alexa fluor 543 (Molecular Probes), diluido

1:800 (v/v) en PBS 1X y por un tiempo de 45 minutos a 37 °C. Finalmente los cubres se lavaron otra vez, se secaron y se montaron en los portas de vidrio empleando el medio de montaje FluorSafe (Calbiochem). Los mismos se conservaron a 4 °C hasta su observación. En el caso de los hepatocitos se introdujo un lavado de 10 minutos con 50 mM NH<sub>4</sub>Cl después de realizar la permeabilización con el objetivo de disminuir la autofluorescencia característica de estas células, aun así fue necesario ajustar la observación restándole a la señal obtenida con el suero de conejo anti-MAT I/III aquella proveniente de la incubación con el suero pre-inmune del mismo animal. Por otra parte, para el análisis del estado de metilación de DNA, utilizando el anticuerpo anti-5-metil-citosina (anti-5MC) fue necesario someter a las células CHO-K1 una vez fijadas y permeabilizadas a un tratamiento con 4M HCl y 0.1 % (v/v) Triton X-100 durante 30 minutos.

#### **4.8 Preparación *in situ* de la matriz nuclear**

Las células cultivadas en cubres de cristal de 12 mm fueron fijadas con 2 % (v/v) de formaldehído durante 10 minutos. Una vez lavadas con PBS 1X se incubaron 15 minutos en la solución tampón CSK (10 mM Pipes pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM sacarosa) conteniendo 0.5 % (v/v) de Triton X-100. A continuación se sustituyó la solución anterior por CSK más 1% (v/v) de NP-40 y 0.5 % (p/v) de deoxicolato de sodio. Pasados 15 minutos los cubres fueron tratados con 300 mM de imidazol (en agua) durante 1 min y lavados durante 5 minutos con PBS 1X. Para la eliminación de la cromatina se realizó un tratamiento con DNAsa I libre de RNAsas (Roche) a razón de 500 U/ml en el tampón CSK durante 1 hora a 37 °C. Pasado ese tiempo se eliminó la DNAsa I y se añadió 250 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 2 minutos. A continuación, las células se trataron con 2 M de NaCl en el tampón CSK (sin sacarosa) durante 1 minuto y se añadió 3.7 % (v/v) de formaldehído durante 10 minutos con el fin de fijar la matriz nuclear. En este punto se procedió a realizar la inmunofluorescencia según se describió anteriormente.

#### **4.9 Aislamiento de RNA, RT-PCR y PCR a tiempo real**

Los tejidos pertenecientes a tres ratas adultas Wistar fueron extraídos e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. De estos se extrajo el RNA total, empleando el método del *Tri-Reagent* (Sigma). Previamente a la amplificación de las isoformas de la MAT mediante RT-PCR, el RNA fue cuantificado mediante

espectrofotometría UV y analizada su integridad mediante electroforesis. Los primers utilizados en la RT-PCR fueron: 5'-ATGGACCTGTGGATGGC-3' y 5'-TGGCCTCCAGT GTTATGT-3' para *MAT1A*, y 5'-ATGAACGGGCAGCTCAA-3' y 5'-GCGTAACCAAGG CAATG-3' para *MAT2A*. En el primer caso se obtuvo una banda de 640 nucleótidos (nt) y en el segundo otra de 508 nt. Las reacciones se realizaron utilizando el *Retrottools cDNA/DNA polymerase kit* (Biotools) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis de la expresión relativa de los diferentes mRNAs se realizó mediante PCR a tiempo real utilizando como referencia el gen 18S, como método de detección el *SYBR Green* y de cálculo el desarrollado por M.W Pfaffl (Pfaffl, 2001). El ensayo se llevó a cabo en un equipo *ABI 7900HT Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). La RT se realizó a partir de 1.25 µg de RNA utilizando el *High Capacity Archive Kit* (Applied Biosystems). Los cDNAs (10 ng) se amplificaron en triplicado utilizando el *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) con una concentración de primers de 300 nM y un volumen de reacción final de 10 µl. La secuencia de los primers utilizados para la detección de *MAT1A* fue: 5'-GCGAGAGCTACTAGAGGTTGTAA-3' y 5'-AGATCCA AGTCCCTGACAATAACAC-3'. Con cada tejido se calculó la eficiencia experimental de amplificación que se utilizó en el cálculo de su expresión relativa, esta última representó la media de los valores calculados a las muestras provenientes de tres ratas distintas. El ensayo se llevó a cabo según las condiciones detalladas por Delgado *et al.* (2008).

## **4.10 Inmunohistoquímica**

Los tejidos seleccionados pertenecientes a ratas macho adultas Wistar fueron fijados durante toda la noche en 4 % (v/v) de formalina, 4% (p/v) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 6.5% (p/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7 y embebidos en parafina. Las secciones de interés (5 µm) se les retiró la parafina, se rehidrataron y se incubaron 10 minutos en la oscuridad con 2% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol con el objetivo de eliminar la actividad peroxidasa endógena. A continuación fueron tratadas con 1mM de EDTA a 150 °C durante 45 minutos y sometidas a un lavado durante 5 minutos con el tampón de lavado (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH 7.4). Para eliminar la unión inespecífica de los anticuerpos las secciones fueron bloqueadas durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) utilizando 1% (p/v) de BSA en el tampón de lavado conteniendo 0.1 % (v/v) de Triton X-100. La incubación con el suero anti-MAT I/III o el suero pre-inmune, diluidos 1:1000 (v/v) en tampón de lavado, se realizó durante 2 horas a TA en una cámara húmeda. Una vez lavadas (2 veces durante 5 minutos) las secciones fueron incubadas por 30 minutos con un anticuerpo anti-IgG de conejo



conjugado a peroxidasa unido a un polímero de dextrano 2:1 (v/v) en tampón de lavado. Las secciones se lavaron una vez más y se revelaron con 3,3'-diaminobencidina en tampón imidazol/HCl pH 7.5 conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y teñidas con hematoxilina.

## 4.11 Preparación de los extractos celulares

Los distintos extractos celulares se prepararon utilizando un conjunto de tampones a los que se les añadió en el momento de su uso un cóctel de inhibidores proteasas (CIP) compuesto por: 2.0 µg/ml aprotinina, 1.0 µg/ml pepstatina A, 0.5 µg/ml leupeptina, 2.5 µg/ml antipaina, 1.0 mM benzamidina y 0.5 mM PMSF y 1.0 mM DTT.

### 4.11.1 Fracción soluble de *E. coli*

Se realizaron a partir de la cepa BL21 (DE3). Inicialmente se resuspendió el pellet bacteriano en 2.5 volúmenes de 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 5 mM EDTA más el CIP. El tubo conteniendo la mezcla se colocó en hielo y se sometió a un proceso de ruptura celular por sonicación (10 pulsos de 30 segundos cada uno a un valor 10 de potencia) en un equipo *Soniprep 150* (Sanyo). A continuación se centrifugó a 100 000xg durante una hora a 4 °C y el sobrenadante (fracción soluble) se utilizó en los ensayos de actividad MAT, inmunotransferencia así como para la aplicación a la columna de exclusión molecular.

### 4.11.2 Fracción citosólica y nuclear

Las fracciones citosólica (C) y nuclear (N) fueron preparadas a partir de células COS-7 (p100, ~90 % confluencia) o de hepatocitos de rata (~5 · 10<sup>5</sup>). El pellet celular fue lavado con PBS 1X y resuspendido en 400 µl del tampón A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA y CIP). Pasados 15 minutos se añadieron 50 µl de 10% (v/v) de NP-40, se agitó intensamente durante 10 segundos (vortex) e inmediatamente se centrifugó a 10 000xg durante 1 minuto. En este punto el pellet obtenido, de apariencia transparente, está constituido por núcleos intactos en su mayoría. El sobrenadante, una vez sometido a otra centrifugación (100 000xg durante 1 hora), constituyó el extracto citosólico. Para la obtención del extracto nuclear el pellet se lavó con el tampón A, a continuación se resuspendió en 50 µl de tampón C (20 mM Hepes pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA y CIP) y se dejó agitando durante una hora. Pasado este

tiempo se centrifugó 5 minutos a 10 000xg y el sobrenadante obtenido constituyó la fracción nuclear. Todo el proceso se realizó en frío.

#### **4.11.3 Fracción soluble del clon CHO-K1 MAT-EGFP Tet-On**

Se preparó utilizando ciclos de congelación/descongelación como método de ruptura. Para ello previamente el pellet celular correspondiente a una placa p100 (~90 % confluencia) se resuspendió en 300 µl de 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 300 mM sacarosa más el CIP. A continuación se efectuaron tres ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido y finalmente se obtuvo la fracción soluble por centrifugación a 100 000xg durante 1 hora a 4 °C.

#### **4.11.4 Extracto celular para el análisis del nivel de metilación de la histona H3**

Para el análisis del nivel de metilación de la histona H3 por inmunotransferencia, se prepararon los extractos a partir de las células CHO-K1. El pellet celular correspondiente a una placa de 60 mm (p60) se resuspendió en 150 µl de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 % SDS (v/v), 30 mM Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF más el CIP. Para ayudar en la resuspensión la muestra se pasó por una aguja (tamaño 27G1/2) diez veces y luego se dejó en hielo 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 100 000xg durante 1 hora a 4 °C y el sobrenadante obtenido se utilizó para el análisis.

### **4.12 Coimmunoprecipitación**

El pellet correspondiente a una p100 (~90 % confluencia) de células COS-7 previamente cotransfectadas con las proteínas FLAG-MAT y MAT-EGFP, se resuspendió en 400 µl de tampón NP-40 (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40 y CIP). Pasados 20 minutos de incubación en hielo, la mezcla se pasó 10 veces a través de una aguja (tamaño 27G1/2) para facilitar la ruptura celular. A continuación se centrifugó a 100 000xg durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante obtenido se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-FLAG. Para ello se le añadieron 40 µl de la resina *Anti-FLAG M2 Affinity Gel* (Sigma) la cual había sido previamente lavada con TBS 1X (3 veces). La mezcla se incubó durante toda la noche con agitación circular a 4 °C y a continuación la resina se volvió a lavar 3 veces con TBS 1X y se resuspendió en 30 µl de tampón muestra 2X para SDS-PAGE (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% (p/v) SDS, 20 % (v/v) glicerol, 100 mM DTT y 0.004 % de bromofenol azul). La muestra se hirvió durante 10 minutos, se

centrifugó durante 1 minuto a 10 000xg y el sobrenadante se aplicó directamente al gel SDS-PAGE para su análisis.

### **4.13 Cromatografía analítica de exclusión molecular**

Se empleó una columna *Superose 12 HR 10/30* conectada a un equipo *Advanced Protein Purification System* (Waters). Una vez equilibrada en la solución tampón 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA y 150 mM KCl, se le inyectaron 100 µl del extracto celular a una concentración de proteína total de 10 mg/ml y se eluyó con el mismo tampón a un flujo de 0.3 ml/min. Se recogieron fracciones de 210 µl que fueron usadas en los ensayos de actividad MAT y Dot Blot. Los patrones de peso molecular empleados fueron: Azul de dextrano (2000 kDa), apoferritina (443 kDa), β-amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), carbónico anhidrasa (29 kDa) y ATP (0.55 kDa)

### **4.14 Electroforesis, inmunotransferencia y Dot-Blot**

Para la electroforesis de proteínas se utilizaron geles SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Se aplicaron cantidades de muestra que oscilaron entre los 5 y 80 µg según el caso. La inmunotransferencia se realizó según Mingorance *et al.* (1996) y el Dot-Blot según Sánchez *et al.* (2003). En este último se aplicaron 20 µl de muestra en cada pocillo.

Las señales obtenidas fueron digitalizadas y la intensidad de las mismas fue calculada con la ayuda del software *ImageJ* (NIH).

### **4.15 Determinación de actividad MAT**

Se siguió el método empleado por Gil *et al.* (1997). Las concentraciones de los sustratos utilizadas fueron de 5 mM para metionina y 5 mM para [2-<sup>3</sup>H] ATP (4 Ci/mmol). Las mediciones se realizaron a una concentración de proteína total de 1 mg/ml.

### **4.16 Determinación de la concentración de proteínas**

Se empleó el kit *Bio-Rad Protein Assay I* (Bio-Rad) con la albúmina de suero bovino como patrón.

## **4.17 Modelos estructurales**

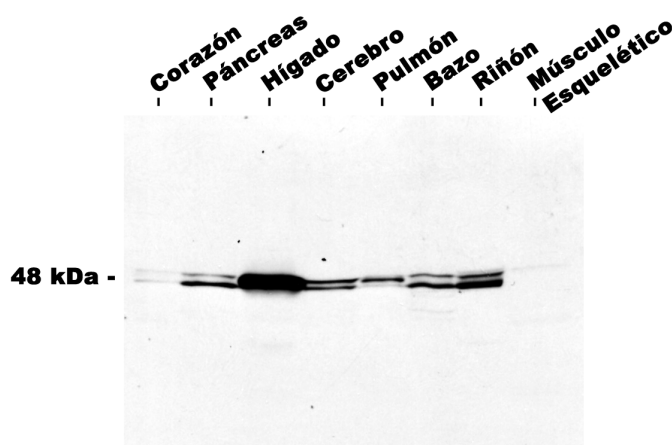
Los distintos modelos estructurales mostrados en esta memoria fueron realizados utilizando las coordenadas correspondientes a la estructura cristalina de la MAT I (PDB 1QM4) con la ayuda de los programas *Pymol* (Delano Scientific) y *SwissPdbViewer* (SIB). Este último se utilizó para la determinación de la accesibilidad de los aminoácidos al solvente así como para calcular la distancia entre los residuos de interés.

## ***5. Resultados***

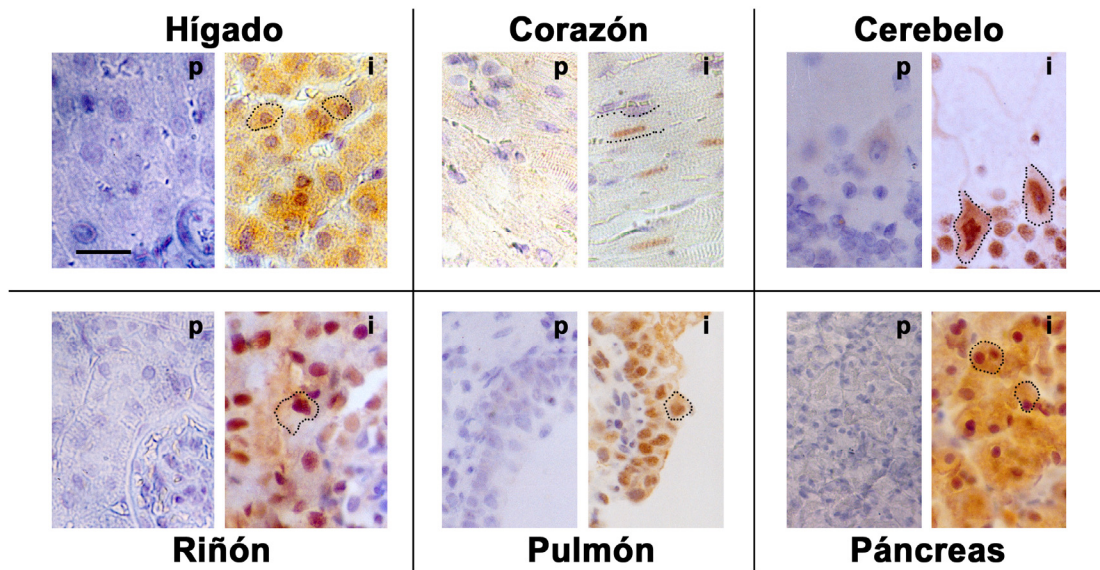


## 5.1 Distribución de MAT $\alpha$ 1 en tejidos de rata

Con el fin de verificar la distribución tisular de la denominada MAT hepática se aislaron muestras de diferentes órganos pertenecientes a ratas Wistar macho de ~200 g de peso, que fueron utilizadas para analizar su expresión a nivel de mRNA y proteína. Mediante inmunotransferencia y con la ayuda del suero anti-MAT I/III, se detectó la presencia de MAT $\alpha$ 1 en la fracción citosólica de varios tejidos (Figura 1). Se observó una mayor expresión en hígado, seguido de riñón y páncreas, mientras que el corazón y, fundamentalmente, el músculo esquelético mostraron los niveles más bajos. Llamó la atención el patrón de detección en forma de doble banda observado en la mayoría de los tejidos extrahepáticos. Este mismo anticuerpo fue utilizado en cortes de varios tejidos en un estudio inmunohistoquímico (Tabla 1 y Figura 2). Con la excepción del músculo liso, vaso sanguíneo y tejido conjuntivo, se apreció la señal de MAT $\alpha$ 1 en el resto de tejidos. En los mismos se pudo identificar el marcaje específico de varios tipos celulares, entre ellos: hepatocitos, células Purkinje, células epiteliales bronquiolares, células acinares y túbulos renales. Además, en hígado se apreció que la señal era más intensa en la zona periportal y que disminuía gradualmente hacia la zona perivenosa. Otro resultado sorprendente fue la localización claramente nuclear que observamos en todas las células donde se detectó MAT $\alpha$ 1, especialmente en los tejidos extrahepáticos en los que, en algunos casos, sólo fue detectada en este orgánulo (Tabla 1). En ningún caso se apreció señal con el suero pre-immune utilizado como control.



**Figura 1. Análisis de la expresión de MAT $\alpha$ 1 en tejidos de rata mediante inmunotransferencia.** Se muestra una inmunotransferencia representativa de las fracciones citosólicas (80  $\mu$ g de proteína total/carril) aisladas de los tejidos de rata especificados. La detección se realizó usando el suero de conejo anti-MAT I/III.



**Figura 2. Análisis de la expresión de MAT $\alpha$ 1 en tejidos de rata mediante inmunohistoquímica** Se muestran imágenes representativas del estudio inmunohistoquímico realizado en cortes de los tejidos especificados provenientes de ratas adultas. La detección se realizó usando un suero inmune (i) de conejo anti-MAT I/III de rata y como control se utilizó el suero preinmune (p) del mismo animal. Con líneas discontinuas está señalado el contorno de las células típicas de cada tejido. La escala se muestra en el panel superior izquierdo y equivale a 10  $\mu$ m.

**Tabla 1**

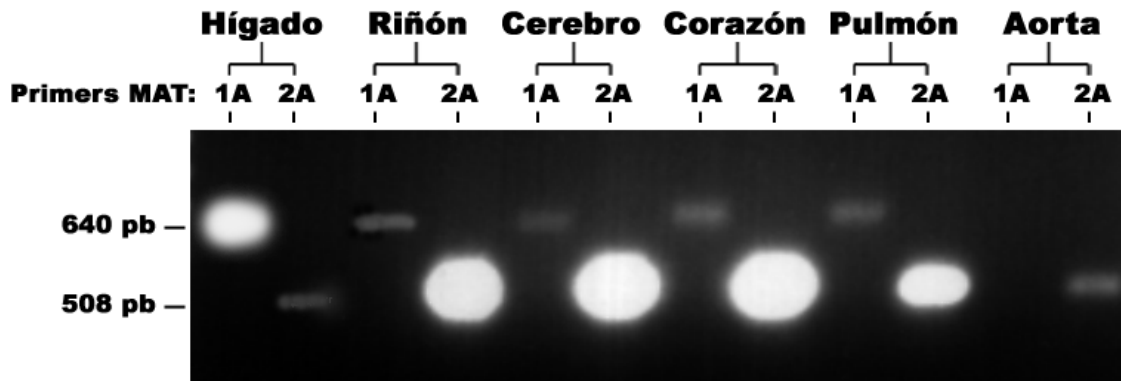
Tejido	Tipo de células	Citosol	Núcleo
Hígado	Hepatocitos	+	+
Páncreas	Células acinares	+	+
Riñón	Túbulos renales epiteliales	+	+
Pulmón	Epitelio bronquiolar	+	+
Cerebro	Células Purkinje	+	+
Epidídimo	Epitelio espermatogénico	-	+
Intestino	Mucosa	-	+
Corazón	Células musculares	-	+
Músculo esquelético	Células musculares	-	+
Vasos sanguíneos	Células endoteliales	-	-
Músculo liso	Paredes vasculares y viscerales	-	-
Tejido conjuntivo	Paredes vasculares y viscerales	-	-

**Tabla 1: Tejidos y tipos de células analizados inmunohistoquímicamente en busca de expresión MAT $\alpha$ 1.** La tabla recoge todos los tejidos de rata, así como los tipos celulares pertenecientes a los mismos, que fueron analizados para conocer la expresión de MAT $\alpha$ 1. La detección se realizó con ayuda del suero de conejo anti-MAT I/III de rata. También se indica la presencia (+) o ausencia (-) de la señal en el citosol y en el núcleo celular.

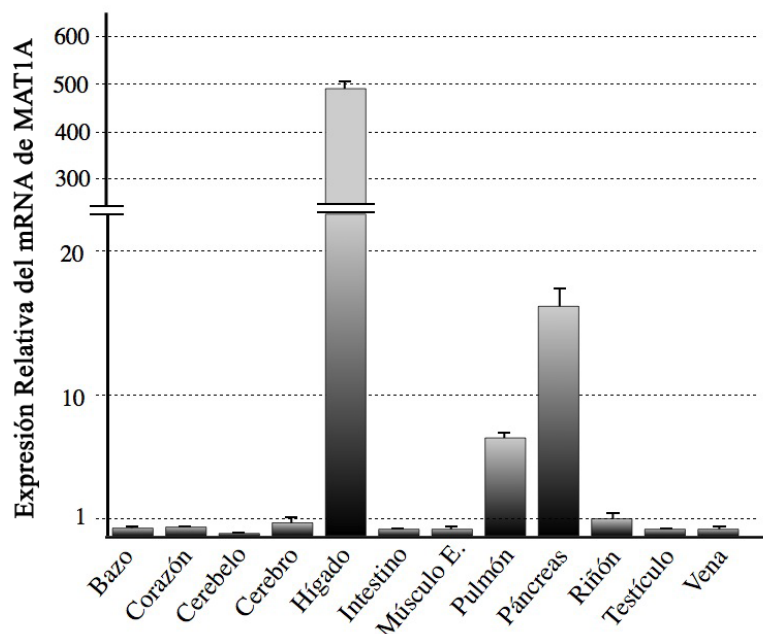
Con el fin de confirmar la amplia expresión tisular observada con MAT $\alpha$ 1 decidimos evaluar el nivel de mRNA de esta enzima. A partir de los tejidos se obtuvo el RNA total y se analizó mediante RT-PCR el producto de expresión de los genes *MAT1A* y *MAT2A* (Figura 3). Se observó expresión de MAT2A en todas las muestras (fragmento de 508 pb), aunque los niveles en hígado y aorta fueron bajos. Por su parte, MAT1A (fragmento de 640 pb) fue detectada en todos los tejidos con la excepción de la aorta,



siendo mayor la expresión en hígado. La expresión de este gen se analizó también mediante RT-PCR a tiempo real, lo que permitió realizar una comparación más precisa de los niveles de MAT1A entre los tejidos (Figura 4). Según los datos obtenidos con esta técnica, se pueden diferenciar tres grupos: uno de alta expresión, en el que está solamente el hígado; otro de expresión media, en el que se encuentran el páncreas, el pulmón y el riñón; y otro de expresión baja, en el que están el resto de tejidos.



**Figura 3** Análisis de la expresión de MAT1A y MAT2A en diferentes tejidos de rata mediante RT-PCR. Se muestran los resultados de la RT-PCR realizada a partir del RNA total aislado de los tejidos de rata indicados. La amplificación se hizo en cada caso con primers para detectar MAT1A (fragmento de 640 pb) y MAT2A (fragmento de 508 pb).

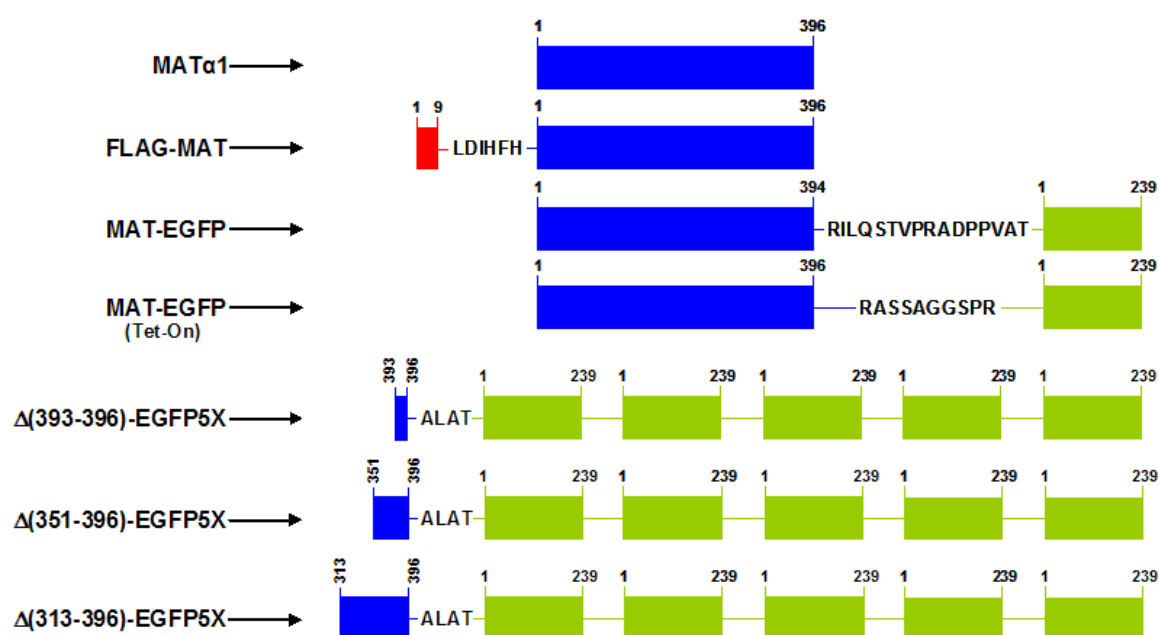


**Figura 4.** Análisis de la expresión del mRNA de MAT1A en diferentes tejidos de rata mediante RT-PCR a tiempo real. La gráfica muestra el nivel de expresión del mRNA de MAT1A según la RT-PCR a tiempo real realizada a partir del RNA total de cada uno de los tejidos especificados. Los valores están referidos a los del riñón y se corresponden a la media  $\pm$  la desviación estándar (SD) de las determinaciones realizadas a partir de tejidos obtenidos de tres ratas distintas.

## 5.1 Localización subcelular de MAT $\alpha$ 1

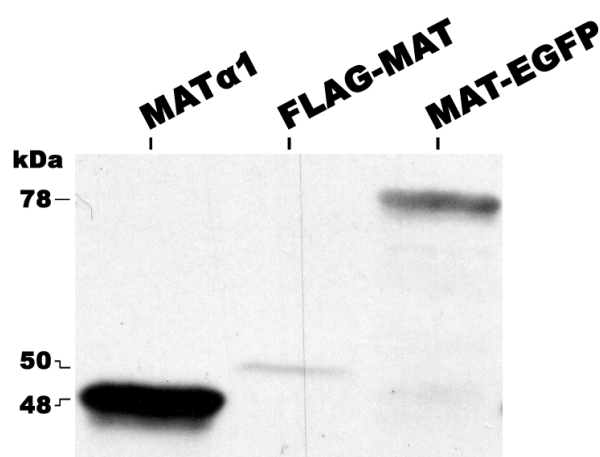
### 5.2.1 Caracterización de las proteínas de fusión a MAT $\alpha$ 1

Con el objetivo de corroborar la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1 observada por inmunohistoquímica procedimos a la sobreexpresión de la proteína en diversas líneas celulares. Para ello preparamos dos construcciones distintas: MAT-EGFP y FLAG-MAT, que permitieron la expresión de MAT $\alpha$ 1 como proteína de fusión (Figura 5). En el primer caso fusionamos al C-terminal de MAT $\alpha$ 1 la proteína fluorescente EGFP (239 aa) y en el segundo, se utilizó el péptido FLAG (9 aa) unido al N-terminal de la subunidad. Para evaluar la influencia que podrían tener en la estructura de la enzima las fusiones a EGFP y FLAG, ambas proteínas de fusión fueron caracterizadas en cuanto a su estado oligomérico y actividad biológica. Inicialmente intentamos realizar el análisis en varios tipos de líneas celulares pero los niveles de expresión y actividad obtenidos no fueron lo suficientemente elevados para hacer viable este abordaje. Así, procedimos a su estudio en bacteria donde se obtuvieron niveles adecuados de proteína soluble cuando fueron sobreexpresadas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).



**Figura 5. Construcciones utilizadas en esta memoria.** La figura muestra un esquema de las distintas construcciones realizadas así como el nombre asignado a cada una. Las regiones pertenecientes a MAT $\alpha$ 1 se representan en color azul. En rojo aparece el péptido FLAG y en verde la EGFP. En cada caso se indican las posiciones aminoacídicas de las proteínas que conforman las construcciones así como las secuencias de unión en el caso de las fusiones.

El comportamiento de ambas proteínas de fusión se comparó con el de la forma salvaje (MAT $\alpha$ 1). El análisis mediante inmunotransferencia de las fracciones solubles (Figura 6) mostró que el anticuerpo desarrollado contra MAT I/III de rata (~48 kDa) reconocía a las proteínas de fusión FLAG-MAT (~50 kDa) y MAT-EGFP (~78 kDa) y que ambas fusiones provocaban una disminución de la cantidad de la enzima, siendo más pronunciada en el caso de FLAG-MAT. A continuación determinamos la actividad MAT en cada una de dichas fracciones (Tabla 2), observándose esta en todos los casos, aunque dadas las diferencias de expresión los valores eran difícilmente comparables. Con el fin de corregir este factor, se evaluó la actividad en cada caso en función de la cantidad de proteína específica detectada por inmunotransferencia y posterior densitometrado. Así pudimos observar (Tabla 2) como ambas proteínas de fusión eran activas aunque los valores para MAT-EGFP fueron inferiores a los de MAT $\alpha$ 1 y FLAG-MAT.



**Figura 6. Expresión de MAT $\alpha$ 1 y de sus productos de fusión a FLAG y EGFP en la fracción soluble de *E. coli*.** Se muestra una inmunotransferencia representativa de los niveles de expresión de MAT $\alpha$ 1 (~48 kDa), FLAG-MAT (~50 kDa) y MAT-EGFP (~78 kDa) en las fracciones solubles de *E. coli* (10  $\mu$ g de proteína total/carril). La detección se realizó usando el suero anti-MAT I/III.

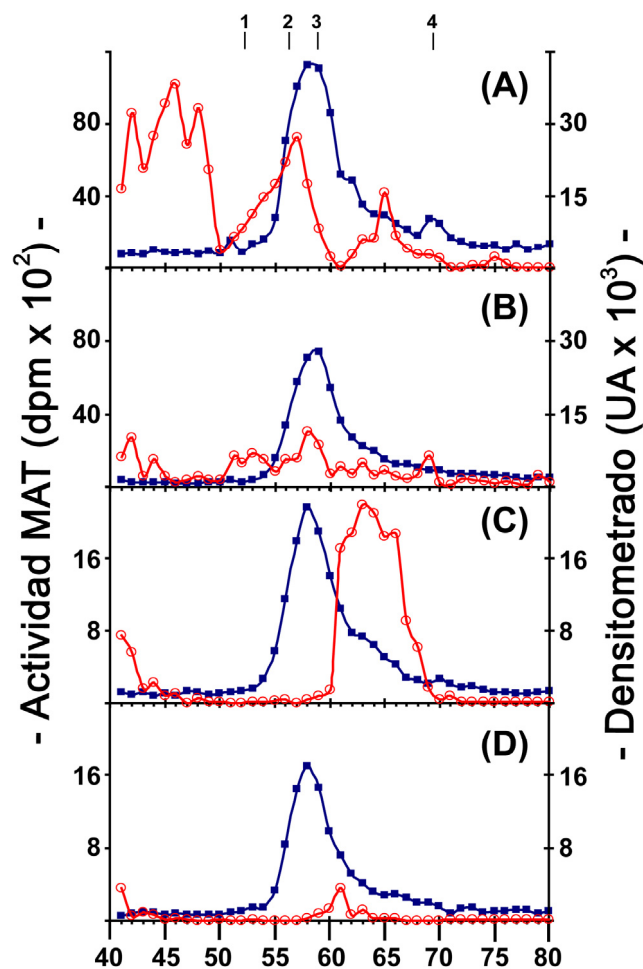
**Tabla 2**

Muestra	Actividad MAT	
	A (nmol/min·mg)	B (pmol/min·UA)
MAT $\alpha$ 1	21.80 $\pm$ 4.30	1.04 $\pm$ 0.10
FLAG-MAT	2.36 $\pm$ 0.10	2.94 $\pm$ 0.12
MAT-EGFP	1.41 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.05

**Tabla 2: Actividad MAT de la forma salvaje y de los productos de fusión en la fracción soluble de *E. coli*.** La actividad MAT está referida según la cantidad de proteína total (A), determinada por ensayo Bradford, y específica (B), estimada por el densitometrado en unidades arbitrarias (UA) de la banda correspondiente en la inmunotransferencia. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Actividad cMAT (nmol/min·mg) = 0.23  $\pm$  0.04

El estado oligomérico de MAT-EGFP y FLAG-MAT se evaluó mediante cromatografía analítica de exclusión molecular, efectuándose su detección en las fracciones eluidas tanto por actividad MAT como por Dot-Blot (Figura 7). La elución de MAT-EGFP (Figura 7A) ocurrió en un único pico de actividad cuya masa molecular

estimada fue de 180 kDa, lo que equivaldría a la forma dimérica de MAT-EGFP. Sin embargo, el perfil de proteína indicó la presencia de agregados inactivos de mayor tamaño. El pico correspondiente a MAT-EGFP dimérica coincidió con el del control (Figura 7B) donde se detectó la actividad de la MAT de la bacteria (cMAT). La comparación de ambos picos reveló un aumento de actividad cuando se expresa MAT-EGFP. En lo que respecta a FLAG-MAT (Figura 7C), la medida de actividad permitió detectar un pico, coincidente con la elución de cMAT en el control (Figura 7D), y también un hombro. Este último se corresponde con el de proteína específica detectada por el Dot-Blot, cuya masa molecular estimada fue de 98 kDa, un valor que se ajusta perfectamente con el esperado para el dímero de FLAG-MAT.

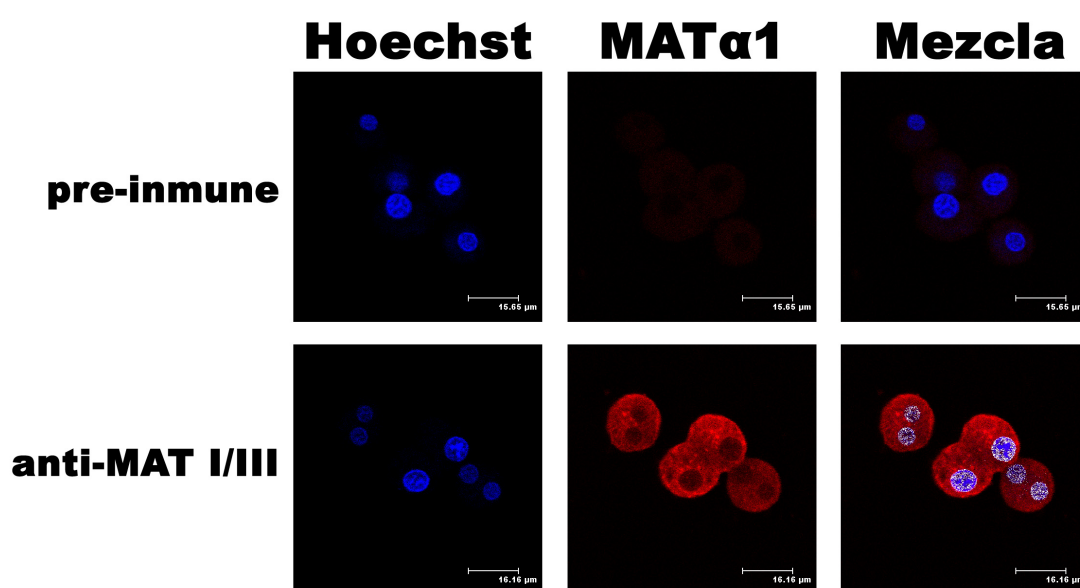


**Figura 7. Análisis del estado oligomérico de MAT-EGFP y FLAG-MAT por cromatografía de exclusión molecular.** La fracción soluble (100  $\mu$ l a 10 mg/ml de proteína total) obtenida de la bacteria *E. coli* transformada con pT7-7-MAT-EGFP (A), pT7-7 (B), pFLAG-MAT (C) o pFLAG-CMV4 (D) se aplicó a la columna de exclusión molecular. A las fracciones eluidas se les determinó la actividad MAT ( $\blacksquare$ ) y se les realizó un Dot-Blot con el suero anti-MAT I/III, cuyo desitometrado ( $\circ$ ) se utilizó para estimar la posición de la elución de MAT $\alpha$ 1. En la parte superior se indican las posiciones de los picos de los patrones de peso molecular empleados: 1- apoferritina (443 kDa), 2-  $\beta$ -amilasa (200 kDa), 3- alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y 4- carbónico anhidrasa (29 kDa).

### 5.2.2 Determinación de la localización subcelular mediante microscopía confocal de fluorescencia

Los hepatocitos son las células que presentan un mayor nivel de expresión de MAT $\alpha$ 1 (Shimizu-Saito et al., 1997). Por esa razón fueron los que inicialmente seleccionamos para estudiar la localización subcelular de esta enzima. La figura 8 muestra

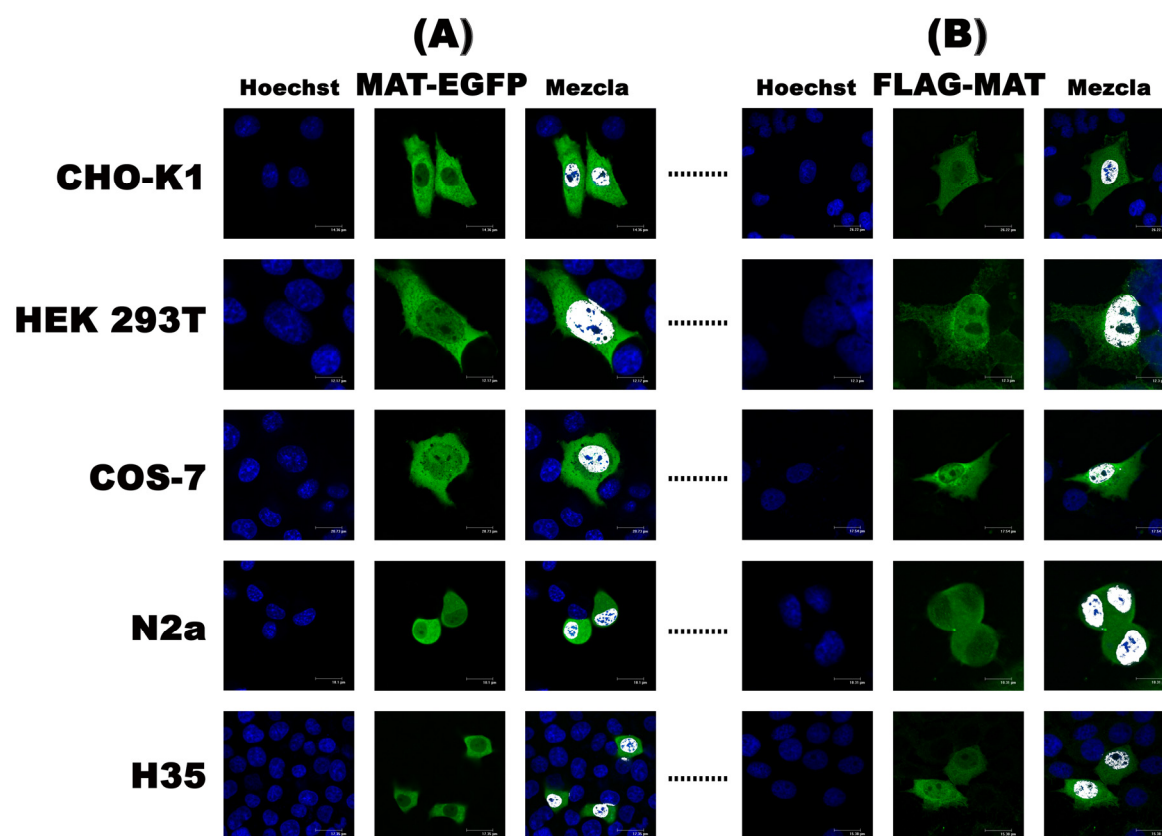
los resultados de la inmunofluorescencia realizada con hepatocitos aislados de hígado de rata. En el canal rojo se aprecia el marcaje específico de la enzima, el cual se realizó con la ayuda del suero anti-MAT I/III. En el canal azul se encuentra marcado el núcleo, en este caso utilizamos Hoechst, un colorante fluorescente que se une al DNA. Se observó que MAT $\alpha$ 1 se encuentra localizada mayoritariamente en el citoplasma aunque se pudo apreciar una señal débil en el núcleo. Con la ayuda del software del equipo se comprobó la existencia de colocalización nuclear, la cual aparece representada con una máscara blanca en la mezcla de ambos canales.



**Figura 8. Análisis de la distribución de MAT $\alpha$ 1 en hepatocitos de rata mediante microscopia confocal.** Se muestra una inmunofluorescencia representativa realizada con hepatocitos aislados de ratas adultas. La detección se realizó utilizando un suero de conejo anti-MAT I/III de rata y como control se utilizó el suero pre-inmune del mismo animal (panel central, canal rojo). Las adquisiciones en este canal se realizaron a igual nivel de ganancia del fotomultiplicador del microscopio (523V). El marcaje del núcleo se realizó con Hoechst (panel de la izquierda, canal azul). La existencia de las zonas de colocalización entre ambos canales fue determinada con la ayuda del software del equipo y se muestran en color blanco (panel de la derecha).

A continuación nos propusimos confirmar que la localización nuclear de la enzima no era un fenómeno único de los hepatocitos ni tampoco el resultado de una reacción cruzada del antisuero con otras proteínas. Para ello expresamos las proteínas de fusión MAT-EGFP y FLAG-MAT en cinco líneas celulares de orígenes diversos: CHO-K1, HEK 293T, N2a, COS-7 y H35. La utilización de MAT-EGFP (Figura 9A) nos permitió realizar la observación *in vivo*, evitando la fijación con agentes químicos que podrían llegar a alterar la distribución subcelular de las proteínas (Melan and Sluder, 1992). Por otro lado, con FLAG-MAT (Figura 9B) pudimos realizar la inmunofluorescencia empleando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo heterólogo FLAG (anti-FLAG), un péptido de

muy pequeño tamaño si se compara con la EGFP (Figura 5). Los resultados obtenidos mostraron que tanto MAT-EGFP como FLAG-MAT se encuentran mayoritariamente en el citoplasma de las cinco líneas celulares, sin embargo, en todos los casos se observó una clara colocalización con el Hoechst en el núcleo. En este compartimento se apreció una distribución homogénea de la enzima, con la excepción de los nucleolos donde no se apreció señal.

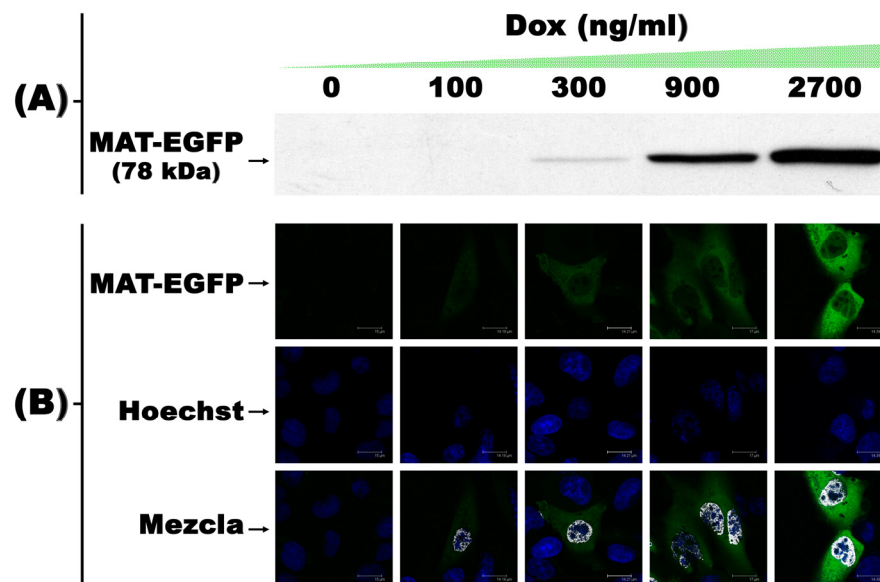


**Figura 9. Análisis de localización subcelular de las proteínas FLAG-MAT y MAT-EGFP en varias líneas celulares mediante microscopía confocal de fluorescencia.** Se muestran imágenes representativas de la expresión transitoria de MAT-EGFP (A) y FLAG-MAT (B) en las líneas celulares especificadas. La observación de MAT-EGFP se realizó *in vivo* mientras que FLAG-MAT fue detectada mediante inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-FLAG (verde). El marcaje de los núcleos se realizó con Hoechst (azul) y las zonas de colocalización con MAT-EGFP o FLAG-MAT se determinaron con el software del equipo mostrándose en color blanco en el panel resultante de la mezcla de ambos canales.

### 5.2.3 Influencia del nivel de expresión en la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1

Con el fin de comprobar si la localización nuclear de MAT $\alpha$ 1 observada en las células de la figura 9 podría deberse a un artefacto originado por un nivel muy elevado de proteína específica asociado a la transfección transitoria, decidimos poner a punto un sistema de expresión regulable de MAT $\alpha$ 1 en células que expresasen establemente esta enzima. El sistema elegido fue del tipo Tet-On mediante el cual la expresión de la proteína

de interés se activa cuando se añade doxiciclina (Dox) al medio, siendo la expresión proporcional a la concentración de este antibiótico. Se obtuvieron 3 clones estables para MAT-EGFP en la línea CHO-K1 Tet-On, sin embargo, sólo uno (CHO-K1 Tet-On MAT-EGFP) mostró una regulación efectiva según se pudo comprobar mediante la inmunotransferencia realizada a los extractos citosólicos de este clon cultivado a concentraciones crecientes de Dox. En la figura 10A se aprecia cómo la expresión de la proteína de fusión (78 kDa) aumenta con la concentración del antibiótico. Similar comportamiento se obtuvo mediante microscopía confocal de fluorescencia *in vivo* (Figura 10B). Mediante esta técnica también se observó que había señal nuclear en presencia de Dox aún a las concentraciones más bajas, lo que se demuestra por la colocalización con la señal del Hoechst en el panel Mezcla.



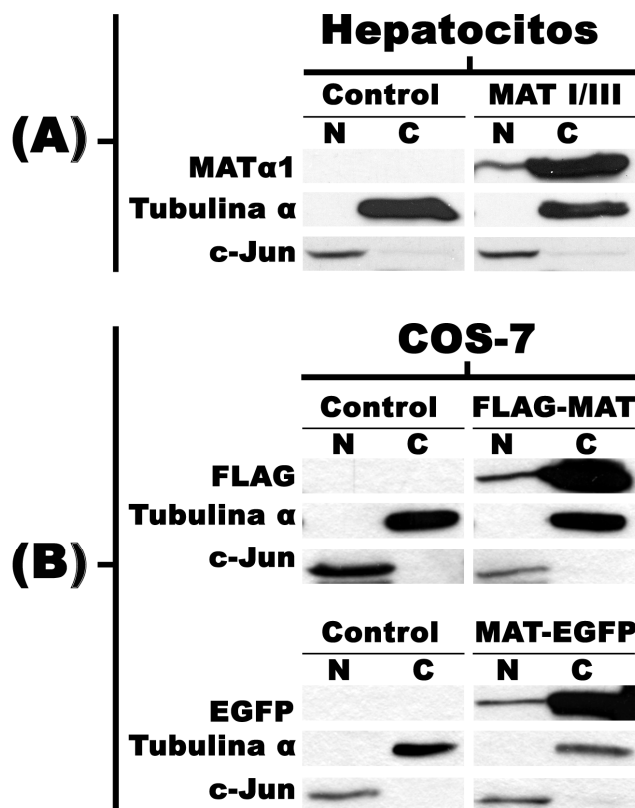
**Figura 10. Monitorización de la expresión de MAT-EGFP en el clon CHO-K1 Tet-On MAT-EGFP.** El clon estable fue cultivado durante 48 horas a las concentraciones indicadas de Dox (A) Se muestran los resultados de la inmunotransferencia realizada a partir de los extractos totales (50  $\mu$ g de proteína total por carril) obtenidos de las células cultivadas a cada concentración de Dox. El anticuerpo anti-EGFP se utilizó para la detección de MAT-EGFP (78 kDa) (B) Las células fueron observadas por microscopía confocal de fluorescencia *in vivo* para comprobar la expresión de MAT-EFP. Las imágenes fueron obtenidas en todos los casos utilizando un mismo nivel de ganancia del fotomultiplicador del microscopio (700V). El marcaje de los núcleos se realizó con Hoechst y las zonas de colocalización con MAT-EGFP se determinaron con el software del equipo, apareciendo representadas en color blanco.

#### 5.2.4 Determinación de la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1 mediante fraccionamiento celular

Como complemento al estudio microscópico nos propusimos validar los resultados obtenidos en el mismo mediante el fraccionamiento celular. A través de esta técnica



separamos la fracción nuclear (N) y citosólica (C) de hepatocitos de rata para observar la distribución de la MAT $\alpha$ 1 endógena. La figura 11A muestra los resultados del estudio realizado mediante inmunotransferencia de las fracciones. En ella se aprecia una elevada expresión de MAT $\alpha$ 1 en el citosol y, aunque en menor medida, también se pudo detectar su presencia en la fracción nuclear. La especificidad del suero anti-MAT I/III se comprobó mediante la incubación de las mismas muestras con el suero pre-inmune, sin que se apreciara señal alguna. La posible contaminación entre las fracciones C y N en el proceso de aislamiento se monitorizó mediante la detección de marcadores específicos de cada una (tubulina  $\alpha$ , para la fracción citosólica y c-Jun, para la nuclear), sin que se observase contaminación entre las mismas. Al igual que con la MAT $\alpha$ 1 endógena, se encontró una distribución similar con la MAT $\alpha$ 1 expresada heterológamente en células COS-7, según se puede apreciar en la inmunotransferencia realizada a partir de las fracciones C y N aisladas de estas células transfectadas transitoriamente con las construcciones FLAG-MAT y MAT-EGFP (Figura 11B). En este caso se utilizó la transfección con los correspondientes vectores vacíos como control del ensayo.



**Figura 11. Análisis de la distribución de MAT $\alpha$ 1 mediante fraccionamiento celular.** Se muestran tres inmunotransferencias representativas de la expresión de MAT $\alpha$ 1, FLAG-MAT y MAT-EGFP en las fracciones nucleares (N) y citosólicas (C) de las células especificadas. La pureza de las fracciones se analizó mediante la detección de los marcadores específicos Tubulina  $\alpha$  (C) y cJun (N) con los anticuerpos correspondientes (A) La MAT $\alpha$ 1 endógena de los hepatocitos de rata fue detectada en cada fracción (40  $\mu$ g de proteína total por carril) usando el suero de conejo anti-MAT I/III de rata y como control se utilizó la detección con un suero pre-inmune del mismo animal. (B) Tanto FLAG-MAT como MAT-EGFP fueron expresadas transitoriamente en COS-7 y su detección en ambas fracciones (80  $\mu$ g de proteína total por carril) se realizó utilizando los anticuerpos anti-FLAG y anti-EGFP, respectivamente. Como controles negativos se utilizaron células transfectadas con los correspondientes vectores vacíos (pFLAG-CMV4 y pEGFP-N1).



## 5.3 Identificación y localización de señales que determinan la distribución subcelular de MAT $\alpha$ 1

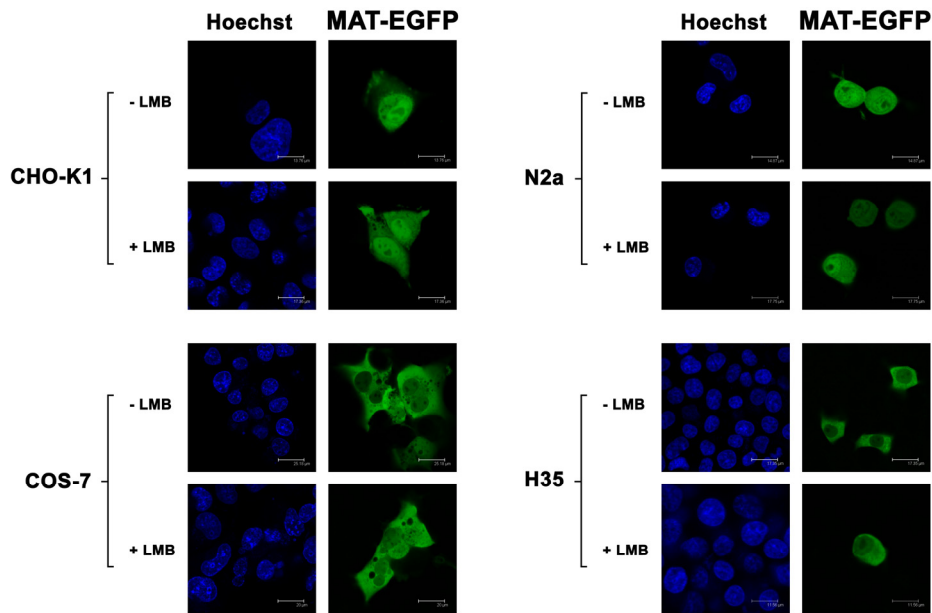
### 5.3.1 Estudio de la secuencia primaria de MAT $\alpha$ 1 en busca de NLS y NES

Las masas moleculares estimadas por cromatografía de exclusión molecular para las forma dimérica y tetramérica en las que se organiza MAT $\alpha$ 1 son de ~200 kDa (MAT I) y ~110 kDa (MAT III), respectivamente. Teniendo en cuenta que la mayoría de los estudios sitúan en un rango de 40 kDa a 60 kDa el tamaño máximo que debe tener una molécula para que pueda atravesar el poro nuclear por simple difusión (Miller et al., 1991; Keminer and Peters, 1999), ambos oligómeros necesitarían de un mecanismo de transporte activo. Aún suponiendo que la forma monomérica pueda existir de forma natural, su masa molecular teórica de 43.6 kDa estaría en el límite del rango y su plegamiento no podría ser igual al que presenta en el oligómero. Por esa razón nos dimos a la tarea de buscar posibles señales implicadas en la localización subcelular de esta enzima mediante el análisis de su secuencia primaria con tres programas de predicción de señales del transporte nuclear: PSORT II (Nakai and Horton, 1999), PredictNLS (Cokol et al., 2000), y NetNES (la Cour et al., 2004).

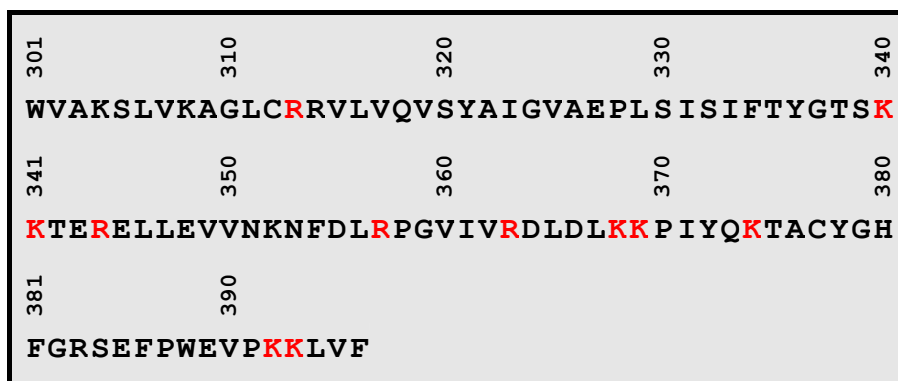
El programa NetNES detectó una posible NES (VIVRDLDL) en la región comprendida entre los residuos 360-367, sin embargo los valores de confianza para esta señal estaban por debajo del umbral. De hecho, el tratamiento con leptomicina B (LMB), un inhibidor de la vía CRM1, a las líneas celulares CHO-K1, transfectadas con MAT-EGFP no alteró la distribución subcelular observada de MAT1 $\alpha$ , lo que indica que el mecanismo de exportación nuclear que utiliza la enzima es independiente de esta vía (Figura 12). Por otra parte, los programas PSORT II y PredictNLS mostraron la ausencia de NLS de tipo clásico en MAT $\alpha$ 1, apuntando a la presencia de señales no convencionales o a otro mecanismo de transporte. Teniendo en cuenta que la mayoría de las NLS conocidas hasta la fecha son ricas en aminoácidos básicos expuestos en la superficie de la molécula, decidimos buscar este tipo de residuos en nuestra enzima.

La subunidad MAT $\alpha$ 1 contiene un elevado número de lisinas (K) y argininas (R) en el extremo C-terminal, muchos de ellos pareados, que en total representan el 16.7 % de los últimos 96 aminoácidos (Figura 13). Esto significa que en esa región se concentran prácticamente el doble de los residuos básicos que en el resto de la proteína. Tomando como referencia las coordenadas de la estructura cristalina de MAT I (pdb 1QM4) y

utilizando el programa SwissPdbViewer observamos que muchos de estos residuos se encuentran accesibles al solvente (Figura 13). Además, se sabe que esta zona no se encuentra implicada en los eventos de asociación entre los monómeros, por lo que quedaría libre para una eventual unión de algún transportador nuclear. Por estas razones decidimos estudiar la implicación que podría tener esta región del C-terminal de MAT $\alpha$ 1 en su transporte al núcleo.



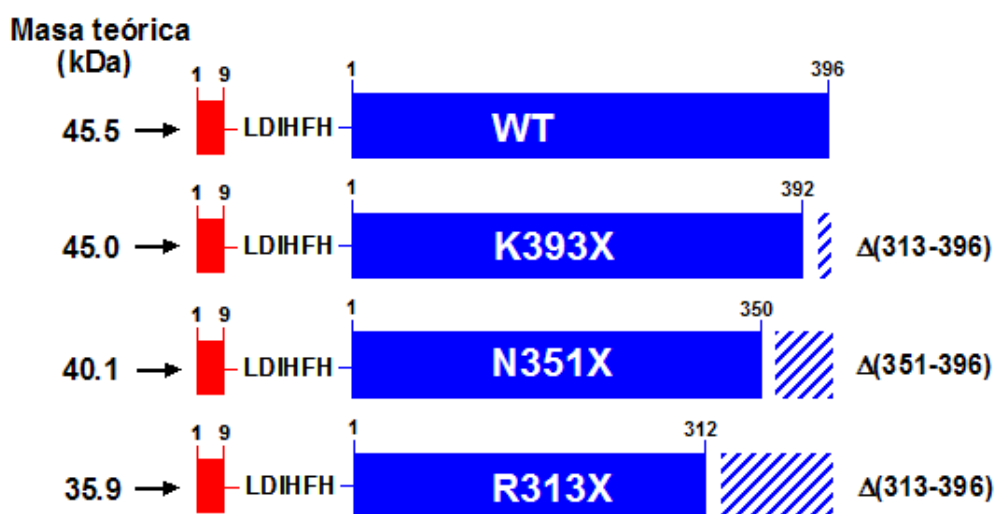
**Figura 12. Evaluación de la vía de exportación CRM1 para MAT $\alpha$ 1 mediante microscopía confocal de fluorescencia *in vivo*.** Diferentes líneas celulares transfectadas con MAT-EGFP fueron tratadas durante 6 horas con 10 ng/ml de leptomicina B (+LMB). A continuación los núcleos fueron teñidos Hoechst y se realizó la observación *in vivo*. Como control se utilizaron las mismas células sin este tratamiento (-LMB).



**Figura 13. Residuos básicos expuestos en el C-terminal de MAT $\alpha$ 1.** Se muestra la secuencia primaria de los últimos 96 residuos del C-terminal de MAT $\alpha$ 1 de rata. Se destacan en color rojo varios residuos básicos expuestos en esta región según un análisis realizado a la estructura de MAT I de rata (pdb 1QM4) con el software SwissPdbViewer.

### 5.3.2 Estudio del transporte al núcleo de MAT $\alpha$ 1 utilizando proteínas truncadas

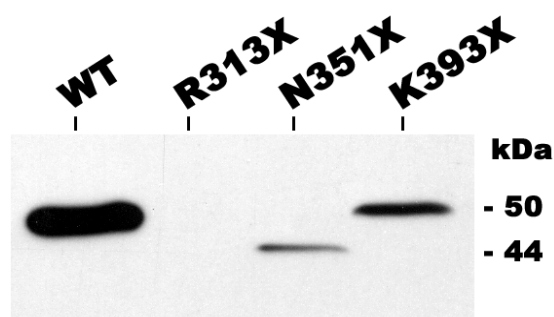
Como primera aproximación preparamos tres mutantes truncados de FLAG-MAT (Figura 14). En el primero, R313X, le fue eliminada prácticamente toda la región C-terminal de la enzima (incluyendo la mayoría de residuos básicos) mediante la sustitución de la arginina 313 por un codón de parada. El segundo, N351X, presenta el codón de parada en un residuo intermedio de esta zona (asparagina 351) y, además de servirnos para evaluar la influencia en el transporte al núcleo de la pérdida de ~50 % de esta región, es especialmente atractivo pues existen antecedentes de pacientes con hipermetioninemia y desordenes neurológicos (desmielinización) en los que se ha demostrado la presencia de una MAT $\alpha$ 1 de sólo 350 aminoácidos (Chamberlin et al., 1996). Por último, con el mutante K393X, carente de los últimos 4 aminoácidos, se quiso evaluar como influía en el transporte nuclear una alteración, en principio, mínima del C-terminal y que elimina el último par de residuos básicos.



**Figura 14. Mutantes truncados de FLAG-MAT.** En el esquema se muestran el número de residuos que conforman cada una de las construcciones, así como las masas moleculares teóricas de la proteína salvaje (WT) y de las proteínas truncadas. Estas han sido nombrada de acuerdo a la posición donde se introdujo el codón de parada: K393X, N351X y R313X. Las regiones de MAT $\alpha$ 1 expresadas como producto de fusión a FLAG (rojo) aparecen en color azul sólido mientras que con rayas azules se destacan los residuos eliminados ( $\Delta$ ). En todos los casos se muestran las secuencias de unión entre FLAG y MAT $\alpha$ 1.

La expresión en *E. coli* de estos mutantes mostró que presentaban niveles bajos en la fracción soluble en comparación con la forma salvaje (WT) y, que además, éstos disminuían en la medida que aumentaba el número de residuos eliminados del C-terminal, llegando a ser indetectable en el caso del mutante R313X (Figura 15). Igual que sucede con la MAT $\alpha$ 1 salvaje, estas proteínas aparecen con una masa molecular de ~5 kDa superior al

valor teórico. Por otra parte, los bajos niveles de expresión impidieron la detección de estos mutantes en las fracciones eluidas de la columna de exclusión molecular, imposibilitándonos conocer el estado oligomérico de cada uno mediante esta técnica. La tabla 3 muestra la actividad MAT de cada proteína en la fracción soluble, los fragmentos eliminados del C-terminal afectaron drásticamente la actividad de la enzima pues los valores obtenidos fueron del mismo orden o ligeramente superiores a los de la bacteria.



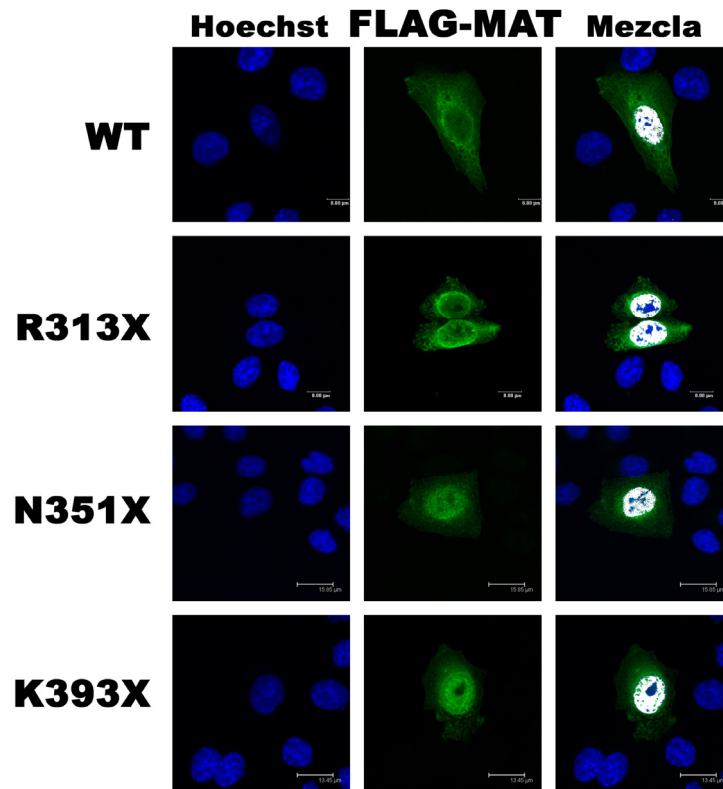
**Figura 15. Expresión de las formas truncadas de FLAG-MAT en la fracción soluble de *E. coli*.** Se muestra una inmunotransferencia representativa donde se pueden comparar los niveles de expresión en la fracción soluble de la bacteria de los mutantes truncados (R313X, N351X y K393X) con los de la forma salvaje (WT). Se aplicaron 60  $\mu$ g de proteína total por carril y la detección se realizó usando el anti-FLAG.

**Tabla 3**

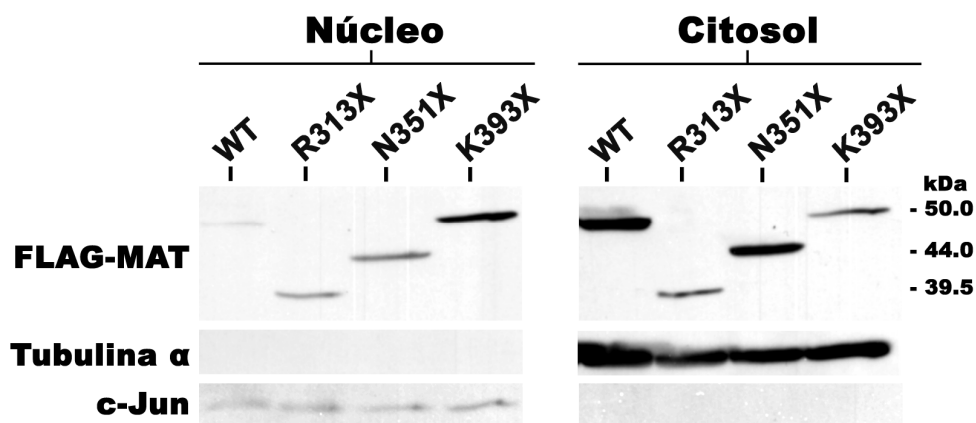
Muestra	Actividad MAT (nmol/min·mg)
WT	2.36 $\pm$ 0.10
K393X	0.86 $\pm$ 0.03
N351X	0.73 $\pm$ 0.04
R313X	0.62 $\pm$ 0.04
FLAG	0.51 $\pm$ 0.03

**Tabla 3: Actividad MAT de las formas truncadas de FLAG-MAT en la fracción soluble de *E. coli*.** Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes donde se determinó la actividad MAT de la forma salvaje (WT) así como la de los mutantes truncados (K393X, N351X y R313X). La actividad cMAT endógena se determinó en la fracción soluble de la bacteria transformada con el vector vacío (FLAG). Todos los valores están referidos según la cantidad de proteína total determinada por ensayo Bradford.

Una vez caracterizados estos mutantes se procedió a estudiar su distribución subcelular. El análisis mediante inmunofluorescencia en células CHO-K1, utilizando el anticuerpo anti-FLAG mostró que los tres presentaban una acumulación nuclear (Figura 16 y Tabla 4). Posteriormente estos patrones de localización se confirmaron mediante la inmunotransferencia de las fracciones C y N preparadas a partir de células COS-7 transitoriamente transfectadas con estas construcciones. Según se puede apreciar en la figura 17 y en la tabla 5, la señal de los mutantes truncados respecto al WT muestra un aumento en el núcleo y una disminución en el citosol.



**Figura 16. Localización subcelular de las formas truncadas de FLAG-MAT en células CHO-K1 mediante microscopía confocal de fluorescencia.** Se muestran imágenes representativas de la expresión transitoria de la forma salvaje (WT) así como la de los mutantes truncados (R313X, N351X y K393X). La detección se realizó con el anticuerpo anti-FLAG. El marcaje de los núcleos se realizó con Hoechst y las zonas de colocalización se determinaron con el software del equipo (LCS Lite), mostrándose en color blanco.



**Figura 17. Fraccionamiento celular de las formas truncadas de FLAG-MAT.** Se muestra una inmunotransferencia representativa (70  $\mu$ g/carril) de las fracciones nucleares y citosólicas aisladas de células COS-7 transitoriamente transfectadas con FLAG-MAT salvaje (WT) y sus formas truncadas (R313X, N351X y K393X). La detección se realizó utilizando en anticuerpo anti-FLAG. Como marcador de las fracciones se utilizó TBP (núcleo) y Tubulina  $\alpha$  (citosol).

Tabla 4

Construcción	N/C	Localización preferente	%
<b><u>FLAG-MAT</u></b>			
WT	0.53 ± 0.19	Citosólica	39.0
R313X	2.09 ± 0.86	Nuclear	54.0
N351X	2.23 ± 0.90	Nuclear	62.5
K393X	2.16 ± 0.85	Nuclear	50.0
R313A	1.58 ± 0.30	Nuclear	38.0
K340A	0.49 ± 0.17	Citosólica	76.0
K341A	0.52 ± 0.17	Citosólica	57.0
R344A	0.57 ± 0.14	Citosólica	67.0
K368A	1.69 ± 0.37	Nuclear	41.0
K369A	1.88 ± 0.48	Nuclear	74.0
K392A	1.45 ± 0.18	Nuclear	57.4
K393A	0.55 ± 0.12	Citosólica	56.0
F251D	0.60 ± 0.18	Citosólica	33.3
K340A-K341A	1.33 ± 0.38	Nuclear	35.7
K340A-R344A	1.52 ± 0.41	Nuclear	41.7
K340A-K393A	1.39 ± 0.21	Nuclear	47.6
K341A-K393A	1.68 ± 0.49	Nuclear	54.5
K368A-K369A	1.82 ± 0.53	Nuclear	50.0
<b><u>MAT-EGFP</u></b>			
WT	0.44 ± 0.19	Citosólica	72.0
R313A	3.89 ± 1.23	Nuclear	100.0
K340A	0.65 ± 0.18	Citosólica	65.0
K341A	0.73 ± 0.10	Citosólica	60.0
R344A	0.64 ± 0.20	Citosólica	92.0
K368A	1.83 ± 0.44	Nuclear	83.0
K369A	2.18 ± 0.49	Nuclear	78.0
K392A	4.06 ± 1.19	Nuclear	100.0
K393A	0.28 ± 0.09	Citosólica	100.0
F251D	0.41 ± 0.07	Citosólica	66.7
<b><u>EGFP</u></b>			
WT	1.19 ± 0.16	Núcleo-Citosólica	100.0
<b><u>EGFP5X</u></b>			
WT	0.31 ± 0.13	Citosólica	89.2
Δ(313-396)-EGFP5X	0.25 ± 0.09	Citosólica	90.0
Δ(351-396)-EGFP5X	0.28 ± 0.12	Citosólica	86.0
Δ(393-396)-EGFP5X	0.34 ± 0.16	Citosólica	87.0

**Tabla 4. Clasificación de las distintas construcciones de acuerdo a la distribución estimada mediante microscopía confocal de fluorescencia.** Cada una de las construcciones especificadas fue expresada en células CHO-K1 y analizada su distribución dentro de una población mediante microscopía confocal de fluorescencia. En base a la relación entre la señal nuclear y la citosólica (N/C) las células se clasificaron dentro de tres grupos: las que presentaban localización nuclear ( $N/C > 1.2$ ), las que mostraban una localización núcleo-citosólica ( $0.8 < N/C < 1.2$ ) y aquellas con localización citosólica ( $N/C < 0.8$ ). La tabla muestra la localización predominante encontrada con cada construcción, el porcentaje de células que mostraron dicho patrón y el valor  $N/C \pm SD$ . Las intensidades del núcleo y del citosol de cada célula se determinaron con la ayuda del software del equipo (LCS lite).

Tabla 5

Mutantes FLAG-MAT	N (FLAG/TBP)	C (FLAG/Tubulina $\alpha$ )	N/C	Patrón de Localización
WT	0.62 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.32	0.66	Citosólica
R313X	2.38 $\pm$ 0.93	0.44 $\pm$ 0.07	5.38	Nuclear
N351X	2.25 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.36	2.71	Nuclear
K393X	1.70 $\pm$ 0.26	0.09 $\pm$ 0.01	18.06	Nuclear
R313A	1.24 $\pm$ 0.74	0.57 $\pm$ 0.38	2.17	Nuclear
K340A	0.59 $\pm$ 0.22	0.49 $\pm$ 0.24	1.19	Núcleo-Citosólica
K341A	0.28 $\pm$ 0.09	0.96 $\pm$ 0.03	0.29	Citosólica
R344A	0.50 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.16	0.58	Citosólica
K368A	3.57 $\pm$ 0.50	1.37 $\pm$ 0.18	2.61	Nuclear
K369A	3.46 $\pm$ 0.92	0.74 $\pm$ 0.09	4.69	Nuclear
K392A	0.48 $\pm$ 0.21	0.67 $\pm$ 0.27	0.72	Citosólica
K393A	1.38 $\pm$ 0.52	1.89 $\pm$ 0.53	0.73	Citosólica
F251D	0.33 $\pm$ 0.23	0.91 $\pm$ 0.06	0.37	Citosólica

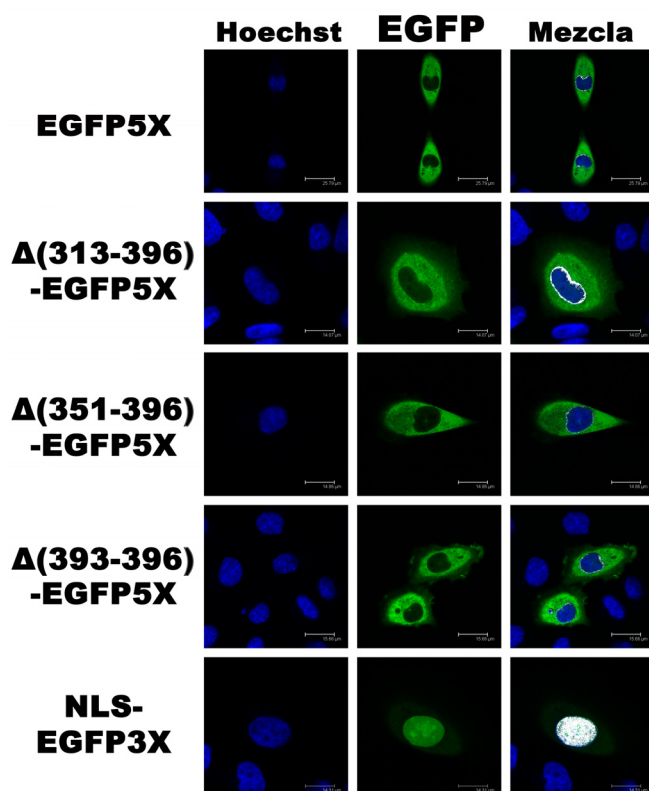
**Tabla 5. Clasificación de los mutantes FLAG-MAT de acuerdo a su nivel de expresión en las fracciones nucleares y citosólicas.** La expresión de los mutantes especificados en la fracción nuclear (N) y citosólica (C) en células COS-7 fue analizada mediante inmunotransferencia y posterior densitometrado de las bandas. Estos valores fueron utilizados para estimar los niveles de expresión de cada mutante en cada fracción. Para ello se determinó la relación entre la señal específica (FLAG) con la de su marcador correspondiente (TBP para N y Tubulina  $\alpha$  para C). En base a la relación N/C cada mutante fue clasificado como nuclear (N/C >1.2), núcleo-citosólico (0.8 < N/C < 1.2) o citosólico (N/C < 0.8). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. El densitometrado de las bandas se realizó con ayuda del software ImageJ.

### 5.3.3 Evaluación de la capacidad del C-terminal de MAT $\alpha$ 1 como NLS

Los resultados obtenidos con los mutantes truncados indicaban una posible señal de retención citoplasmática (CRS) contenida en el C-terminal de MAT $\alpha$ 1 y no una NLS, como inicialmente sospechábamos. Sin embargo, el hecho de que se mostrasen inactivos biológicamente (Tabla 3) y que no hayamos podido determinar si su capacidad de oligomerización está alterada, nos llevó a cuestionarnos hasta qué punto la acumulación nuclear observada podría deberse a la creación de una nueva NLS como resultado de un plegamiento incorrecto.

Para corroborar lo anterior decidimos utilizar una nueva aproximación experimental en la que los fragmentos del C-terminal eliminados en las versiones truncadas R313X, N351X y K393X fueron fusionados al N-terminal de una EGFP que es producida en forma pentamérica (EGFP5X, Figura 5) gracias a su clonación, en tándem de 5 repeticiones, en el vector de expresión pEGFP-N1 (Faleiro and Lazebnik, 2000). De esta forma, a través de la expresión de estas quimeras en células CHO-K1 y posterior observación mediante la microscopía confocal de fluorescencia *in vivo*, pudimos evaluar la capacidad de la región

C-terminal de MAT $\alpha$ 1 para dirigir al núcleo a una proteína de gran tamaño como la EGFP5X (~140 kDa). La figura 18 y la tabla 4 muestra los resultados obtenidos con las quimeras  $\Delta(313-396)$ -EGFP5X,  $\Delta(351-396)$ -EGFP5X y  $\Delta(313-396)$ -EGFP5X (el rango numérico representa la región aminoacídica de MAT $\alpha$ 1 fusionada a EGFP5X). Todas, mostraron el mismo patrón de localización citoplasmática de EGFP5X, siendo incapaces de funcionar como NLS. Por su parte, la construcción usada como control, una EGFP trimérica fusionada a la NLS del SV40 (NLS-EGFP3X), fue transportada eficientemente al núcleo (Figura 18).



**Figura 18. Evaluación mediante microscopía confocal de fluorescencia de la capacidad del C-terminal de MAT $\alpha$ 1 de funcionar como NLS.** Se muestran imágenes representativas de la distribución de los fragmentos fusionados a EGFP5X así como la de un control positivo (NLS-EGFP3X). La observación se realizó *in vivo* y los núcleos fueron marcados previamente con Hoechst. Las zonas de colocalización se determinaron con el software del equipo (LCS Lite) y se muestran en color blanco.

#### 5.3.4 Obtención y estudio de mutantes simples de residuos básicos del C-terminal de MAT $\alpha$ 1

Hasta el momento el estudio de la región C-terminal en relación a su posible implicación en el transporte al núcleo de la enzima, lo hemos abordado mediante la realización de cambios estructurales significativos: eliminación o extracción de fragmentos de esa región de MAT $\alpha$ 1. Este tipo de abordaje, si bien nos puede aportar datos relevantes, implica el riesgo de trabajar con nuevas moléculas de las que se nos hace muy difícil conocer hasta que punto la información que nos brindan procede de una estructura representativa de la original. Por ese motivo decidimos continuar nuestro estudio



intentando reducir el riesgo de un cambio drástico en la arquitectura de la enzima. Para ello utilizamos la mutagénesis dirigida sobre FLAG-MAT y MAT-EGFP con el objetivo de provocar cambios puntuales en algunos de los residuos expuestos y de carácter básico que encontramos en el C-terminal de MAT $\alpha$ 1. En la figura 13 se encuentran señalados en color rojo los 11 residuos seleccionados que fueron cambiados por alanina para generar los correspondientes mutantes en cada construcción (FLAG-MAT y MAT-EGFP): R313A, K340A, K341A, R344A, R357A, R363A, K368A, K369A, K374A, K392A y K393A.

#### 5.3.4.1 Estado oligomérico y actividad biológica de los mutantes simples de FLAG-MAT

Para obtener información sobre como los cambios seleccionados influían en la estructura de la MAT I/III, utilizamos los mutantes realizados en la construcción FLAG-MAT para evaluar el estado oligomérico y la actividad biológica. En el primer caso, los resultados de la cromatografía analítica de exclusión molecular mostraron que en todos se mantenía la capacidad de oligomerización, detectándose la presencia de dímeros y/o tetrámeros en cada uno de ellos (Tabla 6). Por otra parte, los valores de actividad biológica encontrados en la fracción soluble, una vez corregidos por el nivel de expresión de cada mutante mostraron que en ningún caso los cambios introducidos afectaron su capacidad de síntesis de SAM.

**Tabla 6**

Muestra	Estado oligomérico	Actividad MAT	
		A (nmol/min·mg)	B (pmol/min·UA)
WT	D	2.36 ± 0.10	2.73 ± 0.11
R313A	T	3.89 ± 0.17	2.31 ± 0.10
K340A	T + D	5.35 ± 0.22	1.80 ± 0.08
K341A	T + D	3.07 ± 0.37	2.71 ± 0.32
R344A	T + D	3.19 ± 0.09	2.49 ± 0.07
R357A	T	1.30 ± 0.09	1.95 ± 0.13
R363A	T + D	3.66 ± 0.10	4.42 ± 0.03
K368A	T + D	1.39 ± 0.09	2.36 ± 0.08
K369A	T + D	2.64 ± 0.30	3.23 ± 0.37
K374A	T + D	3.63 ± 0.47	3.55 ± 0.46
K392A	T + D	2.35 ± 0.03	3.24 ± 0.04
K393A	T + D	1.12 ± 0.03	3.35 ± 0.09

(continua en la página siguiente)

**Tabla 6** (continuación de la página anterior)

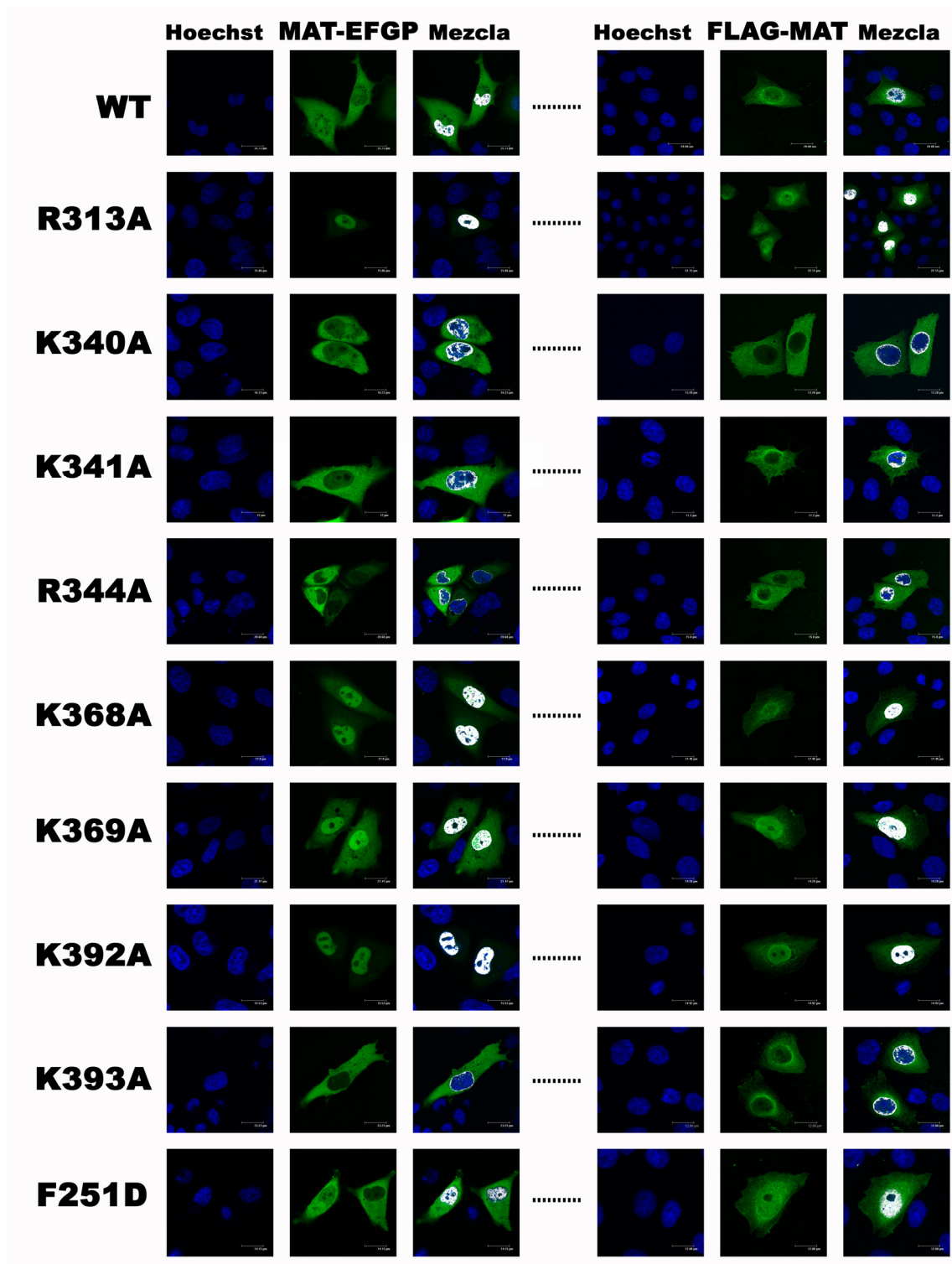
Muestra	Estado oligomérico	Actividad MAT	
		A (nmol/min·mg)	B (pmol/min·UA)
K340A-K341A	D	2,14 ± 0,13	3,20 ± 0,19
K340A-R344A	D + T	0,93 ± 0,08	5,05 ± 0,41
K340A-K393A	D	3,97 ± 0,34	1,91 ± 0,16
K341A-K393A	D + T	2,56 ± 0,06	6,89 ± 0,17
K368A-K369A	D + T	0,99 ± 0,13	3,80 ± 0,48

**Tabla 6: Estado oligomérico y actividad biológica de los mutantes simples y dobles de FLAG-MAT en la fracción soluble de *E. coli*.** El estado oligomérico fue determinado por cromatografía de exclusión molecular como tetrámero (T), dímero (D) o ambos (T + D). La columna A representa la actividad MAT referida a la cantidad de proteína total determinada por Bradford, y la columna B referida a la cantidad de proteína específica, estimada por el densitometrado de la banda correspondiente en la inmunotransferencia. La actividad en nmol/min·mg de la bacteria transformada con el vector vacío (pFLAG-CMV4) fue de 0.51 ± 0.03. Los datos representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

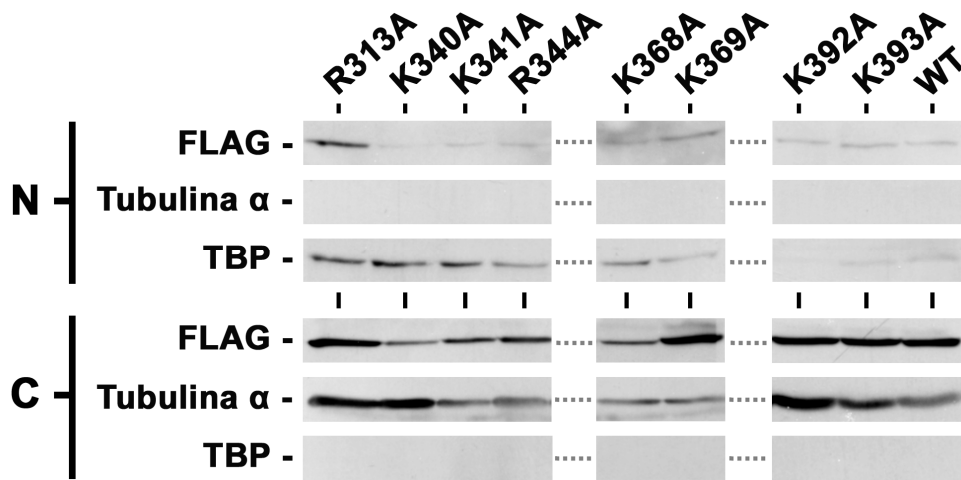
#### 5.3.4.2 Localización subcelular de los mutantes simples de MAT-EGFP y FLAG-MAT

Para visualizar como se afectaba la distribución de MAT $\alpha$ 1 utilizamos la microscopía confocal de fluorescencia *in vivo* para los mutantes MAT-EGFP y la indirecta para detectar, con la ayuda del anticuerpo anti-FLAG, los mutantes FLAG-MAT. Los resultados obtenidos con ambas construcciones mostraron un comportamiento similar con los mutantes R313A, K340A, K341A, R344A, K368A, K369A, K392A y K393A. En el caso de las sustituciones por alanina en los residuos 313, 368, 369 y 392 se observó un aumento de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo, mientras que los cambios en las posiciones 340, 341, 344 y 393 provocaron su disminución en ese orgánulo (Figura 19 y Tabla 4). Además observamos que la alteración en la localización de la enzima fue menos pronunciada cuando la observación se realizó indirectamente ya que el porcentaje de células con patrones preferentes de localización fue generalmente menor con los mutantes FLAG-MAT que con los de MAT-EGFP. Para confirmar este resultado decidimos realizar el fraccionamiento celular y analizar mediante inmunotransferencia las fracciones N y C de aquellos mutantes FLAG-MAT que habían mostrado un cambio en su patrón de localización. Los resultados obtenidos (Figura 20 y Tabla 5) concuerdan en la mayoría de los casos con los datos obtenidos en la observación microscópica. Finalmente, para saber si la localización nuclear de la enzima está condicionada a la presencia de actividad MAT evaluamos mediante inmunofluorescencia (Figura 19 y Tabla 4) e inmunotransferencia (Figura 21 y Tabla 5) la distribución del mutante inactivo F251D. Los resultados

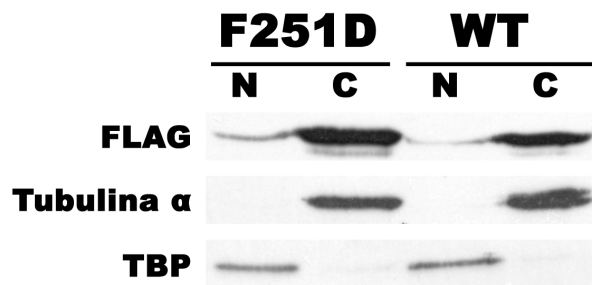
mostraron que se encuentra localizado tanto en el núcleo como en el citosol, en un patrón similar al mostrado por la proteína salvaje (WT).



**Figura 19.** Localización subcelular de los mutantes simples de FLAG-MAT y MAT-EGFP en células CHO-K1 mediante microscopía confocal de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de la expresión transitoria de las formas salvajes (WT) de FLAG-MAT y MAT-EGFP, así como la de sus correspondientes mutantes simples. La observación de MAT-EGFP se realizó *in vivo* mientras que FLAG-MAT fue detectada mediante inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-FLAG. El marcaje de los núcleos se realizó con Hoechst y las zonas de colocalización con MAT-EGFP o FLAG-MAT se determinaron con el software del equipo y se muestran en color blanco.



**Figura 20. Fraccionamiento celular de los mutantes simples de FLAG-MAT.** Se muestra una inmunotransferencia representativa (70  $\mu$ g/carril) de las fracciones nucleares (N) y citosólicas (C) aisladas de células COS-7 transitoriamente transfectadas con FLAG-MAT salvaje (WT) y los mutantes simples especificados. La pureza de las fracciones se analizó mediante la detección de los marcadores Tubulina  $\alpha$  (C) y TBP (N) con los anticuerpos correspondientes. Las líneas discontinuas representan la eliminación de los carriles correspondientes a los mutantes que no mostraron un comportamiento consistente (R357A, K363A, K374A)

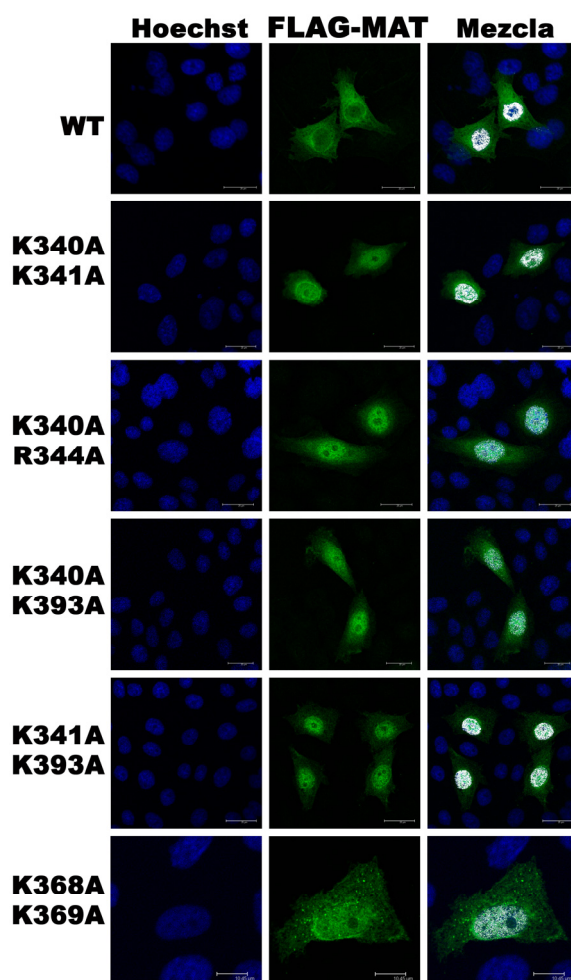


**Figura 21. Fraccionamiento celular del mutante inactivo F251D de FLAG-MAT.** Se muestra una inmunotransferencia representativa (70  $\mu$ g proteína total/carril) de las fracciones nucleares (N) y citosólicas (C) aisladas de células COS-7 transitoriamente transfectadas con FLAG-MAT salvaje (WT) y el mutante inactivo F251D. La detección se realizó utilizando el anticuerpo anti-FLAG. Como marcador de las fracciones se utilizó la detección de TBP (N) y Tubulina  $\alpha$  (C) con los anticuerpos correspondientes

### 5.3.5 Localización subcelular de mutantes dobles de FLAG-MAT

Teniendo en cuenta el diverso comportamiento presentado en su distribución núcleo/citosol por los distintos mutantes simples, decidimos comprobar si la combinación de dos de ellas podría tener un efecto aditivo. Para ello preparamos en FLAG-MAT los siguientes mutantes dobles: K340A-K341A, K340A-R344A, K340A-K393A, K341A-K393A y K368A-K369A. Los cuatro primeros para ver si la acumulación citosólica se reforzaba y el último para comprobar si se producía el mismo efecto pero en la acumulación nuclear. La expresión en la fracción soluble de *E. coli* mostró que todos estos mutantes mantenían su capacidad de oligomerización así como su actividad biológica (Tabla 6). Una vez comprobado el mantenimiento de la estructura, procedimos a analizar

su distribución subcelular mediante transfección en células CHO-K1. Contrariamente a lo esperado, la acumulación de mutaciones que favorecerían una u otra localización no resultó aditiva (Figura 22 y Tabla 4). Es más, en el caso de los mutantes que individualmente favorecen la acumulación citosólica resultó en un efecto opuesto: la acumulación nuclear.



**Figura 22. Localización subcelular de los mutantes dobles de FLAG-MAT en células CHO-K1 mediante microscopía confocal de fluorescencia.** Se muestran imágenes representativas de la expresión transitoria de la forma salvaje (WT) de FLAG-MAT, así como la de sus correspondientes mutantes dobles. La detección se realizó indirectamente usando el anticuerpo anti-FLAG. El marcaje de los núcleos se realizó con Hoechst y las zonas de colocalización con MAT-EGFP o FLAG-MAT se determinaron con el software del equipo y se muestran en color blanco.

## 5.4 Estudio de la función de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo

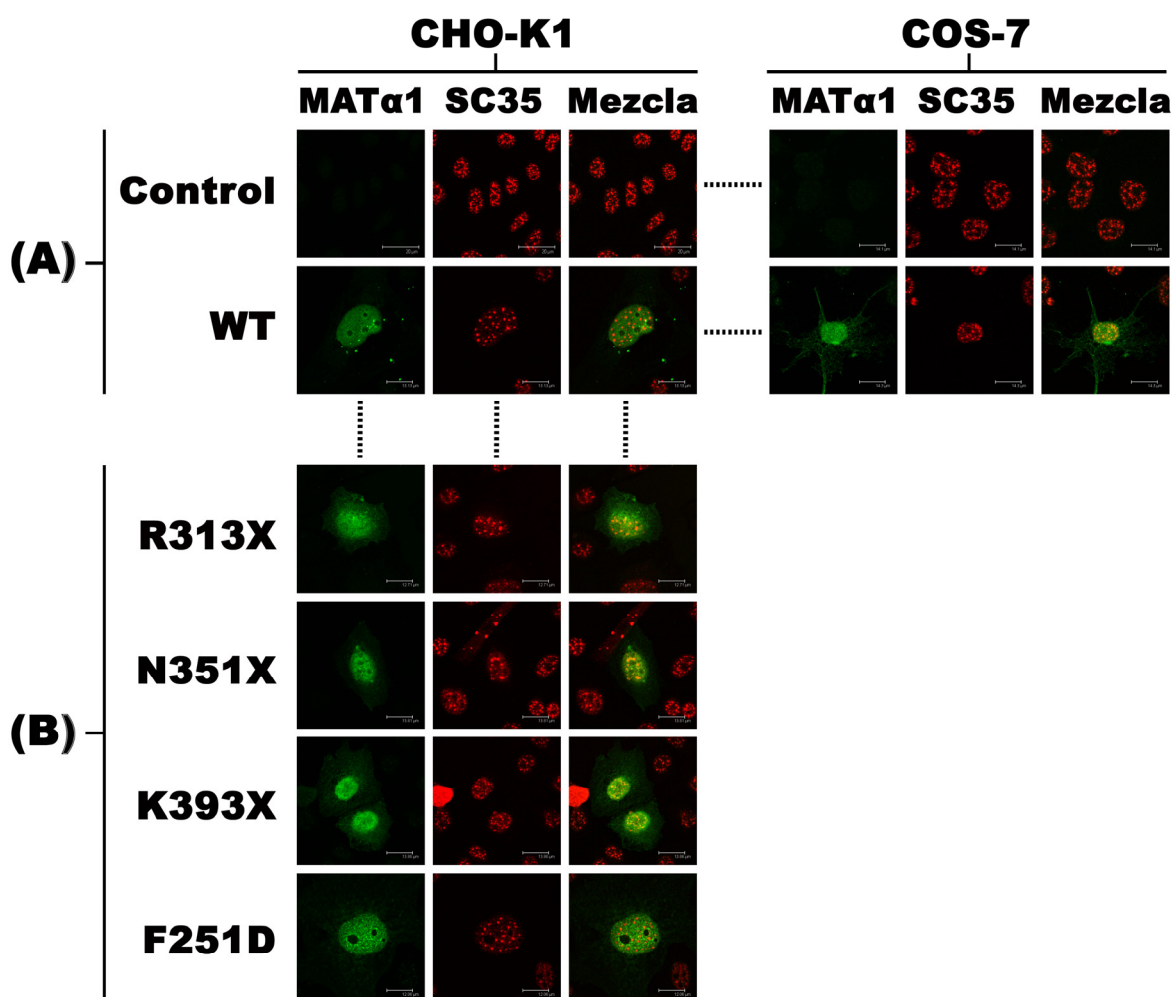
La inesperada presencia de la MAT $\alpha$ 1 en el núcleo plantea interrogantes acerca de su función en dicho compartimento. Con el fin de aclarar este punto procedimos a evaluar la actividad enzimática y el estado oligomérico de la enzima en el interior del núcleo, así como su presencia en la matriz nuclear.

#### 5.4.1 Localización de MAT $\alpha$ 1 en la matriz nuclear y en los *speckles*

Desde un punto de vista experimental la matriz nuclear se considera como el núcleo desprovisto de la cromatina y de sus proteínas asociadas. En ella ocurren importantes procesos nucleares como pueden ser la replicación, la transcripción y el *splicing*. Por ello, conocer si MAT $\alpha$ 1 está presente en esa estructura puede ser un dato valioso para los estudios de su función nuclear. Nosotros hemos llevado a cabo la preparación *in situ* de la matriz nuclear mediante un procedimiento que consistió en someter a las células CHO-K1 y COS-7, previamente transfectadas con FLAG-MAT y fijadas con formaldehído, a un procedimiento agresivo de extracción con sales y detergentes y posterior digestión con DNAsa. La inmunofluorescencia realizada sobre estas células, usando el anticuerpo anti-FLAG, nos reveló la presencia de MAT $\alpha$ 1 asociada a la matriz nuclear, donde se distribuye homogéneamente (Figura 23A). También, observamos una clara colocalización de la enzima con el factor de *splicing* SC35, un marcador específico de los *speckles* nucleares (Figura 23A). Por último, para conocer si el C-terminal de la enzima o su actividad biológica influían en su localización en estas estructuras evaluamos la presencia de las versiones truncadas de FLAG-MAT: R313X, N351X y K393X así como la del mutante inactivo F251D en células de CHO-K1, observándose en todos los casos la presencia en la matriz nuclear y la colocalización con los *speckles* (Figura 23B).

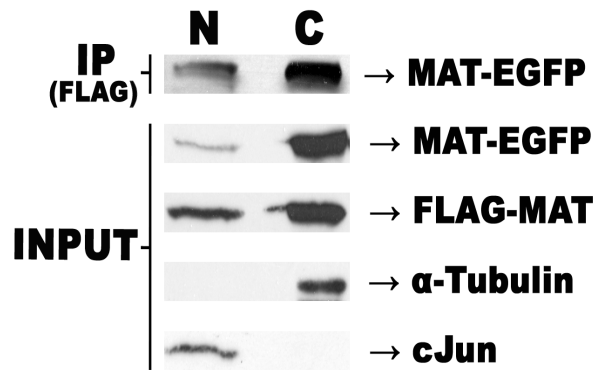
#### 5.4.2 Determinación del estado oligomérico de la MAT $\alpha$ 1 nuclear

Teniendo en cuenta que la actividad biológica de MAT $\alpha$ 1 está condicionada a la formación de dímeros o tetrámeros, decidimos evaluar primero si la capacidad de oligomerización se preservaba en el interior del núcleo. En un primer intento decidimos utilizar la fracción nuclear, aislada de células transfectadas con MAT $\alpha$ 1, para su análisis por cromatografía de exclusión molecular. Sin embargo, los bajos niveles de expresión de MAT $\alpha$ 1 en dicha fracción hicieron inviable este acercamiento. Ante esta limitación nos planteamos evaluar esta variable utilizando otro método. Para ello se diseñó un ensayo en el cual se cotransfectaron transitoriamente células COS-7 con las construcciones MAT-EGFP y FLAG-MAT. Pasadas 24 horas de cultivo, las fracciones nuclear y citosólica fueron aisladas. Mediante inmunotransferencia se verificó la coexpresión de MAT-EGFP y FLAG-MAT dichas fracciones, no observándose contaminación cruzada entre las mismas



**Figura 23. Localización de MAT $\alpha$ 1 en la matriz nuclear y en los *speckles* mediante microscopía confocal de fluorescencia.** Las células transfectadas con las construcciones FLAG-MAT fueron sometidas a un proceso de preparación *in situ* de la matriz nuclear. Posteriormente se realizó la detección utilizando los anticuerpos anti-FLAG (canal verde) y anti-SC35 (canal rojo), para el marcaje específico de MAT $\alpha$ 1 y de los *speckles* nucleares, respectivamente. La colocalización entre ambos canales se aprecia en color naranja en el panel Mezcla. Como control se utilizó la transfección con el vector vacío (pFLAG). **(A)** Localización de FLAG-MAT (WT) en células CHO-K1 y COS-7. **(B)** Localización de los mutantes R313X, N351X, K393X y F251D en células CHO-K1.

según el análisis realizado con los marcadores de citosol y de núcleo (Figura 24, INPUT). A continuación se inmunoprecipitaron las fracciones empleando el anticuerpo anti-FLAG. La detección de la EGFP en el inmunoprecipitado, utilizando un suero de conejo anti-EGFP, reveló la existencia de heteroligómeros (formados por ambas proteínas de fusión) en las dos fracciones (Figura 24, IP). Este resultado indica que, al igual que en el citosol, en el interior del núcleo existen, al menos, dímeros de MAT $\alpha$ 1 por lo que la capacidad de síntesis de SAM en este compartimento no puede ser descartada.

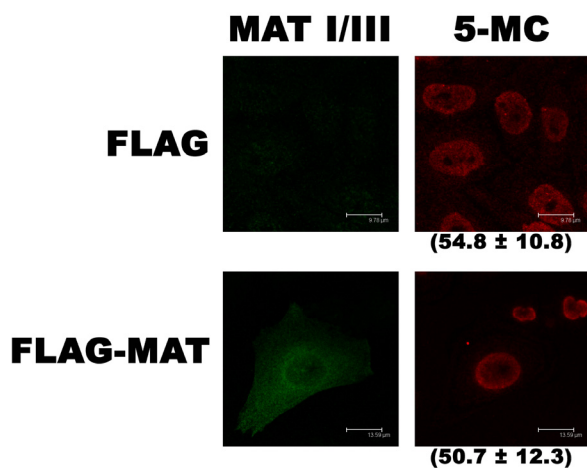


**Figura 24. Coimmunoprecipitación de MAT-EGFP con FLAG-MAT en las fracciones nuclear y citosólica de células COS-7.** Se muestra una inmunotransferencia representativa de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FLAG de la fracción nuclear (N) y citosólica (C) preparadas a partir de células COS-7 que coexpresaban transitoriamente las proteínas FLAG-MAT y MAT-EGFP. Los inmunoprecipitados (IP) fueron detectados con un suero de conejo anti-EGFP. El marcaje de MAT-EGFP y FLAG-MAT en ambas fracciones (INPUT) se realizó con los anticuerpos de ratón anti-EGFP y anti-FLAG, respectivamente. Para identificar las fracciones y controlar la contaminación entre las mismas se utilizaron los anticuerpos anti-tubulina  $\alpha$  (C) y anti c-Jun (N).

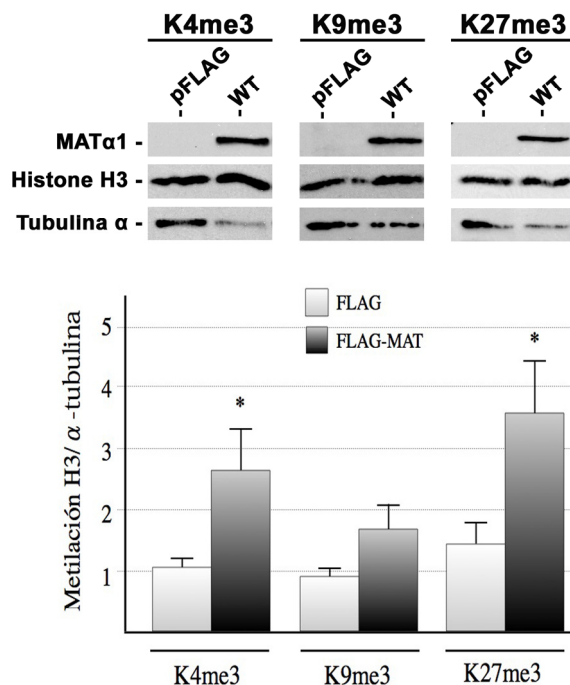
#### 5.4.3 Impacto de la presencia en el núcleo de MAT $\alpha$ 1 en las metilaciones nucleares

Además de los bajos niveles de expresión de la MAT $\alpha$ 1 nuclear, la presencia de detergentes y sales en el tampón de extracción impidieron la medición directa de actividad MAT en la fracción nuclear. Por ello, para estimar este parámetro utilizamos un método indirecto basado en la variación de la actividad de las metiltransferasas dependientes de SAM en función de la cantidad de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo. Antes de iniciar el estudio, fue necesario buscar un método de cuantificación apropiado que nos permitiera detectar las variaciones en la metilación de un determinado componente nuclear cuando aumentaba el nivel de MAT $\alpha$ 1 en la célula. Inicialmente, intentamos determinar mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-5-metilcitosina (5MC), un aumento en la metilación de DNA cuando se expresaba FLAG-MAT en células CHO-K1. Sin embargo no encontramos cambios significativos en ese parámetro (Figura 25) por lo que decidimos evaluar el comportamiento de la metilación en la histona H3, otro componente nuclear dependiente de SAM. La figura 26 muestra el resultado del estudio realizado mediante inmunotransferencia con la ayuda de anticuerpos que reconocen específicamente en H3 las lisinas K4, K9 y K27 en su forma trimetilada (K4me3, K9me3 y K27me3). La comparación con la célula transfectada con el vector vacío (pFLAG), mostró que la expresión de FLAG-MAT en células CHO-K1 provoca un aumento significativo de K4me3 y K27me3.





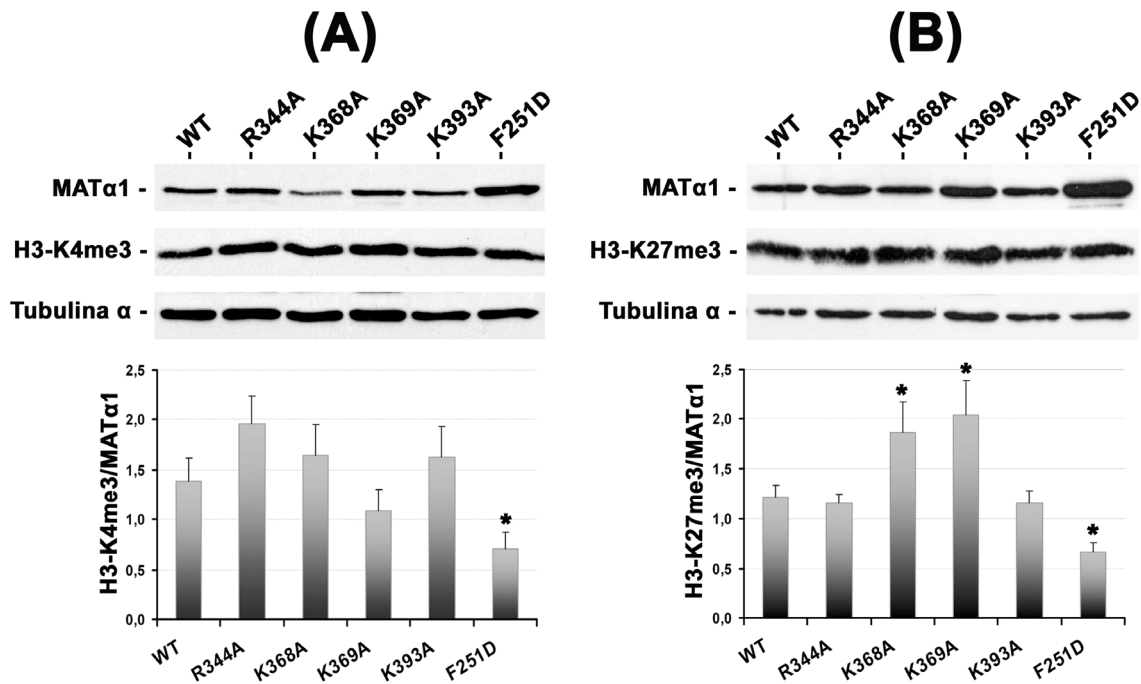
**Figura 25. Análisis del nivel de metilación del DNA por microscopía confocal de fluorescencia.** Se muestran imágenes representativas de la inmunofluorescencia realizadas a células transfectadas transitoriamente con FLAG-MAT, así como con el vector vacío pFLAG-CMV4 (FLAG). La detección de MAT $\alpha$ 1 se realizó usando el suero anti-MAT I/III (canal verde). El DNA metilado se detectó con un anticuerpo anti-5-metil-citosina (5-MC, canal rojo). Para estimar el nivel de metilación se analizó con el software del equipo la intensidad de la señal fluorescente en el canal rojo. Entre paréntesis se muestra, en unidades arbitrarias, la media de este valor  $\pm$  SD de todas las células analizadas.



**Figura 26. Efecto de la expresión de MAT $\alpha$ 1 en la trimetilación de la histona H3.** (A) Se muestran inmunotransferencias representativas en las que los extractos (10  $\mu$ g de proteína total/carril) de células CHO-K1 transfectadas con FLAG-MAT (WT) o con el vector vacío (pFLAG) fueron analizados para conocer el nivel de trimetilación de la histona H3 en las posiciones K4, K9 y K27 (K4me3, K9me3 y K27me3). Para la detección se utilizaron los anticuerpos: anti-MAT I/III, anti-Tubulina  $\alpha$  y, según el caso, anti-K4me3, anti-K9me3 o anti-K27me3. (B) La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas pertenecientes a cada una de las histonas trimetiladas corregidas a base al nivel de Tubulina  $\alpha$ . Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 7 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$

Una vez demostrado que los niveles de K4me3 y K27me3 en H3 respondían a un aumento de la actividad MAT celular, decidimos utilizar ambas metilaciones para conocer si también lo hacían en función de la concentración particular de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo. Para ello se comparó con FLAG-MAT (WT) el comportamiento de 5 mutantes: dos cisólicos (R344A y K393A), dos nucleares (K368A y K369A) (tablas 4 y 5), y uno inactivo (F251D), este último empleado como control negativo del ensayo. Los resultados mostraron que la eliminación de la actividad MAT en el mutante F251D producía una caída significativa de la trimetilación en ambas posiciones (hasta valores que se correspondían con los que se calcularon en estas células transfectadas con el pFLAG). El

resto de mutantes mostraron valores similares al del WT tanto para K4me3 como para K27me3. Sin embargo, la trimetilación en K27 presentó un aumento de ~2 veces cuando se expresaban los mutantes K368A y K369A. Teniendo en cuenta que estos dos mutantes son los que presentan una mayor acumulación nuclear, este resultado indica una relación proporcional entre este factor y los niveles de K27me3.



**Figura 27. Efecto del nivel de expresión de MATα1 nuclear en la trimetilación de la histona H3 en la posiciones K4 y K27.** Se muestra una inmunotransferencia representativa así como el análisis densitométrico de 7 experimentos independientes para determinar el efecto de la expresión de los mutantes indicados en la trimetilación de la histona H3 en la posición K4 (A) y K27 (B). Los extractos (10 µg de proteína total/carril) de células CHO-K1 transfectadas con cada uno de los mutantes fueron detectados con anticuerpos anti-MAT I/III, anti-Tubulina α y anti-K27me3. Los valores de las graficas representan la media ± el error estándar del nivel de trimetilación en cada posición corregido en base al nivel de MATα1 correspondiente. \* p < 0.05

## ***6. Discusión***



## 6.1 Distribución tisular y subcelular de MAT $\alpha$ 1

Durante muchos años MAT $\alpha$ 1 fue considerada una enzima exclusivamente hepática hasta que en el año 2003 el grupo de Shelly C. Lu descubrió su expresión en páncreas mientras estudiaban el mecanismo de aparición de la pancreatitis (Lu et al., 2003). Previamente se había observado en algunos pacientes con hipermetioninemia y mutaciones en el gen *MAT1A*, una correlación entre la deficiencia en esta isoforma y el desarrollo de trastornos neurológicos como la desmielinización (Chamberlin et al., 1996). Aunque aún no se conoce la relación que pueda tener MAT $\alpha$ 1, en el desarrollo de estas enfermedades, estos hallazgos nos sirvieron para considerar un posible papel de esta enzima en tejidos extrahepáticos y que, por consiguiente, decidiéramos verificar su distribución tisular.

A la luz de los resultados de nuestro estudio, se podría ahora afirmar que MAT $\alpha$ 1 es prácticamente ubicua. El análisis de su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína en tejidos de rata adulta, mostró que se expresa principalmente en hígado pero también, a niveles más bajos, en varios tejidos extrahepáticos. Teniendo en cuenta que en estos últimos la detección de este mRNA mediante *northern blot* no había sido posible (Alvarez et al., 1991), decidimos utilizar como técnica alternativa la RT-PCR, mientras que la distribución de la proteína MAT $\alpha$ 1 fue evaluada de forma indirecta (inmunotransferencia) e *in situ* (inmunohistoquímica). Un análisis comparativo más detallado de los datos obtenidos con estas técnicas muestra que en los tejidos extrahepáticos los niveles de mRNA, estimados por la PCR a tiempo real, fueron mucho menores que los del hígado. Sin embargo, esa diferencia en términos de expresión de proteína fue menor, según se observa en los resultados de la inmunotransferencia y fundamentalmente de la inmunohistoquímica. Este comportamiento dispar podría deberse a algún mecanismo de regulación postranscripcional sobre el mRNA o postraduccionales sobre su producto. En el primer caso, hasta la fecha no se han realizado ningún estudio relacionado con la estabilidad del mRNA de MAT $\alpha$ 1, pero el análisis de su secuencia 3'UTR revela la presencia de un dominio tipo ARE (secuencias ricas en UA), el principal elemento regulador del tiempo de vida media medio ( $t_{1/2}$ ) del mRNA en eucariotas (Bevilacqua et al., 2003). En el segundo caso, tampoco se ha estudiado la estabilidad *in vivo* de MAT I/III pero se sabe que determinadas modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación, hidroxilación, glicosilación, etc) pueden regular la degradación de una proteína, previa ubiquitinación, a través de la vía del proteosoma (Laney and Hochstrasser, 1999; Pickart and Eddins, 2004). En ese sentido, la presencia de una banda

adicional observada en la inmunotransferencia correspondiente a los tejidos extrahepáticos, podría corresponderse con una forma de MAT $\alpha$ 1 con algún tipo de modificación postraduccional. No obstante, no se debe descartar que pueda existir cierta reactividad cruzada con MAT $\alpha$ 2 por parte del suero anti-MAT I/III, algo que podría ocurrir en las condiciones de nuestro ensayo a pesar que previamente no se haya observado (Gil et al., 1996; Sanchez-Gongora et al., 1996). La acción de uno de estos sistemas regulatorios (o los dos a la vez) podría provocar la existencia en tejidos extrahepáticos de una forma del mRNA de MAT $\alpha$ 1 con un  $t_{1/2}$  menor o de una enzima con un  $t_{1/2}$  mayor, en comparación al que presentan en el hígado.

Al mismo tiempo, el estudio inmunohistoquímico aportó otros datos interesantes como que la distribución de MAT $\alpha$ 1 en el hígado no es homogénea, sino que se encuentra en una mayor concentración en la zona periportal en detrimento de la perivenosa, en un patrón similar al descrito con otras enzimas del ciclo de la metionina como la GNMT y la BHMT (Yeo and Wagner, 1994; Delgado-Reyes et al., 2001). Teniendo en cuenta que por la zona periportal de este órgano entra la sangre con una mayor cantidad de oxígeno y, en consecuencia, allí es más intensa la fosforilación oxidativa (Jungermann and Kietzmann, 2000), la presencia mayoritaria de MAT $\alpha$ 1 en esa región podría deberse a la necesidad de asegurar un suministro estable de ATP para la reacción de síntesis de SAM. De esta forma, la distribución de esta enzima en el hígado estaría en concordancia con la elevada capacidad de producción y utilización de este metabolito en este órgano (Mudd and Poole, 1975). Por otra parte, la detección de MAT $\alpha$ 1 en los tejidos mostró que, además de en el citosol, la misma se encontraba localizada en el núcleo de las células, principalmente en aquellas pertenecientes a los tejidos extrahepáticos, en los que en algunos casos sólo se detectó en ese compartimento.

La presencia de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo no había sido descrita con anterioridad. Dada la relevancia que podría tener este hallazgo, decidimos corroborar este resultado en varios tipos celulares que expresasen MAT $\alpha$ 1. Para ello empleamos otras dos técnicas: la microscopía confocal de fluorescencia y la inmunotransferencia de las fracciones nuclear y citosólica. Con ambos métodos detectamos MAT $\alpha$ 1 en el núcleo de hepatocitos aislados de rata adulta, la célula que presenta una mayor expresión de esta enzima (Shimizu-Saito et al., 1997), y también en varias líneas celulares de orígenes diversos previamente transfectadas con dos proteínas de fusión a MAT $\alpha$ 1 (MAT-EGFP y FLAG-MAT), lo que nos valió para confirmar que la localización nuclear era una propiedad general. Por otra parte, la utilización de MAT-EGFP y FLAG-MAT nos permitió comprobar que la

presencia de esta isoenzima en el núcleo no era un artefacto causado por las condiciones del ensayo. Con ambas pudimos realizar la detección de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo sin necesidad de utilizar el suero anti-MAT I/III, descartando una posible reactividad cruzada de éste con otra proteína. También, pudimos verificar que ni un elevado nivel de expresión, ni los procesos de fijación y permeabilización, eran los causantes de su localización nuclear. Sin embargo, el empleo de estas proteínas tenía como principal inconveniente la posibilidad de que el marcador utilizado en la fusión (FLAG o EGFP) pudiera llegar a alterar la estructura y por consiguiente la función biológica de MAT $\alpha$ 1, lo cual podría resultar en una distribución anormal dentro de la célula. Por ello, para asegurarnos que la localización subcelular de las mismas se correspondía con la de MAT $\alpha$ 1 y que era independiente del tipo de marcador y de la forma en que estaba fusionado (al C-terminal o N-terminal de MAT $\alpha$ 1), decidimos comprobar hasta qué punto se afectó el estado oligomérico y la actividad de la enzima por estas uniones. Debido a los bajos niveles de expresión y actividad MAT obtenidos en las líneas celulares transfectadas con ambas proteínas de fusión, decidimos realizar este estudio en *E. coli*. El análisis mediante la cromatografía de exclusión molecular reveló que tanto MAT-EGFP como FLAG-MAT se encuentran en el citosol de esta bacteria en la organización mínima que garantiza la actividad enzimática: dímeros. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se detectó la presencia del tetrámero, a diferencia de lo reportado con MAT $\alpha$ 1 (Alvarez et al., 1994). No obstante, conociendo que MAT $\alpha$ 1 se encuentra en la fracción soluble en un equilibrio dímero/tetrámero dependiente de la concentración de enzima (Mingorance et al., 1997), no es posible descartar un desplazamiento hacia la forma dimérica en el caso de MAT-EGFP y FLAG-MAT, ya que los niveles de expresión obtenidos con ambas proteínas fueron notablemente menores a los de la enzima salvaje. En cuanto a la determinación de la actividad específica en estas fracciones, se encontró una reducción importante de este parámetro en MAT-EGFP, pero el hecho de que esta construcción haya mantenido la capacidad de oligomerización de MAT $\alpha$ 1 sugiere que su plegamiento global no ha cambiado. En este caso la reducción de la actividad podría deberse a la modificación en uno de sus residuos como el que ocurre en la C121 cuando es oxidada por determinadas especies reactivas (Mato et al., 2002). Teniendo en cuenta que en la formación del cromóforo de la EGFP se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que a partir de éste se pueden producir radicales HO<sup>•</sup> a través de la reacción de Fenton, es probable que en *E. coli* (donde se sabe que ocurre esta reacción) estos radicales provoquen la hidroxilación de la C121 en MAT $\alpha$ 1 y, por tanto, la inactivación enzimática (Starke and Farber, 1985; Imlay and Linn, 1988; Cubitt et al., 1995). Este mecanismo ha sido

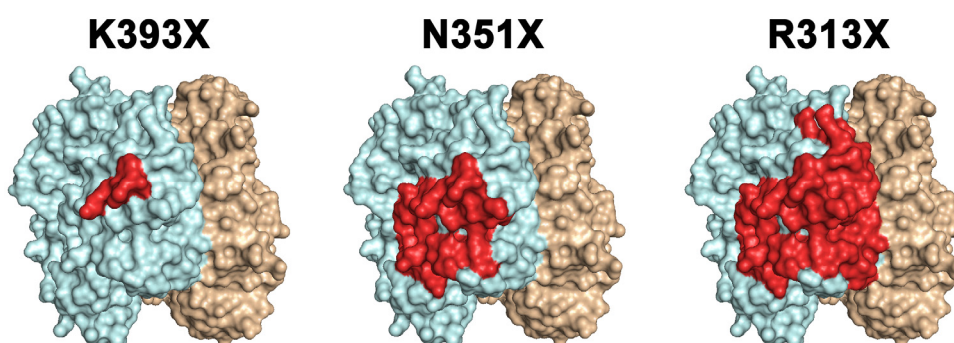
demostrado en células CHO-K1 establemente transfectadas con MAT $\alpha$ 1 cuando fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sanchez-Gongora et al., 1997), por lo que la baja actividad observada con MAT-EGFP podría ser la consecuencia del mismo y no de un plegamiento incorrecto de la enzima. De esta forma, los datos obtenidos de la caracterización de FLAG-MAT y MAT-EGFP indican que ambas construcciones son dímeros con una masa molecular superior a la permitida para que puedan atravesar el poro nuclear por simple difusión y, además, estructuralmente válidas para el estudio de la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1, por lo que creemos que esta isoenzima no debería seguir considerándose como únicamente citosólica.

## **6.2 Estudio del C-terminal de MAT $\alpha$ 1 y su implicación en su distribución subcelular**

El análisis de la secuencia de MAT $\alpha$ 1 utilizando programas de predicción de NLS de tipo clásico mostró la ausencia de este tipo de señales, lo que indica que su transporte nuclear podría producirse por un mecanismo menos conocido, aunque no se puede excluir la posibilidad de la existencia de una señal conformacional que esté mimetizando a una clásica. Aunque las posibilidades de un transporte alternativo al clásico son muy amplias (Christophe et al., 2000), la presencia de aminoácidos de carácter básico en las NLS descritas hasta la fecha es una propiedad bastante común. El elevado número de residuos de este tipo entre los 96 últimos del ORF de MAT $\alpha$ 1 y el hecho de que esta zona del C-terminal no esté implicada en la asociación entre monómeros, nos llevó estudiar su importancia en la distribución subcelular de esta enzima. La utilización de tres formas truncadas de MAT $\alpha$ 1: 313X, 351X y 393X, así como la fusión a EGFP5X de cada uno de los fragmentos eliminados, mostraron la posible presencia de una CRS en esa zona. Sin embargo, del análisis de los modelos estructurales de los mutantes truncados se puede inferir que la magnitud del cambio que suponen estas eliminaciones a la estructura de MAT $\alpha$ 1 es importante, fundamentalmente en el caso de R313X y N351X (Figura 28). Esta evidencia, unida al conocimiento de que en el plegamiento de la enzima participan regiones no consecutivas de su secuencia (Gonzalez et al., 2000), apunta a que es probable que la estructura de los mutantes truncados, así como la de los fragmentos eliminados, sea diferente a la que presentan en la enzima salvaje. De hecho, la pérdida de la actividad biológica de las enzimas truncadas expresadas en *E. coli* es un dato que refuerza esta hipótesis. A pesar de estas limitaciones, la información obtenida con estos mutantes sirvió para evidenciar la importancia de esta región en la localización subcelular de MAT $\alpha$ 1, pues



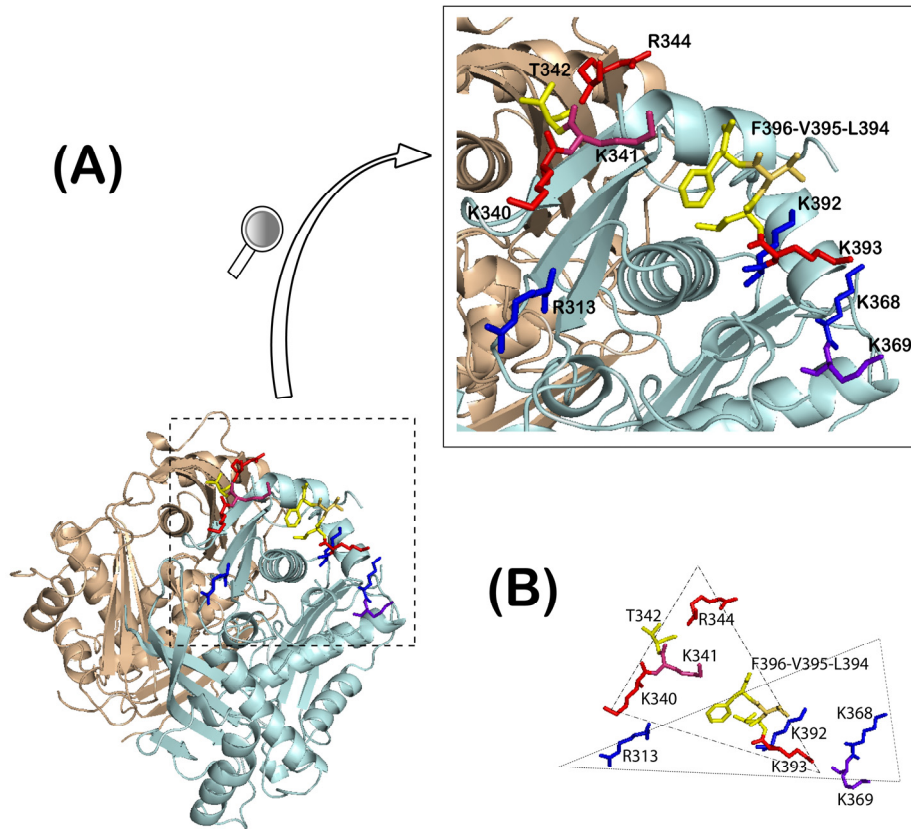
aún en el caso de un cambio estructural menor (K393X) se observó una alteración en el patrón de localización de la enzima.



**Figura 28. Impacto en la estructura de MAT $\alpha$ 1 de las eliminaciones de regiones de su C-terminal.** Se muestra la estructura del dímero de MAT $\alpha$ 1 cuyas dos subunidades aparecen representadas en color trigo y azul. Sobre esta última se ha señalado en color rojo las zonas eliminadas en el C-terminal para la obtención de los mutantes truncados K393X, N351X y R313X.

Para minimizar el riesgo de cambios estructurales drásticos en la estructura de MAT $\alpha$ 1 realizamos mutaciones puntuales en varios de los residuos básicos expuestos en el C-terminal de la enzima, utilizando para ello las construcciones MAT-EGFP y FLAG-MAT. En ese aspecto, la estrategia fue efectiva pues los mutantes obtenidos con FLAG-MAT fueron caracterizados en la fracción soluble de *E.coli*, comportándose, en todos los casos, como oligómeros activos. Los datos del estudio de la distribución subcelular nos permitió identificar 8 residuos en MAT $\alpha$ 1 que presentaron, en ambas construcciones, un comportamiento similar y que clasificamos en dos grupos de acuerdo al tipo de distribución mostrada en la célula: aquellos involucrados en el transporte al núcleo (340, 341, 344 y 393) y los implicados en la retención citoplasmática (313, 368, 369 y 392). Un dato que refuerza la relevancia de estos residuos para la distribución subcelular de esta enzima viene del análisis de su conservación entre las MATs de vertebrados. Con la excepción del residuo 340, todos se encuentran conservados en MAT $\alpha$ 1 e, incluso, en MAT $\alpha$ 2. En la figura 29A se puede apreciar que debido al plegamiento de esta enzima, y a pesar de estar dispersos por toda la secuencia primaria del C-terminal, estos residuos coinciden en una misma región, en la que K392 y K393 se encuentran situados hacia el centro de la misma, a una distancia de 16 Å a 23 Å del resto de residuos. De esta disposición se puede inferir la existencia de dos señales conformacionales de distinto tipo (CRS y NLS) solapándose entre sí en esa zona central (Figura 29B). También, en esa zona están los 3 últimos residuos de MAT $\alpha$ 1 cuya relevancia estudiamos con K393X, y que a tenor del comportamiento de este mutante podrían ser más importantes para la retención

citoplasmática que para el transporte nuclear de la enzima. Posiblemente, el carácter conformacional y la coincidencia en una misma región de estas señales sea la explicación del comportamiento de los mutantes dobles. Éstos presentaron un efecto nulo o contrario al esperado sobre la acumulación nuclear o citoplasmática, respectivamente, evidenciando la complejidad experimental de trabajar con señales de estas características.



**Figura 29. Solapamiento parcial de una CRS con una NLS en la región C-terminal de MAT $\alpha$ .** (A) Se muestra la estructura del dímero de MAT $\alpha$ 1 cuyas subunidades están representadas en color trigo y azul claro. Sobre la región C-terminal de esta última se ha hecho una ampliación dónde se destacan en tonos rojos los residuos que conforman la NLS (K340, K341, R344 y K393), en tonos azules los que integran la CRS (R313, K368, K369 y K392) y en color amarillo el residuo T342 y los tres últimos del C-terminal (L394-V395-F396). (B) Se muestra la orientación y las posiciones de los residuos mencionados. En líneas discontinuas de trazos cortos se muestran la zona que abarca la CRS mientras que la zona en la que se localiza la NLS está encerrada con trazos más largos.

Aunque las señales relacionadas con la retención citoplasmática han sido poco estudiadas, sí se ha estudiado con más profundidad las NLSs de tipo clásico, llegándose a describir las bases estructurales de la interacción de las mismas con la importina  $\alpha$  (Fontes et al., 2000; Fontes et al., 2003). Esta información ha servido para demostrar que este receptor es capaz de unirse a señales de tipo conformacional cuya organización tridimensional de los residuos que la integran mimetiza al de una NLS monopartita (Sessler and Noy, 2005) o bipartita (Rodríguez et al., 2006). Sin embargo, no parece ser el

caso de la NLS conformada por los residuos 340, 341, 344 y 393 pues tanto las posiciones como la distancia a la que están situados entre si no se ajustan a los requerimientos de esta interacción. Por otra parte, recientes estudios de las interacciones proteína-proteína, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han mostrado que SAM1 y SAM2, las MATs equivalentes en mamífero a MAT $\alpha$ 1 y MAT $\alpha$ 2, interaccionan con KAP95, el homólogo de la importina  $\beta$ 1 en estas células (Gavin et al., 2006; <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/interactions.pl>). Teniendo en cuenta la similitud de ~68 % que presentan estas enzimas con MAT $\alpha$ 1 (Horikawa et al., 1989), esta información estaría en concordancia con la identificación en nuestro trabajo de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo y constituye un dato que no debería obviarse en la búsqueda del receptor de su transporte nuclear. No obstante, hay que tener en cuenta que la identificación de KAP95 se ha producido utilizando técnicas de exploración a gran escala que deben ser validadas con otras más específicas (Charbonnier et al., 2008), y que en cualquier caso dicha interacción fue identificada en un sistema biológico distinto al de mamífero. De hecho, otra de las interacciones identificadas con SAM1 fue la del receptor de exportación nuclear CRM1, que en nuestro caso no parece estar involucrado en la exportación de MAT $\alpha$ 1, según los datos que obtuvimos de las células que expresaban esta enzima tratadas con leptomicina B.

El solapamiento parcial de estas dos señales sugiere la existencia de algún mecanismo que regule la función de cada una. Las modificaciones postraduccionales en alguno de los residuos de esa zona, constituyen una de las formas más probables para llevar a cabo este tipo de control. De esta forma, y según las necesidades de la célula, se podría favorecer la interacción con el receptor encargado de la importación nuclear o bien con el factor responsable de la retención de la enzima en el citosol. Sin embargo, hasta ahora solamente se ha demostrado que *in vivo* MAT $\alpha$ 1 es modificada mediante nitrosilación o hidroxilación de la C121 (Sanchez-Gongora et al., 1997; Ruiz et al., 1998), un residuo que está situado fuera del C-terminal. Uno de los mecanismos más conocidos de regulación de la interacción entre proteínas *in vivo* es la fosforilación y son numerosos los ejemplos de control del transporte nuclear mediado por esta modificación (Jans and Hubner, 1996; Poon and Jans, 2005; Alvisi et al., 2008). Precisamente dentro de la región que delimita la NLS identificada en nuestro trabajo se encuentra localizada la T342 (Figura 29), un residuo que al menos *in vitro* se ha demostrado que es fosforilado por PKC (Pajares et al., 1994). Por ello, sería interesante estudiar si esta modificación ocurre dentro de la célula y, en tal caso, qué influencia tendría sobre la localización nuclear de MAT $\alpha$ 1. Tampoco se debe obviar el estudio de otros residuos de esa región, principalmente las

lisinas que conforman ambas señales. Este aminoácido puede sufrir una gran variedad de modificaciones. Entre ellas se ha visto que la ubiquitinación, la sumoilación y la acetilación juegan un papel mucho más importante que el que se pensaba en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, incluido el transporte nuclear (Haglund and Dikic, 2005; Zhao, 2007; Yang and Seto, 2008). El análisis de la secuencia primaria de MAT $\alpha$ 1 con programas de predicción de este tipo de modificaciones dan valores de confianza superiores al umbral para la ubiquitinación de la K392, la sumoilación de K341 y K368 y la acetilación de K340, K341 y K392 (Li et al., 2006; Xue et al., 2006; Rytinki and Palvimo, 2008; Tung and Ho, 2008). Estos datos también deberían tenerse en cuenta en un futuro estudio de la regulación de estas señales. Por último, aunque en nuestro trabajo hemos identificado varios residuos básicos implicados en la distribución subcelular de MAT $\alpha$ 1, estos podrían no ser los únicos pues existen casos en los que se ha descrito más de una NLS dentro de una misma proteína o incluso señales conformadas por residuos de otro tipo (Mo et al., 2000; Majerciak et al., 2006).

### 6.3 Función nuclear de MAT $\alpha$ 1

Los resultados del análisis del estado oligomérico y de la actividad biológica de MAT $\alpha$ 1 en el interior del núcleo sugieren que su función en este orgánulo es la misma que en el citosol. El motivo por el que la síntesis de este metabolito necesitaría llevarse a cabo dentro del núcleo no es evidente si asumimos el modelo generalizado de la estructura del NPC, en el que los iones y moléculas pequeñas, como la SAM, pueden atravesar el canal central del poro por difusión pasiva. Una razón podría ser la elevada inestabilidad de la SAM (Borchardt, 1979; Hoffman, 1986), un factor que provoca su rápida degradación en solución y que justificaría su síntesis *in situ* para su uso inmediato. Aunque se ha especulado con la posibilidad de que en la célula la SAM podría estabilizarse por su unión a macromoléculas, hasta la fecha se desconoce si *in vivo* existe algún mecanismo para proteger a este metabolito de su degradación, como el que se ha observado *in vitro* mediante su unión a determinados aniones o disacáridos (Morana et al., 2000; Morana et al., 2002). Por ello, además de la inestabilidad de la SAM, la presencia de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo podría explicarse teniendo en cuenta algunos datos que llevan a cuestionar el libre paso de iones y pequeñas moléculas a través del NPC y que podrían indicar que el transporte nuclear de estas especies, al igual que el de las macromoléculas, es un proceso que está regulado. Esta hipótesis se apoya en las evidencias experimentales que en los últimos años se han estado obteniendo y que apuntan a la existencia de una ruta alternativa

para iones y pequeñas moléculas a través de pequeños canales localizados en la periferia del poro (Kramer et al., 2007; Naim et al., 2007; Kramer et al., 2008) y, también, en la descripción de transportadores para  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  en la membrana nuclear (Valenzuela et al., 1997; Matzke et al., 2001; Atkinson et al., 2002). De esta forma, suponiendo que la SAM no puede atravesar el poro nuclear por difusión pasiva, el transporte de MAT $\alpha$ 1 al interior del núcleo sería una forma de garantizar el suministro de este metabolito a los numerosos procesos en los que participa en este orgánulo.

Se conoce que la sobreexpresión de MAT $\alpha$ 1 en células no hepáticas (CHO-K1) provoca un aumento de los niveles de SAM con una consecuente hipermetilación del DNA (Sanchez-Gongora et al., 1996). Este efecto no lo hemos podido verificar por inmunofluorescencia probablemente porque la abundancia de DNA obstaculizó la identificación de los cambios con esta técnica y por ello se está reevaluando actualmente. Sin embargo, sí observamos un aumento en los niveles de trimetilación de la histona H3, especialmente en K4 y K27. El estado de trimetilación en estos residuos se ha relacionado con la actividad transcripcional del genoma, encontrándose altos niveles de H3K4me3 en las zonas activas mientras que las inactivas son ricas en H3K9me3 y H3K27me3 (Bhaumik et al., 2007; Regha et al., 2007). Nosotros hemos encontrado una correlación positiva entre el aumento de MAT $\alpha$ 1 nuclear con el nivel de K27me3, lo cual sugiere que existe un suministro *in situ* de SAM a las metiltransferasas encargadas de esta metilación y, por lo tanto, podría suponer una implicación directa de MAT $\alpha$ 1 en el control epigenético celular, específicamente en el silenciamiento génico. En ese sentido la expresión mayoritaria de MAT $\alpha$ 1 en el núcleo de las células pertenecientes a los tejidos extrahepáticos se correspondería con esa posible función, suponiendo que MAT $\alpha$ 2 no la pueda realizar. No obstante, teniendo en cuenta la importancia del silenciamiento génico en procesos como la diferenciación celular o durante el desarrollo de distintas enfermedades como el cáncer (Lanzuolo and Orlando, 2007), no debería descartarse que en hígado fetal, hepatocarcinoma, o en cualquier otra circunstancia en la que existe expresión del gen *MAT2A* y no de *MAT1A*, la función de MAT $\alpha$ 1 en la represión de determinados genes pueda ser realizada por MAT $\alpha$ 2. Es por ello que la presencia en el núcleo de esta última merecería ser evaluada.

La existencia de una MAT $\alpha$ 1 nuclear no es una excepción si se tiene en cuenta el número creciente de enzimas que se creían actuaban exclusivamente en el citosol y que últimamente han sido identificadas en el núcleo realizando una función igual o distinta a la citosólica. Entre ellas se encuentran enzimas de una gran variedad de rutas metabólicas

como por ejemplo la GAPDH (glucólisis), la serina hidroximetiltransferasa (SHMT, metabolismo de los folatos) o la SAHH (metabolismo de la metionina) (Radomski et al., 1999; Sirover, 2005; Woeller et al., 2007). Esta última se ha identificado en el núcleo asociada a la mRNA guanina 7-metiltransferasa (CMT, Radomski et al., 2002), una enzima que cataliza la metilación del *cap* en el pre-mRNA a partir de la SAM originando SAH como producto. Dado que este último es un potente inhibidor de la actividad de las metiltransferasas se cree que la función nuclear de la SAHH es la misma que en el citosol: la eliminación de la SAH para garantizar una elevada eficiencia de metilación. También, en concordancia con que la modificación del extremo 5' del pre-mRNA se lleva a cabo por un complejo de transcripción formado por factores y enzimas asociados a la RNA polimerasa II (Pol II), al que se ha visto pertenece la CMT (McCracken et al., 1997), se observó que SAHH colocalizaba con Pol II en los cuerpos de Cajal y en los B-esnruposomas. Estos compartimentos subnucleares están involucrados en el almacenamiento de los factores necesarios para el procesamiento del mRNA al igual que los *speckles* (Lamond and Spector, 2003). En nuestro caso hemos encontrado que MAT $\alpha$ 1 se encuentra asociada a la matriz nuclear y que colocalizaba con SC35, un marcador de los *speckles* nucleares, lo que podría significar que también esta enzima está involucrada en la metilación del *cap*. Una razón que lo justificaría sería la necesidad de un consumo inmediato de la SAM en la reacción de metilación, ya que como consecuencia de la inestabilidad de la SAM se genera como principal producto de degradación la 5'-metiltioadenosina (MTA), un compuesto que también es capaz de inhibir las metilaciones, ya sea directamente por su unión a las metiltransferasas o bien indirectamente por la inactivación de la SAHH o la represión transcripcional de la BHMT (Williams-Ashman et al., 1982; Ou et al., 2007). Por ello, sería razonable pensar que la eficiencia de la metilación del *cap* dependerá, además de una rápida eliminación de la SAH, de un consumo inmediato de la SAM, lo cual podría lograrse si en el complejo de transcripción de la Pol II, además de la SAHH, estuviera presente la MAT $\alpha$ 1. De momento desconocemos si MAT $\alpha$ 1 forma parte de dicho complejo, sin embargo el hecho de que en el estudio del interactoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* haya sido identificada la Pol II como una de las proteínas que se unen a SAM1 refuerza esta hipótesis (Gavin et al., 2006). Además, la presencia en los *speckles* nucleares de los mutantes truncados así como la del inactivo, sugiere que las regiones implicadas en la localización de MAT $\alpha$ 1 en esta estructura nuclear están localizadas fuera del C-terminal, y que la actividad MAT no es un requisito para esa localización.

Por otra parte, al igual que sucede con otras enzimas como la GNMT, no se debe excluir la posibilidad que MAT $\alpha$ 1 pueda desempeñar en el núcleo una función adicional (*moonlighting*). Una razón que lo avala podría ser la ausencia de un transportador de SAM en este compartimento, como el que sí existe en mitocondria y aparentemente en el aparato de Golgi (Marobbio et al., 2003; Agrimi et al., 2004; Ibar and Orellana, 2007). Dicha ausencia podría interpretarse en terminos de economía celular. Esto significaría que la célula, con una misma proteína, puede llegar a garantizar tanto la síntesis de la SAM nuclear como el desempeño de otra función desconocida. Además de lo anterior, la diferencia de afinidades que existe entre la forma dimérica y la tetramérica de MAT $\alpha$ 1 hace pensar que dada la pequeña contribución que hace el dímero a la síntesis de SAM a la célula, su función principal pueda ser otra distinta.

Finalmente, en nuestro trabajo hemos aportado evidencias experimentales que conducen a un replanteamiento de la distribución y localización subcelular de MAT $\alpha$ 1. Según nuestros resultados, en lugar de una enzima citosólica de hígado y páncreas, MAT $\alpha$ 1 es una enzima ubicua localizada tanto en el citosol como en el núcleo de las células, con preferencia nuclear en aquellas pertenecientes a tejidos extrahepáticos. También hemos observado que podría estar involucrada en procesos que ocurren tanto en la cromatina (silenciamiento génico) como en la matriz nuclear (procesamiento del pre-mRNA), probablemente en ambos casos para garantizar el suministro de SAM, aunque no se puede descartar alguna otra función. Estos hallazgos podrían servir de punto de partida para el entendimiento del mecanismo de desarrollo de varias enfermedades. Entre ellas, la desmielinización observada en pacientes con hipermetioninemia a los que se les ha detectado la presencia de una forma truncada de MAT $\alpha$ 1, no activa, similar a nuestro mutante N351X (Chamberlin et al., 1996). Hasta ahora se había propuesto como causa de esta enfermedad la caída de los niveles de SAM debido a la interacción no productiva, en términos de actividad biológica, entre MAT $\alpha$ 2 y la MAT $\alpha$ 1 truncada, lo cual se traduciría en una caída de los productos metilados necesarios para la síntesis de la mielina (Hazelwood et al., 1998). Sin embargo, la localización exclusivamente hepática de MAT $\alpha$ 1, no era coherente con esta influencia sobre la función cerebral. Ahora, con la detección de MAT $\alpha$ 1 en células del cerebro y del cerebelo se puede relacionar directamente a esta enzima con esta patología. Además, probablemente en su preferente localización nuclear en dichos tejidos podría encontrarse la respuesta al comportamiento anormal de su mutante truncado y, por consiguiente, al desarrollo de esta enfermedad.





## ***7. Conclusiones***



1. MAT $\alpha$ 1 presenta una distribución tisular prácticamente ubicua, que en hígado se concentra en la zona periportal.
2. MAT $\alpha$ 1 se localiza subcelularmente en citoplasma y núcleo, siendo preferentemente nuclear en células de tejidos extrahepáticos y citosólica en hepatocitos.
3. En la región C-terminal de MAT $\alpha$ 1, existen al menos dos señales de carácter conformacional que se solapan parcialmente, una que determina la localización nuclear y otra la retención citoplasmática.
4. MAT $\alpha$ 1 conserva la capacidad de oligomerizar en el interior del núcleo, aunque la actividad de síntesis de S-adenosil-L-metionina no es un requisito para la localización nuclear.
5. Dentro del núcleo MAT $\alpha$ 1 se localiza unida a la matriz nuclear en los *speckles*, y esta localización no está mediada por la secuencia C-terminal de la enzima, ni depende de su capacidad de síntesis de S-adenosil-L-metionina.
6. La sobreexpresión de MAT $\alpha$ 1 produce un aumento en la trimetilación de determinados residuos en la histona H3, pero sólo la trimetilación de la lisina 27 se correlaciona con el nivel de expresión nuclear de la enzima.



## ***8. Bibliografía***



- Agrimi, G., Di Noia, M.A., Marobbio, C.M., Fiermonte, G., Lasorsa, F.M., Palmieri, F., 2004. Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution. *Biochem J* 379, 183-190.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Rout, M.P., Sali, A., 2007a. Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* 450, 683-694.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., Rout, M.P., 2007b. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695-701.
- Alvarez, L., Asuncion, M., Corrales, F., Pajares, M.A., Mato, J.M., 1991. Analysis of the 5' non-coding region of rat liver S-adenosylmethionine synthetase mRNA and comparison of the Mr deduced from the cDNA sequence and the purified enzyme. *FEBS Lett* 290, 142-146.
- Alvarez, L., Corrales, F., Martin-Duce, A., Mato, J.M., 1993. Characterization of a full-length cDNA encoding human liver S-adenosylmethionine synthetase: tissue-specific gene expression and mRNA levels in hepatopathies. *Biochem J* 293 ( Pt 2), 481-486.
- Alvarez, L., Mingorance, J., Pajares, M.A., Mato, J.M., 1994. Expression of rat liver S-adenosylmethionine synthetase in *Escherichia coli* results in two active oligomeric forms. *Biochem J* 301 ( Pt 2), 557-561.
- Alvisi, G., Rawlinson, S.M., Ghildyal, R., Ripalti, A., Jans, D.A., 2008. Regulated nucleocytoplasmic trafficking of viral gene products: a therapeutic target? *Biochim Biophys Acta* 1784, 213-227.
- Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E., Goldberg, M.W., 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10), 1651-1659.
- Allsop, J., Watts, R.W., 1975. Methionine adenosyltransferase, cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase activity of rat liver subcellular particles, human blood cells and mixed white cells from rat bone marrow. *Clin Sci Mol Med Suppl* 48, 509-513.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Dargemont, C., 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110 ( Pt 3), 369-378.
- Atkinson, L., Milligan, C.J., Buckley, N.J., Deuchars, J., 2002. An ATP-gated ion channel at the cell nucleus. *Nature* 420, 42.
- Avila, M.A., Berasain, C., Torres, L., Martin-Duce, A., Corrales, F.J., Yang, H., Prieto, J., Lu, S.C., Caballeria, J., Rodes, J., Mato, J.M., 2000. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 33, 907-914.
- Avila, M.A., Mingorance, J., Martinez-Chantar, M.L., Casado, M., Martin-Sanz, P., Bosca, L., Mato, J.M., 1997. Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *Hepatology* 25, 391-396.
- Azuma, Y., Dasso, M., 2000. The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* 12, 302-307.

- Baake, M., Doenecke, D., Albig, W., 2001. Characterisation of nuclear localisation signals of the four human core histones. *J Cell Biochem* 81, 333-346.
- Bayliss, R., Littlewood, T., Stewart, M., 2000. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102, 99-108.
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., Medalia, O., 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306, 1387-1390.
- Bednenko, J., Cingolani, G., Gerace, L., 2003. Importin beta contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *J Cell Biol* 162, 391-401.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., Baldwin, A.S., Jr., 1992. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 6, 1899-1913.
- Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S., Nicolin, A., 2003. Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 195, 356-372.
- Bhat, R., Bresnick, E., 1997. Glycine N-methyltransferase is an example of functional diversity. Role as a polycyclic aromatic hydrocarbon-binding receptor. *J Biol Chem* 272, 21221-21226.
- Bhaumik, S.R., Smith, E., Shilatifard, A., 2007. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1008-1016.
- Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A., Ponstingl, H., 1994. RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2587-2591.
- Bischoff, F.R., Ponstingl, H., 1991a. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80-82.
- Bischoff, F.R., Ponstingl, H., 1991b. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10830-10834.
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J., Cullen, B.R., 1996. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16, 4207-4214.
- Borchardt, R.T., 1979. Mechanism of Alkaline Hydrolysis of S- Adenosyl-L-methionine and Related Sulfonium Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc* 101, 458-463.
- Cabrero, C., Duce, A.M., Ortiz, P., Alemany, S., Mato, J.M., 1988. Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* 8, 1530-1534.
- Cabrero, C., Puerta, J., Alemany, S., 1987. Purification and comparison of two forms of S-adenosyl-L-methionine synthetase from rat liver. *Eur J Biochem* 170, 299-304.
- Cai, J., Sun, W.M., Hwang, J.J., Stain, S.C., Lu, S.C., 1996. Changes in S-adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance. *Hepatology* 24, 1090-1097.
- Cansizoglu, A.E., Chook, Y.M., 2007. Conformational heterogeneity of karyopherin beta2 is segmental. *Structure* 15, 1431-1441.



- Cansizoglu, A.E., Lee, B.J., Zhang, Z.C., Fontoura, B.M., Chook, Y.M., 2007. Structure-based design of a pathway-specific nuclear import inhibitor. *Nat Struct Mol Biol* 14, 452-454.
- Cantoni, G.L., 1953. S-adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *Journal Biological Chemistry* 204, 403-416.
- Cantoni, G.L., 1975. Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem* 44, 435-451.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., Muller, C.W., 1999. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* 399, 221-229.
- Cokol, M., Nair, R., Rost, B., 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* 1, 411-415.
- Conti, E., Muller, C.W., Stewart, M., 2006. Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol* 16, 237-244.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., Kuriyan, J., 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94, 193-204.
- Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., Matunis, M.J., 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158, 915-927.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20, 448-455.
- Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Levy, H.L., Chou, J.Y., 1997. Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gene. *Am J Hum Genet* 60, 540-546.
- Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Wilson, W.G., Leonard, J.V., Chou, J.Y., 1996. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J Clin Invest* 98, 1021-1027.
- Charbonnier, S., Gallego, O., Gavin, A.C., 2008. The social network of a cell: recent advances in interactome mapping. *Biotechnol Annu Rev* 14, 1-28.
- Chen, A., Wang, P.Y., Yang, Y.C., Huang, Y.H., Yeh, J.J., Chou, Y.H., Cheng, J.T., Hong, Y.R., Li, S.S., 2006. SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. *J Cell Biochem* 98, 895-911.
- Chen, L., Zeng, Y., Yang, H., Lee, T.D., French, S.W., Corrales, F.J., Garcia-Trevijano, E.R., Avila, M.A., Mato, J.M., Lu, S.C., 2004. Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *Faseb J* 18, 914-916.
- Chen, M.H., Ben-Efraim, I., Mitrousis, G., Walker-Kopp, N., Sims, P.J., Cingolani, G., 2005. Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. *J Biol Chem* 280, 10599-10606.
- Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K., McCann, P.P., 1996. S-Adenosylmethionine and methylation. *Faseb J* 10, 471-480.
- Chook, Y.M., Blobel, G., 1999. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* 399, 230-237.
- Chook, Y.M., Blobel, G., 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11, 703-715.

- Chou, J.Y., 2000. Molecular genetics of hepatic methionine adenosyltransferase deficiency. *Pharmacol Ther* 85, 1-9.
- Christophe, D., Christophe-Hobertus, C.Pichon, B., 2000. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal* 12, 337-341.
- Dasso, M., 2002. The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol* 12, R502-508.
- Deigner, H.P., Mato, J.M.Pajares, M.A., 1995. Study of the rat liver S-adenosylmethionine synthetase active site with 8-azido ATP. *Biochem J* 308 ( Pt 2), 565-571.
- Delgado-Reyes, C.V., Wallig, M.A.Garrow, T.A., 2001. Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human, pig, and rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys* 393, 184-186.
- Delgado, M., Perez-Miguelsanz, J., Garrido, F., Rodriguez-Tarduchy, G., Perez-Sala, D.Pajares, M.A., 2008. Early effects of copper accumulation on methionine metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65, 2080-2090.
- Denning, D.P., Patel, S.S., Uversky, V., Fink, A.L.Rexach, M., 2003. Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2450-2455.
- Dingwall, C.Laskey, R.A., 1991. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* 16, 478-481.
- Dultz, E., Zanin, E., Wurzenberger, C., Braun, M., Rabut, G., Sironi, L.Ellenberg, J., 2008. Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol* 180, 857-865.
- Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L.Julkunen, I., 2002. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem* 277, 30072-30078.
- Faleiro, L.Lazebnik, Y., 2000. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 151, 951-959.
- Feldherr, C.M.Akin, D., 1993. Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Exp Cell Res* 205, 179-186.
- Finkelstein, J.D., 1990. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1, 228-237.
- Finkelstein, J.D., 2007. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 45, 1694-1699.
- Finkelstein, J.D., Kyle, W.E., Martin, J.L.Pick, A.M., 1975. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 66, 81-87.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W.Luhrmann, R., 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-483.
- Fontecave, M., Atta, M.Mulliez, E., 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29, 243-249.
- Fontes, M.R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I.Kobe, B., 2003. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem* 278, 27981-27987.
- Fontes, M.R., Teh, T.Kobe, B., 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* 297, 1183-1194.

- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W., 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Frohlich, T., Risau, W., Flamme, I., 1998. Characterization of novel nuclear targeting and apoptosis-inducing domains in FAS associated factor 1. *J Cell Sci* 111 ( Pt 16), 2353-2363.
- Fukuhara, N., Fernandez, E., Ebert, J., Conti, E., Svergun, D., 2004. Conformational variability of nucleo-cytoplasmic transport factors. *J Biol Chem* 279, 2176-2181.
- Gasiorowski, J.Z., Dean, D.A., 2003. Mechanisms of nuclear transport and interventions. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 703-716.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B., Superti-Furga, G., 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.
- Gil, B., Casado, M., Pajares, M.A., Bosca, L., Mato, J.M., Martin-Sanz, P., Alvarez, L., 1996. Differential expression pattern of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. *Hepatology* 24, 876-881.
- Gil, B., Pajares, M.A., Mato, J.M., Alvarez, L., 1997. Glucocorticoid regulation of hepatic S-adenosylmethionine synthetase gene expression. *Endocrinology* 138, 1251-1258.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., Adam, S.A., 2004. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* 14, 505-514.
- Gonzalez, B., Pajares, M.A., Hermoso, J.A., Alvarez, L., Garrido, F., Sufrin, J.R., Sanz-Aparicio, J., 2000. The crystal structure of tetrameric methionine adenosyltransferase from rat liver reveals the methionine-binding site. *J Mol Biol* 300, 363-375.
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., Bischoff, F.R., 1996. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 15, 5584-5594.
- Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A., Hartmann, E., 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767-778.
- Graham, D.E., Bock, C.L., Schalk-Hihi, C., Lu, Z.J., Markham, G.D., 2000. Identification of a highly diverged class of S-adenosylmethionine synthetases in the archaea. *J Biol Chem* 275, 4055-4059.
- Griffis, E.R., Xu, S., Powers, M.A., 2003. Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Mol Biol Cell* 14, 600-610.
- Haglund, K., Dikic, I., 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24, 3353-3359.
- Halim, A.B., LeGros, L., Geller, A., Kotb, M., 1999. Expression and functional interaction of the catalytic and regulatory subunits of human methionine adenosyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 29720-29725.
- Handwerker, K.E., Gall, J.G., 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol* 16, 19-26.
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder,

- S.H.Sawa, A., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* 7, 665-674.
- Harel, A.Forbes, D.J., 2004. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol Cell* 16, 319-330.
- Harreman, M.T., Cohen, P.E., Hodel, M.R., Truscott, G.J., Corbett, A.H.Hodel, A.E., 2003. Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin alpha. *J Biol Chem* 278, 21361-21369.
- Hazelwood, S., Bernardini, I., Shotelersuk, V., Tangerman, A., Guo, J., Mudd, H.Gahl, W.A., 1998. Normal brain myelination in a patient homozygous for a mutation that encodes a severely truncated methionine adenosyltransferase I/III. *Am J Med Genet* 75, 395-400.
- Hoffman, J.L., 1986. Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry* 25, 4444-4449.
- Horikawa, S., Ishikawa, M., Ozasa, H.Tsukada, K., 1989. Isolation of a cDNA encoding the rat liver S-adenosylmethionine synthetase. *Eur J Biochem* 184, 497-501.
- Horikawa, S., Ozasa, H., Ota, K.Tsukada, K., 1993. Immunohistochemical analysis of rat S-adenosylmethionine synthetase isozymes in developmental liver. *FEBS Lett* 330, 307-311.
- Horikawa, S., Sasuga, J., Shimizu, K., Ozasa, H.Tsukada, K., 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the rat kidney S-adenosylmethionine synthetase. *J Biol Chem* 265, 13683-13686.
- Huang, Z.Z., Mao, Z., Cai, J.Lu, S.C., 1998. Changes in methionine adenosyltransferase during liver regeneration in the rat. *Am J Physiol* 275, G14-21.
- Hue, L., Bontemps, F.Hers, H., 1975. The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations. *Biochem J* 152, 105-114.
- Ibar, C.Orellana, A., 2007. The import of S-adenosylmethionine into the Golgi apparatus is required for the methylation of homogalacturonan. *Plant Physiol* 145, 504-512.
- Imasaki, T., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Kose, S., Imamoto, N., Yamada, M.Sato, M., 2007. Structural basis for substrate recognition and dissociation by human transportin 1. *Mol Cell* 28, 57-67.
- Imlay, J.A.Linn, S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302-1309.
- Ito, K., Ikeda, S., Kojima, N., Miura, M., Shimizu-Saito, K., Yamaguchi, I., Katsuyama, I., Sanada, K., Iwai, T., Senoo, H.Horikawa, S., 2000. Correlation between the expression of methionine adenosyltransferase and the stages of human colorectal carcinoma. *Surg Today* 30, 706-710.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W.Gorlich, D., 1997. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* 16, 6535-6547.
- Jans, D.A., Ackermann, M.J., Bischoff, J.R., Beach, D.H.Peters, R., 1991. p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J Cell Biol* 115, 1203-1212.
- Jans, D.A.Hubner, S., 1996. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* 76, 651-685.

- Jencks, D.A., Mathews, R.G., 1987. Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. *J Biol Chem* 262, 2485-2493.
- Jordan, M., Schallhorn, A., Wurm, F.M., 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24, 596-601.
- Jungermann, K., Kietzmann, T., 2000. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 31, 255-260.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., Smith, A.E., 1984. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38.
- Kanai, M., Hanashiro, K., Kim, S.H., Hanai, S., Boulares, A.H., Miwa, M., Fukasawa, K., 2007. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribose)ylation. *Nat Cell Biol* 9, 1175-1183.
- Keminer, O., Peters, R., 1999. Permeability of single nuclear pores. *Biophys J* 77, 217-228.
- Kim, J.W., Dang, C.V., 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 30, 142-150.
- Kobe, B., 1999. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* 6, 388-397.
- Kohler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H., Hartmann, E., 1997. Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* 417, 104-108.
- Kotb, M., Geller, A.M., 1993. Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacol Ther* 59, 125-143.
- Kotb, M., Kredich, N.M., 1985. S-Adenosylmethionine synthetase from human lymphocytes. Purification and characterization. *J Biol Chem* 260, 3923-3930.
- Kramer, A., Liashkovich, I., Ludwig, Y., Shahin, V., 2008. Atomic force microscopy visualises a hydrophobic meshwork in the central channel of the nuclear pore. *Pflugers Arch* 456, 155-162.
- Kramer, A., Ludwig, Y., Shahin, V., Oberleithner, H., 2007. A pathway separate from the central channel through the nuclear pore complex for inorganic ions and small macromolecules. *J Biol Chem* 282, 31437-31443.
- Kudo, N., Taoka, H., Toda, T., Yoshida, M., Horinouchi, S., 1999. A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J Biol Chem* 274, 15151-15158.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., Nomoto, A., 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21, 6139-6150.
- Kutay, U., Guttinger, S., 2005. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* 15, 121-124.
- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F.M., Brunak, S., 2003. NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* 31, 393-396.
- la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S., 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamond, A.I., Spector, D.L., 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 605-612.
- Laney, J.D., Hochstrasser, M., 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97, 427-430.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., Corbett, A.H., 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282, 5101-5105.
- Lanzuolo, C., Orlando, V., 2007. The function of the epigenome in cell reprogramming. *Cell Mol Life Sci* 64, 1043-1062.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., Chook, Y.M., 2006. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126, 543-558.
- LeGros, H.L., Jr., Halim, A.B., Geller, A.M., Kotb, M., 2000. Cloning, expression, and functional characterization of the beta regulatory subunit of human methionine adenosyltransferase (MAT II). *J Biol Chem* 275, 2359-2366.
- Li, A., Xue, Y., Jin, C., Wang, M., Yao, X., 2006. Prediction of Nepsilon-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 818-824.
- Lieber, C.S., 1999. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of liver diseases. *J Hepatol* 30, 1155-1159.
- Lu, S.C., Alvarez, L., Huang, Z.Z., Chen, L., An, W., Corrales, F.J., Avila, M.A., Kanel, G., Mato, J.M., 2001. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5560-5565.
- Lu, S.C., Gukovsky, I., Lugea, A., Reyes, C.N., Huang, Z.Z., Chen, L., Mato, J.M., Bottiglieri, T., Pandol, S.J., 2003. Role of S-adenosylmethionine in two experimental models of pancreatitis. *Faseb J* 17, 56-58.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., Melchior, F., 1997. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Majerciak, V., Yamanegi, K., Nie, S.H., Zheng, Z.M., 2006. Structural and functional analyses of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57 nuclear localization signals in living cells. *J Biol Chem* 281, 28365-28378.
- Markham, G.D., Parkin, D.W., Mentch, F., Schramm, V.L., 1987. A kinetic isotope effect study and transition state analysis of the S-adenosylmethionine synthetase reaction. *J Biol Chem* 262, 5609-5615.
- Marobbio, C.M., Agrimi, G., Lasorsa, F.M., Palmieri, F., 2003. Identification and functional reconstitution of yeast mitochondrial carrier for S-adenosylmethionine. *Embo J* 22, 5975-5982.
- Martinez-Chantar, M.L., Corrales, F.J., Martinez-Cruz, L.A., Garcia-Trevijano, E.R., Huang, Z.Z., Chen, L., Kanel, G., Avila, M.A., Mato, J.M., Lu, S.C., 2002. Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *Faseb J* 16, 1292-1294.

- Martinez-Chantar, M.L., Garcia-Trevijano, E.R., Latasa, M.U., Martin-Duce, A., Fortes, P., Caballeria, J., Avila, M.A. Mato, J.M., 2003. Methionine adenosyltransferase II beta subunit gene expression provides a proliferative advantage in human hepatoma. *Gastroenterology* 124, 940-948.
- Mato, J.M., Alvarez, L., Ortiz, P. Pajares, M.A., 1997. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 73, 265-280.
- Mato, J.M., Camara, J., Fernandez de Paz, J., Caballeria, L., Coll, S., Caballero, A., Garcia-Buey, L., Beltran, J., Benita, V., Caballeria, J., Sola, R., Moreno-Otero, R., Barrao, F., Martin-Duce, A., Correa, J.A., Pares, A., Barrao, E., Garcia-Magaz, I., Puerta, J.L., Moreno, J., Boissard, G., Ortiz, P. Rodes, J., 1999. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 30, 1081-1089.
- Mato, J.M., Corrales, F.J., Lu, S.C. Avila, M.A., 2002. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J* 16, 15-26.
- Mato, J.M., Martinez-Chantar, M.L. Lu, S.C., 2008. Methionine Metabolism and Liver Disease. *Annu Rev Nutr* 28, 273-293.
- Matzke, M., Aufsatz, W., Gregor, W., van Der Winden, J., Papp, I. Matzke, A.J., 2001. Ion transporters in the nucleus? *Plant Physiol* 127, 10-13.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S. Bentley, D.L., 1997. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 11, 3306-3318.
- Melan, M.A. Sluder, G., 1992. Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy. *J Cell Sci* 101 ( Pt 4), 731-743.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. Gerace, L., 1993. Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol* 123, 1649-1659.
- Merali, S. Clarkson, A.B., Jr., 2004. S-adenosylmethionine and Pneumocystis. *FEMS Microbiol Lett* 237, 179-186.
- Miller, M., Park, M.K. Hanover, J.A., 1991. Nuclear pore complex: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 71, 909-949.
- Mingorance, J., Alvarez, L., Pajares, M.A. Mato, J.M., 1997. Recombinant rat liver S-adenosyl-L-methionine synthetase tetramers and dimers are in equilibrium. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 485-491.
- Mingorance, J., Alvarez, L., Sanchez-Gongora, E., Mato, J.M. Pajares, M.A., 1996. Site-directed mutagenesis of rat liver S-adenosylmethionine synthetase. Identification of a cysteine residue critical for the oligomeric state. *Biochem J* 315 ( Pt 3), 761-766.
- Mitsui, K., Teraoka, H. Tsukada, K., 1988. Complete purification and immunochemical analysis of S-adenosylmethionine synthetase from bovine brain. *J Biol Chem* 263, 11211-11216.
- Mizuno, T., Okamoto, T., Yokoi, M., Izumi, M., Kobayashi, A., Hachiya, T., Tamai, K., Inoue, T. Hanaoka, F., 1996. Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *J Cell Sci* 109 ( Pt 11), 2627-2636.

- Mo, Y.Y., Wang, C.Beck, W.T., 2000. A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 275, 41107-41113.
- Morana, A., Di Lernia, I., Carten inverted question marki, M., De Rosa, R.De Rosa, M., 2000. Synthesis and characterisation of a new class of stable S-adenosyl-L-methionine salts. *Int J Pharm* 194, 61-68.
- Morana, A., Stiuso, P., Colonna, G., Lamberti, M., Carteni, M.De Rosa, M., 2002. Stabilization of S-adenosyl-L-methionine promoted by trehalose. *Biochim Biophys Acta* 1573, 105-108.
- Mosammaparast, N.Pemberton, L.F., 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* 14, 547-556.
- Mudd, S.H.Poole, J.R., 1975. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism* 24, 721-735.
- Naim, B., Brumfeld, V., Kapon, R., Kiss, V., Nevo, R.Reich, Z., 2007. Passive and facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled. *J Biol Chem* 282, 3881-3888.
- Nakai, K.Horton, P., 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24, 34-36.
- Nickerson, J.A., Krockmalnic, G., Wan, K.M.Penman, S., 1997. The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4446-4450.
- Nikolaev, A.Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J.Gu, W., 2003. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29-40.
- Oden, K.L.Clarke, S., 1983. S-adenosyl-L-methionine synthetase from human erythrocytes: role in the regulation of cellular S-adenosylmethionine levels. *Biochemistry* 22, 2978-2986.
- Okada, G., Teraoka, H.Tsukada, K., 1981. Multiple species of mammalian S-adenosylmethionine synthetase. Partial purification and characterization. *Biochemistry* 20, 934-940.
- Okada, G., Watanabe, Y.Tsukada, K., 1980. Changes in patterns of S-adenosylmethionine synthetases in fetal and postnatal rat liver. *Cancer Res* 40, 2895-2897.
- Ou, X., Yang, H., Ramani, K., Ara, A.I., Chen, H., Mato, J.M.Lu, S.C., 2007. Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *Biochem J* 401, 87-96.
- Pajares, M.A., Duran, C., Corrales, F.Mato, J.M., 1994. Protein kinase C phosphorylation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase: dissociation and production of an active monomer. *Biochem J* 303 ( Pt 3), 949-955.
- Pajares, M.A., Duran, C., Corrales, F., Pliego, M.M.Mato, J.M., 1992. Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J Biol Chem* 267, 17598-17605.
- Paschal, B.M.Gerace, L., 1995. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J Cell Biol* 129, 925-937.
- Patel, S.S., Belmont, B.J., Sante, J.M.Rexach, M.F., 2007. Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex. *Cell* 129, 83-96.



- Paulillo, S.M., Phillips, E.M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K.S., Powers, M.A., Fahrenkrog, B., 2005. Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* 351, 784-798.
- Pennisi, E., 2004. Evolutionary biology. The birth of the nucleus. *Science* 305, 766-768.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pickart, C.M., Eddins, M.J., 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55-72.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielnny, S., Siomi, M.C., Wang, F., Dreyfuss, G., 1996. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86, 985-994.
- Poon, I.K., Jans, D.A., 2005. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* 6, 173-186.
- Pouton, C.W., Wagstaff, K.M., Roth, D.M., Moseley, G.W., Jans, D.A., 2007. Targeted delivery to the nucleus. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 698-717.
- Pyhtila, B., Rexach, M., 2003. A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex. *J Biol Chem* 278, 42699-42709.
- Rabut, G., Doye, V., Ellenberg, J., 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat Cell Biol* 6, 1114-1121.
- Radomski, N., Barreto, G., Kaufmann, C., Yokoska, J., Mizumoto, K., Dreyer, C., 2002. Interaction of S-adenosylhomocysteine hydrolase of *Xenopus laevis* with mRNA (guanine-7)-methyltransferase: implication on its nuclear compartmentalisation and on cap methylation of hnRNA. *Biochim Biophys Acta* 1590, 93-102.
- Radomski, N., Kaufmann, C., Dreyer, C., 1999. Nuclear accumulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in transcriptionally active cells during development of *Xenopus laevis*. *Mol Biol Cell* 10, 4283-4298.
- Raha, A., Wagner, C., MacDonald, R.G., Bresnick, E., 1994. Rat liver cytosolic 4 S polycyclic aromatic hydrocarbon-binding protein is glycine N-methyltransferase. *J Biol Chem* 269, 5750-5756.
- Raina, A., Eloranta, T., Kajander, O., 1976. Biosynthesis and metabolism of polyamines and S-adenosylmethionine in the rat. *Biochem Soc Trans* 4, 968-971.
- Rassin, D.K., Gaull, G.E., 1975. Subcellular distribution of enzymes of transmethylation and transsulphuration in rat brain. *J Neurochem* 24, 969-978.
- Regha, K., Sloane, M.A., Huang, R., Pauler, F.M., Warczok, K.E., Melikant, B., Radolf, M., Martens, J.H., Schotta, G., Jenuwein, T., Barlow, D.P., 2007. Active and repressive chromatin are interspersed without spreading in an imprinted gene cluster in the mammalian genome. *Mol Cell* 27, 353-366.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M., Gorlich, D., 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* 17, 6587-6598.
- Rihs, H.P., Peters, R., Hobom, G., 1991. Nuclear localization of budgerigar fledgling disease virus capsid protein VP2 is conferred by residues 308-317. *FEBS Lett* 291, 6-8.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., Dingwall, C., 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-623.

- Rodriguez, M., Benito, A., Tubert, P., Castro, J., Ribo, M., Beaumelle, B., Vilanova, M., 2006. A cytotoxic ribonuclease variant with a discontinuous nuclear localization signal constituted by basic residues scattered over three areas of the molecule. *J Mol Biol* 360, 548-557.
- Roje, S., 2006. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67, 1686-1698.
- Rout, M.P., Wente, S.R., 1994. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol* 4, 357-365.
- Ruiz, F., Corrales, F.J., Miqueo, C., Mato, J.M., 1998. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase *in vivo* by S-nitrosylation. *Hepatology* 28, 1051-1057.
- Ryczyn, M.A., Reilly, S.C., O'Malley, K., Clevenger, C.V., 2000. Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol Endocrinol* 14, 1175-1186.
- Rytinki, M.M., Palvimo, J.J., 2008. SUMOylation modulates the transcription repressor function of RIP140. *J Biol Chem* 283, 11586-11595.
- Sanchez-Gongora, E., Pastorino, J.G., Alvarez, L., Pajares, M.A., Garcia, C., Vina, J.R., Mato, J.M., Farber, J.L., 1996. Increased sensitivity to oxidative injury in chinese hamster ovary cells stably transfected with rat liver S-adenosylmethionine synthetase cDNA. *Biochem J* 319 ( Pt 3), 767-773.
- Sanchez-Gongora, E., Ruiz, F., Mingorance, J., An, W., Corrales, F.J., Mato, J.M., 1997. Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical. *FASEB J* 11, 1013-1019.
- Sanchez-Perez, G.F., Bautista, J.M., Pajares, M.A., 2004. Methionine adenosyltransferase as a useful molecular systematics tool revealed by phylogenetic and structural analyses. *J Mol Biol* 335, 693-706.
- Sanchez-Perez, G.F., Gasset, M., Calvete, J.J., Pajares, M.A., 2003. Role of an intrasubunit disulfide in the association state of the cytosolic homo-oligomer methionine adenosyltransferase. *J Biol Chem* 278, 7285-7293.
- Santamaria, E., Avila, M.A., Latasa, M.U., Rubio, A., Martin-Duce, A., Lu, S.C., Mato, J.M., Corrales, F.J., 2003. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3065-3070.
- Santamaria, E., Munoz, J., Fernandez-Irigoyen, J., Sesma, L., Mora, M.I., Berasain, C., Lu, S.C., Mato, J.M., Prieto, J., Avila, M.A., Corrales, F.J., 2006. Molecular profiling of hepatocellular carcinoma in mice with a chronic deficiency of hepatic S-adenosylmethionine: relevance in human liver diseases. *J Proteome Res* 5, 944-953.
- Sessler, R.J., Noy, N., 2005. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell* 18, 343-353.
- Sheid, B., Bilik, E., 1968. S-adenosylmethionine synthetase activity in some normal rat tissues and transplantable hepatomas. *Cancer Res* 28, 2512-2515.
- Shimizu-Saito, K., Horikawa, S., Kojima, N., Shiga, J., Senoo, H., Tsukada, K., 1997. Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in different cell types of rat liver. *Hepatology* 26, 424-431.
- Siomi, H., Dreyfuss, G., 1995. A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* 129, 551-560.

- Sirover, M.A., 2005. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 95, 45-52.
- Smith, W.A., Schurter, B.T., Wong-Staal, F., David, M., 2004. Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J Biol Chem* 279, 22795-22798.
- Sommer, L., Hagenbuchle, O., Wellauer, P.K., Strubin, M., 1991. Nuclear targeting of the transcription factor PTF1 is mediated by a protein subunit that does not bind to the PTF1 cognate sequence. *Cell* 67, 987-994.
- Spector, D.L., 2001. Nuclear domains. *J Cell Sci* 114, 2891-2893.
- Spector, D.L., 2006. SnapShot: Cellular bodies. *Cell* 127, 1071.
- Stallings, C.L., Silverstein, S., 2005. Dissection of a novel nuclear localization signal in open reading frame 29 of varicella-zoster virus. *J Virol* 79, 13070-13081.
- Starke, P.E., Farber, J.L., 1985. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem* 260, 10099-10104.
- Steidl, S., Tuncher, A., Goda, H., Guder, C., Papadopoulou, N., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N., Kato, M., Brakhage, A.A., 2004. A single subunit of a heterotrimeric CCAAT-binding complex carries a nuclear localization signal: piggy back transport of the pre-assembled complex to the nucleus. *J Mol Biol* 342, 515-524.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W., 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282, 754-759.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., Wahl, G.M., 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 18, 1660-1672.
- Surtees, R., Leonard, J., Austin, S., 1991. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway. *Lancet* 338, 1550-1554.
- Tabor, S., Richardson, C.C., 1992. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. 1985. *Biotechnology* 24, 280-284.
- Terry, L.J., Shows, E.B., Wenthe, S.R., 2007. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318, 1412-1416.
- Thevenet, L., Mejean, C., Moniot, B., Bonneaud, N., Galeotti, N., Aldrian-Herrada, G., Poulat, F., Berta, P., Benkirane, M., Boizet-Bonhoure, B., 2004. Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J* 23, 3336-3345.
- Timney, B.L., Tetenbaum-Novatt, J., Agate, D.S., Williams, R., Zhang, W., Chait, B.T., Rout, M.P., 2006. Simple kinetic relationships and nonspecific competition govern nuclear import rates in vivo. *J Cell Biol* 175, 579-593.
- Torre, L., Lopez-Rodas, G., Latasa, M.U., Carretero, M.V., Boukaba, A., Rodriguez, J.L., Franco, L., Mato, J.M., Avila, M.A., 2000. DNA methylation and histone acetylation

- of rat methionine adenosyltransferase 1A and 2A genes is tissue-specific. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 397-404.
- Tran, E.J.Wente, S.R., 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041-1053.
- Trotman, L.C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N.P., Carver, B.S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chi, S.G., Kim, H.J., Misteli, T., Jiang, X.Pandolfi, P.P., 2007. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128, 141-156.
- Tung, C.W.Ho, S.Y., 2008. Computational identification of ubiquitylation sites from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 9, 310.
- Valenzuela, S.M., Martin, D.K., Por, S.B., Robbins, J.M., Warton, K., Bootcov, M.R., Schofield, P.R., Campbell, T.J.Breit, S.N., 1997. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem* 272, 12575-12582.
- Vetter, I.R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J.Wittinghofer, A., 1999. Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature* 398, 39-46.
- Walther, R.F., Atlas, E., Carrigan, A., Rouleau, Y., Edgecombe, A., Visentin, L., Lamprecht, C., Addicks, G.C., Hache, R.J.Lefebvre, Y.A., 2005. A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 280, 17549-17561.
- Williams-Ashman, H.G., Seidenfeld, J.Galletti, P., 1982. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Pharmacol* 31, 277-288.
- Woeller, C.F., Anderson, D.D., Szebenyi, D.M.Stover, P.J., 2007. Evidence for small ubiquitin-like modifier-dependent nuclear import of the thymidylate biosynthesis pathway. *J Biol Chem* 282, 17623-17631.
- Xue, Y., Zhou, F., Fu, C., Xu, Y.Yao, X., 2006. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res* 34, W254-257.
- Yang, W.Musser, S.M., 2006. Nuclear import time and transport efficiency depend on importin beta concentration. *J Cell Biol* 174, 951-961.
- Yang, X.J.Seto, E., 2008. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* 31, 449-461.
- Yasuhara, N., Shibasaki, N., Tanaka, S., Nagai, M., Kamikawa, Y., Oe, S., Asally, M., Kamachi, Y., Kondoh, H.Yoneda, Y., 2007. Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin-alpha. *Nat Cell Biol* 9, 72-79.
- Yeo, E.J.Wagner, C., 1994. Tissue distribution of glycine N-methyltransferase, a major folate-binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 210-214.
- Zhao, J., 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci* 64, 3017-3033.

## ***9. Anexos***



El trabajo recogido en esta memoria ha sido enviado para su publicación a la revista *Journal of Biological Chemistry* bajo el título:

- “*Nuclear localization of methionine adenosyltransferase I/III correlates with histone H3K27 methylation changes*” (Autores: **Edel Reytor**, Juliana Pérez-Miguelsanz, Luis Alvarez, Dolores Pérez-Sala y María A. Pajares)

También durante este período he colaborado en otras dos publicaciones no relacionadas con el tema de esta tesis:

- Gil F, **Reytor E**, Pérez-Filgueira DM, Escribano JM “*Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants*” *J. Biotechnology*. 2007, 128: 512-518
- Falcon V, Acosta-Rivero N, China G, Gavilondo J, de la Rosa MC, Menendez I, Duenas-Carrera S, Vina A, Garcia W, Gra B, Noa M, **Reytor E**, Barcelo MT, Alvarez F, Morales-Grillo J. “*Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients*”. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305(4): 1085-90.

Todos estos trabajos se adjuntan a continuación como material anexo:





**NUCLEAR LOCALIZATION OF METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE I/III  
CORRELATES WITH HISTONE H3K27 METHYLATION CHANGES**

**Edel Reytor<sup>1</sup>, Juliana Pérez-Miguelsanz<sup>2</sup>, Luis Alvarez<sup>3</sup>, Dolores Pérez-Sala<sup>4</sup> and María A. Pajares<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Anatomía y Embriología Humana I, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Unidad de Investigación, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

**Running head:** MAT I/III nuclear localization

<sup>5</sup>Address correspondence to: María A. Pajares, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain (Phone: 34-915854414; FAX: 34-915854401; email: [mapajares@iib.uam.es](mailto:mapajares@iib.uam.es))

**Methionine adenosyltransferase I/III, considered as the hepatic S-adenosylmethionine synthesizing isoenzyme, is here identified in most rat tissues both in the cytoplasm and the nucleus. Nuclear localization is the preferred distribution observed in extrahepatic tissues, where the protein appears bound to the nuclear matrix. A battery of mutants has been used in several cell lines to decipher the determinants involved in methionine adenosyltransferase subcellular localization. The results demonstrate the presence of two partially overlapping areas at the C-terminal end of the protein involved both in cytoplasmic retention and nuclear localization. The nuclear enzyme is found in the minimal oligomeric assembly required for activity, although inactive constructs retain nuclear localization and matrix binding. Moreover, nuclear accumulation of active oligomers correlates with an increase in histone H3K27 trimethylation, a modification related with gene repression, whereas methylation levels are reduced upon inactive mutant accumulation.**

Control of gene expression, synthesis of adrenaline or phospholipids such as phosphatidylcholine are some examples of processes involving S-adenosylmethionine (AdoMet)-dependent methylations (1). AdoMet also parti-

cipates in other important reactions such as those catalyzed by SAM radical proteins (i.e. biotin synthesis) or, upon decarboxylation, in spermidine and spermine synthesis (2,3). In fact, all the radicals surrounding the AdoMet sulfur atom can be donated, as well as the carboxyl and amino groups of the methionine and the ribosyl moiety (4,5). Thus, the number of processes involving AdoMet has been calculated to be as large as that of reactions using ATP. This small positively charged compound is synthesized from methionine and ATP in a singular reaction catalyzed by methionine adenosyltransferases (MATs)(6). These enzymes are present in the cytoplasm of eukaryotic cells (2), albeit reactions using this compound exhibit a wider subcellular distribution. Transfer of AdoMet to other cell compartments is therefore needed and carried out by specific transporters (7). Changes in AdoMet levels have been detected in several diseases, ranging from Parkinson (8) to alcohol liver cirrhosis (9). However, a direct correlation between AdoMet levels and pathology was only obtained by generation of *MAT1A* knockout mice, which spontaneously develop hepatocellular carcinoma (HCC)(10).

Sequences for MAT catalytic subunits are highly conserved in all organisms (11), except in Archaea (12). This strong conservation is also observed at the structural level, with monomers composed by three domains formed by non-

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

consecutive stretches of the sequence (13). General properties of these proteins include their association into oligomers to form the intersubunit active sites and their tripolyphosphatase activity. In mammals, three isoenzymes have been detected, one ubiquitous (MAT II) and two others considered liver-specific (MAT I and III). MAT II is believed to be a heterotetramer ( $\alpha 2\beta$ )<sub>2</sub>, where  $\alpha 2$  is the catalytic and  $\beta$  the regulatory subunit, encoded by the *MAT2A* and *MAT2B* genes, respectively (14). On the other hand, MAT I is a homotetramer and MAT III a homodimer of a different  $\alpha 1$  subunit, 396 amino acids long, and codified by the *MAT1A* gene (2). These isoenzymes differ in their affinities for methionine, an important fact in human liver, where a 48% of the ingested amino acid is metabolized (2). MAT I/III are the main forms in adult hepatocytes, whereas MAT II is the prevalent fetal enzyme (15). Moreover, the expression pattern is also altered in carcinogenesis (16,17), during liver regeneration (18,19), and after glucocorticoid stimulation (20). In addition, reductions in MAT I/III activity were shown in animal models of toxicity leading to GSH depletion (21,22) or enhancing nitric oxide levels (23). Surprisingly, two patients expressing truncated MAT $\alpha 1$  subunits exhibit impaired hepatic MAT activity, together with neurological symptoms (24), thus suggesting a key role for MAT I/III in extrahepatic tissues. In order to shed light on these effects we performed the present work that, to the best of our knowledge, describes for the first time the nearly ubiquitous tisular distribution of MAT I/III, along with its presence in the cell nucleus. In addition, the results allowed characterization of the structural features that contribute to subcellular localization and demonstrated the correlation of nuclear localization with specific methylations marks, whose alteration may lead to disease development.

### **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

**RNA isolation and RT-PCR.** Rat tissues were excised and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using the Tri-Reagent (Sigma) and following manufacturer's instructions. The primers used for RT-PCR were 5'-ATGGACCTGTGGATGGC-3' and 5'-TGGCC TCCAGTGTATGT-3' for MAT1A and 5'-ATGA ACGGGCAGCTCAA-3' and 5'-GCGTAACCAA GGCAATG-3' for MAT2A amplification, rendering fragments of 640 and 508 nucleotides,

respectively. Reactions were performed using the Retrotools cDNA/DNA polymerase kit (Biotools) and following manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was performed using the 18S gene as reference, the MAT1A primers and conditions previously described (25).

**Immunohistochemistry.** For the detection of MAT $\alpha 1$  on 5  $\mu$ m thick paraffin sections endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 2% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 minutes in the dark. Sections were heated in 1 mM EDTA for 45 minutes at 150°C before incubation with 1% (w/v) BSA for 30 minutes. Immunostaining was obtained by incubation with anti-MAT antiserum (26) (1:1000, v/v) for 2 hours at room temperature followed by EnVision (DAKO Corporation) incubation for 30 minutes using 3,3'-diaminobenzidine for color development following manufacturer's instructions. Counterstaining was performed with hematoxylin. For negative controls, the preimmune rabbit serum was used. Sections were photographed and analyzed using Adobe-Photoshop software.

**Constructions.** Plasmids pSSRL-BlueT2 (26) and pSSRL-T7N (27) were used to obtain the MAT1A ORF for the new constructions that were named according to their main characteristics. pTRE-tight-MAT-EGFP for expression in a CHO-K1 Tet-On cell line (BD Biosciences) was obtained by mutation of the MAT stop codon in pSSRL-Blue-T2 using the QuickChange method (Stratagene) (modified or included bases appear underlined), the primer 5'-GAAGCTTGTGTTTA GAGCCTCGAGTG-3' and its complementary. The plasmid was then Kpn I/Bam HI digested and the insert ligated on pTRE-tight-EGFP (BD Biosciences). This construct renders a fused MAT-EGFP protein including a 10 amino acid linker sequence at the C-terminal of MAT (RASSA GGSPR). pMAT-EGFP-T7N was prepared by Nde I/Eco RI digestion of pTRE-tight-MAT-EGFP and cloning of the corresponding fragment on pT7.7 for *E. coli* expression. pMAT-EGFP for expression of the fusion protein in nonregulated systems was obtained from pSSRL-Blue-T2 by Xho I/Hind III digestion with loss of the four C-terminal amino acids of MAT, two of which were recovered by cloning on pEGFP-N1 (BD Biosciences). This strategy creates a 17 amino acid linker at the C-terminal end of MAT with the sequence RILQSTVPRARDPPVAT.

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

pFLAG-MAT was prepared by cloning the MAT $\alpha$ 1 ORF, obtained by Eco RI/Bam HI digestion of pSSRL-BlueT2, into a modified pFLAG-CMV4 vector (Sigma) including a Kpn I restriction site. To produce in frame FLAG-MAT an additional base was introduced using the oligonucleotide 5'-CAAGCTTGC~~G~~CACGCGA ATTCATC-3' and its complementary. The new fusion protein includes 15 extra amino acids in its N-terminal (MDYKDDDDKLDIEFH).

p(313-396)-EGFP5x and p(351-396)-EGFP5x, including the sequences encoding for the 313-396 and 351-396 protein fragments fused to EGFP pentamers, were prepared by PCR amplification of the corresponding regions of pSSRL-BlueT2 using the sense oligonucleotides 5'-CAGCTAGCATGCGGAGAGTCCTTGTTCAGGT-3' and 5'-CAGCTAGCATGAACAAGAAC TTTGACCTCCGG-3', respectively and the antisense primer 5'-CAGCTAGCGCAAACACA AGCTTCTTGGGA-3'. Primers include Nhe I sites for further cloning in pEGFP5x generously provided by Dr. Lazebnick (28). p(393-396)-EGFP5x was obtained by mixing 1.5  $\mu$ g each of the oligonucleotides 5'-CTAGATGAAGCTTGT GTTTGGC-3' (sense) and 5'-CTAGCGCAA CACAAGCTTCAT-3' (antisense), including Nhe I sites, denaturation for 3 minutes at 95°C, annealing by cooling to 25°C in 46 minutes and phosphorylation prior to cloning in pEGFP5x. All the sense oligonucleotides designed for fragment expression include ATG initiation codons.

**Site-directed mutagenesis.** Mutants were prepared using the QuickChange method, following manufacturer's instructions. For this purpose, the mutagenic oligonucleotides included in Table 3 were used. Truncated proteins were prepared on pFLAG-MAT by introduction of stop codons at the positions of interest. The F251D inactive mutant was prepared on pFLAG-MAT using the primers described previously (13). Mutations were verified by automatic sequencing.

**Cell culture and transfections.** CHO, N2a, COS-7 and H35 cell lines were grown in DMEM (Gibco) supplemented with 10% (v/v) FBS and 2 mM glutamine, whereas HEK 293T cells were cultured in the same medium using polyornithine (Sigma) coated plates. For CHO-K1 Tet-On culture 10% (v/v) Tet system approved FBS (BD Biosciences) was used. Transfections were performed using Lipofectamine (Invitrogen). Selection of stable clones was performed in the

Tet-On system using 1-1.4 mg/ml hygromycin (BD Biosciences) after 48 hours of culture. One of the stable clones showing doxycycline (BD Biosciences) dependent expression of MAT was called CHO Tet-On MAT-EGFP and used in further studies.

**Immunofluorescence.** Direct immunofluorescence of both the CHO Tet-On stable clone (in the presence of doxycycline) and transient transfections (12000 cells on glass coverslips) was performed after 48 hours of culture. For indirect immunofluorescence, cells were fixed for 10 minutes with 2% (v/v) formaldehyde, permeabilized for 10 minutes with 0.3% (v/v) Triton X-100 and incubated 30 minutes with 10% (v/v) FBS. Cells were then incubated for 1 hour at 37°C with the monoclonal M2 anti-FLAG antibody (5  $\mu$ g/ml; Sigma), and later for 45 minutes at 37°C with an antimouse secondary antibody conjugated to Alexa fluor 488 (1:800 v/v; Molecular Probes). Glass coverslips were mounted using FluorSave™ reagent (Calbiochem). Nuclei were stained using 5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 dye (Molecular Probes) for 1 hour before fixation or direct observation. Cell imaging (0.3-0.4  $\mu$ m sections) was performed on a Leica TCS SPII Spectral microscope using a 63x/1.3 NA objective. Images were analyzed using the Leica Confocal Software (LCS Lite). Leptomycin B treatment (10 ng/ml; Calbiochem) was performed for 6 hours before fixation or direct observation. DNA methylation analysis was performed by incubation with anti 5-methyl cytosine antibody (1:1000; Calbiochem) on fixed cells treated with 4 N HCl and 0.1 % (v/v) Triton X-100 for 30 minutes.

**Protein expression.** Expression of MAT-EGFP in the Tet-On system was obtained by addition of doxycycline 0-4  $\mu$ g/ml for two days. Protein expression in *E. coli* was obtained by transformation of competent BL21(DE3) cells. Constitutive FLAG-MAT expression was obtained after 12-16 hours culture at 37°C, whereas for MAT-EGFP expression induction with 0.5 mM IPTG (Ambion) for 3 hours at 37°C at an A<sub>595</sub> of 0.3-0.4 was needed.

**Tissue and cell extracts.** Tissues were obtained from normal male Wistar rats (200 g) and preserved in liquid nitrogen. Cytosolic fractions of the tissues (20), cell cultures (29) and bacteria (27) for activity, western blot and gel filtration measurements were prepared as previously described. Separation of nuclear and cytosolic

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

fractions was carried out as described previously (30). Evaluation of histone methylation was carried out in cell extracts obtained by a 30 minutes incubation on ice in 50 mM Tris/HCl pH 7.5 containing 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) SDS, 30 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF and protease inhibitors, followed by centrifugation at 100000 x g 30 minutes.

**Nuclear matrix preparation.** Cells grown on coverslips (12 mm) were fixed with 2% (v/v) formaldehyde for 10 minutes, washed with PBS and incubated with CSK buffer (10 mM Pipes pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM sucrose) containing 0.5% (v/v) Triton X-100 for 15 minutes. This solution was replaced by CSK buffer including 1% (v/v) NP-40 and 0.5% (w/v) sodium deoxycholate for 15 minutes, followed by a 1 minute treatment with 300 mM imidazole. Chromatin elimination was performed by RNase-free/DNase treatment (500 U/ml; Roche) in CSK buffer for 1 hour at 37°C, followed by 2 minutes incubation with 250 mM ammonium sulfate. Cells were then incubated for 1 minute with 2M NaCl in CSK buffer without sucrose and fixed with 3.7% (v/v) formaldehyde for 10 minutes before immunostaining.

**Gel filtration chromatography.** Samples of MAT-EGFP, FLAG-MAT and their controls from either bacterial (1-2 mg) or eukaryal cytosols (1 mg) were injected on a Superose 12 HR 10/30 gel filtration column (GE Healthcare) and elution, MAT activity measurements (100 µl) and Dot-Blot analysis (10 µl) performed as previously described (31). The protein standards (Sigma) used and their elution volumes were as follows: Dextran Blue (2000 kDa), 8.69 ml; apoferritin (443 kDa), 9.87 ml; β-amylase (200 kDa), 11.34 ml; alcohol dehydrogenase (150 kDa), 12.07 ml; carbonic anhydrase (29 kDa), 15.12 ml; and ATP (0.551 kDa), 19.26 ml.

**SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotting.** Denaturing gel electrophoresis was performed on 10% SDS-PAGE gels under reducing conditions, using the Laemmli buffer system. Samples containing 80, 40 or 5 µg of tissue, cellular or bacterial cytosols, respectively, were loaded per lane. Histone methylation was detected using 10 µg/lane of cell extracts. Immunoblotting analysis was carried out as described previously (26) using anti-MAT (1:10000), anti-FLAG (5 µg/ml; Sigma), anti-EGFP (1:5000; BD Biosciences), anti-cJun

(1:1500; Santa Cruz), anti-TBP (1:1000; Santa Cruz), anti-α-Tubulin (1:10000; Sigma), anti-trimethyl H3K4 (0.1 µg/ml; Upstate), anti-trimethyl H3K9 (1:2000; Upstate) or anti-trimethyl H3K27 (1 µg/ml; Upstate) antibodies, as required. Protein bands were visualized using Western Lightning™ chemiluminescence reagent (Perkin Elmer).

**Immunoprecipitation.** Nuclear and cytoplasmic fractions (400 µl) were incubated o/n at 4°C with anti-FLAG M2 Affinity Gel (40 µl; Sigma). After three washes using TBS, the samples were boiled 10 minutes in Laemmli sample buffer including 100 mM DTT, microfuged for 1 minute at 10000 x g and the supernatants loaded on SDS-PAGE gels.

**Determination of methionine adenosyltransferase activity.** MAT activity was measured as described by Gil et al. (20) using 160 µl of cytosolic samples or 100 µl of gel filtration fractions and 5 mM concentrations of both ATP and methionine.

**Protein concentration determination.** The protein concentration of the samples was measured using the Bio-Rad protein assay kit and bovine serum albumin as the standard.

**Sequence analysis and molecular modeling.** Analysis of MATα1 sequence in search for putative localization and export signals was performed using the programs NetNES (32) and PredictNLS (33) and the PSort II server, whereas for molecular modeling the Swiss-PdbViewer (Glaxo Smithkline R & D) was used.

## RESULTS

### **Expression of MAT1A RNA and MATα1 protein shows a wide distribution.**

MATα1 was detected in the cytosol of all rat tissues examined by western blot using an anti-MAT I/III polyclonal antiserum. The liver protein signal was the strongest and those of heart, lung and skeletal muscle showed the lowest levels (Fig. 1A). Noteworthy, a double band was consistently observed in all extrahepatic tissues. The same anti-MAT antiserum was used for immunohistochemistry and again signals for MAT I/III were detected in all the tissues tested, except in endothelium, smooth muscle and connective tissue of the visceral walls (Fig. 1B and Table 1). Among the cell types clearly labeled, hepatocytes, Purkinje cells, renal tubule, bronchiolar and spermatogenic

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

epithelial cells and pancreatic acini cells could be identified. In contrast to the generally accepted cytoplasmic distribution of the protein, nuclear staining was a general feature observed in the nonhepatic cells, but also in hepatocytes. Moreover, the strongest liver signals were detected in the periportal area with a decreasing gradient of staining towards the perivenous area (data not shown). Confirmation of the broad expression of MAT1A was obtained by RT-PCR using total RNA purified from the same rat tissues in combination with specific oligonucleotides for MAT1A or MAT2A amplification (Fig. 1C). All the samples showed signals corresponding to both cDNAs, except for aorta that only showed MAT2A signal. Real-time PCR quantification confirmed the highest MAT1A expression in liver, demonstrated intermediate levels in lung, pancreas and kidney and faint signals in the rest of the tissues tested (Fig. 1D). Thus, expression of MAT1A cannot be longer considered liver specific.

**MAT $\alpha$ 1 locates to cytoplasm and nucleus.** In order to confirm the subcellular distribution observed by immunohistochemistry, several MAT constructions were prepared and their behavior analyzed in various cell lines by confocal fluorescence microscopy. The constructions include either FLAG or EGFP tags at the N- (FLAG-MAT) or C-terminal ends (MAT-EGFP) of the MAT $\alpha$ 1 ORF, respectively (Fig. 2A). Western blot analysis showed expression of the proteins in bacterial and cellular extracts with the expected mobilities: 48 kDa (wild type MAT $\alpha$ 1), 50 kDa (FLAG-MAT) and 78 kDa (MAT-EGFP)(Fig. 2B). All constructions were active and retained oligomerization capacity upon expression in *E. coli* (Table 2), but their expression level was much lower than that of the wild type protein. The association state of the fusion proteins was found to be dimeric by gel filtration chromatography (150 and 90 kDa for MAT-EGFP and FLAG-MAT, respectively), the minimum required for catalysis as the active sites locate in the subunit interface. Peaks for the controls containing *E. coli* MAT appeared in volumes corresponding to approximately 180 kDa, and hence their activity profiles partially overlap with MAT-EGFP and FLAG-MAT (data not shown). Precise identification of the elution position was obtained by Dot blot using anti-MAT I/III antiserum. Thus, the fusion forms of MAT I/III are

active oligomers, their sizes being larger than that required for diffusion through the nuclear pore.

Transient transfections of both FLAG-MAT and MAT-EGFP constructs were analyzed in several cell lines (CHO-K1, N2a, COS-7, H35 and HEK 293T), in addition to a stable doxycycline-inducible MAT-EGFP clone prepared in CHO cells. In all cases cells demonstrated strong cytoplasmic fluorescence along with a lighter nuclear signal that overlapped with Hoechst staining (Fig. 3A). The use of the stable clone allowed detection in cytoplasmic and nuclear compartments independently of the expression levels, thus indicating that nuclear localization of exogenous MAT is not due to saturation effects (Fig. 3B). Moreover, the nuclear MAT signal was excluded from presumptive nucleoli. The results obtained by in vivo and indirect fluorescence were consistent, thus excluding artifacts due to cell fixation or the influence of the tag localization in the protein structure. Indirect immunofluorescence of isolated hepatocytes showed a similar distribution pattern to that observed in the cell lines and by immunohistochemistry (Fig. 3C). In addition, subcellular fractionation followed by western blot analysis confirmed the presence of MAT $\alpha$ 1 subunits in the nuclear and cytosolic fractions of several cell lines (Fig. 3D). The purity of these fractions was assessed by detection of cJun and  $\alpha$ -Tubulin as nuclear and cytoplasmic markers, respectively. Therefore, our results confirm the nuclear localization of MAT $\alpha$ 1 as a general feature in all cell types used.

**Analysis of MAT $\alpha$ 1 sequence and structure in search for localization determinants.** Commonly, transport to different subcellular compartments is dependent on the presence of protein targeting signals and several programs have been developed to search for the presence of this type of sequences in any given protein. Among them, we have analyzed MAT $\alpha$ 1 sequence using NetNES, PredictNLS and PSort II, neither of which identified nuclear export (NES) or localization signals (NLS) in this protein. Only a stretch at the C-terminal end of the protein comprising V360-L367 showed a low score for a possible NES, but NetNES consider it below its confidence levels. In fact, addition of the CRM1 inhibitor leptomycin B to the transfected cells induced no changes in MAT $\alpha$ 1 distribution (data not shown). These results do not support the presence of classical signals of transport, but they

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

do not exclude other mechanisms or other determinants of localization.

MAT $\alpha$ 1 sequence contains a considerable number of lysine and arginine residues at the C-terminal end (16.7% of the last 96 amino acids). Some of these residues appear paired and exposed at the protein surface (Figs. 2C,D), out of the oligomerization interfaces. A first approach to check for the possible implication of this part of the molecule in subcellular localization was to prepare C-terminal deletions on FLAG-MAT (Fig. 2C). These truncated forms correspond to proteins lacking: 1) the last four residues, including one of the lysines in the last basic pair (FLAG-MAT K393X); 2) an 80% of the C-terminal domain including most of the C-terminal basic sequence (FLAG-MAT R313X); and 3) half of this basic area (FLAG-MAT N351X). Truncated proteins were expressed in both *E. coli* and the mammalian cell lines used in this study and their production confirmed by detection of bands with the expected mobilities (39.5, 44 and 50 kDa)(Fig. 4A). Determination of their oligomeric association state was precluded due to the reduced expression levels attained and low MAT activity was measured (Table 2). Confocal microscopy and subcellular fractionation revealed nuclear accumulation of the three truncated proteins as compared to the control (Figs. 4A,B and supplemental data Tables S1, S2). These results suggest that the C-terminal domain of MAT $\alpha$ 1 is involved in cytoplasmic retention, but the existence of a NLS in the truncated protein or exposure of a NLS otherwise buried in the subunit structure cannot be excluded (supplemental data Fig. S1). To distinguish among these possibilities the fragments deleted were fused to EGFP5x and their behavior analyzed (Fig. 4C). The size of these fusion proteins precluded diffusion through the nuclear pore, and hence they would be retained in the cytoplasm unless these fragments included signals for targeting to a different subcellular location. In vivo fluorescence revealed cytoplasmic accumulation in all the cases as compared to EGFP5x and NLS-tagged EGFP3x, and in contrast to the behavior of the truncated proteins. Thus, the involvement of MAT $\alpha$ 1 C-terminal in cytoplasmic retention seems feasible.

In parallel, the role of the basic residues at the C-terminal domain was explored by point mutation, an approach that induced minimum structural perturbations. For this purpose, only those lysine or arginine residues exposed at the

protein surface were selected for alanine substitution (Fig. 2D). Mutants were prepared in both FLAG-MAT and MAT-EGFP plasmids in order to avoid artifacts due to either fixation or masking by the fusion of EGFP (27 kDa). All the mutants exhibited MAT activity and were able to oligomerize as studied in *E. coli* overexpressing extracts, their dimer/tetramer ratio depending on the protein concentration as previously described for wild type MAT I/III (Table 2). Confocal fluorescence microscopy revealed that mutations at positions 313, 340, 341, 344, 368, 369, 392 and 393 elicited similar behavior of both constructs (Fig. 5A). A reduction in nuclear MAT $\alpha$ 1 content was observed for K340A, K341A, R344A and K393A that was especially clear for R344A and K393A, whereas R313A, K368A, K369A and K392A tended to accumulate in the nucleus (Fig. 5A and supplemental data Table S1). Subcellular fractionation of the total culture confirmed this behavior for most of the mutants (Fig. 5B and supplemental data Table S2). Thus, looking at the subunit structure (Fig. 2D), mutants related to nuclear localization are next to those involved in cytosolic retention. Noteworthy, whereas K393A accumulates in the cytoplasm, deletion of the 393-396 stretch resulted in increased nuclear signal, therefore highlighting the role of residues 394-396 in cytosolic retention. Moreover, the behavior exhibited by the K392A mutant also corresponds to a cytosolic retention signal, hence pointing to a possible overlap between areas involved in cytosolic retention and nuclear localization at the C-terminal end of the MAT $\alpha$ 1 chain. Thus, nuclear localization is related to the triangular area comprised by residues 340, 344 and 393 (including 341), whereas cytoplasmic retention is determined by the area delimited by residues 313, 368, 369 and 392 that shows partial spatial overlap at K393 and the 394-396 stretch (Fig. 2D). These results suggested the presence of structural rather than sequence-based localization determinants in MAT $\alpha$ 1 subunits.

**MAT $\alpha$ 1 subunits localize to the nuclear matrix.** Confocal microscopy showed exclusion of MAT $\alpha$ 1 from the nucleoli in all the cell lines tested (Fig. 3A). To get further insight on the precise subnuclear distribution CHO and COS-7 cells were transfected with pFLAG-MAT, fixed and extracted with detergents and high salt in order to obtain the nuclear matrix. Indirect immunofluorescence showed the presence of MAT $\alpha$ 1 at

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

nuclear speckles as shown by colocalization with signals of an anti-SC35 antibody (Fig. 6). Additionally, other constructions used in this study were also checked for their putative association to the nuclear matrix. The results indicated that none of the C-terminal deletions precluded nuclear matrix association, and hence suggested that determinants for this binding may locate in other domains of the protein.

**Nuclear MAT $\alpha$ 1 subunits associate into dimers whose accumulation correlates with specific methylations.** Two different association levels of MAT $\alpha$ 1 subunits have been described in the cytoplasm, tetramers and dimers. The nuclear localization of MAT $\alpha$ 1 subunits may or may not be related to AdoMet synthesis, for which oligomerization is needed. In order to clarify this point cotransfections using FLAG-MAT and MAT-EGFP were performed, and the nuclear and cytoplasmic fractions isolated. Expression of both types of tagged subunits was demonstrated by western blot of the input fractions with anti-FLAG and anti-EGFP antibodies, and the purity of the subcellular fractions assessed with anti-cJun and anti- $\alpha$ -Tubulin antibodies (Fig. 7). Nuclear and cytosolic fractions were immunoprecipitated with anti-FLAG Affinity Gel and the immunoprecipitates further analyzed by western blot with an anti-EGFP antibody. The presence of a band showing the correct size for MAT-EGFP indicates that MAT $\alpha$ 1 subunits appear as oligomers, at least dimers, in the nucleoplasm, and hence preserving AdoMet synthesizing capacity. However, no MAT activity could be measured in the nuclear extracts due both to the low enzyme expression in this compartment and the presence of detergents in the extraction buffers.

In order to get insight the function of MAT $\alpha$ 1 in the nuclear compartment, the effect of different constructions on nuclear methylations was evaluated. Overexpression of FLAG-MAT produced significant increases in histone H3 trimethylation levels at positions K4, K9 and K27 (Fig. 8A), as well as in DNA methylation (data not shown). These effects were not observed upon transfection of the inactive mutant F251D, although it also distributed among cytoplasm and nucleus as shown by both confocal microscopy and subcellular fractionation (Fig. 5A,B) and retained nuclear matrix binding capacity (Fig. 6). Moreover, only K27me3 methylation levels correlated with the preferred subcellular

distribution of the mutants (Fig. 8B). Hence, cells transfected with mutants with primary nuclear distribution (K368A and K369A) showed increased H3K27me3, whereas those expressing mutants of preferred cytoplasmic location (R344A and K393A) exhibited levels comparable to those of the wild type protein. In addition, expression of the inactive F251D mutant further reduced these specific methylation levels to those of the mock transfected cells. The results thus suggested that nuclear MAT $\alpha$ 1 is in its active oligomeric assembly to contribute for specific methylations, although preservation of AdoMet synthesizing capacity is not a prerequisite for nuclear localization.

## **DISCUSSION**

Mammalian MAT activity has been shown to be ubiquitous, but much higher in liver than in any other tissue. This fact was ascribed to the presence of specific hepatic isoenzymes known as MAT I and III. However, this specificity was questioned when their presence in pancreas was reported (34). Now we show that the distribution of these isoenzymes is nearly ubiquitous in normal rat tissues. The presence of a double band in western blots of extrahepatic tissues may indicate a certain degree of cross-reactivity of the antibody used with MAT $\alpha$ 2, although no such pattern was previously reported (20,26,29). Thus, these results were confirmed using additional techniques. Previous attempts to detect MAT1A mRNA by Northern blot in extrahepatic tissues failed to do so (35), and hence we used specific primers against either of the catalytic MAT subunits and RT-PCR for detection. The data further demonstrated a wider expression for MAT1A, resembling that of western blot and immunohistochemistry experiments. Moreover, detection of MAT $\alpha$ 1 in extrahepatic tissues showed staining of the nuclear compartment, an observation that was later confirmed in several cell lines overexpressing two types of fusion proteins and also observed in normal hepatocytes. Additionally, the large hepatic AdoMet production (~8 g/day in humans) requires a constant supply of ATP (2). Such a requirement is consistent with the periportal distribution of the protein, which correlates to the more aerobic areas of the tissue, where oxidative energy metabolism takes place (36).

Analysis of MAT $\alpha$ 1 sequence showed no evidence of classical mono- or bipartite NLSs (37).

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

However, this fact does not exclude the existence of other less known determinants such as hydrophobic rich (38,39), conformationally dependent (40-42) and PY NLSs (43) or piggyback transport mechanisms (44). The fact that several sets of paired basic residues occur at the C-terminal end of the protein led us to focus on this part of the molecule. The use of truncated MAT $\alpha$ 1 subunits and fusion of these fragments to multiple EGFP reporters confirmed the importance of this segment in subcellular localization. However, the fact that MAT domains are formed from nonconsecutive stretches of the sequence makes independent folding unfeasible (13), and hence the structure and folding of the truncated subunits (especially R313X and N351X), as well as that of the fragments could differ strongly from those in the native protein. In addition, it should be taken into account that in many cases redundant NLSs have been observed (45) and the importance of the protein context in which these signals are placed (46). To overcome these problems single mutants of exposed basic residues at the C-terminal were studied, and their behavior allowed discrimination of two areas with opposite character. One, delimited by residues 340-341-344-393 involved in nuclear transport and another, 313-368-369-392, involved in cytoplasmic retention. The high conservation observed in these residues among vertebrate MATs highlights the importance of this part of the structure and its role, the exceptions being K340 and the presence in MAT $\alpha$ 2 of an additional basic residue in the 392-396 stretch.

Although the sets of residues determining localization are scattered along the C-terminal domain sequence, they are placed close in the three dimensional structure of the monomers, thus raising the possibility of a topological distribution similar to that of classical NLSs (40,47). However, this does not seem to be the case for MAT $\alpha$ 1 as distances between analogous positions differ in more than 2Å. Areas determining cytosolic or nuclear MAT $\alpha$ 1 localization partially overlap in the structure, and hence the function of either one may be regulated by post-translational modification or interaction with to date unknown partners. Modification by nitric oxide is among the known mechanisms to act on NLSs (48) and is known to occur on MAT $\alpha$ 1 in vivo (23). However, nitrosylation occurs on cysteine 121 located at the loop of access to the active site, out of the C-terminal domain (23), and hence of the areas

related to subcellular localization. The existence of other post-translational modifications on this enzyme has not been studied in vivo, although in vitro phosphorylation at T342 has been shown (49). On the other hand, cytosolic retention determinants are not well characterized and no consensus sequences have been postulated. In our case, the data allow definition of areas including nonconsecutive stretches of the C-terminal domain as responsible for both nuclear and cytoplasmic localization, thus suggesting conformational determinants.

The role of MAT isoenzymes in AdoMet synthesis and the need of this metabolite for methylation of nuclear components may be linked to the presence of MAT $\alpha$ 1 in that compartment. The positive correlation among nuclear localization of MAT $\alpha$ 1 oligomers, the active form of the enzyme, and trimethylation of histone H3K27 suggests its role to guarantee an adequate supply of the methyl donor for specific modifications and is further supported by the results with the inactive mutant (F251D). Although the small size of AdoMet, and even its positive charge, may not preclude diffusion through the nuclear pore (50), the possibility exists that its high instability requires in situ synthesis for gene repression, a process traditionally related to H3K27 trimethylation (51). Normal development depends on maintenance of the correct methylation pattern, whereas tumor progression is associated with aberrant methylation (52). Thus, situations in which AdoMet levels are reduced may lead to disease development, as has been demonstrated in animal feeding of methionine deficient diets (53,54) and *MAT1A* knockout mice (10), where hepatitis and HCC occur. In these models, as well as in pancreatitis (34), a switch between MAT1A and MAT2A expression is detected that is not enough to cope with all the AdoMet needs of the cell, and suggests a specific role for MAT I/III in epigenetic modification. This effect could acquire additional importance if, in spite of their high homology (11), MAT $\alpha$ 2 cannot substitute for the nuclear role of MAT $\alpha$ 1 in gene repression. Such a potential specific function is further supported by the minimal MAT $\alpha$ 1 expression detected in most tissues, where the protein is mainly nuclear.

Proteins of the intermediary metabolism are been identified in the nucleus, although their role in this compartment has not always been established. Among them, S-adenosylhomocystei-



## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

ne hydrolase, whose nuclear presence has been ascribed to the need for S-adenosylhomocysteine removal during cap methylation to avoid inhibition of these reactions (55). However, other examples link nuclear location to the ability of the proteins to exhibit additional functions (moonlighting), properties that can be acquired e.g. by oligomer dissociation (56). Detection of nuclear MAT $\alpha$ 1 oligomers points towards its role in AdoMet synthesis, although the wide divergence in methionine affinity among tetramers and dimers may be related to the capacity to display other functions. This is especially challenging for the dimer, whose physiological contribution to AdoMet synthesis is minimal and that accumulates in liver pathologies (57). A reduced production of AdoMet has been also considered the cause of demyelination in the few patients expressing truncated MAT $\alpha$ 1 forms ~350 residues long (24). However, the hepatic expression of the enzyme was difficult to conciliate with the neurological symptoms to date. Our results showing expression of MAT1A in almost every tissue, together with its preferred nuclear localization outside the liver, now offer additional possibilities to understand this pathological behaviour that may rely not only on

the hetero-oligomerization with MAT $\alpha$ 2, but also in its effects on specific repression marks or its binding to the nuclear matrix.

## REFERENCES

1. Cantoni, G. L. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 435-451
2. Mato, J. M., Alvarez, L., Ortiz, P., and Pajares, M. A. (1997) *Pharmacol. Ther.* **73**, 265-280
3. Fontecave, M., Mulliez, E., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 506-511
4. Dolnick, B. J., Angelino, N. J., Dolnick, R., and Sufrin, J. R. (2003) *Cancer Biol. Ther.* **2**, 364-369
5. Van Lanen, S. G., Kinzie, S. D., Matthieu, S., Link, T., Culp, J., and Iwata-Reuyl, D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 10491-10499
6. Chiang, P. K., and Cantoni, G. L. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 4506-4513
7. Horne, D. W., Holloway, R. S., and Wagner, C. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 201-206
8. Cheng, H., Gomes-Trolin, C., Aquilonius, S. M., Steinberg, A., Lofberg, C., Ekblom, J., and Oreland, L. (1997) *Exp. Neurol.* **145**, 580-585
9. Lu, S. C., Huang, Z. Z., Yang, H., Mato, J. M., Avila, M. A., and Tsukamoto, H. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, G178-185
10. Lu, S. C., Alvarez, L., Huang, Z. Z., Chen, L., An, W., Corrales, F. J., Avila, M. A., Kanel, G., and Mato, J. M. (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**, 5560-5565
11. Sanchez-Perez, G. F., Bautista, J. M., and Pajares, M. A. (2004) *J. Mol. Biol.* **335**, 693-706

*Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

12. Graham, D. E., Bock, C. L., Schalk-Hihi, C., Lu, Z. J., and Markham, G. D. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4055-4059
13. Gonzalez, B., Pajares, M. A., Hermoso, J. A., Alvarez, L., Garrido, F., Sufrin, J. R., and Sanz-Aparicio, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 363-375
14. Kotb, M., and Geller, A. M. (1993) *Pharmacol. Ther.* **59**, 125-143
15. Gil, B., Casado, M., Pajares, M. A., Bosca, L., Mato, J. M., Martin-Sanz, P., and Alvarez, L. (1996) *Hepatology* **24**, 876-881
16. Cai, J., Sun, W. M., Hwang, J. J., Stain, S. C., and Lu, S. C. (1996) *Hepatology* **24**, 1090-1097
17. Cai, J., Mao, Z., Hwang, J. J., and Lu, S. C. (1998) *Cancer Res.* **58**, 1444-1450
18. Huang, Z. Z., Mao, Z., Cai, J., and Lu, S. C. (1998) *Am. J. Physiol.* **275**, G14-21
19. Frago, L. M., Gimenez, A., Rodriguez, E. N., and Varela-Nieto, I. (1998) *FEBS Lett.* **426**, 305-308
20. Gil, B., Pajares, M. A., Mato, J. M., and Alvarez, L. (1997) *Endocrinology* **138**, 1251-1258
21. Corrales, F., Ochoa, P., Rivas, C., Martin-Lomas, M., Mato, J. M., and Pajares, M. A. (1991) *Hepatology* **14**, 528-533
22. Corrales, F., Gimenez, A., Alvarez, L., Caballeria, J., Pajares, M. A., Andreu, H., Pares, A., Mato, J. M., and Rodes, J. (1992) *Hepatology* **16**, 1022-1027
23. Avila, M. A., Mingorance, J., Martinez-Chantar, M. L., Casado, M., Martin-Sanz, P., Bosca, L., and Mato, J. M. (1997) *Hepatology* **25**, 391-396
24. Chamberlin, M. E., Ubagai, T., Mudd, S. H., Wilson, W. G., Leonard, J. V., and Chou, J. Y. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 1021-1027
25. Delgado, M., Perez-Miguelsanz, J., Garrido, F., Rodriguez-Tarduchy, G., Perez-Sala, D., and Pajares, M. A. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2080-2090
26. Mingorance, J., Alvarez, L., Sanchez-Gongora, E., Mato, J. M., and Pajares, M. A. (1996) *Biochem. J.* **315**, 761-766
27. Alvarez, L., Mingorance, J., Pajares, M. A., and Mato, J. M. (1994) *Biochem. J.* **301**, 557-561
28. Faleiro, L., and Lazebnik, Y. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 951-959
29. Sanchez-Gongora, E., Pastorino, J. G., Alvarez, L., Pajares, M. A., Garcia, C., Vina, J. R., Mato, J. M., and Farber, J. L. (1996) *Biochem. J.* **319**, 767-773
30. Cernuda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J., and Perez-Sala, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 35530-35536
31. Sanchez-Perez, G. F., Gasset, M., Calvete, J. J., and Pajares, M. A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 7285-7293
32. la Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 527-536
33. Cokol, M., Nair, R., and Rost, B. (2000) *EMBO Rep.* **1**, 411-415
34. Lu, S. C., Gukovsky, I., Lugea, A., Reyes, C. N., Huang, Z. Z., Chen, L., Mato, J. M., Bottiglieri, T., and Pandol, S. J. (2003) *FASEB J.* **17**, 56-58
35. Alvarez, L., Asuncion, M., Corrales, F., Pajares, M. A., and Mato, J. M. (1991) *FEBS Lett.* **290**, 142-146
36. Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996) *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 179-203
37. Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991) *Cell* **64**, 615-623
38. Chen, M. H., Ben-Efraim, I., Mitrousis, G., Walker-Kopp, N., Sims, P. J., and Cingolani, G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 10599-10606

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

39. Polizotto, R. S., and Cyert, M. S. (2001) *J. Cell Biol.* **154**, 951-960
40. Sessler, R. J., and Noy, N. (2005) *Mol. Cell* **18**, 343-353
41. Zhu, J., Qiu, Z., Wiese, C., Ishii, Y., Friedrichsen, J., Rajashekara, G., and Splitter, G. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 16038-16044
42. Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5339-5354
43. Cansizoglu, A. E., Lee, B. J., Zhang, Z. C., Fontoura, B. M., and Chook, Y. M. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 452-454
44. Turpin, P., Ossareh-Nazari, B., and Dargemont, C. (1999) *FEBS Lett.* **452**, 82-86
45. Majerciak, V., Yamanegi, K., Nie, S. H., and Zheng, Z. M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 28365-28378
46. Friedrich, B., Quensel, C., Sommer, T., Hartmann, E., and Kohler, M. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8697-8709
47. Rodriguez, M., Benito, A., Tubert, P., Castro, J., Ribo, M., Beaumelle, B., and Vilanova, M. (2006) *J. Mol. Biol.* **360**, 548-557
48. Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H., and Sawa, A. (2005) *Nat. Cell Biol.* **7**, 665-674
49. Pajares, M. A., Duran, C., Corrales, F., and Mato, J. M. (1994) *Biochem. J.* **303**, 949-955
50. Kramer, A., Ludwig, Y., Shahin, V., and Oberleithner, H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 31437-31443
51. Bhaumik, S. R., Smith, E., and Shilatifard, A. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1008-1016
52. Richards, E. J., and Elgin, S. C. (2002) *Cell* **108**, 489-500
53. Shivapurkar, N., and Poirier, L. A. (1983) *Carcinogenesis* **4**, 1051-1057
54. Zhou, W., Alonso, S., Takai, D., Lu, S. C., Yamamoto, F., Perucho, M., and Huang, S. (2008) *PLoS ONE* **3**, e3390
55. Radomski, N., Kaufmann, C., and Dreyer, C. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 4283-4298
56. Jeffery, C. J. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8-11
57. Cabrero, C., Duce, A. M., Ortiz, P., Alemany, S., and Mato, J. M. (1988) *Hepatology* **8**, 1530-1534

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

E. R. Reytor was a fellow of RCMN C03/08, PI05/0563 and the I3P Program of the CSIC. The authors wish to thank Dr. E. Sanchez-Góngora for preliminary experiments, Dr. Y. Labzeczuk for providing the multiple EGFP vectors and Dr. J. P. Garcia Ruiz for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia (BMC2002-0243 and BFU2005-00050 to MAP and SAF2006-03489 to DPS) and the Instituto de Salud Carlos III (RCMN C03/08 to MAP and RD07/0064/0007 to DPS).

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. MAT $\alpha$ 1 expression in rat tissues.** Panel A shows a western blot of cytosolic fractions (80  $\mu$ g per lane) from several rat tissues developed with anti-MAT I/III antiserum. Panel B includes preimmune (a, c, e, g, i and k) and immune staining (b, d, f, h, j and l) of tissue sections, where a discontinuous line indicates the contour of typical cells (the bar corresponds to 10  $\mu$ m). Panel C shows RT-PCR results using

## *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

specific primers for MAT1A (I) and MAT2A (II) amplification. Panel D presents data of MAT1A mRNA abundance in triplicate  $\pm$  SD, using the kidney levels as reference for graphical purposes.

**Figure 2. MAT $\alpha$ 1 constructions used in this work and their oligomeric structures.** Panel A depicts a schematic view of the constructions used in this work, including the sequences of the C-terminal end of MAT $\alpha$ 1 and the linkers. Panel B shows a representative western blot (10  $\mu$ g/lane) of MAT $\alpha$ 1 (lane 1), FLAG-MAT (lane 2) and MAT-EGFP (lane 3) expression in the soluble fraction of *E. coli*. The calculated molecular masses appear on the left side of the figure. Panel C shows the sequence of the last 97 residues of the C-terminal domain, indicating the position of the exposed basic amino acids (red), the positions at which stop codons were introduced (arrows) and the putative low score NES sequence (underlined). Panel D depicts views of the tetramer and dimer structures (subunits A and B in palecyan and salmon, respectively) highlighting the residues mutated in this work, as well as the 394-396 stretch.

**Figure 3. Subcellular distribution of MAT $\alpha$ 1.** Panel A shows expression of MAT-EGFP (left) and FLAG-MAT (right) in different cell lines, as well as colocalization with nuclear staining. Panel B illustrates MAT-EGFP expression in the CHO Tet-On MAT-EGFP stable clone as a function of doxycycline concentration by both western blot and confocal microscopy. Panel C includes preimmune and immune staining of hepatocytes using anti-MAT I/III antiserum, the overlap with nuclear staining appearing in white. Panel D shows a representative western blot of nuclear and cytoplasmic fractions obtained from COS-7 cells and hepatocytes developed with anti-FLAG, anti-EGFP or anti-MAT antibodies, as indicated. Anti-cJun and anti- $\alpha$ -Tubulin antibodies were used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively.

**Figure 4. Subcellular distribution of truncated forms and C-terminal fragments.** Panel A shows a representative western blot of nuclear and cytoplasmic fractions (80  $\mu$ g/lane) of FLAG-MAT truncated proteins expressed in COS-7 cells with their calculated masses appearing on the right. Confocal microscopy images of the truncated proteins (panel B) and the C-terminal fragments fused to pentameric EGFP (panel C) are also shown. Colocalization with Hoechst nuclear staining appears in white. Panel C also includes images of pentameric EGFP and the NLS-EGFP3x controls.

**Figure 5. Distribution of mutant proteins in subcellular compartments.** Panel A shows confocal microscopy images of CHO cells overexpressing the FLAG-MAT and MAT-EGFP mutants used in this study, the Hoechst overlapping nuclear signal appearing in white. Panel B includes representative western blots of COS-7 subcellular fractions for the mutants developed with anti-FLAG, anti- $\alpha$ -Tubulin and anti-TBP. Dotted lines indicate positions at which lanes from the same blot have been cropped.

**Figure 6. MAT $\alpha$ 1 locates at the nuclear matrix.** Nuclear matrix preparations of CHO cells expressing wild type, truncated and the F251D mutant of MAT $\alpha$ 1 were analyzed by confocal microscopy. FLAG-MAT signals (green) overlap with SC-35 (red) a nuclear matrix marker, colocalization appearing in orange.

**Figure 7. Nuclear MAT $\alpha$ 1 association state.** Contranfections of COS-7 cells with pFLAG-MAT and pMAT-EGFP were performed to analyze the association state shown by MAT $\alpha$ 1 subunits in the nucleus. The figure shows immunoprecipitation of FLAG-MAT followed by western blot detection of MAT-EGFP of nuclear (N) and cytosolic (C) fractions. The expression of both types of MAT $\alpha$ 1 subunits, as well as the purity of the fractions, is demonstrated by western blot of the input samples.

**Figure 8. Effects of MAT $\alpha$ 1 overexpression on histone H3 trimethylation.** FLAG-MAT and selected mutants were overexpressed in CHO cells to evaluate the impact exerted on histone H3 trimethylation levels at residues K4, K9 and K27. Panel A shows the effect of wild type MAT overexpression as compared to the empty plasmid on these three methylations. Panel B shows the effects on K27

### *Methionine adenosyltransferase I/III nuclear localization*

trimethylation of MAT mutants showing preferred cytoplasmic (R344A and K393) and nuclear localizations (K368A and K369A), as well as those of the inactive F251D mutant. The histograms show the results corrected against  $\alpha$ -Tubulin (panel A) and MAT levels (panel B) of seven independent experiments  $\pm$  SEM \* indicates  $p < 0.05$ .

**Keywords:** Cytosolic retention, hepatocellular carcinoma, histone methylation, methionine adenosyltransferase, nuclear localization, S-adenosylmethionine synthetase.

**Table 1**

**Immunohistochemistry staining and subcellular distribution.** The organs listed in the table were extracted from adult Wistar rats, fixed and analyzed by immunohistochemistry using preimmune (control) and anti MAT I/III antisera. The most relevant cell types showing positive (+) and negative (-) staining for MAT $\alpha$ 1 among cytoplasm and nuclei appear summarized in the table.

<b>Organ/tissue type</b>	<b>Anti-MAT signal</b>		
	<b>Structure/cell type</b>	<b>Cytoplasm</b>	<b>Nucleus</b>
Liver	Hepatocytes	+	+
Brain	Cerebellar Purkinje cells	+	+
Kidney	Epithelium of renal tubules	+	+
Lung	Bronchiolar epithelium	+	+
Epididymus	Spermatogenic epithelium	-	+
Digestive system	Mucosa	-	+
Pancreas	Pancreatic acini cells	+	+
Heart	Muscle cells	-	+
Skeletal muscle	Muscle cells	-	+
Blood vessels	Endothelium	-	-
Smooth muscle	Visceral and vascular wall	-	-
Connective tissue	Visceral and vascular wall	-	-

**Table 2**

**Methionine adenosyltransferase activity of the protein variants used in this study.** All the protein variants used in this study were expressed in *E. coli* BL21(DE3) and the soluble fractions isolated to determine their activity and oligomerization state. The table shows activity results from a typical experiment carried out in triplicate  $\pm$  SD, and the association state detected by gel filtration chromatography (T = tetramer and D = dimer). Proteins with low or very low expression levels (\*) and constructs needing IPTG induction (\*\*) appear labeled in the table. ND, not determined

Construction		MAT activity (nmol/min/mg)	Association level
pSSRL-T7N		21.8 $\pm$ 4.30 <sup>**</sup>	T, D
pMAT-EGFP-T7N <sup>*</sup>		1.41 $\pm$ 0.01 <sup>**</sup>	D
pFLAG-CMV4-MAT <sup>*</sup>		2.36 $\pm$ 0.10	D
pFLAG-CMV4		0.51 $\pm$ 0.03	-
pFLAG-CMV4-MAT	R313A	3.89 $\pm$ 0.17	T
	K340A	5.35 $\pm$ 0.22	T, D
	K341A	3.07 $\pm$ 0.37	T, D
	R344A	3.19 $\pm$ 0.09	T, D
	R357A	1.30 $\pm$ 0.09	T
	R363A	3.66 $\pm$ 0.10	T, D
	K368A	1.39 $\pm$ 0.09	T, D
	K369A	2.64 $\pm$ 0.30	T, D
	K374A	3.63 $\pm$ 0.47	T, D
	K392A	2.35 $\pm$ 0.03	T, D
	K393A	1.12 $\pm$ 0.03	T, D
	R313X <sup>*</sup>	0.62 $\pm$ 0.04	ND
	N351X <sup>*</sup>	0.73 $\pm$ 0.04	ND
	K393X <sup>*</sup>	0.86 $\pm$ 0.03	ND

**Table 3**

**Oligonucleotides used for mutagenesis.** The table lists the oligonucleotides (sense only) used for mutagenesis in this work.

<b>Mutated plasmid</b>	<b>Residue change</b>	<b>Primers (5'-3'; sense only)</b>
<b>pMAT-EGFP</b>	<b>R313A</b>	GGCTGGGCTCTGCGCCAGAGTCCTTGTTTC
	<b>K340A</b>	CCTACGGAACTTCCGCCAAGACTGAGCGAGAG
	<b>K341A</b>	CTACGGAACTTCCAAGGCCACTGAGCGAGAGC
	<b>R344A</b>	CCAAGAAGACTGAGGCAGAGCTACTAGAGG
	<b>R357A</b>	CAAGAACTTTGACCTCGCCCCGGGTGTTATTGTC
	<b>R363A</b>	CCGGGTGTTATTGTCGCCGACTTGGATCTGAAG
	<b>K368A</b>	GGGACTTGGATCTGGCCAAGCCCATCTACCAG
	<b>K369A</b>	GACTTGGATCTGAAGGCCCCCATCTACCAGAAG
	<b>K374A</b>	GCCCATCTACCAGGCCACTGCATGCTATGG
	<b>K392A</b>	CCTGGGAGGTCCCCGCCAAGCTTCGAATTC
	<b>K393A</b>	GGGAGGTCCCCAAGGCCCTTCGAATTCTGC
<b>pFLAG-MAT</b>	<b>R313A</b>	GGCTGGGCTCTGCGCCAGAGTCCTTGTTTC
	<b>K340A</b>	CCTACGGAACTTCCGCCAAGACTGAGCGAGAG
	<b>K341A</b>	CTACGGAACTTCCAAGGCCACTGAGCGAGAGC
	<b>R344A</b>	CCAAGAAGACTGAGGCAGAGCTACTAGAGG
	<b>R357A</b>	CAAGAACTTTGACCTCGCCCCGGGTGTTATTGTC
	<b>R363A</b>	CCGGGTGTTATTGTCGCCGACTTGGATCTGAAG
	<b>K368A</b>	GGGACTTGGATCTGGCCAAGCCCATCTACCAG
	<b>K369A</b>	GACTTGGATCTGAAGGCCCCCATCTACCAGAAG
	<b>K374A</b>	GCCCATCTACCAGGCCACTGCATGCTATGG
	<b>K392A</b>	CCTGGGAGGTCCCCGCCAAGCTTGTGTTTTAG
	<b>K393A</b>	GGGAGGTCCCCAAGGCCCTTGTGTTTTAGAGC
	<b>R313X</b>	GGCTGGGCTCTGCTAGAGAGTCCTTGTTTC
	<b>N351X</b>	GAGCTACTAGAGGTTGTGTGAAAGAACTTTGACCTCCG
	<b>K393X</b>	GGGAGGTCCCCAAGTAGCTTGTGTTTTAG



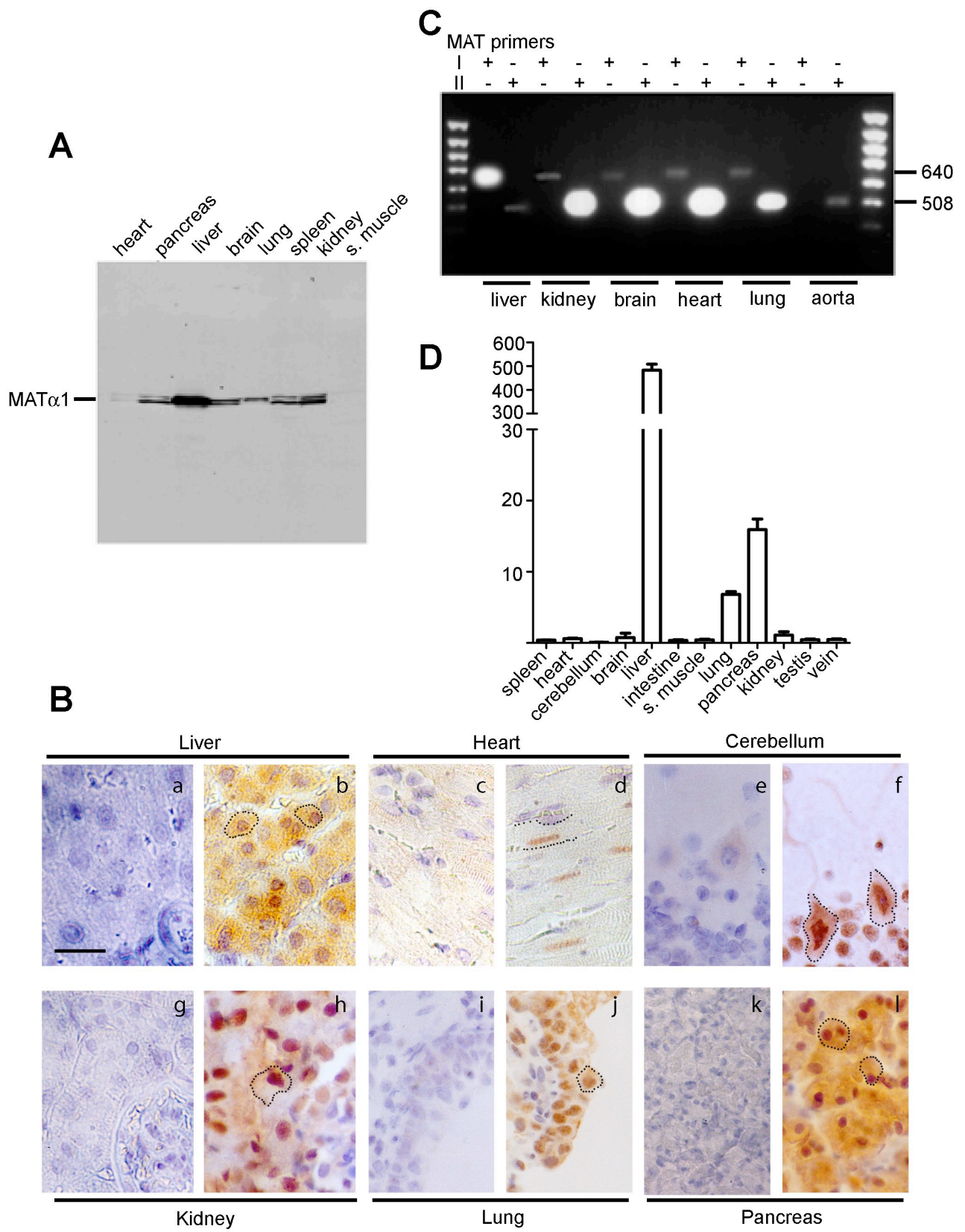
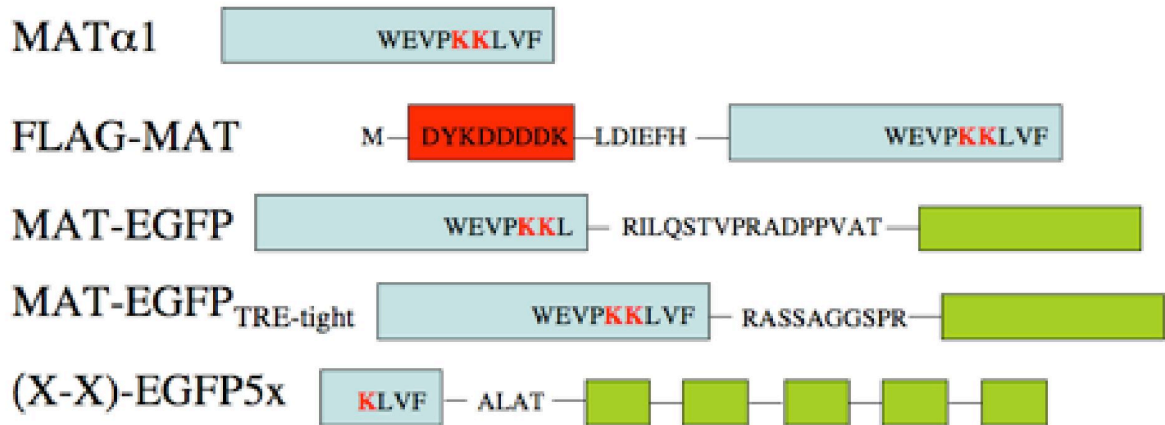
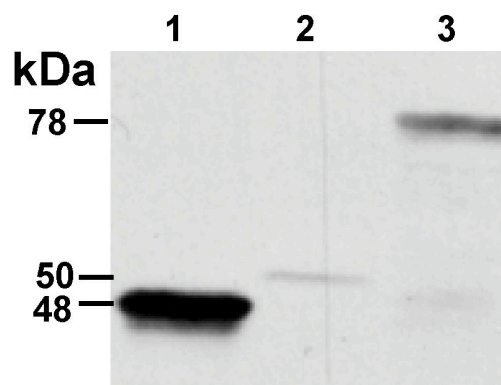
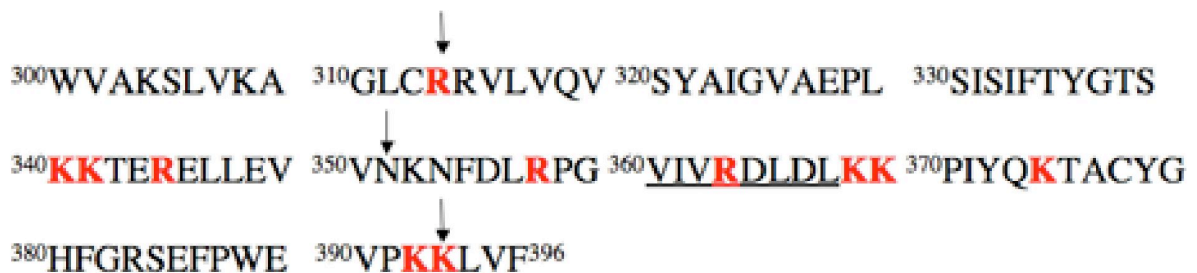
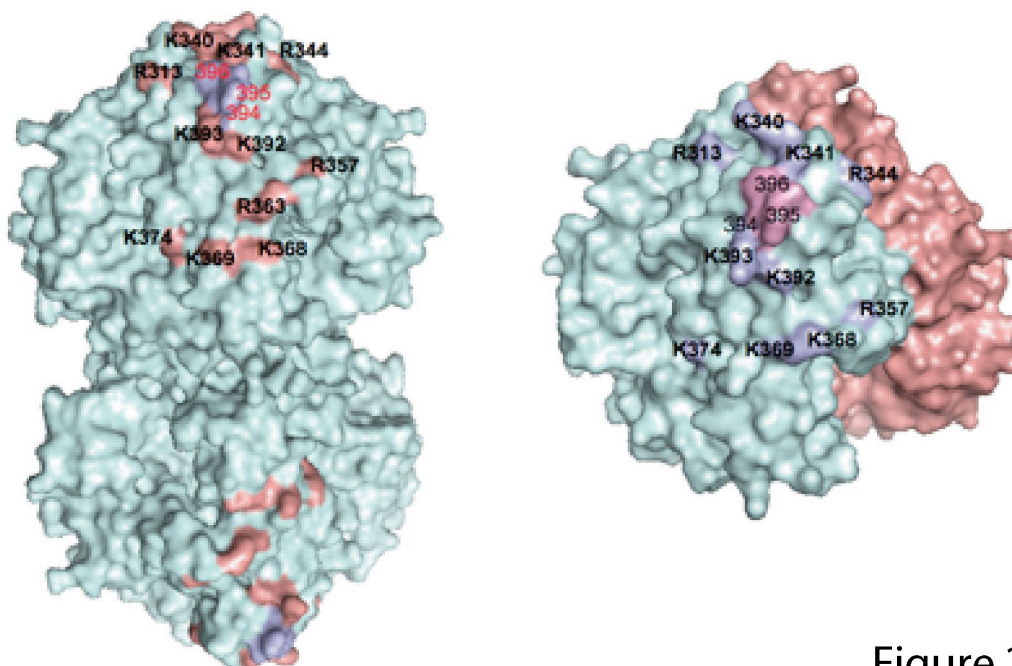


Figure 1, Page 17

**A****B****C****D**

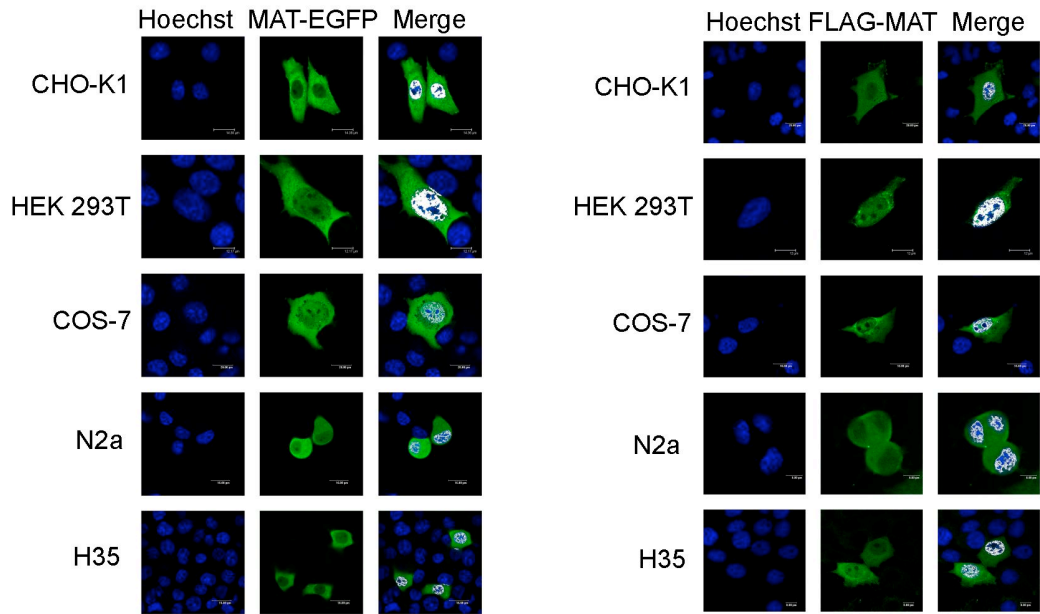
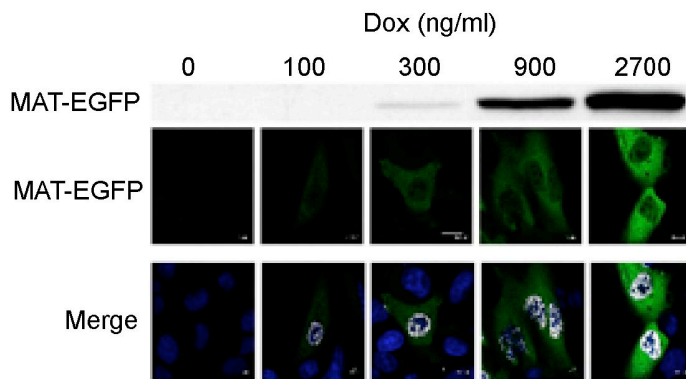
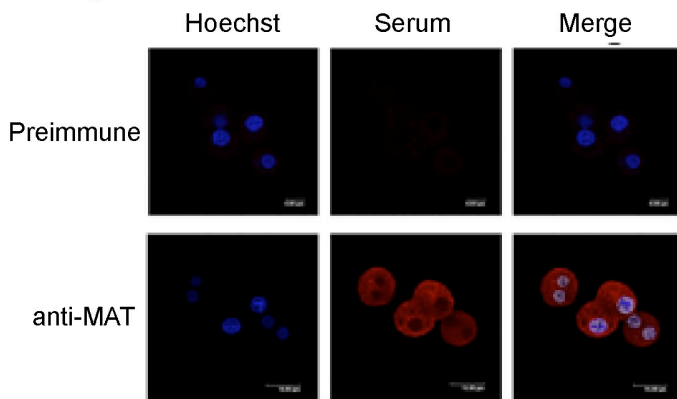
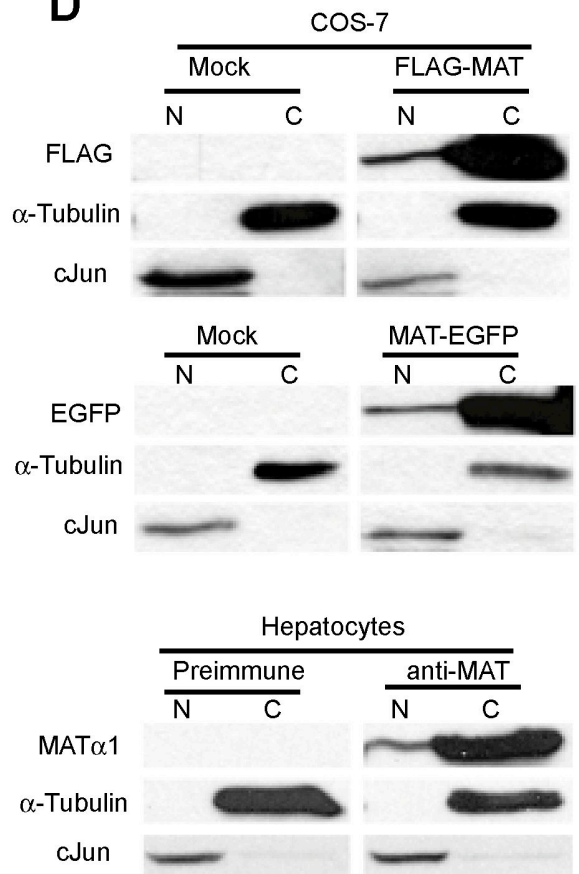
**A****B****C****D**

Figure 3, Page 19

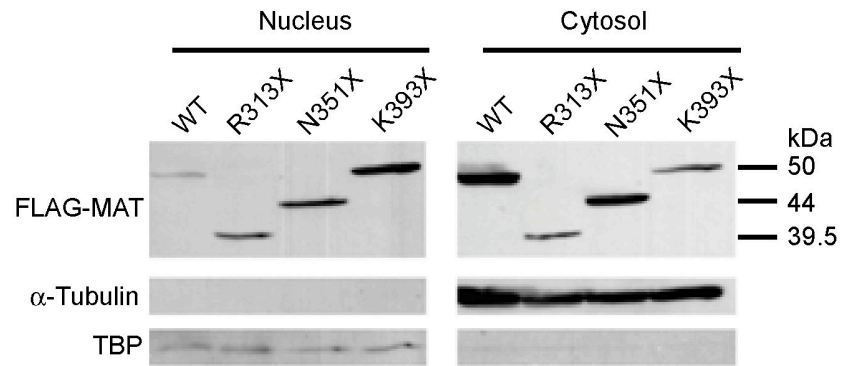
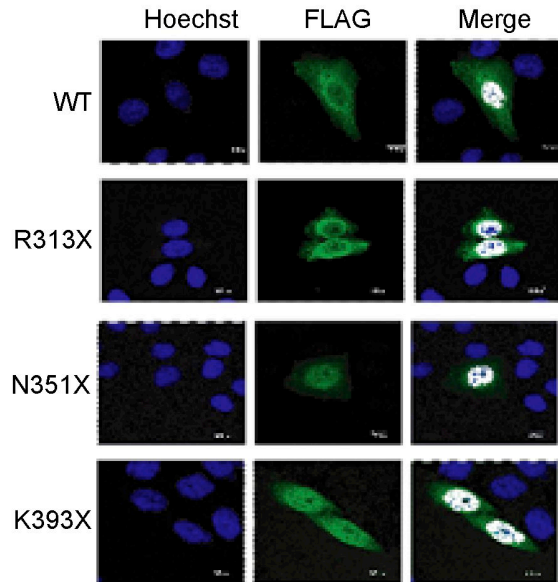
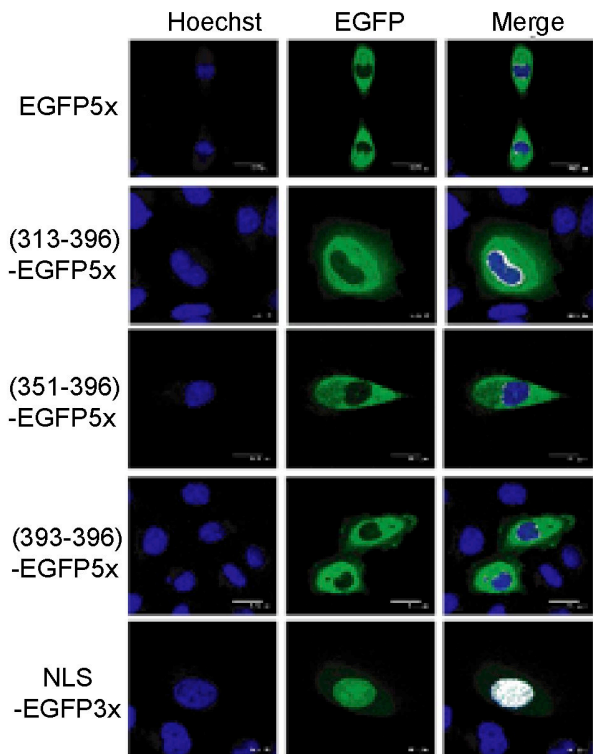
**A****B****C**

Figure 4, Page 20



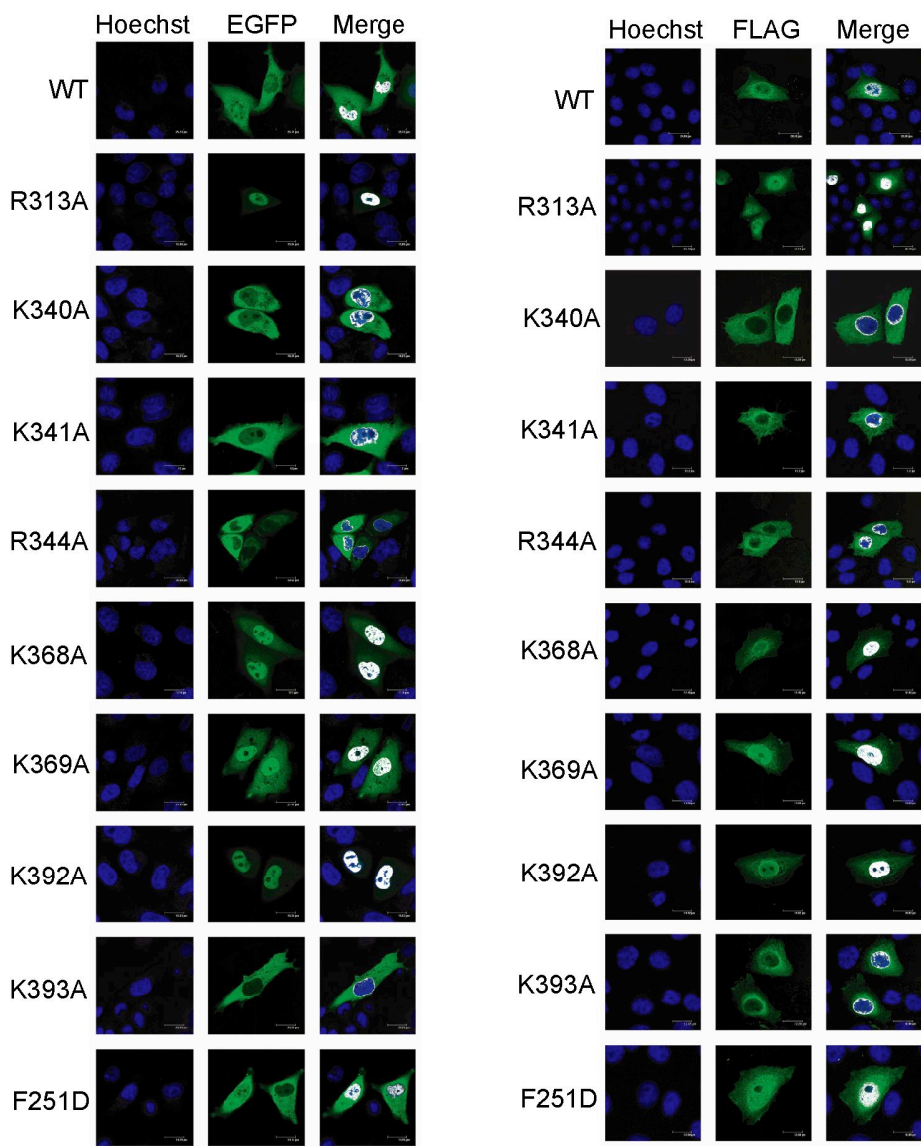
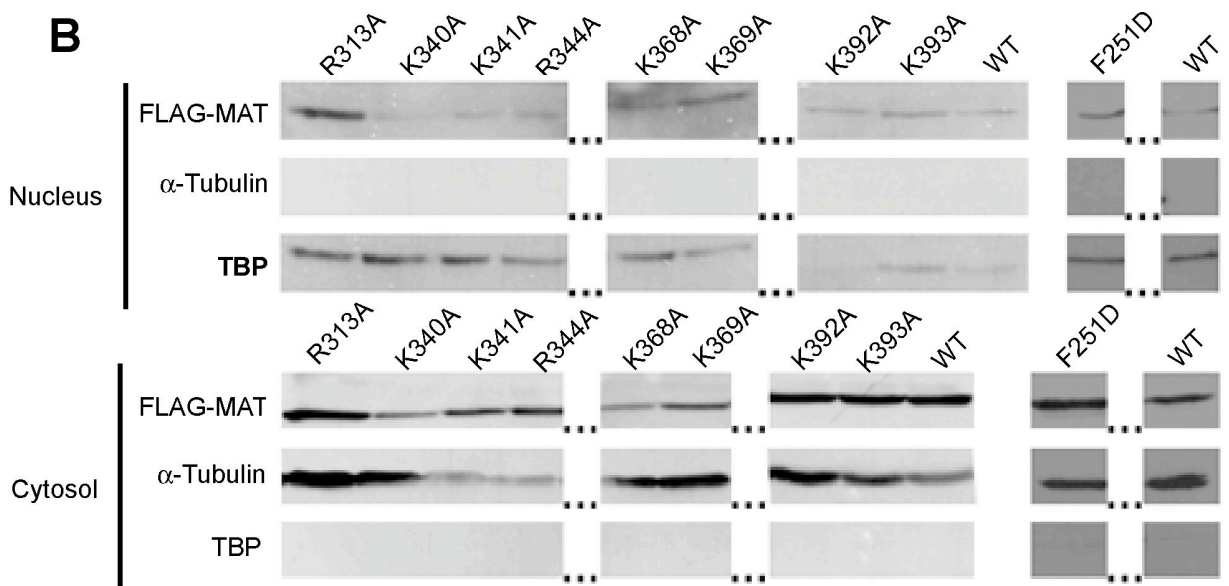
**A**

Figure 5  
Page 21

**B**

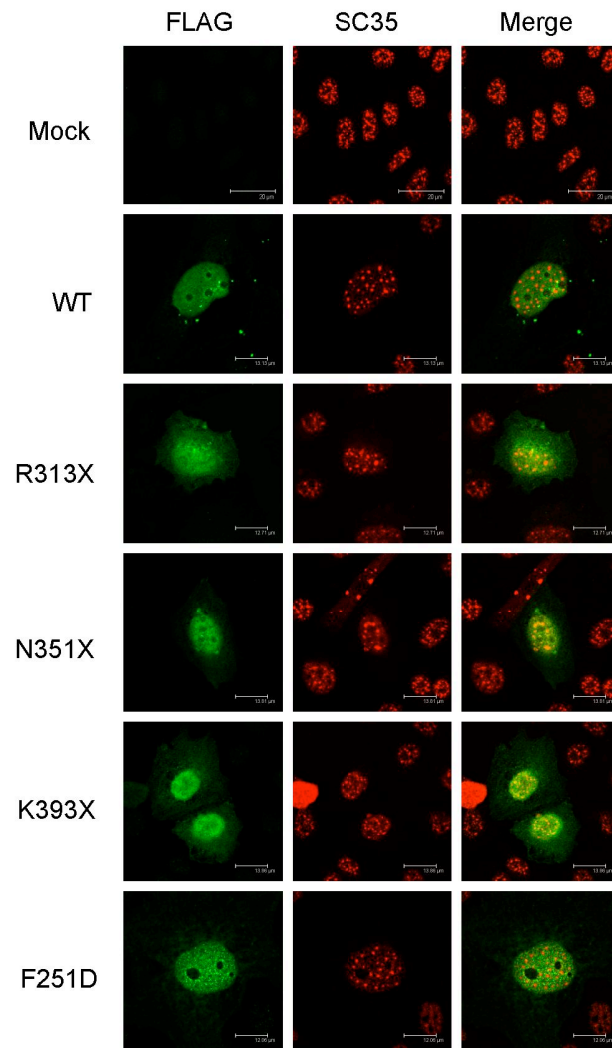


Figure 6, Page 22

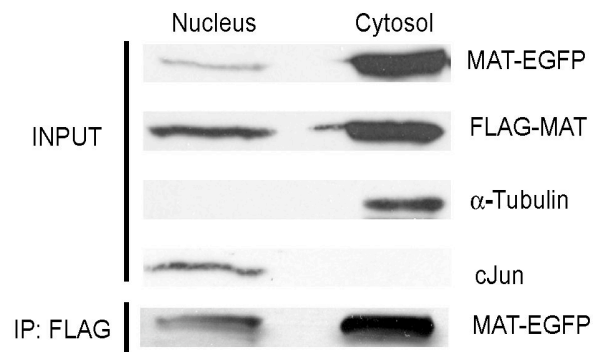
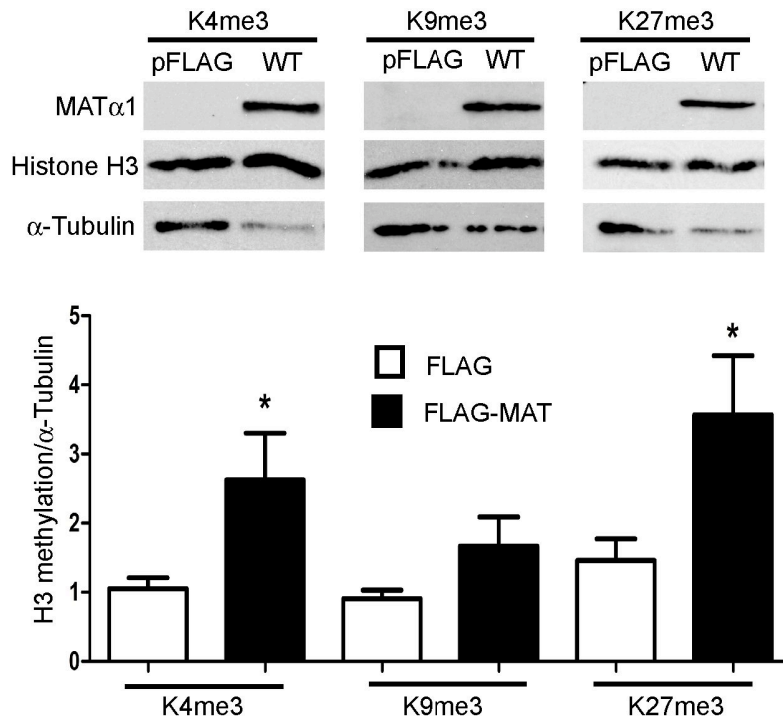
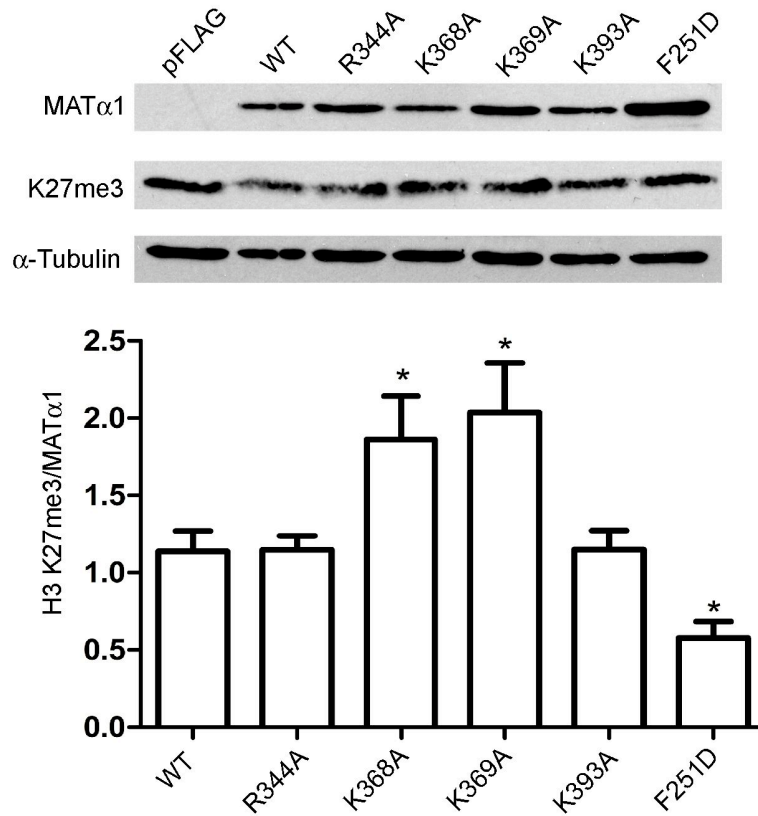


Figure 7, page 23

**A****B**



**Supplemental data to the manuscript by Reytor et al. entitled “Nuclear Localization of Methionine Adenosyltransferase I/III Correlates with Histone H3K27 Methylation Changes”**

This appendix includes quantification of confocal microscopy images (Table S1) and subcellular fractionation (Table S2). In addition, a figure showing the impact of truncations in the dimer structure is also included (Fig. S1).

**Figure S1. Impact of truncations in the MAT $\alpha$ 1 dimer structure.** The figure shows views of the MAT $\alpha$ 1 dimer structure (pdb 1QM4), where the areas deleted in the truncated subunits (K393X, N351X and R313X) generated for this work are indicated in red. Subunits A and B appear in palecyan and salmon, respectively.

**Table S1**

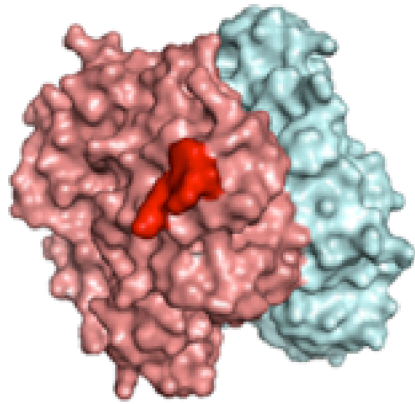
**Classification of the mutants according to their maximal fluorescence ratio.** The fluorescence in nucleus and cytoplasm was measured for each cell using the Leica Confocal Software (LCS Lite), and the ratio between nuclear and cytoplasmic signals established. Cells were classified according to this ratio as: N>C with a ratio above 1.2; N=C when the ratio was  $1 \pm 0.2$ ; C>N if the ratio was lower than 0.8.

	N>C			N=C			C>N	
	N/C ratio	% cells		N/C ratio	% cells		N/C ratio	% cells
<b>R313A-EGFP</b>	3.89 ± 1.23	100	<b>EGFP</b>	1.19 ± 0.16	100	<b>MAT-EGFP</b>	0.44 ± 0.19	72
<b>FLAG-R313A</b>	1.58 ± 0.30	38				<b>FLAG-MAT</b>	0.53 ± 0.19	39
<b>K368A-EGFP</b>	1.83 ± 0.44	83				<b>K340A-EGFP</b>	0.65 ± 0.18	65
<b>FLAG-K368A</b>	1.69 ± 0.37	41				<b>FLAG-K340A</b>	0.49 ± 0.17	76
<b>K369A-EGFP</b>	2.18 ± 0.49	78				<b>K341A-EGFP</b>	0.73 ± 0.10	60
<b>FLAG-K369A</b>	1.88 ± 0.48	74				<b>FLAG-K341A</b>	0.52 ± 0.17	57
<b>K392A-EGFP</b>	4.06 ± 1.19	100				<b>R344A-EGFP</b>	0.64 ± 0.20	92
<b>FLAG-K392A</b>	1.45 ± 0.18	58				<b>FLAG-R344A</b>	0.57 ± 0.14	67
<b>FLAG-R313X</b>	2.06 ± 0.86	54				<b>K393A-EGFP</b>	0.28 ± 0.09	100
<b>FLAG-N351X</b>	2.23 ± 0.9	63				<b>FLAG-K393A</b>	0.55 ± 0.12	56
<b>FLAG-K393X</b>	2.16 ± 0.86	50				<b>(313-396)-EGFP5x</b>	0.25 ± 0.09	90
						<b>(351-396)-EGFP5x</b>	0.28 ± 0.12	86
						<b>(393-396)-EGFP5x</b>	0.34 ± 0.16	87

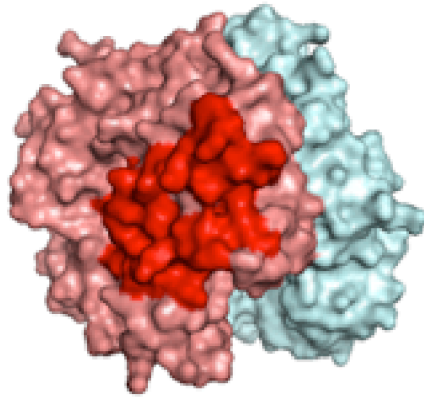
**Table S2**

**Quantification of FLAG-MAT distribution among nuclear and cytosolic fractions of COS-7 cells.** Western blots of cytosolic and nuclear fractions from total populations were analyzed using ImageJ software to quantify the distribution for each MAT mutant used in this work. The table shows the mean  $\pm$  SD of three independent experiments, as well as the ratio among signals for both compartments.

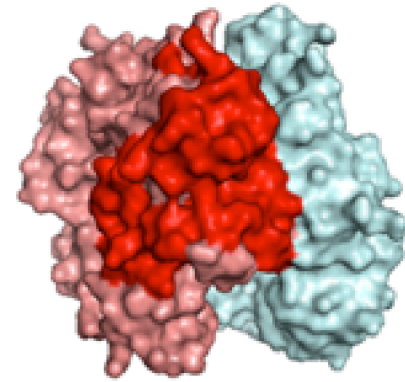
	<b>Nuclear signal</b>	<b>Cytosolic signal</b>	<b>Ratio nucleus/cytosol</b>
	<b>FLAG-MAT/TBP</b>	<b>FLAG-MAT/<math>\alpha</math>-Tubulin</b>	
<b>wt</b>	0.62 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.32	0.66
<b>R313A</b>	1.24 $\pm$ 0.74	0.57 $\pm$ 0.38	2.17
<b>K340A</b>	0.59 $\pm$ 0.22	0.49 $\pm$ 0.24	1.19
<b>K341A</b>	0.28 $\pm$ 0.09	0.96 $\pm$ 0.03	0.29
<b>R344A</b>	0.50 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.16	0.58
<b>K368A</b>	3.57 $\pm$ 0.50	1.37 $\pm$ 0.18	2.61
<b>K369A</b>	3.46 $\pm$ 0.92	0.74 $\pm$ 0.09	4.69
<b>K392A</b>	0.48 $\pm$ 0.21	0.67 $\pm$ 0.27	0.72
<b>K393A</b>	1.38 $\pm$ 0.52	1.89 $\pm$ 0.53	0.73
<b>F251D</b>	0.33 $\pm$ 0.23	0.91 $\pm$ 0.06	0.37
<b>R313X</b>	2.38 $\pm$ 0.93	0.44 $\pm$ 0.07	5.38
<b>N351X</b>	2.25 $\pm$ 0.21	0.83 $\pm$ 0.36	2.71
<b>K393X</b>	1.70 $\pm$ 0.26	0.09 $\pm$ 0.01	18.06



K393X



N351X



R313X

Figure S1, Pag 4

Short communication

# Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants

Félix Gil<sup>a</sup>, Edel Reytor<sup>a</sup>, Daniel Mariano Pérez-Filgueira<sup>a,b</sup>, José M. Escribano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, INIA, Ctra. A Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

Received 17 August 2006; received in revised form 18 October 2006; accepted 7 November 2006

## Abstract

Previous literature addressing the production of recombinant proteins in heterologous systems has consistently shown that proteins capable of forming complex structures tend to accumulate within host cells at relatively higher levels than monomeric forms. In this report, we translationally fused a 21-aminoacid long highly immunogenic peptide (2L21), derived from canine parvovirus (CPV) VP2 protein to a 41-aminoacid long tetramerization domain (TD) from the transcriptional factor p53. The chimerical DNA construction 2L21-TD was cloned in a binary plant transformation vector and used to transform *Arabidopsis thaliana* plants. Fifteen of the 25 transgenic lines obtained in the experiment showed detectable 2L21-TD RNA accumulation and from these we chose 4 to study 2L21-TD protein accumulation. Non-denaturing immunoblotting assays revealed that 2L21-TD chimeras effectively formed tetrameric complexes with yields reaching up to 12 µg/mg of soluble protein. Mice immunized by oral or intraperitoneal routes with crude protein extracts containing 2L21-TD protein were able to detect both 2L21-synthetic peptide and CPV VP2 proteins, with titers similar to those elicited by a previously reported fusion between 2L21 and the β-glucuronidase protein. These results demonstrate that multimerization directed by the small TD domain contributed to the stabilization and consequently to the accumulation of the 2L21 peptide in transgenic plants, without altering its native antigenicity and immunogenicity.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Peptide; Multimerization; Recombinant vaccines; Transgenic plants

## 1. Introduction

One of the main concerns about the production of recombinant proteins in heterologous systems regards

to the accumulation of the protein of interest. This is particularly important in proteins expressed in transgenic plants, in which problems associated with low protein yields are usually due to a combination of factors including poor protein folding and stability reduction (Ma et al., 2003; Fischer et al., 2004).

Different strategies have been described to allow the correct folding of recombinant proteins and to make them less susceptible to degradation by cellu-

\* Corresponding author at: INIA-Dto. Biotecnología, Autovía A-6 Km 7, Madrid 28040, Spain. Tel.: +34 91 347 3917; fax: +34 91 357 3107.

E-mail address: [escriban@inia.es](mailto:escriban@inia.es) (J.M. Escribano).

lar proteases. Among others, targeting xenoproteins to different cellular compartments (Conrad and Fiedler, 1998; Richter et al., 2000) and fusing them to other proteins that remain stable in the cellular environment (Gil et al., 2001; Dus Santos et al., 2002; Skosyrev et al., 2003) have been reported to improve yields of target proteins. Likewise, proteins which naturally tend to produce multimeric structures, such as virus-like particles formed by viral capsid proteins (Mason et al., 1996; Pérez-Filgueira et al., 2004; Gil et al., 2006; Varsani et al., 2006) or oligomers as is the case for cholera toxin and heat-labile enterotoxin from *E. coli* (Streatfield et al., 2003; Tacket, 2005), tend to accumulate to relatively high levels in plant cells.

Peptide antigens have usually been expressed in plants translationally fused to larger protein carriers (Gil et al., 2001; Dus Santos et al., 2002; Wigdorovitz et al., 2004) or to capsid proteins from plant virus-based vectors (Canizares et al., 2005). However, their expression as fusions to short polypeptides or as independent products, proved to be more difficult as is reflected by the practically total absence of publications or experimental data on this subject (Krebbbers and Vandekerckhove, 1990; Scitutto et al., 2002). Here, we present a strategy to enhance peptide antigen expression through its fusion to a 41 aminoacid fragment (TD) containing the tetramerization domain from the human transcription factor p53 (Sakamoto et al., 1994). Although early works utilized this self-assembling sequence in *E. coli* for oligomerization of single-chain antibodies (scFv) designed for tumor targeting (Rheinacker et al., 1996; Willuda et al., 2001), refer to the use of this domain for peptide oligomerization has not been reported yet. Similarly, other peptide sequences have been reported to enhance accumulation of proteins within plant cells, although these studies did not include fusions to other peptides (Kogan et al., 2001; Fernández-Carneado et al., 2004).

Here, we produced transgenic *Arabidopsis thaliana* plants carrying a translational fusion between the TD and a highly immunogenic 21-mer peptide (2L21) derived from the N-terminal domain of the VP2 capsid protein from the canine parvovirus (CPV) (Casal et al., 1995). Our results demonstrated that the p53 tetramerization domain mediated oligomerization of 2L21 peptide, producing stable peptide tetramers that accumulated to more than 1% of the total protein extracted from transgenic leaves. Recombinant 2L21-

TD tetramers elicited CPV-specific humoral responses when administered in mice by intraperitoneal (i.p.) or oral routes. All together these results indicate that the native antigenicity of 2L21 was preserved in the tetramers and that recombinant 2L21 oligomers were clearly immunogenic, eliciting CPV-specific humoral responses similar to those previously reported for a fusion between 2L21 and the  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -GUS) protein (Gil et al., 2001).

## 2. Results

CPV-derived 2L21 peptide and p53TD fragment coding sequences were obtained by PCR amplification using the pBI-121 2L21-GUS (Gil et al., 2001) and pCMV-p53 (Clontech, USA) plasmids as templates, respectively. A set of four primers were designed to include appropriate restriction sites at the 5' and 3' ends of the 2L21 and p53TD sequences, allowing in frame fusion of the two fragments and further cloning into an intermediate plasmid (pGemT-easy, Promega, USA). In frame start and stop codons were also added upstream and downstream the 2L21 and p53TD sequences, respectively, and the fusion gene was cloned into the pBI-121p35S/TEV binary vector, under control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (CaMV35S) and tobacco etch virus enhancer leader sequence (TEVe) (Fig. 1). The resulting pBI-2L21-TD and control pBI121 (Clontech, USA) vectors were used to transform *Arabidopsis thaliana* plants (Columbia ecotype) by floral infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58C0) as described previously (Gomez et al., 1998). Seeds obtained after the infiltration (T0) were screened using Murashige-Skoog (MS) cell culture medium (Sigma, St. Louis, MO) containing 50 mg/l of kanamycin, and those antibiotic-resistant plants (T1) were transferred to soil two weeks after germination for further analysis. Stable integration of the 2L21-TD gene was confirmed at this stage by PCR amplification performed using primers *xho*-2L21-F and *kpn*-TDR and genomic DNA from transformed lines as templates (data not shown).

Twenty-five independent kanamycin-resistant transgenic lines were finally obtained appearing similar in morphology to wild-type plants. T1 plants were selected based on their 2L21-TD expression levels and sequentially self-pollinated to obtain a T3 generation

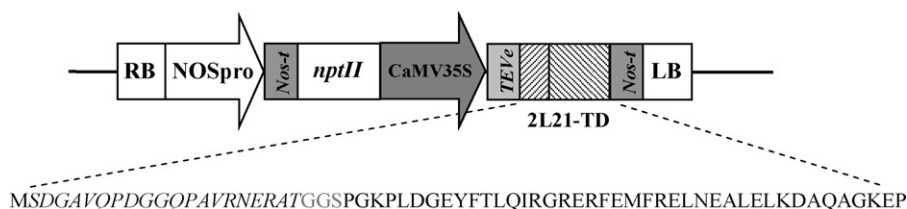


Fig. 1. Fusion of the 2L21 peptide with the p53 TD. Schematic representation of the transgene region of the pBI-2L21-TD binary vector. Fusion gene 2L21-TD was obtained by PCR as described in the text using primers: *xho-2L21-F* (5' ctcgagatgtctgatggagca 3'), *sma-2L21-R* (5' cccgggtcatcctctagctctctc 3'), *sma-TD-F* (5' cccgggcaaacactggatggag 3') and *kpn-TD-R* (5' cctagtcaccctggctcctt 3'); RB and LB, right and left borders of the T-DNA; NOSpro and NOS-t, nopaline synthase gene promoter and polyadenylation signals; *nptII*, neomycin phosphotransferase gene; CaMV35S, 35S promoter from cauliflower mosaic virus and TEVe, tobacco etch virus enhancer sequence. Amino acid sequence of the 2L21-TD is depicted below, residues for 2L21 peptide are shown in italics, fragment in grey represents a linker sequence and the minimum TD sequence within the p53-derived fragment is underlined.

that was finally used to estimate recombinant protein yields and carry out immunization experiments.

Transcription the 2L21-TD gene was analyzed by Northern Blot assays performed using total RNA extracted from leaf samples from the T1 of each transgenic line ( $n = 25$ ) and pBI121-transformed plants ( $n = 2$ ). Samples were resolved in 1.2% formaldehyde-agarose gels, transferred to Hybond-N membranes (Amersham, USA) and hybridized overnight with a P32 labelled ssDNA probe complementary to the whole 2L21-TD sequence, following standard procedures (Sambrook et al., 1989). Fifteen lines presented bands of the expected size with variable levels of intensity, probably indicating different levels of transcriptional activity that might correspond to differences in transgene copy numbers and integration sites among independent transgenic lines.

A representative Northern blot experiment is shown in Fig. 2a. Four transgenic lines presenting the highest transcriptional levels for the 2L21-TD gene were further analysed for protein expression.

Expression of the 2L21-TD fusion in transgenic plants was analysed in both denaturing and native PAGE and Western blot assays. For denaturing assays, total soluble proteins were obtained by grinding fresh leaves in extraction buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 M EDTA pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol and 2 mM phenylmethylsulphonylfluoride. Plant saps were centrifuged at  $12,000 \times g$  at 4 °C during 15 min and total soluble protein (TSP) concentrations of the resulting supernatants were measured by Bradford assay (BioRad, USA). Samples containing 40  $\mu$ g of TSP were resolved in a 15%

tricine-SDS PAGE, as previously described (Schagger and von Jagow, 1987). Gels were transferred to nitrocellulose membranes and probed using the 3C9 mAb (Ingenasa, Spain) that recognizes an epitope within the 2L21 sequence (Langeveld et al., 1994). A single band with the expected electrophoretic mobility ( $\sim 7$ –8 kDa) was readily detected in all tested plants indicating effective expression of the transgene which seemed to roughly correlate with the corresponding transcriptional levels previously registered. To test the ability of the recombinant chimeras to form oligomeric structures, native protein extracts obtained as described above but using an extraction buffer lacking EDTA and  $\beta$ -mercaptoethanol, were resolved by native 15% tricine PAGE. Immunoblotting analyses using the 3C9 mAb showed that all plant lines presented a predominant band with an electrophoretic mobility of  $\sim 28$ –30 kDa and a second band with lower intensity around 16 kDa as expected for 2L21-TD tetramers and dimers, respectively (Fig. 2c). These results indicated that most of the recombinant 2L21-TD expressed in plants was accumulated in stable tetrameric forms, with expression levels that resembled those registered in the corresponding denaturing Western blot assays. Dimeric species probably represent intermediate forms since it has been described that the native tetramers are actually constituted by dimers of two primary dimers (Sakamoto et al., 1994). In both assays, no immunoreactive bands could be detected in protein extracts from plants transformed with pBI121 plasmid. Based on these results, transgenic line #6 was selected for quantification and immunization experiments.

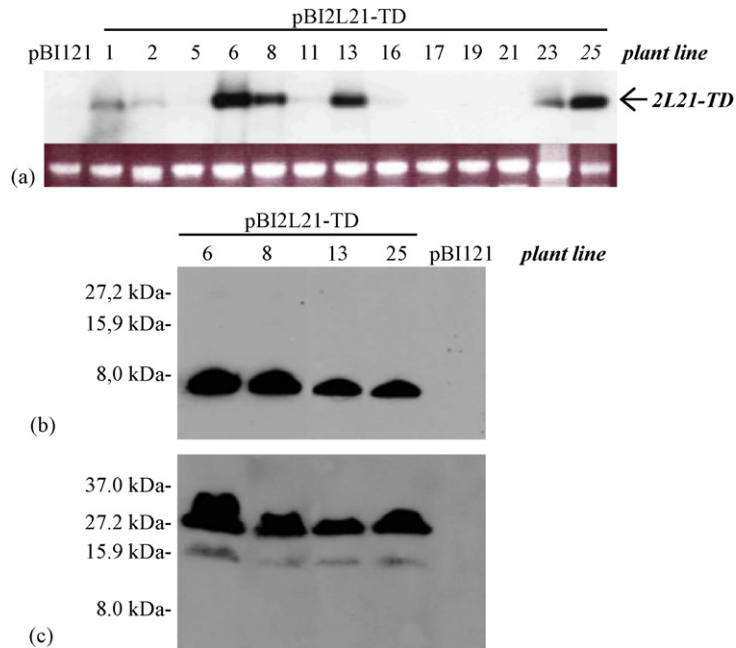


Fig. 2. Expression of the 2L21-TD polypeptide in transgenic plants. (a) Northern blot analyses for pBI-2L21-TD and pBI-121 transgenic lines. Total RNA samples (5 µg) were resolved by agarose electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and tested with a P32 labeled ssDNA probe corresponding to the whole 2L21-TD sequence. Arrow indicates the expected position for 2L21-TD transcripts and corresponding loading controls for each sample are shown below. Protein extracts from four plant lines were studied by: (b) denaturing PAGE and Western blot assays using the 3C9 mAb as detector and (c) non-denaturing PAGE and analyzed by immunoblotting using the same mAb as probe.

Western blot results presented above showed that tetrameric and monomeric forms of the fusion were immunodetected by the 3C9 mAb with approximately similar efficiency. Based on these observations, the amount of recombinant antigen produced in 2L21-TD transgenic plants was roughly estimated by coating ELISA plates with serial dilutions of a 2L21 synthetic peptide and native protein extracts from 2L21-TD transgenic line #6, and using the 3C9 mAb to detect the 2L21 peptide (data not shown). Nanograms of 2L21 synthetic peptide and micrograms of TSP from 2L21-TD transgenic leaves that produced the same ODs within a linear range (between 0.25 and 0.65 absorbance units) were determined and a correlation between them was established (correlation  $R^2 = 0.9977$ ). Using this approach we estimated that line #6 of 2L21-TD transgenic plants contained ~12 ng of 2L21 peptide per microgram of TSP (1.2%).

The immunogenicity of the plant-produced 2L21-TD was analyzed by intraperitoneal (i.p.) and oral

immunization experiments performed in mice and quantified in terms of the induction of 2L21 and VP2-specific antibodies. For i.p. immunizations, plant saps from wild-type *Arabidopsis thaliana* and plants transgenic for pBI121, 2L21-GUS (line #4, Gil et al., 2001) or 2L21-TD (line #6) were obtained by grinding fresh leaves in phosphate buffered saline pH7.4. Saps were clarified by centrifugation ( $15,000 \times g$  for 10 m) and vaccines were formulated by emulsifying clarified saps (1 mg of TSP per dose) with complete (first dose) or incomplete (subsequent boosters) Freund's adjuvant. Six weeks old female Swiss mice were immunized at days 0, 15 and 30 and serum samples were obtained 15 days after the last booster. Orally immunized mice were placed in individual cages, deprived of food 4 h before treatment and then offered 2 g of fresh leaves sprayed with 10 µg of the subunit B of cholera toxin (CTB) (Sigma, USA) dissolved in a 10% sucrose solution. This treatment was repeated five times during 3 weeks and serum samples were taken 10 days after the last immunization.



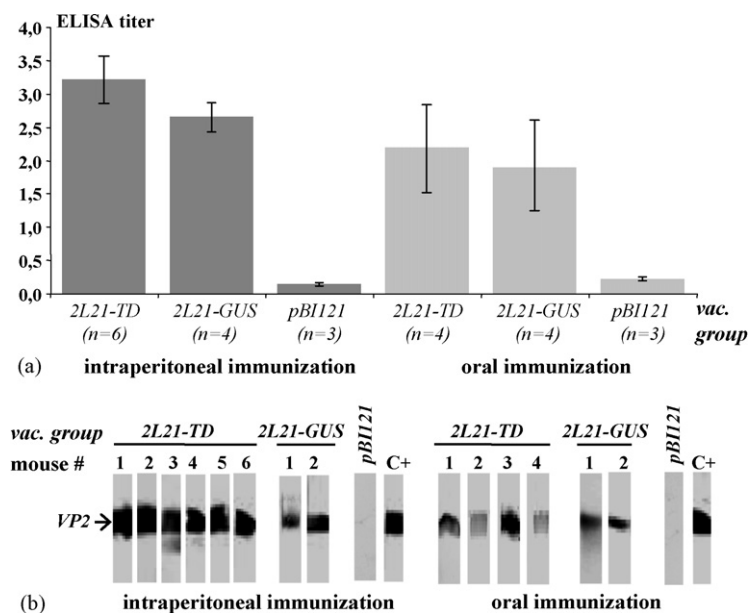


Fig. 3. Immunogenicity of the 2L21-TD antigen produced in plants. (a) Mean antibody titers obtained for each vaccination group against the 2L21 peptide; number of individuals is shown in parenthesis and standard deviations are represented as vertical lines on each bar. ELISA titers were expressed as log 10 of the reciprocal of the highest serum dilution which gave OD readings of at least twice a pool of sera from three animals immunized with extracts from wild-type plants at the same dilution. (b) Western blot assay performed on membranes carrying a recombinant VP2 from CPV expressed in baculovirus and using sera (diluted 1/100 in PBST 4% skim milk) from animals immunized with the antigens described in the text as primary antibody; (C+) positive control lanes detected using the 3C9 mAb as probe.

All serum samples were analyzed and the presence of 2L21 and VP2-specific antibodies was evaluated by ELISA and Western blot. ELISA plates were coated overnight with a synthetic 2L21 peptide (0.8  $\mu\text{g}/\text{well}$ ), incubated with serial dilutions of serum samples and detected essentially as described before (Pérez-Filgueira et al., 2000). As shown in Fig. 3a, all mice immunized with protein extracts from 2L21-TD transgenic plants presented significant titers of antibodies against the 2L21 peptide, regardless of the immunization route. For both immunization protocols, 2L21-specific antibody titers were similar in the 2L21-TD- and 2L21-GUS immunized groups. Animals immunized by the oral route presented lower and more variable titers than those vaccinated by the i.p. route (Fig. 3a), probably reflecting differences in the antigen doses delivered to animals due to the immunization protocol utilized. Sera from 2L21-GUS and 2L21-TD immunized animals were also able to recognize the 2L21 epitope within a recombinant VP2 protein produced in baculovirus (Lopez de Turiso et al., 1992), while control animals immunized with trans-

genic plants for pBI121 control vector did not show positive reactions in any of the immunoassays (Fig. 3a and b). All together these results suggested that the immunogenic and antigenic features of the 2L21 were preserved within the 2L21-TD chimera.

### 3. Discussion

Expression of peptide sequences in plants has been predominantly obtained by their fusion to larger protein carriers; their production as short peptide fragments is practically absent in literature. The experiments presented in this report demonstrated that a 65 aminoacid sequence (2L21-TD) comprising the 2L21 peptide fused to the p53 tetramerization domain can be efficiently expressed in transgenic plants. This fusion was able to produce stable tetramers of the target peptide and to reach expression levels above the usual yields for non-targeted proteins obtained in plants by nuclear transformation, reported to range between 0.01 and 0.4% of the TSP (Giddings, 2001).

Immunization experiments performed in mice using crude leaf extracts from 2L21-TD transgenic plants, demonstrated that the 2L21-TD tetramers were clearly immunogenic irrespectively of the immunization route. Interestingly, TD-derived tetramers were reported to remain stable up to 72 h after inoculation in mice (Willuda et al., 2001), a factor that may also play a role in achieving an efficient presentation of the antigen to the immune system. Importantly as well, the reported tertiary structure of the tetramer, with the four N termini spatially distant and projecting in different directions in the tetramers (Jeffrey et al., 1995), would provide proper spatial arrangement for epitope. In accordance with this, detection of the 2L21 and CPV VP2 using sera from 2L21-TD-immunized mice have shown that the antigenicity of the native 2L21 peptide was preserved in the recombinant product.

Recent reports presented fusions of 2L21 peptide to CTB in transplasmic tobaccos specifically aimed to the development of edible vaccines (Molina et al., 2004, 2005). Despite the very high levels of expression reached with this strategy, the inclusion of highly immunogenic carrier molecules as CTB may prevent the recurring use of such immunogens since immune responses generated against the carrier would eventually affect those to the target hapten (George Chandy et al., 2006; Renjifo et al., 1998). In this regard it is important to stress that the TD is a small domain (<4.9 kDa) that derives from a cellular factor that is highly conserved in vertebrates (Walker et al., 1999) and therefore presents low antigenicity. This would make the approach introduced in this paper completely general since it might be applied to different vaccination protocols and expression systems. It would even be possible to produce constructs carrying fusions between the TD and different protein sequences within a single vector, allowing expression of hetero-tetramers that would combine different peptides or polypeptides in a single molecule.

In summary, we show that a peptide product may be multimerized by a small self-associating protein domain in the transgenic plants, having the potential to induce specific humoral responses against the target sequence through different immunization routes and without altering the native characteristics of the antigen. This approach offers particular advantages for the vaccinology field, although the structural features associated with the possibility of producing stable

recombinant tetramers may have applications in other sanitary or industrial disciplines as well.

## Acknowledgements

Authors wish to thank Dr. Ignacio Moreno-Echanove and Dr. Macarena Garrido-Esteba for valuable contributions and critical reading of the manuscript.

## References

- Canizares, M.C., Nicholson, L., Lomonosoff, G.P., 2005. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. Cell Biol.* 83, 263–270.
- Casal, J.I., Langeveld, J.P., Cortes, E., Schaaper, W.W., van Dijk, E., Vela, C., Kamstrup, S., Meloen, R.H., 1995. Peptide vaccine against canine parvovirus: identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence. *J. Virol.* 69, 7274–7277.
- Conrad, U., Fiedler, U., 1998. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol. Biol.* 38, 101–109.
- Dus Santos, M.J., Wigdorovitz, A., Trono, K., Ríos, R.D., Franzone, P.M., Gil, F., Moreno, J., Carrillo, C., Escribano, J.M., Borca, M.V., 2002. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine* 20, 1141–1147.
- Fernández-Carreado, J., Kogan, M.J., Castel, S., Giralt, E., 2004. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43, 1811–1814.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R.M., 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 152–158.
- George Chandy, A., Hultkrantz, S., Raghavan, S., Czerkinsky, C., Lebens, M., Telemo, E., Holmgren, J., 2006. Oral tolerance induction by mucosal administration of cholera toxin B-coupled antigen involves T-cell proliferation in vivo and is not affected by depletion of CD25+ T cells. *Immunology* 118, 311–320.
- Giddings, G., 2001. Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 450–454.
- Gil, F., Brun, A., Wigdorovitz, A., Catala, R., Martínez-Torrecedrada, J.L., Casal, I., Salinas, J., Borca, M.V., Escribano, J.M., 2001. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett.* 488, 13–17.
- Gil, F., Titarenko, E., Terrada, E., Arcalís, E., Escribano, J.M., 2006. Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. *Plant Biotechnol. J.* 4, 135–143.
- Gomez, N., Carrillo, C., Salinas, J., Parra, F., Borca, M.V., Escribano, J.M., 1998. Expression of immunogenic glycoprotein S polypep-

- tides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249, 352–358.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S., Pavletich, N.P., 1995. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498–1502.
- Krebbers, E., Vandekerckhove, J., 1990. Production of peptides in plant seeds. *Trends Biotechnol.* 8, 1–3.
- Kogan, M.J., Dalcol, I., Gorostiza, P., Lopez-Iglesias, C., Pons, M., Sanz, F., Ludevid, D., Giralt, E., 2001. Self-assembly of the amphipathic helix (VHLPPP)<sub>8</sub>. A mechanism for zein protein body formation. *J. Mol. Biol.* 312, 907–913.
- Langeveld, J.P., Casal, J.I., Osterhaus, A.D., Cortes, E., de Swart, R., Vela, C., Dalsgaard, K., Puijk, W.C., Schaaper, W.M., Melen, R.H., 1994. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* 68, 4506–4513.
- Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Martinez, C., Ruiz de Ybanez, R., Simarro, I., Vela, C., Casal, I., 1992. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* 66, 2748–2753.
- Ma, J.K., Drake, P.M., Christou, P., 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.* 4, 794–805.
- Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K., Arntzen, C.J., 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5335–5340.
- Molina, A., Hervas-Stubbs, S., Daniell, H., Mingo-Castel, A., Veramendi, J., 2004. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol. J.* 2, 141–153.
- Molina, A., Veramendi, J., Hervas-Stubbs, S., 2005. Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* 342, 266–275.
- Pérez-Filgueira, M., Wigdorovitz, A., Romera, A., Zamorano, P., Borca, M.V., Sadir, A.M., 2000. Detection and characterization of functional T-cell epitopes on the structural proteins VP2, VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1 Campos. *Virology* 271, 234–239.
- Pérez-Filgueira, D.M., Brayfield, B.P., Phiri, S., Borca, M.V., Wood, C., Morris, T.J., 2004. Preserved antigenicity of HIV-1 p24 produced and purified in high yields from plants inoculated with a tobacco mosaic virus (TMV)-derived vector. *J. Virol. Methods* 121, 201–208.
- Renjifo, X., Wolf, S., Pastoret, P.P., Bazin, H., Urbain, J., Leo, O., Moser, M., 1998. Carrier-induced, hapten-specific suppression: a problem of antigen presentation? *J. Immunol.* 161, 702–706.
- Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L.L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Pluckthun, A., Pack, P., 1996. Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J. Immunol.* 157, 2989–2997.
- Richter, L.J., Thanavala, Y., Arntzen, C.J., Mason, H.S., 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* 18, 1167–1171.
- Sakamoto, H., Lewis, M.S., Kodama, H., Appella, E., Sakaguchi, K., 1994. Specific sequences from the carboxyl terminus of human p53 gene product form anti-parallel tetramers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8974–8978.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Rosas-Salgado, G., Hernández-González, M., Herrera-Estrella, L., Cabrera-Ponce, J., López-Casillas, F., González-Bonilla, C., Santiago-Machuca, A., Ruiz-Pérez, F., Sánchez, J., Goldbaum, F., Aluja, A., Larralde, C., 2002. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch. Med. Res.* 33, 371–378.
- Skosyrev, V.S., Rudenko, N.V., Yakhnin, A.V., Zagranichny, V.E., Popova, L.I., Zakharov, M.V., Gorokhovatsky, A.Y., Vinokurov, L.M., 2003. EGFP as a fusion partner for the expression and organic extraction of small polypeptides. *Protein Expr. Purif.* 27, 55–62.
- Streatfield, S.J., Lane, J.R., Brooks, C.A., Barker, D.K., Poage, M.L., Mayor, J.M., Lamphear, B.J., Drees, C.F., Jilka, J.M., Hood, E.E., Howard, J.A., 2003. Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 21, 812–815.
- Tacket, C.O., 2005. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 23, 1866–1869.
- Varsani, A., Williamson, A.L., Stewart, D., Rybicki, E.P., 2006. Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res.* 120, 91–96.
- Walker, D.R., Bond, J.P., Tarone, R.E., Harris, C.C., Makalowski, W., Boguski, M.S., Greenblatt, M.S., 1999. Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* 18, 211–218.
- Wigdorovitz, A., Mozgovej, M., Santos, M.J., Parreño, V., Gomez, C., Pérez-Filgueira, D.M., Trono, K.G., Rios, R.D., Franzone, P.M., Fernandez, F., Carrillo, C., Babiuk, L.A., Escribano, J.M., Borca, M.V., 2004. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* 85, 1825–1832.
- Willuda, J., Kubetzko, S., Waibel, R., Schubiger, P.A., Zangemeister-Wittke, U., Pluckthun, A., 2001. Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *J. Biol. Chem.* 276, 14385–14392.



## Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients

Viviana Falcón,<sup>a,\*</sup> Nelson Acosta-Rivero,<sup>a</sup> Glay Chinae,<sup>a</sup> Jorge Gaviñondo,<sup>a</sup> María-C de la Rosa,<sup>a</sup> Ivón Menéndez,<sup>a</sup> Santiago Dueñas-Carrera,<sup>a</sup> Ariel Viña,<sup>a</sup> Waldo García,<sup>c</sup> Bienvenido Gra,<sup>b</sup> Miriam Noa,<sup>d</sup> Edel Reytor,<sup>e</sup> María Teresa Barceló,<sup>e</sup> Felix Alvarez,<sup>a</sup> and Juan Morales-Grillo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Biomedicine Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, P.O. Box 6162, C.P. 10600, Havana, Cuba

<sup>b</sup> Institute of Gastroenterology, C.P. 10400, Havana, Cuba

<sup>c</sup> General Hospital "Calixto García", C.P. 10400, Havana, Cuba

<sup>d</sup> National Center for Scientific Research, P.O. Box 6990, Havana, Cuba

<sup>e</sup> Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Sancti Spiritus 60200, Cuba

Received 24 April 2003

### Abstract

In this study, 13 samples of liver biopsies from patients with chronic hepatitis C were studied by transmission electron microscopy (EM) and immunoelectron microscopy (IEM). The 13 biopsies showed ultrastructural cell damage typical of acute viral hepatitis. In four of the 13 liver biopsies enveloped virus-like particles (VLPs) inside cytoplasmic vesicles and in the cytoplasm of hepatocytes were observed. We also detected the presence of unenveloped VLPs mainly in the cytoplasm and in the endoplasmic reticulum. IEM using anti-core, E1 and E2 monoclonal antibodies (mAbs) confirmed the specific localization of these proteins, *in vivo*, inside cytoplasm and endoplasmic reticulum. Thus, this work provided evidence for hepatocellular injury related to HCV infection. It also suggested the presence of HCV-related replicating structures in the cytoplasm of hepatocytes and raised the possibility of hepatitis C virion morphogenesis in intracellular vesicles.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** HCV; Core protein; Virus-like particles; Transmission electron microscopy; Immunoelectron microscopy

Hepatitis C virus (HCV), a member of the Flaviviridae family, is now recognized as the major cause of transfusion-acquired non-A, non-B hepatitis [1]. Infection by HCV is found throughout the world and the prevalence of anti-HCV antibodies in different countries ranges from 0.4% to 14% [1]. Besides transmission via blood and blood-derived products or less frequently by sexual and congenital routes more than 40% of HCV cases are sporadic and have not yet been associated with known risk factors [2,3]. Infections are usually chronic, and their clinical outcome ranges from a non-apparent carrier state, to acute hepatitis, to chronic hepatitis and

cirrhosis. The latter strongly associated to the development of hepatocellular carcinoma [2,4].

Previously, it had been described about the presence of spherical virus-like particles (VLPs) in liver biopsies from HCV-infected patients [5]. They were similar to those visualized in human sera, in hepatocytes from HCV-infected chimpanzee liver cells, and *in vitro* infected cells [6–9]. In addition, immunoelectron microscopy (IEM) studies using monoclonal (mAb) and polyclonal antibodies have also identified HCV antigens in liver biopsies, but their precise intracellular localization in the infected hepatocytes has been discordant [10–13].

Transmission electron microscopy (EM) and IEM might be powerful tools to elucidate some of the mechanisms involved in HCV replication, virion morphogenesis, and HCV pathogenesis. In this study we

\* Corresponding author. Fax: +537-2714764/+537-336008.

E-mail address: [viviana.falcon@cigb.edu.cu](mailto:viviana.falcon@cigb.edu.cu) (V. Falcón).

reported detailed EM and IEM analyses of liver biopsies from chronically HCV-infected patients.

## Materials and methods

**Patients and samples.** Patients with chronic HCV infection hospitalized for hepatitis in the Institute of Gastroenterology, Havana, Cuba, were recruited after informed consent in writing was obtained. Liver needle biopsy samples were taken at the time of routine diagnostic biopsy from all patients. Thirteen chronically HCV-infected patients (5 females and 8 males, aged 25–46 years) were selected based upon they were serologically positive to third-generation HCV enzyme immunoassays (Tecnosuma International, Havana, Cuba) and that the anti-HCV positive sera were confirmed by Ortho HCV 2.0 ELISA (Ortho Diagnostic Systems, Rariton, NJ). They also showed positive detection of serum HCV RNA by reverse-transcription nested polymerase chain reaction (RT-PCR) (Amplicor HCV Amplification Kit 2.0, Roche Diagnostic Systems), were histologically confirmed as bearing chronic hepatitis, and had abnormal serum alanine aminotransferase levels for at least six months before the biopsy was performed. None were seropositive for markers of hepatitis B virus, hepatitis A virus, and human immunodeficiency virus by enzyme immunoassays (Tecnosuma International, Havana, Cuba). Some patients had been previously treated with interferon- $\alpha$ , but at the time of inclusion none of the patients were receiving antiviral treatment. In addition, patients suffering from alcoholic liver diseases and metabolic liver disorders were excluded. Besides, liver needle biopsy samples were taken from two HCV-uninfected healthy donor livers for transplantation purpose as negative controls.

**Proteins and peptides.** The HCV core protein containing aa 1–120 (HCcAg.120) fused to a leader tag of six histidines has been previously described [14]. Four oligopeptides, PKPQRKTKRNTNRRPQDVK FPGGGQIVGGVY (Co.5; residues 5–35), GWLLSPRGRSPSWGPT (Co.95; residues 95–110), SAYEVHNVSGIYHVTNDCSNA (E1.190; residues 190–219), and ACNWTRGERCDLEDRDRPELSPLLST TE (E2.643; residues 643–671) from structural HCcAg, E1, and E2 proteins, respectively, encoded by an HCV cuban isolate [15], were synthesized at the CIGB production facilities (CIGB, Cuba).

**Antibodies.** The following mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used for IEM studies: anti-HCcAg CBSS-HepC.1 mAb recognizing aa 5–35 has been previously described [15,16]. To produce other anti-HCcAg, E1, and E2 mAbs, HCV different peptides (Co.95, E1.190, and E2.643) covalently coupled to BSA and HCcAg.120 were injected into BALB/c mice to produce HCV-specific, antibody-secreting hybridomas, as previously described [17]. The newly generated CBSS-HepC.2, CBSS-HepC.3, CBSS-HepC.4, and CBSS-HepC.5 (specific for E1.190, E2.643, Co.95, and Co.120, respectively) were screened in 96-well plates coated with either one of the Co.95, E1.190, and E2.643 HCV peptides or HCcAg.120.

**Transmission electron microscopy.** The hepatic tissue samples were fixed for 1 h at 4 °C in 1% (v/v) glutaraldehyde and 4% (v/v) paraformaldehyde, rinsed in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4), post-fixed for 1 h at 4 °C in 1% OsO<sub>4</sub>, and dehydrated in increasing concentrations of ethanol. The embedding was done, as previously described with minor modifications [18]. Briefly, ultrathin sections (400–500 Å) made with an ultramicrotome (NOVA, LKB) were placed on 400 mesh grids, stained with saturated uranyl acetate and lead citrate, and examined with a JEOL/JEM 2000 EX transmission electron microscope (JEOL, Japan). To avoid sample bias, 2000 microphotographs were analyzed in this study.

**Immunoelectron microscopy.** Samples of hepatic tissue were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde containing 0.2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) at 4 °C for 3 h and washed with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3. Fixed cells were dehydrated as

described above, embedded in Lowicryl, and polymerized by exposure to ultraviolet light at room temperature (RT) for 72 h. Ultrathin sections of liver biopsies were incubated with anti-E1 (CBSS-HepC.2), anti-E2 (CBSS-HepC.3), or a mixture of anti-HCcAg mAbs (CBSS-HepC.1, CBSS-HepC.4, and CBSS-HepC.5) in phosphate buffer, for 45 min at RT. The sections were rinsed three times for 30 min at RT with 0.1% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline, pH 7.3 (BSA–PBS), and incubated for 1 h at RT with gold-labeled (15 nm) anti-mouse IgG (Amersham, UK) diluted 1:100 in BSA–PBS. As control the primary antibody was substituted by normal mouse serum. All sections were stained and analyzed with a transmission electron microscope, as mentioned above.

## Results

All liver biopsy samples from the 13 chronically HCV-infected patients showed ultrastructural cell damage (Fig. 1), whereas the negative control did not show any ultrastructural cell damage (Fig. 1A). Ballooning hepatocytes with dilatation of the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria were observed (Figs. 1B and C). In addition, a large number of cytolysosomes (Fig. 1D) and lamellar bodies were shown (Fig. 1E).

Remarkably, other ultrastructural changes such as inclusions inside the nuclei were observed (Fig. 1F). Alterations of nuclei and nucleoli were frequent with the formation of pseudo-inclusions, enlargement, and fragmentation of nucleoli, and an increased number of nuclear bodies. The presence of large lipid droplets in hepatocytes was characteristic for biopsy materials obtained from HCV-infected patients while being absent in the control samples (Fig. 1G). On the other hand, lymphocytes in close contact to hepatocytes were also detected (Fig. 1H).

In four of the 13 HCV-infected patient liver biopsies the presence of enveloped VLPs with an average diameter of 65 nm was observed in the cytoplasm (Figs. 2B and C) and inside cytoplasmic vesicles (Fig. 2D). Smaller enveloped VLPs with diameters ranging from 30 to 55 nm were also localized in the cytoplasm of hepatocytes (Fig. 2E). All of these VLPs were clearly composed of an inner electron-dense core-like particle surrounded by an envelope. In addition, large numbers of unenveloped VLPs resembling nucleocapsid-like structures with 30 nm in diameter were detected mainly in the cytoplasm and also in the ER membranes (Fig. 2F). Remarkably, these cytoplasmic unenveloped VLPs associated forming aggregates similar to the factories found in other viral infections [19]. Neither enveloped nor unenveloped VLPs were detected in hepatocytes from normal controls (Fig. 2A).

To confirm the specificity of these observations, immunogold labeling with the various mAbs was carried out in the five biopsy samples containing VLPs and from normal controls. In all analyzed samples, HCcAg was specifically recognized both in the cytoplasm and in the ER membranes by the anti-HCcAg mAbs

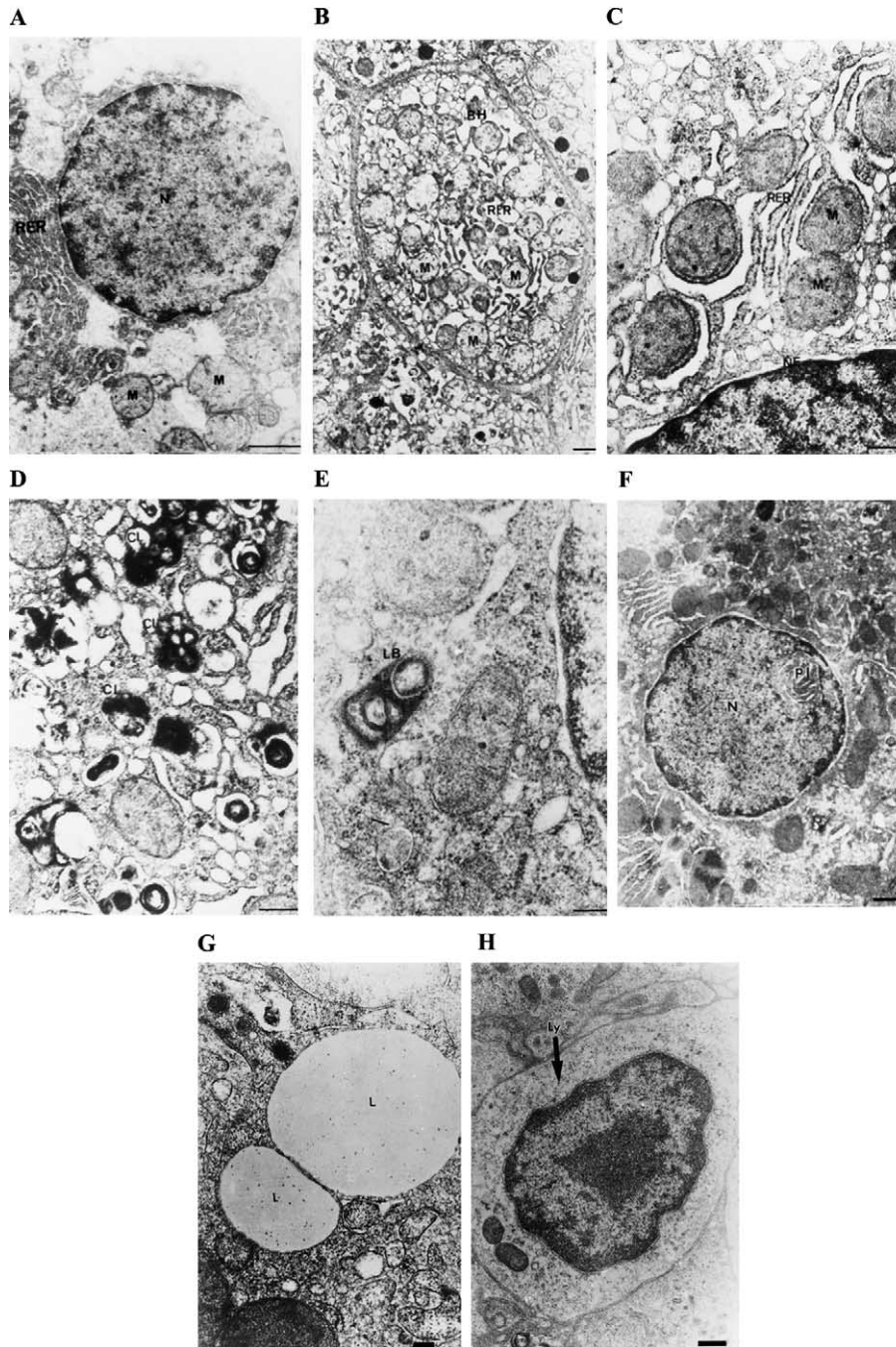


Fig. 1. EM analysis of liver biopsies from HCV-infected patients with chronic hepatitis. (A) Liver biopsies from healthy subjects were used as negative controls. Part of a hepatic cell with nucleus (N), mitochondria (M), and rough endoplasmic reticulum (RER) within normal limits. (B) Ultrastructural changes including balloning hepatocyte (BH) with dilatation of RER and mitochondria (M). (C) Part of a BH with dilatation of RER, mitochondria (M) and broadening of space between the two membranes of the nuclear envelope (NE). (D) Large number of cytolysosomes (CL). (E) Lamellar body (LB). (F) Paracrystalline inclusion (PI) inside the nucleus (N). (G) Large lipid droplets (L). (H) Lymphocytes (Ly) in close contact with hepatocytes. (Bar = 1  $\mu$ m in A, B, and F; 500 nm in C and D; and 200 nm in E, G, and H.)

(CBSS-HepC.1, CBSS-HepC.4, and CBSS-HepC.5) (Fig. 3B). Note strongly labeled prebudding or budding structures at ER membranes. However, HCCAg could not be detected by anti-HCCAg mAbs neither in samples from normal controls (Fig. 3A) nor in sections incubated with normal mouse immunoglobulins as primary

antibodies. In addition, gold labeling in the ER and mainly in the cytoplasm (Figs. 4A and B) of hepatocytes was clearly observed using anti-E1 and anti-E2 mAbs (CB SS-HepC.2 and CBSS-HepC.3, respectively), whereas the negative control did not show any staining (Fig. 3A).



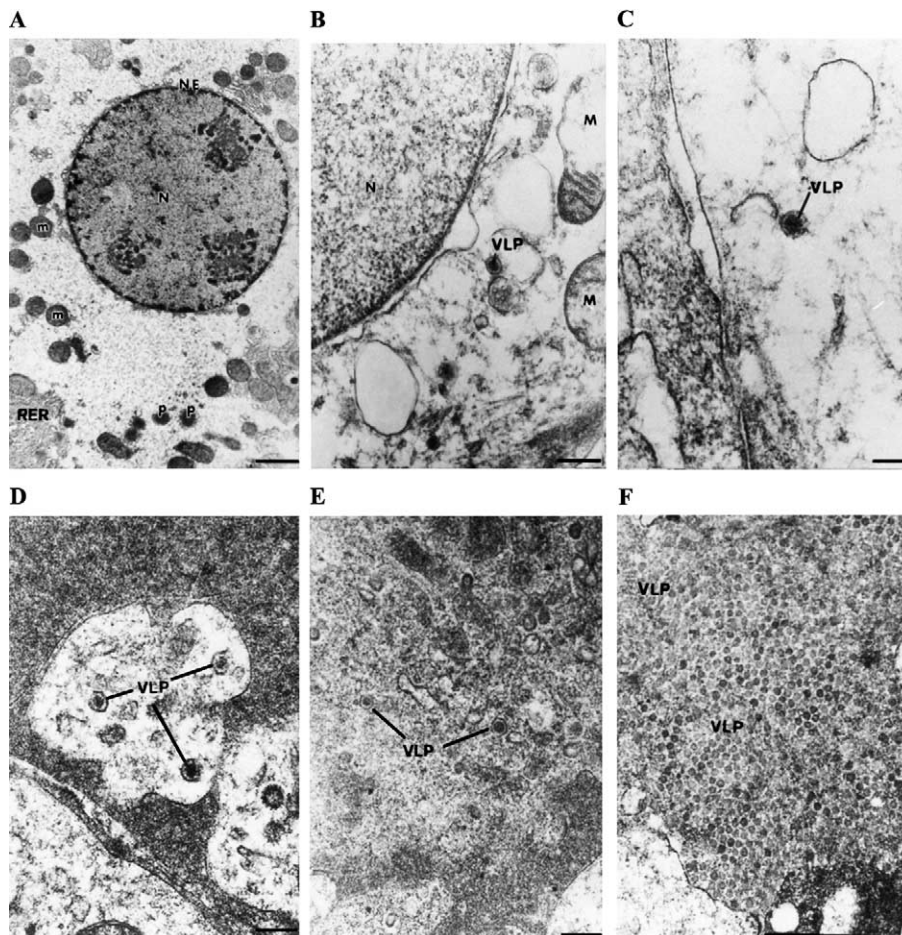


Fig. 2. VLPs in liver biopsies from HCV-infected patients, detected by EM. (A) Liver biopsies from healthy subjects were used as negative controls. Part of a hepatic cell with nucleus (N), nuclear envelope (NE), peroxisomes (P), mitochondria (M), and rough endoplasmic reticulum (RER) within normal limits. (B,C) Single enveloped VLPs of 65 nm of diameter in the cytoplasm. (D) Single enveloped VLPs of 65 nm inside cytoplasmic vesicles. (E) Enveloped VLPs with diameters ranging from 30 to 55 nm in the cytoplasm of hepatocytes. (F) Unenveloped VLPs of 30 nm in the cytoplasm of hepatocytes. (Bar = 2  $\mu$ m in A; 150 nm in B, D, and F; 100 nm in C and E; 450 nm in E.)

## Discussion

The low levels of HCV particles in patient samples, the lack of a cell culture system supporting an efficient HCV replication or particle assembly, and the scarcity of EM positive reports on VLPs in liver biopsies from HCV-infected patients have hampered a better knowledge of the life cycle and pathogenicity of this virus [6,7,20]. However, detection and localization of HCV antigens in the liver would be important to study the host–viral interactions at the cellular level.

In this study, severe ultrastructural cell damage was observed in all biopsy samples from HCV-infected patients (Fig. 1). Ballooning of hepatocytes is probably associated with changes in ion and water regulation within the cell [21,22], while cytolysosomes and roundish lamellar bodies are believed to be phospholipid bilayers formed by the interaction of bile with membrane phospholipids (Figs. 1B–E) [23].

In addition, the presence of large lipid droplets was found in the hepatocytes from most of the biopsy materials analyzed (Fig. 1G). This result confirms a previous work which demonstrated the presence of these structures in hepatocytes from HCV-infected chimpanzees [13].

The pathogenesis of chronic hepatitis induced by the HCV as well as the mechanisms responsible for the elimination of this infection are still not fully understood. The finding of lymphocytes in close contact to hepatocytes (Fig. 1H) supports previous reports suggesting that immune mechanisms are involved in the pathogenesis of hepatitis C [24]. However, other evidences have suggested a direct role for HCV in pathogenicity and several viral proteins have been involved [25]. Inclusion body formation is one of the commonest cytopathic effects of virus infection. It is noteworthy that the presence of intranuclear inclusion bodies was observed in the hepatocytes from all chronically HCV-in-



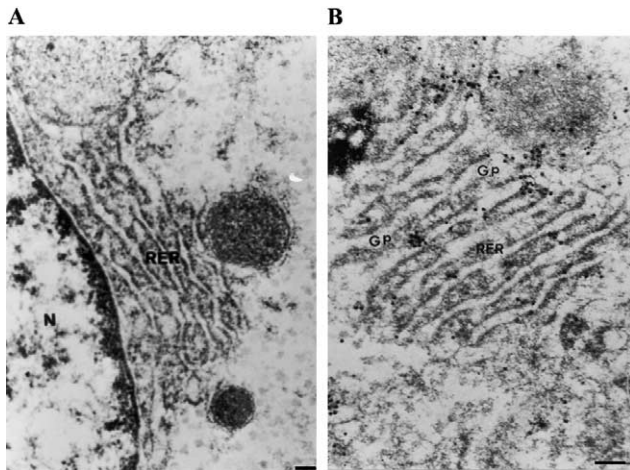


Fig. 3. Immunolabeling of HCCAg by IEM. (A) Liver biopsies from healthy subjects, no immunostaining was observed in the rough endoplasmic reticulum (RER) and cytoplasm using either a mixture of anti-HCCAg mAbs (CBSS-HepC.1, CBSS-HepC.4, and CBSS-HepC.5) or CBSS-HepC.2 and CBSS-HepC.3 specific for E1 and E2, respectively. (B) Immunostaining with a mixture of anti-HCCAg mAbs (CBSS-HepC.1, CBSS-HepC.4, and CBSS-HepC.5) and gold-labeled anti-mouse IgG (GP), revealed HCCAg in cytoplasm and along the RER. (Bar = 500 nm in A; 200 nm in B.)

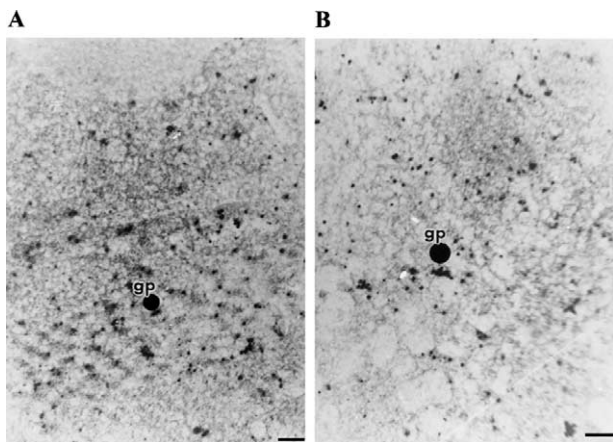


Fig. 4. Immunolabeling of E1 and E2 by IEM. (A) HCV E1 in the hepatocyte cytoplasm and ER was identified with CBSS-HepC.2 mAb and gold-labeled anti-mouse IgG (GP). (B) HCV E2 in the hepatocyte cytoplasm and ER was identified with CBSS-HepC.3 mAb and gold-labeled anti-mouse IgG (GP). (Bar = 200 nm in A and B.)

ected patients (Fig. 1F), suggesting a possible cytopathic role of HCV at the cell nucleus level.

In the present work we were able to detect enveloped and unenveloped VLPs in four out of 13 liver biopsy samples from HCV-infected individuals with chronic hepatitis (Fig. 2). These enveloped VLPs showed a flavivirus-like morphology [26] with ultrastructural characteristics, size, and morphology similar to those previously reported in different HCV models [5–7,9,27].

Enveloped VLPs were detected not only in cytoplasm but also inside cytoplasmic vesicles (Figs. 2B–E).

These VLPs containing vesicles probably derived from ER membranes due to its close proximity. This is in agreement with previous studies showing HCV virus-like particles localized in cytoplasmic vesicles [5]. Thus, these findings are consistent with the model of virion morphogenesis in intracellular vesicles previously described for flaviviruses [26]. However, we failed to definitively show that these VLPs contain HCV proteins by immunoelectron microscopy. This failure may be attributable partly to low sensitivity of the antibodies used and partly to the inability of antibodies to access antigenic epitopes after proteins have fully been assembled.

By using CBSS-HepC.2 and CBSS-HepC.3 mAbs, a specific gold immunolabeling was detected in the ER and mainly in the cytoplasm of hepatocytes (Fig. 3), suggesting the presence of E1 and E2 proteins at these sites. Several previous studies have shown that both E1 and E2 are synthesized on the endoplasmic reticulum where they may interact with nucleocapsids to assemble into VLPs [28,29]. On the other hand, a novel unglycosylated form of E2 protein that is located in the cytosol has been previously described [30]. Whether the cytoplasm localized E1 and E2 proteins detected in this study represent the enveloped VLPs or polypeptides interacting with other cytoplasmic structures remains unknown.

In addition, considerable numbers of unenveloped VLPs resembling nucleocapsid-like particles were observed mainly in the cytoplasm and also in the ER membranes of hepatocytes (Fig. 2F). Interestingly, they accumulated in the cytoplasm forming structures similar to the factories for nucleic acid replication and virion assembly found in the cytoplasm of other virus infections (Fig. 2F) [19]. The location of these structures reflects the site of replication of a given virus. Thus, these nucleocapsid-like particles could play an active role in HCV replication.

On the other hand, the presence of prebudding and budding structures containing HCCAg in the ER membranes confirms previous results suggesting that HCV nucleocapsids could bud through the ER membranes in vivo [27,29].

VLPs were just found in four out 13 of hepatocytes from HCV-infected patients. It is known that HCV replicates at a low rate and, therefore, the amount of HCV antigens in the liver is small, rendering its detection difficult. In addition, a relationship between serum HCV RNA level and degree of HCV antigen hepatic expression has been previously reported in HCV-infected human [31]. Furthermore, a decrease in hepatic HCV antigen expression in HCV-infected patients previously treated with IFN had been observed [31,32]. Although serum HCV RNA level was not determined in this study, possibly some of these factors hampered efforts to detect VLPs in the liver biopsies of chronic HCV-infected patients.

In conclusion, this work provided evidence for hepatocellular injury related to HCV infection. It also suggested the presence of HCV-related replicating structures in the cytoplasm of hepatocytes and raised the possibility of hepatitis C virion morphogenesis in intracellular vesicles.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Osvaldo Reyes and Dr. Dayamí Dorta for their technical assistance, Dr. Jorge Aguiar and Dr. Rafael F. Sanchez-Betancourt for critical reading of the manuscript and for many helpful suggestions.

## References

- [1] M.J. Alter, S.C. Hadler, F.N. Judson, Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection, *JAMA* 264 (1990) 2231–2235.
- [2] M.J. Alter, H.S. Margolis, K. Krawczynski, The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 1899–1905.
- [3] M. MacDonald, N. Crofts, J. Kaldor, Transmission of hepatitis C virus: rates, routes, and cofactors, *Epidemiol. Rev.* 18 (1996) 137–148.
- [4] K. Shimotohno, Hepatocellular carcinoma in Japan and its linkage to infection with hepatitis C virus, *Semin. Virol.* 4 (1993) 305–312.
- [5] C. Bosman, M.B. Valli, L. Bertolini, A. Serafino, R. Boldrini, M. Marcellini, G. Carloni, Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients, *Res. Virol.* 149 (1998) 311–314.
- [6] M. Kaito, S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishada, S. Suzuki, M. Kohara, Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study, *J. Gen. Virol.* 75 (1994) 1755–1760.
- [7] Y.K. Shimizu, S.M. Feinstone, M. Komara, R.H. Purcell, H. Yoshimura, Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy, *Hepatology* 23 (1996) 205–209.
- [8] S. Laccovacci, A. Manzin, S. Barca, M. Sargiacomo, A.L. Serafino, M.B. Valli, G. Macioce, J. Hassan, A. Ponzetto, M. Clementi, C. Peschle, G. Carloni, Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro, *Hepatology* 26 (1997) 1328–1337.
- [9] A. Serafino, M.B. Valli, A. Alejandrini, A. Ponzetto, G. Carloni, L. Bertolini, Ultrastructural observations of viral particles within hepatitis C virus-infected human B lymphoblastoid cell line, *Res. Virol.* 148 (1997) 153–159.
- [10] N. Hiramatsu, N. Hayashi, Y. Harura, A. Kasahara, H. Fusamoto, C. Mori, I. Fuke, H. Okayama, T. Kamada, Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core, envelope and NS3 regions of the hepatitis C virus genome, *Hepatology* 16 (1992) 306–311.
- [11] K. Krawczynski, M.J. Beach, D.W. Bradley, G. Kuo, A.M. Di Bisceglie, M. Houghton, J.R. Reyes, J.P. Kim, Q.L. Choo, M.J. Alter, Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification, *Gastroenterology* 103 (1992) 622–629.
- [12] D. Sansonno, F. Dammacco, Hepatitis C virus c100 antigen in liver tissue from patients with acute and chronic infection, *Hepatology* 18 (1993) 240.
- [13] G. Barba, F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Zs. Scaff, Zs.M.J. Chapman, T. Miyamura, C. Brechot, Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 1200–1205.
- [14] L.J. Lorenzo, S. Dueñas-Carrera, V. Falcon, N. Acosta-Rivero, E. Gonzalez, M.C. de la Rosa, I. Menendez, J. Morales, Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 (2001) 962–965.
- [15] J. Morales, A. Viña, C. Garcia, N. Acosta-Rivero, S. Dueñas-Carrera, O. Garcia, I. Guerra, V. Falcon, Sequences derived from the genome of the hepatitis C virus, and use thereof (1998), WO 98/25960.
- [16] V. Falcon, C. Garcia, M.C. de la Rosa, I. Menendez, J. Seoane, J.M. Grillo, Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic *Pichia pastoris* yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1), *Tissue Cell* 31 (1999) 117–125.
- [17] E. Harlow, D.P. Lane, in: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988, pp. 174–178.
- [18] A.R. Spurr, A slow viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultrastruct. Res.* 26 (1969) 31–43.
- [19] A.H. Sharpe, L.B. Chen, B.N. Fields, The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells, *Virology* 120 (1982) 399–411.
- [20] Z. Schaff, E. Tabor, D.R. Jackson, R.J. Gerety, Ultrastructural alterations in serial liver biosy specimens from chimpanzees experimentally infected with a human non-A, non-B hepatitis Agent, *Virchows Arch. Cell Pathol.* 45 (1984) 301–312.
- [21] Z. Schaff, K. Lapis, Fine structure of hepatocytes during the etiology of several common pathologies, *J. Electron Microsc. Technol.* 14 (1990) 179–207.
- [22] V. Falcón, N. Baranosky, F.O. Castro, C. Montero, M. González, O. Hayes, O. Ancheta, B. Gra, S. Mandado, Ultrastructural and immunocytochemical characteristics of hepatocytes from hepatitis B virus infected chimpanzees, *Tissue Cell* 25 (1993) 865–873.
- [23] K. Lapis, Z. Schaff, Acute viral hepatitis, *Electron Microsc. Hum. Med.: The liver* 8 (1979) 124–136.
- [24] M.A. Gerber, Pathobiologic effects of hepatitis C, *J. Hepatol.* 22 (1995) 83–86.
- [25] K. Shimotohno, Hepatitis C virus and its pathogenesis, *Semin. Cancer Biol.* 10 (2000) 233–240.
- [26] C.M. Rice, Flaviviridae: the viruses and their replication, in: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996, pp. 931–959.
- [27] T.F. Baumert, S. Ito, D.T. Wong, T. Liang, Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells, *J. Virol.* 72 (1998) 3827–3836.
- [28] J. Dubuisson, Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242 (2000) 135–148.
- [29] E. Blanchard, D. Brand, S. Trassard, A. Goudeau, P. Roingeard, Hepatitis C virus-like particle morphogenesis, *J. Virol.* 76 (2002) 4073–4079.
- [30] N. Pavio, D.R. Taylor, M.M. Lai, Detection of a novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelope protein that is located in the cytosol and interacts with PKR, *J. Virol.* 76 (2002) 1265–1272.
- [31] R. Gonzalez-Peralta, J. Fang, G.L. Davis, R.G. Gish, M. Kohara, M.U. Mondelli, M.S. Urdea, M. Mizokami, J.Y. Lau, Significance of hepatic expression of hepatitis C viral antigens in chronic hepatitis C, *Dig. Dis. Sci.* 40 (1995) 2595–2601.
- [32] A.M. Di Bisceglie, J.H. Hoofnagle, K. Krawczynski, Changes in hepatitis C virus antigen in liver with antiviral therapy, *Gastroenterology* 105 (1993) 858–862.