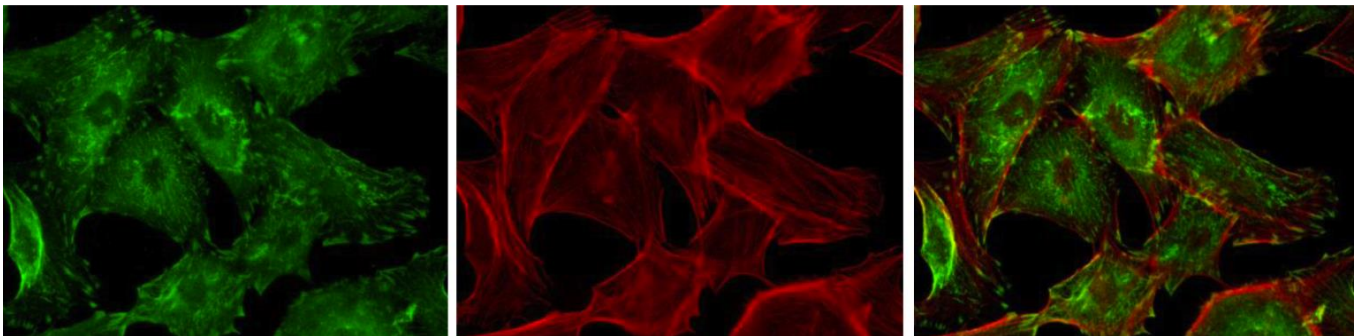




DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Papel de SUMO en la regulación de PKR
y la vía molecular PI3K/AKT**



Carlos Felipe de la Cruz Herrera

Madrid, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Papel de SUMO en la regulación de PKR y la vía molecular PI3K/AKT

Memoria presentada por **Carlos Felipe de la Cruz Herrera,**

Licenciado en Química, Bacteriología y Parasitología, para optar al grado
de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Dr. María del Carmen Rivas Vázquez

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

Esta tesis doctoral se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología – CSIC, gracias a las becas otorgadas por la Fundación La Caixa y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México y de los proyectos BFU2011-27064 y BFU2014-58530-P del Ministerio de Economía y Competitividad de España.

A ti cosis, a mi familia y amigos

Deseo agradecer en primer lugar a mi directora de tesis Carmen por aceptarme en su laboratorio y ofrecerme la oportunidad de aprender, por sus enseñanzas, su paciencia y sobre todo por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, sin él la consecución de esta tesis no hubiese sido posible. A mi compañera y amiga Maite por su ayuda y buena convivencia. A Michela por sus enseñanzas, su apoyo y sus consejos. A Melisa por su amistad, por su apoyo y por dedicar parte de su tiempo a ayudarme con el papeleo burocrático. A Emily y a mi madre por todo el amor y apoyo recibido durante mi estancia en España. A todos vosotros que de alguna forma contribuyeron en la realización de esta tesis.

RESUMEN



La SUMOilación es una modificación post-traducciona que consiste en que las proteínas SUMO se conjugan a sus proteínas diana. Esta modificación regula proteínas celulares involucradas en múltiples procesos como transcripción, replicación, reparación del ADN, apoptosis, senescencia, transporte nuclear y transducción de señales. De esta forma, su desregulación parece estar relacionada con el desarrollo de numerosas enfermedades. La relevancia de esta modificación queda patente al descubrir que numerosos patógenos y, específicamente, muchos virus han desarrollado mecanismos para explotar la SUMOilación ya sea empleando la maquinaria de SUMOilación celular para modificar y así regular sus propias proteínas o modulando la SUMOilación de proteínas celulares para favorecer la replicación viral.

Igual que ocurre con los procesos de SUMOilación, muchos virus también han desarrollado mecanismos para inhibir la actividad de una de las proteínas más relevantes en la defensa antiviral de la célula, la quinasa PKR. La acción antiviral de PKR está mediada, entre otras, por la inhibición de la síntesis de proteínas y la inducción de apoptosis ejercidos por la quinasa. Además, recientemente se ha demostrado que existe una interconexión entre PKR y otra vía molecular cuya activación es importante para numeroso virus, la PI3K/AKT. Dicha activación se relaciona con un aumento en la proliferación celular, metabolismo, progresión del ciclo celular, migración y supervivencia, y es una de las vías más frecuentemente alteradas en cáncer.

En este trabajo analizamos la regulación por SUMO de PKR y de varios componentes de la vía molecular PI3K/AKT, específicamente de p85 β , p110 β , y AKT1 y su posible regulación por virus. Nuestros resultados demuestran que la conjugación de PKR a SUMO induce su activación y favorece la inhibición de la síntesis de proteínas en respuesta a ARN de doble cadena y su actividad antiviral. También demostramos que la conjugación de SUMO modula la capacidad oncogénica de p85 β y de p110 β e induce la activación de AKT1. Además, demostramos que la infección con determinados agentes virales puede alterar esta regulación. Así, nuestros resultados muestran que la infección con el virus de la estomatitis vesicular, sensible al interferón y a la acción de PKR, favorece la SUMOilación de PKR. Por el contrario, la infección con el virus Influenza A modula negativamente la SUMOilación de p85 β .

En conjunto, en este trabajo identificamos un nuevo mecanismo de regulación de vías de señalización de la célula importantes para la defensa antiviral y para la proliferación y supervivencia celular, la conjugación a SUMO. Además, mostramos cómo la infección viral puede alterar dicho mecanismo de regulación.

SUMMARY



SUMOylation is a post-translational modification in which a member of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family of proteins is covalently conjugated to target proteins. Numerous cellular proteins involved in processes such as transcription, replication, DNA repair, apoptosis, senescence, nuclear transport and signal transduction are regulated by SUMO conjugation. Indeed, it is becoming apparent that deregulation in the SUMO pathway contributes to the development and progression of different diseases. So, it is no surprising that various intracellular pathogens and, specifically, many viruses have evolved to take advantage of the conserved host cell SUMOylation pathway by either being targets of this post-translational modification themselves or modulating essential components of the SUMOylation machinery.

Some viruses inhibit SUMOylation and many viruses have developed mechanisms to inhibit the activity of PKR, one of the most important players in antiviral defense of the cell. The antiviral activity of PKR is mediated, among others, by the inhibition of protein synthesis and induction of apoptosis promoted by the kinase. It has recently demonstrated a relationship between PKR and the PI3K/AKT pathway. The activation of the PI3K/AKT signaling pathway is frequently required for viral growth, it is associated with increased cell proliferation, metabolism, cell cycle progression, migration and survival, and is one of the most frequently dysregulated pathways in cancer.

In this work we have studied the regulation of PKR and the PI3K/AKT pathway components p85 β , p110 β and AKT1 by SUMO. Moreover, we have evaluated the putative regulation of this post-translational modification by virus. Our results demonstrate that the conjugation of SUMO to PKR induces its activation and favors both the inhibition of protein synthesis in response to double stranded ARN and its antiviral activity. We also demonstrate that SUMOylation modulates the oncogenic capacity of p85 β and p110 β , and induces the activation of AKT1. Furthermore, we demonstrate that infection with certain viral agents can alter this post-translational modification. Thus, our results show that infection with vesicular stomatitis virus, a highly sensitive virus to the antiviral activity of PKR, favors the SUMOylation of PKR. By contrast, infection with Influenza A virus negatively modulates the SUMOylation of p85 β .

Altogether, our results identify SUMO conjugation as a new mechanism regulating cellular signaling pathways important for the antiviral defense, cell proliferation and survival. In addition, we show that viral infection can alter such mechanism of regulation.

ÍNDICE



Abreviaturas	1
Introducción	7
1. Modificación por SUMO	9
1.1 SUMO	9
1.2 Conjugación a SUMO	10
1.3 Interacción no covalente con SUMO	11
1.4 Relación entre SUMO y otras modificaciones post-traduccionales	11
1.5 Relevancia de la SUMOilación	12
2. Proteína quinasa R	12
2.1 Estructura y activación de PKR	13
2.2 Vías de señalización afectadas por PKR	14
2.3 Enfermedades asociadas a la desregulación en la actividad de PKR	17
3. Isoformas beta de la clase IA de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)	18
3.1 Subunidades beta de p85 y p110	18
3.2 PI3K y virus	20
4. Quinasa AKT1	21
4.1 Estructura y activación de AKT1	21
4.2 Vías de señalización reguladas por AKT1	22
Objetivos	25
Materiales y métodos	29
1. Líneas celulares y medios de cultivo	31
2. Transfección celular	31
3. Generación de líneas celulares estables	32
4. Infección viral	33
5. Titulación viral	33
6. Ensayo MTT de proliferación celular	33
7. Ensayo de formación de focos	34
8. Ensayo de formación de colonias en agar blando	34
9. Bacterias competentes	34
10. Transformación de bacterias competentes	35
11. Extracción del ADN plasmídico	35
12. Purificación de proteínas fusionadas a GST	35

13. Plásmidos	36
14. Mutagénesis dirigida	37
15. ARN	38
16. Anticuerpos primarios	38
17. Anticuerpos secundarios	40
18. Proteínas recombinantes y enzimas	40
19. Transcripción-Traducción de proteínas <i>in vitro</i>	40
20. Ensayo de SUMOilación <i>in vitro</i>	40
21. De-sumoilación y de-fosforilación	41
22. Ensayo de interacción con proteínas fusionadas a GST	41
23. Ensayo de interacción con ARN	41
24. Purificación de proteínas fusionadas a una cola de histidinas	42
25. Inmunoprecipitación	42
26. Inmunofluorescencia	42
27. Ensayo de estabilidad proteica	43
28. Autorradiografía y Western-blot	43
29. Ensayos con el gen reportero de la luciferasa	44
30. Cuantificación de apoptosis	44
31. Fraccionamiento subcelular	44
32. Ensayo de migración celular	45
33. Purificación de proteínas de membrana	45
34. Programas informáticos y análisis estadísticos	45
35. Tampones	46
Resultados	49
1. Regulación de la activación de PKR por SUMO	51
1.1 PKR interacciona con SUMO de forma covalente	51
1.2 Identificación de los residuos aminoacídicos de PKR que conjugan SUMO	53
1.3 SUMO promueve la unión de PKR al ARN de doble cadena, la dimerización y la activación de PKR	55
1.4 SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas por PKR	57
1.5 SUMO favorece la actividad antiviral de PKR	62
2. Modulación de la PI3K por SUMO	64

2.1	p85 β interacciona con SUMO de forma covalente	64
2.2	Identificación de los residuos aminoacídicos de p85 β que conjugan SUMO	66
2.3	La mutación de los residuos de SUMOilación de p85 β favorece su actividad oncogénica	67
2.4	La mutación de los residuos de SUMOilación de p85 β favorece la migración celular	69
2.5	SUMO regula negativamente la fosforilación de p85 β	70
2.6	El virus Influenza A modula negativamente la SUMOilación de p85 β	72
2.7	El virus Influenza A promueve la interacción de p85 β con la quinasa Src e induce la fosforilación de p85 β	74
2.8	p110 β interacciona con SUMO de forma covalente	75
2.9	Identificación de los residuos aminoacídicos de p110 β que conjugan SUMO	76
2.10	La mutación del sitio de SUMOilación reduce la actividad transformante de la proteína silvestre	77
3.	SUMO regula la actividad de AKT1	80
3.1	AKT1 interacciona con SUMO de forma covalente	80
3.2	Identificación de los residuos de lisina en AKT1 que conjugan SUMO	83
3.3	SUMO aumenta la actividad de AKT1	84
3.4	Modulación de la SUMOilación de AKT y su activación	86
3.5	SUMO contribuye a la actividad anti-apoptótica y pro-tumoral de AKT	89
	Discusión	93
	Conclusiones	101
	Bibliografía	105
	Anexo	

ABREVIATURAS



Abreviaturas

ABD	dominio de unión al adaptador
ADN	ácido desoxirribunucleico
AKT	homólogo del oncogén viral de timoma de ratón v-akt
AMP	adenosina monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BACE-1	beta secretasa 1
Bad	proteína asociada al promotor de Bcl-2
Bax	proteína x asociada a Bcl-2
Bcl-2	proteína 2 de linfoma de células B
Bcl-2	proteína de linfoma de células B 2
Bcl-XL	proteína extra grande de linfoma de células B
C2	dominio C 2
CDK	quinasa dependiente de ciclina
CHX	cicloheximida
CREB	proteína de unión a elementos de respuesta al AMP cíclico
cSH2	dominio homólogo a Src carboxilo terminal 2
DENV	virus dengue
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA-PK	proteína quinasa dependiente de ADN
dsRBD	dominio de unión a ARN de doble cadena
dsRBM	motivo de unión a ARN de doble cadena
EBV	virus Epstein Barr
eIF2 α	factor de iniciación de la traducción 2 alfa
FADD	dominio de muerte asociado a FAS
FANC	grupo de complementación de la anemia de Fanconi
FOXO	familia O de factores de transcripción "Forkhead"
GAPs	proteínas activadoras de hidrolasas de GTP
GEFs	factores intercambiadores del nucleótido guanina
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GSK-3	quinasa 3 de la enzima glucógeno sintasa

Abreviaturas

GTP	guanidina trifosfato
HCMV	citomegalovirus humano
HCV	virus de la hepatitis C
HDV	virus de la hepatitis D
HSV-1	virus herpes simplx 1
HuR	antígeno humano R
IκB	proteína inhibidora de NF-κB
IFN	interferón
IKK	quinasa de la proteína inhibidora IκB
iSH2	dominio homólogo a Src intermedio 2
kDa	kilodalton
KSHV	herpesvirus humano asociado al sarcoma de Kaposi
LMP1	proteína latente de membrana 1 del EBV
LPS	lipopolisacárido
MDM2	“murine doble minute 2”
mTOR	diana de rapamicina en células de mamíferos
mTORC1	complejo 1 de mTOR
mTORC2	complejo 2 de mTOR
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolium
Nef	factor regulador negativo del virus VIH
NF-κB	factor de transcripción nuclear kappa B
NS1	proteína no estructural 1 del virus Influenza
NS5A	proteína no estructural 5 A del virus HCV
nSH2	dominio homólogo a Src amino terminal 2
NSP1	proteína no estructural 1 de rotavirus
PKD1	proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinositol
PH	dominio homólogo a pleckstrina
PHLPP1/2	proteínas fosfatasa que contienen repeticiones ricas en leucina en el dominio PH 1 y 2
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinasa
PIP2	fosfatidil inositol 3, 4 bifosfato
PIP3	fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato

Abreviaturas

PKB	proteína quinasa B
PKR	proteína quinasa R
Poli-IC	ácido poliinositídico – policitídílico
PP2A	proteína fosfatasa 2 A
PRAS40	sustrato de AKT rico en prolina de 40 kDa
PTEN	fosfatasa y homóloga a tensina delecionada en el cromosoma 10
PTP1B	proteína fosfatasa de tirosinas 1 B
RAS	sarcoma de rata
RBD	dominio de unión a RAS
RD	dominio regulador
RTK	receptor tirosina quinasa
SAE1/2	enzima 1/2 activadora de SUMO
SARS	síndrome respiratorio agudo severo
SENP	SUMO proteasa
SIM	motivo de interacción con SUMO
STAT	transductores de señales y activadores de la transcripción
SUMO	pequeño modificador tipo ubiquitina
TNF	factor de necrosis tumoral
TSC2	proteína de la esclerosis tuberosa 2
T-tau	proteína tau total
Ubc9	enzima ligasa de ubiquitina 9 (SUMO E2 ligasa)
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VPH	virus del papiloma humano
VSV	virus de la estomatitis vesicular
VV	virus vaccinia
VV-PKR	virus vaccinia que expresa PKR
XBP-1	proteína de unión a la caja X 1

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Modificación por SUMO

La modificación post-traducciona de una proteína puede resultar, entre otros, de la adición a la misma de grupos funcionales o proteínas. Estas modificaciones son una forma eficiente, rápida y reversible de modular la función de las proteínas sin necesidad de sintetizar proteínas *de novo*. Entre las proteínas que se unen de forma covalente a una proteína sustrato se encuentran las proteínas SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier).

1.1 SUMO

SUMO son proteínas de aproximadamente 12 kDa con una estructura parecida a la ubiquitina, aunque solo comparten 16% de homología en su secuencia de aminoácidos (Figura 1) (Müller et al., 2001; Kotamarthi et al., 2013). En los vertebrados, la familia de proteínas SUMO consta de cuatro isoformas denominadas SUMO1, 2, 3 y 4. En mamíferos las isoformas 1, 2 y 3 no son específicas de un tipo celular concreto. Por el contrario, la proteína SUMO4 parece específica de determinados tejidos del sistema inmune y del riñón. SUMO2 y SUMO3 muestran una homología de alrededor del 97% entre ellos y del 50% con SUMO1 (Droescher et al., 2013; Flotho and Melchior, 2013). Los niveles de SUMO1 en las células son mucho menores que los de SUMO2 o SUMO3. Además, a diferencia de SUMO1, SUMO2 y SUMO3 pueden formar cadenas de poli-SUMOilación ya que poseen un residuo susceptible de ser SUMOilado.

Las proteínas SUMO son sintetizadas como precursores inmaduros que deben ser procesados para su activación. Esta activación se consigue mediante la escisión proteolítica del carboxilo terminal lo que permite la exposición de un motivo di-glicina necesario para su posterior conjugación. El procesamiento de los precursores de SUMO lo realizan las proteasas específicas de SUMO (SENPs), las cuales también de-conjugan SUMO de sus sustratos (Droescher et al., 2013; Flotho and Melchior, 2013).

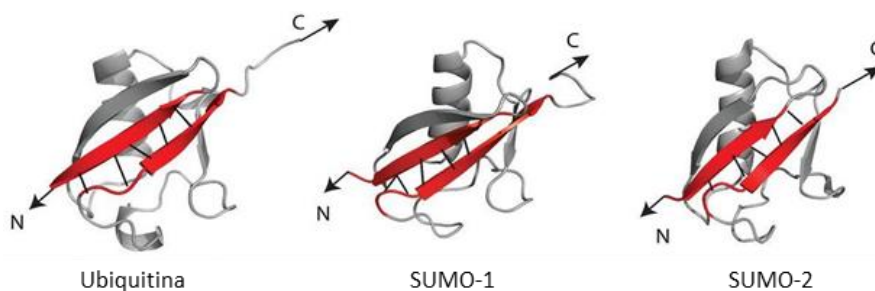


Figura 1. Similitud de la estructura entre SUMO y ubiquitina (figura adaptada de Kotamarthi et al., 2013).

1.2 Conjugación a SUMO

La conjugación a SUMO o SUMOilación es una modificación post-traduccional que consiste en la unión de forma covalente y reversible de proteínas SUMO a la lisina de una proteína sustrato a través de una cascada enzimática similar a la que conjuga la ubiquitina. Después de ser procesada a su forma madura, la proteína SUMO es adenilada en forma dependiente de ATP-Mg²⁺ por la enzima activadora E1 (también denominada SAE1/2, heterodímero compuesto por las subunidades SAE1 y SAE2) y transferida a la cisteína del sitio catalítico de la subunidad SAE2. De aquí es transferida a la cisteína del sitio catalítico de la SUMO E2 ligasa Ubc9, que puede conjugar SUMO directamente a la lisina del sustrato mediante el reconocimiento de una secuencia consenso de SUMOilación o con la ayuda de las SUMO E3 ligasas. Se cree que la especificidad de sustrato de las SUMO E3 ligasas es importante en la conjugación de SUMO a lisinas no localizadas en secuencias consenso. Finalmente, las proteasas SENP escinden SUMO de sus sustratos para reiniciar el ciclo (Figura 2) (Droescher et al., 2013; Flotho and Melchior, 2013). De esta forma, la SUMOilación es un proceso transitorio y dinámico lo que explica que en un momento determinado solo una pequeña fracción de la proteína sustrato se encuentra conjugada a SUMO.

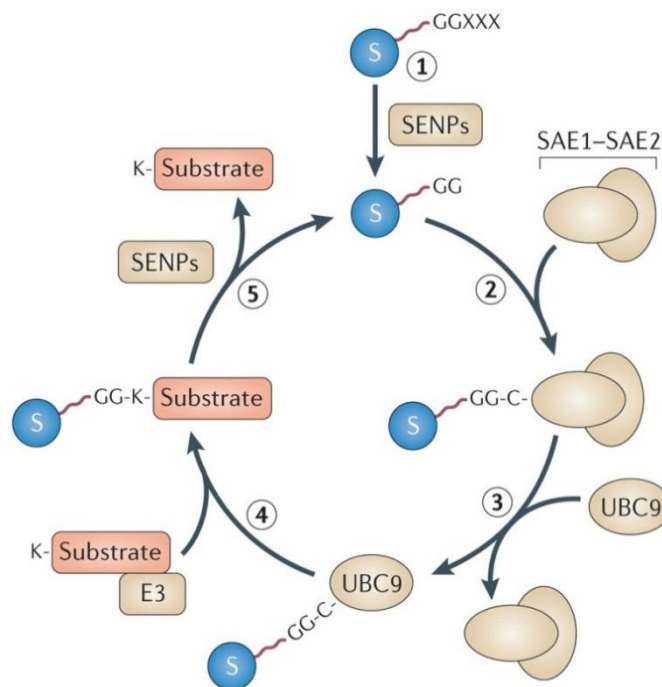


Figura 2. Proceso de conjugación a SUMO. 1) Las proteasas SENP procesan las proteínas SUMO inmaduras para exponer el motivo di-glicina en su región C-terminal; 2) La enzima activadora SAE1/2 activa SUMO; 3) SAE1/2 transfiere las proteínas SUMO a la SUMO ligasa Ubc9; 4) Ubc9 conjuga SUMO a sus sustratos directamente o con ayuda de las SUMO E3 ligasas; 5) SENP escinden SUMO de sus sustratos (figura tomada de Everett et al., 2013).

La conjugación de SUMO a las proteínas sustrato requiere frecuentemente la existencia de una secuencia consenso ψ KxE/D o E/DxK ψ , donde ψ es un aminoácido hidrofóbico (leucina, isoleucina o valina), K es el residuo de lisina aceptor de SUMO, x es cualquier aminoácido, E es ácido glutámico y D es ácido aspártico. Se han descrito también variaciones de dicha secuencia consenso incluyendo residuos de aminoácidos cargados negativamente después de la misma o un grupo de residuos hidrofóbicos antes de esta. Sin embargo, no todas las secuencias consenso son dianas de SUMO y algunas proteínas sustrato son modificadas por SUMO en lisinas no localizadas en secuencias consenso (Droescher et al., 2013; Flotho and Melchior, 2013).

1.3 Interacción no covalente con SUMO

Además de conjugarse a SUMO de forma covalente, muchos sustratos de SUMO poseen dominios de interacción no covalente con SUMO (dominios SIM). La mayoría de los dominios SIM que han sido identificados hasta ahora están constituidos por un grupo de tres o cuatro aminoácidos hidrofóbicos flanqueados por residuos ácidos. Los SIM pueden ser de tres tipos: $\psi\psi x\psi$ (D/E/S)₅; $\psi\psi$ DLT; o (D/E/S)₅ $\psi x\psi\psi$. Donde ψ son leucina, isoleucina o valina, DLT son ácido aspártico, leucina y treonina, respectivamente, y Ac son ácido aspártico, ácido glutámico o serina. Además, el propio SIM puede ser regulado, la fosforilación que añade carga negativa promueve la unión del SIM a SUMO (Droescher et al., 2013; Flotho and Melchior, 2013).

1.4 Relación entre SUMO y otras modificaciones post-traduccionales

La conjugación de SUMO a un sustrato puede verse afectada por otras modificaciones post-traduccionales. Una de ellas es la ubiquitinación. La interacción entre estas dos modificaciones es compleja y en muchos casos SUMO y ubiquitina se conjugan a la misma lisina del sustrato actuando de forma antagónica. En otros casos ambas modificaciones actúan de forma secuencial (Denuc and Marfany, 2010). Otra modificación post-traduccionales que recientemente se identificó como regulador de SUMO es la acetilación. La acetilación de Ubc9 en el residuo K65 regula la SUMOilación de algunos sustratos (Hsieh et al., 2013). Además, las proteínas SUMO pueden ser acetiladas (en la lisina 37 de SUMO1 y la lisina 33 de SUMO2), lo cual neutraliza la carga positiva de SUMO y bloquea su interacción con los SIMs de algunas proteínas (Ullmann et al., 2012). Existe también una compleja interacción entre la SUMOilación y la fosforilación. La fosforilación de proteínas sustrato de SUMO puede regular de forma positiva o negativa su modificación por SUMO y viceversa, dependiendo de la proteína. Por otro lado, SUMO también puede regular el sistema de fosforilación de la célula a través de la SUMOilación de quinasas y fosfatasa. Asimismo, la fosforilación puede regular

componentes de la vía de SUMOilación y afectar a la conjugación de SUMO a sus sustratos (Wilkinson and Henley, 2010).

1.5 Relevancia de la SUMOilación

En el proceso de SUMOilación se ha descrito un hecho paradójico: las enormes consecuencias de la SUMOilación no se corresponden con el pequeño porcentaje de sustrato que se encuentra SUMOilado en un momento dado. Para explicar esta paradoja conocida como el enigma de SUMO se ha propuesto que SUMO podría ser necesario para iniciar una determinada actividad pero no para mantenerla (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Este hecho y el número de proteínas que se ha demostrado que funcionan como sustrato de SUMO podrían explicar la relevancia de la SUMOilación en numerosos procesos celulares.

La modificación de proteínas celulares por SUMO regula entre otros la transcripción, replicación, segregación de cromosomas, reparación del ADN, diferenciación, apoptosis, senescencia, transporte nuclear y transducción de señales (Andreou and Tavemarakis, 2009; Flotho and Melchior, 2013; Wasik and Filipek, 2014). Además, la desregulación de los procesos afectados por SUMO se ha relacionado con el desarrollo de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y del corazón (Bettermann et al., 2011; Eckermann, 2013; Lee et al., 2014; Wang, 2011). No sorprende, por tanto, que los patógenos también hayan desarrollado estrategias para explotar los procesos de SUMOilación de la célula. El virus del sarcoma de Kaposi (KSHV), el virus de Epstein barr (EBV), el papilomavirus humano (VPH), el virus asociado al síndrome respiratorio agudo severo (SARS), el virus del dengue (DENV), Rotavirus, el virus Influenza o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como las bacterias del género *Yersinia* o *Listeria monocitogenes* son algunos ejemplo de patógenos que utilizan la maquinaria de SUMOilación de la célula para modificar sus propias proteínas o alteran la SUMOilación de proteínas celulares para favorecer su replicación (Everett et al., 2013; Wimmer et al., 2012).

2. Proteína quinasa R

La proteína quinasa R (PKR) pertenece a la familia de quinasas de serina y treonina con la capacidad de fosforilar la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción (eIF2 α) en el residuo de serina 51 y, por tanto, de inhibir la síntesis de proteínas en respuesta a determinados estímulos (Donnelly

et al., 2013). PKR se expresa constitutivamente de forma basal en todos los tejidos y se induce en respuesta a interferón de tipo I (IFN α/β) (Pindel and Sadler, 2011).

2.1 Estructura y activación de PKR

La traducción del ARN (ácido ribonucleico) mensajero de PKR da lugar a una proteína de 551 aminoácidos que consta de dos dominios funcionales distintos: un dominio de unión a ARN de doble cadena (“dsRBD”) en su región amino terminal y un dominio catalítico con actividad quinasa de serina y treonina en su región carboxilo terminal (Sadler and Williams, 2007) (Figura 3). El dsRBD consta de dos motivos de interacción con ARN (“dsRBM1 y dsRBM2”) separados por una región flexible de 20 aminoácidos (Green and Mathews, 1992). Estos motivos tienen una estructura secundaria idéntica que consiste en una conformación α - β - β - β - α y los dos son necesarios para unirse de manera óptima al ARN (McCormack et al., 1994; Schmedt et al., 1995). El dominio quinasa de PKR consiste en dos lóbulos, el lóbulo menor amino terminal con estructura secundaria de hoja plegada beta y el lóbulo mayor carboxilo terminal formado en su mayoría por hélices alfa (Dar et al., 2005; Dey et al., 2005). El lóbulo menor y el dsRBD están involucrados en la dimerización de PKR requerida para su activación, mientras que el lóbulo mayor contiene el sitio de interacción con el sustrato y el sitio catalítico (Dar et al., 2005; Li et al., 2006).

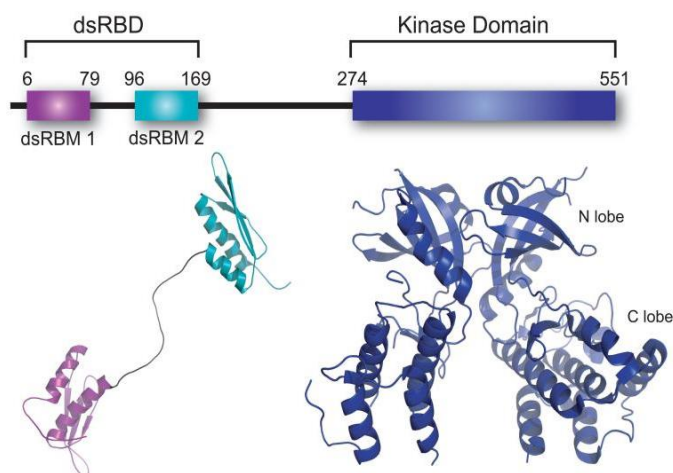


Figura 3. Modelo de estructura de PKR que muestra los dominios funcionales de la proteína (figura tomada de Nallagatla et al., 2011)

La proteína PKR se encuentra habitualmente en las células como un monómero inactivo y se activa por estrés oxidativo, factores de crecimiento, citoquinas, en respuesta al ARN de doble cadena, la actividad de las caspasas 3, 7 y 8, pequeñas moléculas poli-aniónicas como heparina o tras la unión a proteínas como la proteína activadora de PKR (PACT) o el gen estimulado por el interferón 15 (ISG15) (García et al., 2006; Okumura et al., 2013; Saelens et al., 2001).

La unión al ARN a través de su dsRBD, produce un cambio en la conformación de PKR que favorece su dimerización. La dimerización promueve la auto-fosforilación de los residuos Thr446 y Thr451 en el dominio catalítico y así favorece el reconocimiento y fosforilación de eIF2 α (Dey et al., 2005; Zhang et al., 2001) (Figura 4). Además, la fosforilación de PKR en otros residuos como la tirosina 101, 162 y 293 parece ser necesaria para la óptima activación de PKR (Su et al., 2006). La activación de PKR por ISG15 requiere su conjugación a las lisinas 69 y 159 de la quinasa (Okumura et al., 2013). Esta conjugación activa PKR en ausencia de infección viral e inhibe la síntesis de proteínas.

Además de estos estímulos activadores, numerosos factores regulan negativamente la actividad de PKR. Entre otros se encuentran la conjugación de PKR a ubiquitina o la acción de numerosas proteínas virales. En el caso de ubiquitina, el resultado final parece depender en gran medida de los niveles existentes de PKR conjugada a cadenas de ubiquitina unidas entre sí por la lisina 48 (ubiquitina-K48) y aquellos en los que se encuentra conjugada a cadenas de ubiquitina unidas entre sí a través de la lisina 63 (ubiquitina-K63). De esta forma, aunque PKR puede modificarse por ambas cadenas, sólo la poliubiquitinación de PKR con cadenas de ubiquitina-K63 conducen a la degradación de la quinasa (Perkins et al., 2010).

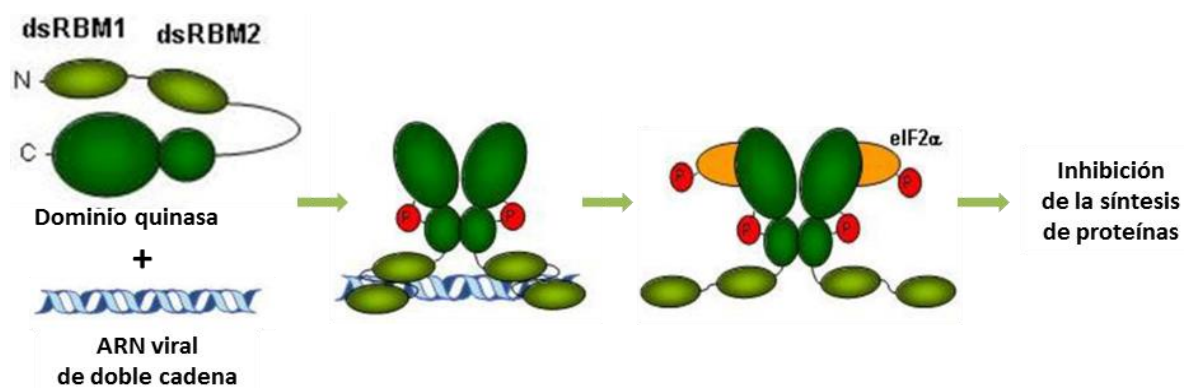


Figura 4. Modelo de activación de PKR en respuesta al ARN de doble cadena. PKR se une al ARN a través de su dominio de unión a ARN lo que induce un cambio en la conformación de PKR, su dimerización y activación. La proteína PKR activa fosforila eIF2 α e inhibe la síntesis de proteínas (figura adaptada de Dauber and Wolff, 2009).

2.2 Vías de señalización afectadas por PKR

PKR desempeña un papel importante en procesos de apoptosis, reparación del ADN, proliferación, diferenciación y metabolismo (García et al., 2006). Estas actividades las lleva a cabo a través de la modulación de distintas dianas. Una de estas dianas es el supresor de tumores p53. PKR puede interactuar con el supresor de tumores p53 y fosforilarlo en la serina 392 *in vitro* (Cuddihy et al.,

1999). Además, en respuesta a estrés, PKR parece favorecer la SUMOilación, estabilización y fosforilación de p53 y la consiguiente parada en G1 del ciclo celular (Bennet et al., 2012).

PKR también interacciona con los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) 1 y 3, proteínas que forman parte de las cascadas de señalización del IFN y otras citoquinas, aunque las consecuencias de esta interacción podrían depender del tipo celular o estímulo. Así, se ha descrito que la interacción de PKR con STAT1 inhibe la unión al ADN y la actividad de transactivación de STAT1 sin afectar a su fosforilación (Wong et al. 1997; Ramana et al. 2000). Por el contrario, en determinadas condiciones PKR puede reducir la fosforilación en tirosina de STAT1 y STAT3 (Wang et al., 2006), inducir la fosforilación de STAT1 en tirosina (Ruuska et al., 2013) o favorecer la fosforilación de STAT1 en serina (Handy and Patel, 2013).

Otra diana de PKR es la proteína con dominio de muerte asociada a Fas (FADD). En respuesta a estrés severo PKR activa la vía molecular FADD/caspasa8/caspasa3 lo que induce la fragmentación del antígeno humano R (HuR) generándose así los productos HuR-CP1 y Hu-CP2 que funcionan como inductores de apoptosis (von Roretz and Gallouzi, 2009).

En la inducción de apoptosis por PKR en respuesta a la infección viral parece hay dos vías que juegan un papel relevante. Por un lado, la fosforilación del factor eIF2a (Donnelly et al., 2013) y por otro la vía del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B). PKR regula la activación de NF- κ B mediante su interacción con la quinasa de la proteína inhibidora I κ B (IKK). Esto resulta en la fosforilación y degradación de I κ B, lo cual permite la translocación de NF- κ B al núcleo y la activación de la vía (Gil et al., 2000; Zamanian-Daryoush et al., 2000).

PKR también regula la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Esta fosfatasa está formada por una subunidad catalítica y varias subunidades reguladoras (Lechward et al., 2001). PKR interacciona con la subunidad reguladora B56 α y la fosforila, lo que resulta en el aumento de la actividad de PP2A y un menor ritmo de síntesis de proteínas o en la translocación de PP2A a la membrana mitocondrial y la defosforilación e inactivación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Ruvolo et al., 2008; Xu and Williams, 2000).

Otra vía cuya regulación por PKR también podría depender del estímulo o tipo celular es la vía de AKT. Así, aunque se ha descrito que en líneas celulares derivadas de leucemias PKR podría regular negativamente la activación de AKT mediante un mecanismo que involucra la actividad fosfatasa de

PP2A (Blalock et al., 2009), en otros contextos PKR activa AKT (von Holzen et al., 2007; Kazemi et al., 2007).

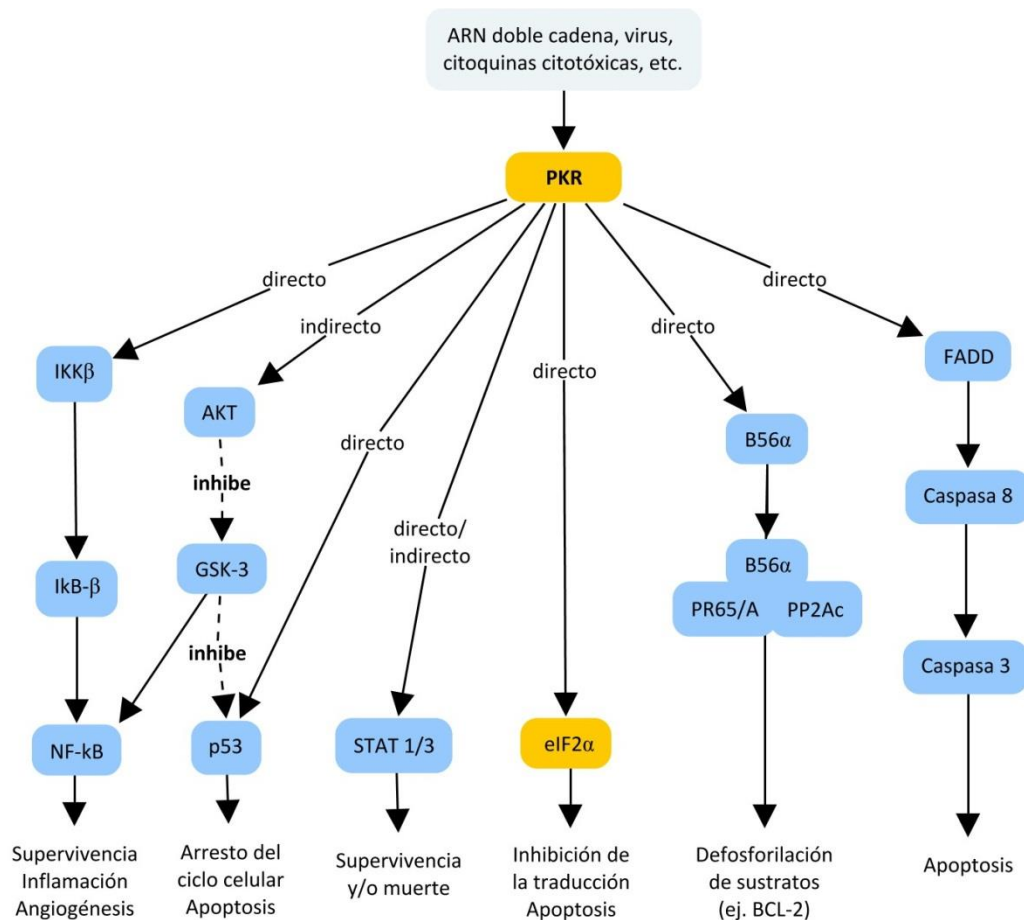


Figura 5. Vías de señalización afectadas por PKR. Figura adaptada de Blalock et al., 2010.

La implicación de PKR en el control de todas estas vías moleculares (Figura 5) justifica su papel en numerosos procesos celulares. Sin embargo, la actividad más ampliamente reconocida para PKR es su papel antiviral. Esta actividad de PKR está mediada fundamentalmente a través de tres vías: la fosforilación de eIF2 α que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas, la activación de NF- κ B que contribuye a la inducción de apoptosis y la activación de la producción de interferón (Schulz et al., 2010). Así, PKR está implicada en el control del virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis D (HDV), virus del Nilo Occidental, virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), virus Sindbis, virus de la encefalomiocarditis o el virus herpes simplex 1 (HSV-1), entre otros (Sadler and Williams, 2008). La importancia de PKR en la respuesta antiviral queda patente ya que muchos virus, tanto de ADN como de ARN, han desarrollado estrategias para regular la actividad de PKR mediante la inhibición de su dimerización o activación,

inducen cambio de su localización celular, secuestran el ARN de doble cadena, sintetizan pseudosustratos que compiten con eIF2 α e inhiben su fosforilación, activan fosfatasa antagonistas de la actividad de PKR o inducen la degradación de PKR (García et al., 2006; Dauber and Wolff, 2009).

2.3 Enfermedades asociadas a la desregulación en la actividad de PKR

La desregulación en la actividad de PKR se ha relacionado con el desarrollo de cáncer ya que la expresión del mutante de PKR en la lisina 296, que funciona como dominante negativo, en células NIH-3T3 induce su transformación (Koromilas et al., 1992) y algunas líneas celulares derivadas de leucemias son defectivas en la activación de PKR (Blalock et al., 2010). Sin embargo, otros resultados apuntan a que PKR podría funcionar como un oncogén. Así, se han encontrado mayores niveles de PKR y su activación en tumores de colon o seno, en melanomas y carcinoma hepatocelular (García et al., 2006). También se han observado niveles elevados de PKR en la anemia de Fanconi. La anemia de Fanconi es el resultado de la mutación en los genes FANCA involucrados en la reparación del ADN. PKR puede interactuar con algunas de las proteínas de la anemia de Fanconi como FANCA, FANCC y FANCG. A través de dicha interacción se inhibe la actividad proapoptótica de PKR (Pang et al., 2002). Cuando las proteínas de la anemia de Fanconi están mutadas dicha interacción conduce a la hiperactivación de PKR y a la hipersensibilidad de las células al interferón (Pang et al., 2001). La apoptosis inducida por PKR parece así contribuir al fallo de la médula ósea que se produce de forma habitual en los enfermos de anemia de Fanconi (Blalock et al., 2010).

Otra enfermedad que se ha relacionado con una hiperactividad de PKR es la enfermedad de Alzheimer (Marchal et al., 2014). Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de péptidos amiloides β que forman placas seniles extracelulares y por la formación de ovillos neurofibrilares compuestos de proteína T-tau hiperfosforilada que causan la inducción de apoptosis celular y la pérdida de neuronas. Por un lado, la activación de PKR y posterior fosforilación de eIF2 α promueve la expresión de la beta secretasa 1 (BACE-1) (Ill-Raga et al., 2011; Mouton-Liger et al., 2012), una de las enzimas que proteoliza la proteína precursora de amiloide y por tanto, favorece el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Además, PKR también podría promover la fosforilación de la proteína T-tau a través de la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Bose et al., 2011).

3. Isoformas beta de la clase IA de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)

La familia de enzimas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) está implicada, entre otros, en la regulación del crecimiento celular, proliferación, movilidad y supervivencia. Dichas enzimas se clasifican en clase I, II y III en base a la especificidad de sustrato y a su estructura. Las de clase I son heterodímeros compuestos de una subunidad reguladora y una subunidad catalítica y se subdividen en clase IA y IB en función de los receptores con los que se acoplan (Jean and Kiger, 2014). Las PI3Ks de clase IA son las que presentan una relación clara con el desarrollo del cáncer. Constan de una subunidad reguladora (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ o p50 α) y una subunidad catalítica (p110 α , p110 β , p110 γ o p110 δ). Las isoformas p110 α y p110 β se expresan en todos los tejidos mientras que p110 γ y p110 δ se expresan principalmente en leucocitos (Jean and Kiger, 2014). Las subunidades reguladoras inhiben y estabilizan a las subunidades catalíticas y median su translocación a la membrana celular mientras que las subunidades catalíticas son las encargadas de fosforilar fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) dando lugar a fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) que actúa como señal para la activación de vías moleculares involucradas en proliferación, metabolismo, migración y supervivencia (Jabbour et al., 2014; Burke and Williams, 2014).

3.1 Subunidades beta de p85 y p110

La subunidad reguladora p85 β está codificada por el gen PIK3R2. Es una proteína de 728 aminoácidos que contiene dos dominios con homología a Src (nSH2 y cSH2) separados por un dominio intermedio (iSH2) que interactúa fuertemente con el dominio de unión a p85 de p110 β . Además, p85 β contiene en su región amino terminal un dominio SH3 y un dominio BH localizado entre dos regiones ricas en prolina (Figura 6) (Burke and Williams, 2014; Thorpe et al., 2015). Una diferencia importante entre la subunidad beta y la subunidad alfa de p85 es que p85 β tiene capacidad transformante cuando se sobreexpresa mientras que p85 α no. Esta capacidad y los altos niveles de expresión de p85 β que se detectan en ciertos cánceres como cáncer de seno y de colon han llevado a sugerir que p85 β puede funcionar como un oncogén (Cortes et al., 2012). Además, p85 β favorece la estabilidad y maduración de adhesiones focales y la metástasis tumoral (Cariaga-Martínez et al., 2014).

El gen PIK3CB que codifica la subunidad catalítica p110 β se transcribe en un ARN mensajero que al ser traducido genera una proteína de 1070 aminoácidos. p110 β presenta en el extremo amino terminal un dominio de interacción con p85 (ABD) seguido de un dominio de interacción con RAS

(RBD), un dominio C2, un dominio helicoidal y en el extremo carboxilo terminal es donde se localiza el dominio quinasa conformado por el lóbulo N y el lóbulo C (Figura 6) (Burke and Williams, 2014; Thorpe et al., 2015). La inhibición de la actividad quinasa basal de p110 β está mediada por interacciones entre el dominio iSH2 de p85 con el dominio C2 de p110 β , el dominio nSH2 de p85 con los dominios C2, helicoidal y quinasa de p110 β y el dominio cSH2 de p85 con el dominio quinasa de p110 β (Figura 6) (Burke and Williams, 2014). La proteína p110 β se diferencia de la subunidad catalítica p110 α en que si se sobreexpresa en ausencia de co-transfección con la subunidad reguladora p85 tiene actividad transformante (Kang et al., 2006).

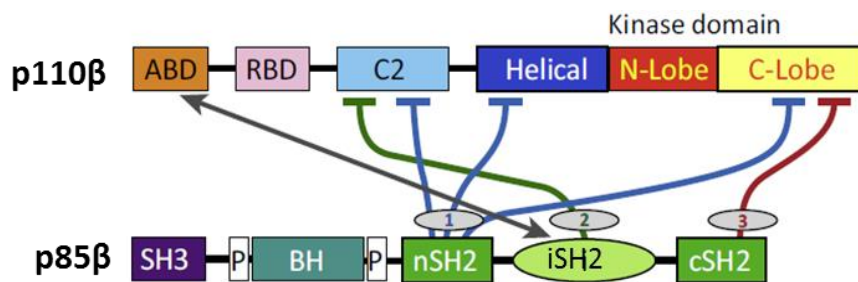


Figura 6. Dominios estructurales de las subunidades beta de p85 y p110. Las líneas representan las interacciones e inhibiciones existentes entre p85 β sobre p110 β (Figura adaptada de Burke and Williams, 2015).

En ausencia de señales de activación, p85 interacciona con p110 e inhibe su actividad quinasa. En respuesta a diversos estímulos se produce la activación de receptores tirosina quinasa (RTKs), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o RAS, lo que provoca el reclutamiento de PI3K a la membrana celular. Ya en la membrana, la interacción de p85 con los receptores o proteínas adaptadoras libera p110 pudiendo así fosforilar PIP2 y generar PIP3, el cual actúa como segundo mensajero para la activación de vías de señalización efectoras (Figura 7) (Burke and Williams, 2014; Thorpe et al., 2015). Determinadas mutaciones en el gen que codifica para p85 β como algunas detectadas en pacientes con cáncer de endometrio y colorectal (Cheung et al., 2011; [Jaiswal et al., 2009](#)) o la presencia de ligandos que interaccionan con p85 β e interrumpen la inhibición de p110, como la proteína NS1 del virus Influenza o la proteína NSP1 de rotavirus (Bagachi et al., 2013; Hale et al., 2006), pueden también inducir la activación de p110.

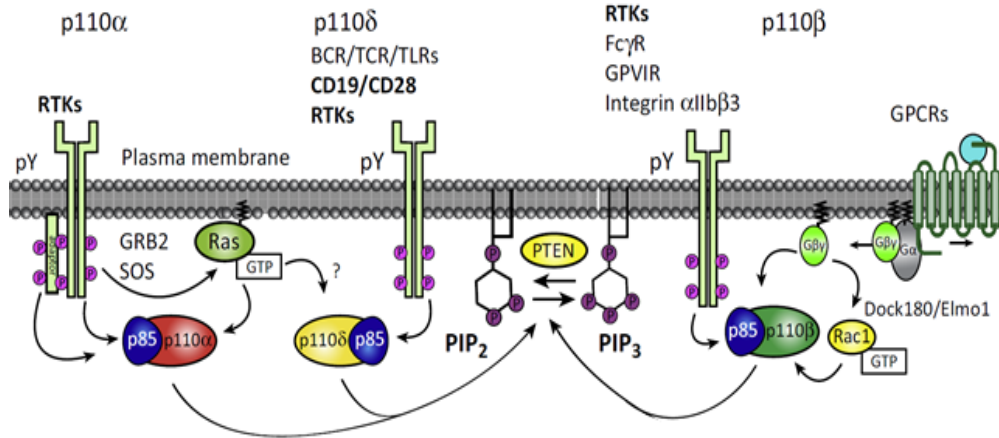


Figura 7. Activación de las distintas PI3K de clase I. Para su activación, las PI3K integran una gran variedad de estímulos directos e indirectos a partir de receptores tirosina quinasa (RTKs), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o la superfamilia de GTPasas RAS. Una vez activadas, las PI3K catalizan la fosforilación de PIP₂ en PIP₃. PTEN inactiva la vía de PI3K al defosforilar PIP₃ (figura adaptada de Burke and Williams, 2015).

3.2 PI3K y virus

La actividad de PI3K favorece la supervivencia celular, mientras que la inactivación de PI3K resulta en apoptosis. Durante la infección viral, la apoptosis representa un mecanismo altamente efectivo para controlar la replicación y diseminación de virus. Por ello, los virus han desarrollado estrategias para activar la vía molecular de la PI3K y así favorecer su replicación. Algunos ejemplos de virus con esta capacidad son el virus Influenza A, el virus Ebola, HCV, HSV-1 o VV. Todos ellos activan la vía de PI3K en dos momentos diferentes de la infección (Diehl and Schaal, 2013; Dunn and Connor, 2012). Una primera activación tiene lugar en el momento de entrada del virus o en etapas tempranas de la infección y parece estar relacionada con el proceso de entrada de los virus a las células mediante endocitosis (Diehl and Schaal, 2013). Una vez dentro de las células se produce una segunda activación de la vía, a través de mecanismos diversos que en muchos casos no se conocen con exactitud y con un fin aún no claramente demostrado. Uno de los casos más estudiados es el virus Influenza A que para activar la vía PI3K/AKT requiere de la interacción entre la proteína NS1 del virus con p85β, aunque los detalles moleculares de cómo se produce esta activación se desconocen (Ehrhardt et al., 2007; Hale et al., 2006). Si esta segunda activación de la vía PI3K/AKT por Influenza contribuye o no al control de apoptosis no está claro. La inhibición de apoptosis y favorecer la síntesis de las proteínas virales parece ser las principales consecuencias tras la activación de la vía PI3K/AKT por la proteína Nef de VIH (Wolf et al., 2001), LMP1 de EBV (Dawson et al., 2003), MIEPs de HCMV (Yu and Alwine, 2002), NS5A de HCV (Street et al., 2004) o NSP1 de Rotavirus (Bagchi et al., 2010).

4. Quinasa AKT1

El PIP3 generado por la PI3K recluta a la membrana celular una serie de proteínas efectoras que poseen dominio PH (“pleckstrin homology”) (Lemmon, 2008). Dentro de las proteínas reclutadas por PIP3 se encuentran las quinasas de serina y treonina AKT, la quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos 1 (PDK1), proteínas activadoras de hidrolasas de GTP (GAPs) y proteínas intercambiadoras de guanina (GEFs) (Burke and Williams, 2014). En este trabajo nos centramos en el estudio de la proteína AKT que es el efector más estudiado de la vía PI3K ya que fosforila una gran cantidad de sustratos involucrados en metabolismo, progresión del ciclo celular, supervivencia, migración y angiogénesis, entre otros (Cohen, 2013; Martelli et al., 2012).

La proteína AKT, también conocida como proteína quinasa B (PKB), es una quinasa de serina y treonina. Existen tres isoformas (AKT1/2/3 o PKB α / β / γ) codificadas por tres genes localizados en tres cromosomas diferentes (Martelli et al., 2012). En este trabajo nos centramos en AKT1 que se expresa a altos niveles en todos los tejidos. AKT2 se expresa a altos niveles en músculo y adipocitos y AKT3 tiene una distribución limitada y se encuentra principalmente en el cerebro y los testículos (Cohen, 2013).

4.1 Estructura y activación de AKT1

Las tres isoformas de AKT poseen alta homología en su secuencia de aminoácidos y una estructura altamente conservada. La proteína AKT1 posee 480 aminoácidos, un peso molecular de 56 kDa y dominios estructurales bien definidos: un dominio PH en su región amino terminal (aminoácidos 5 al 108), el dominio quinasa (aminoácidos 150 al 408) que contiene el “loop” de activación y está separado del dominio PH por una región helicoidal y una región reguladora (RD) que contiene un motivo hidrofóbico en su región carboxilo terminal (aminoácidos 409 al 480) (Figura 8) (Martelli et al., 2012; Vanhaesebroeck and Alessi, 2000).

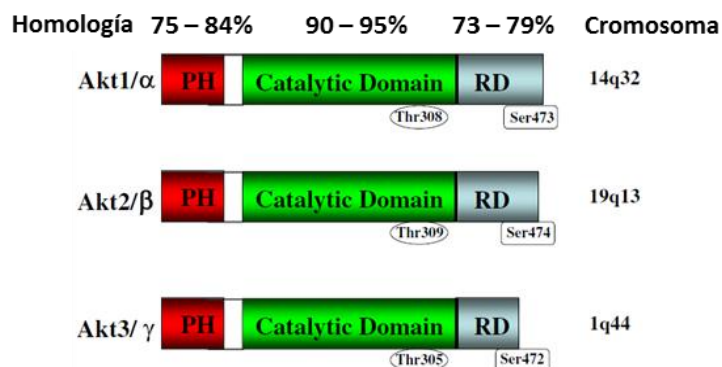


Figura 8. Dominios estructurales de AKT. Se indica la homología existente entre los dominios de las tres isoformas de AKT y la posición de los residuos aminoácidos importantes para su activación (figura adaptada de Martelli et al., 2012)

En ausencia de señales de activación, AKT se mantiene en la célula en un estado inactivo debido a interacciones entre el dominio pH y el dominio quinasa (Calleja et al., 2007). La generación de PIP3 estimula la translocación de AKT a la membrana celular (Lemmon, 2008). La interacción del dominio PH de AKT con PIP3 induce un cambio conformacional en AKT que expone el “loop” de activación para que PDK1 fosforile la treonina 308 y active parcialmente AKT (Alessi et al., 1997) (Figura 9). La completa activación de AKT se induce por la fosforilación de la serina 473 localizada en el motivo hidrofóbico de la región carboxilo terminal. Dicha fosforilación es llevada a cabo por mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) (Sarbasov et al., 2005) (Figura 9) o por la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) (Feng et al., 2004). Una vez activada, AKT reconoce y fosforila la secuencia RxRxx(S/T) Ψ donde R es arginina, x es cualquier aminoácido, S/T son serina o treonina y Ψ representa un residuo hidrofóbico grande (Hers et al., 2011). La defosforilación de AKT en la treonina 308 por la fosfatasa PP2A y en la serina 473 por las fosfatasas que contiene repeticiones ricas en leucina en el dominio PH 1/2 (PHLPP1/2) inactiva AKT.

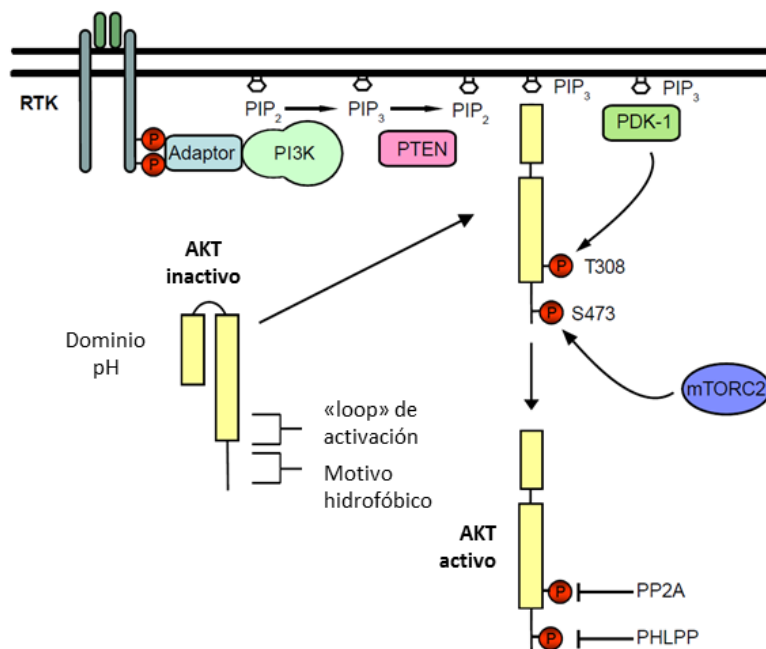


Figura 9. Activación de AKT. La generación de PIP3 por PI3K promueve la translocación de AKT a la membrana celular donde es fosforilada por PDK1 lo que activa parcialmente a la quinasa. Posteriormente mTORC2 fosforila AKT lo que permite su completa activación. Las fosfatasas PP2A y PHLPP defosforilan e inactivan AKT (figura adaptada de Hers et al., 2011)

4.2 Vías de señalización reguladas por AKT1

Una de las dianas de AKT1 es la fosfatasa de tirosinas 1B (PTP1B). La fosforilación de PTP1B por AKT regula su actividad fosfatasa, evitando que defosforile y disminuya la señalización del receptor de insulina (Ravichandran et al., 2001). Asimismo, AKT regula el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno a través de la fosforilación e inactivación de GSK-3 (Cross et al., 1995) lo que impide la

fosforilación e inactivación de la enzima glucógeno sintasa, lo cual promueve un aumento en la síntesis y almacenamiento de glucógeno. Además, AKT promueve el crecimiento celular al inducir la síntesis de proteínas por medio de la activación de mTORC1. AKT fosforila e inactiva el sustrato de AKT rico en prolina de 40 kDa (PRAS40) y la proteína de la esclerosis tuberosa 2 (TSC2) que inhiben directa e indirectamente a mTORC1, respectivamente (Vander Haar et al., 2007), involucrado en la iniciación de la traducción, biogénesis de ribosomas y progresión del ciclo celular (Manning and Cantley, 2007).

AKT también promueve la supervivencia de las células al inducir la transcripción de genes por el factor de transcripción NF- κ B. AKT activa IKK α , el cual a su vez fosforila y promueve la degradación de la proteína inhibidora de NF- κ B, I κ B. La degradación de I κ B induce la translocación de NF- κ B al núcleo donde promueve la transcripción de genes involucrados en supervivencia celular (Romashkova and Makarov, 1999). Asimismo, AKT modula positivamente la actividad de la proteína de unión a elementos de respuesta al AMP cíclico (CREB). La fosforilación de CREB por AKT induce su interacción con proteínas necesarias para la transcripción de genes de supervivencia como Bcl-2 (Du and Montminy, 1998). Por otro lado, AKT regula negativamente la apoptosis celular al fosforilar los factores de transcripción FOXO1a, FOXO3a y FOXO4 (Kloet and Burgering, 2011) y de esta forma inducir su translocación al citoplasma, disminuyendo así la transcripción de genes involucrados en la inducción de apoptosis. AKT también previene la apoptosis y promueve la supervivencia celular al fosforilar las proteínas pro-apoptóticas Bad y Bax (Datta et al., 2002). La fosforilación de Bad interrumpe su interacción con- y la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL. La fosforilación de Bax bloquea su translocación a la mitocondria donde promueve la apoptosis (Maddika et al., 2007). AKT también fosforila MDM2 (murine double minute 2), una ubiquitina ligasa que controla los niveles de p53 en el núcleo (Momand et al., 2000). La fosforilación de MDM2 por AKT le confiere mayor estabilidad, lo cual conduce a una disminución en la apoptosis inducida por p53 (Feng et al., 2004).

AKT también promueve la progresión del ciclo celular. En respuesta a diferentes estímulos AKT migra hacia el núcleo durante el inicio de la fase G1 del ciclo celular (Astoul et al., 1999; Meier et al., 1997; van Opstal et al., 2012). En el núcleo, AKT fosforila las proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) p21 y p27. La fosforilación de p21 y p27 por AKT resulta en su translocación al citoplasma, lo cual libera la inhibición de las CDKs y promueve la progresión del ciclo celular (Shin et al., 2002; Zhou et al., 2001).

Debido a la relevancia de las actividades de AKT para la célula, una alteración en sus niveles o en su activación se asocia con múltiples patologías. La asociación de AKT1 con el desarrollo de cáncer está relacionada con el aumento en su activación por la existencia de mutaciones o la desregulación de moléculas implicadas en su activación, como los receptores tirosina quinasa o la PI3K (Cheung and Testa, 2013). Sin embargo, también se ha descrito una actividad oncogénica de AKT1 relacionada con su amplificación o con la existencia de cambios conformacionales en su estructura debido a mutaciones (Carpten et al., 2007; Kumar and Purohit, 2013). Así, en cáncer de seno, colorrectal y de ovario se ha identificado un mutante E17K en el dominio PH de AKT1 que presenta una mayor afinidad por PIP2, lo cual induce su localización y activación en la membrana celular en ausencia de PIP3. Este mutante es cuatro veces más activo que la proteína AKT1 silvestre (Carpten et al. 2007; Kumar and Purohit, 2013). La desregulación en la actividad de la proteína AKT también se ha relacionado con el desarrollo de diabetes, fibrosis renal y patologías cardiovasculares y neurológicas (Hers et al., 2011; Lan and Du, 2015).

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Las modificaciones post-traduccionales son una forma rápida, eficiente y reversible de regular la función de proteínas sin necesidad de sintetizar proteínas *de novo*. La SUMOilación es el proceso por el cual las proteínas SUMO se conjugan a sus proteínas sustrato. SUMO modifica y regula la actividad de proteínas celulares involucradas en múltiples procesos celulares así como proteínas expresadas por una gran variedad de patógenos. En este trabajo analizamos la SUMOilación de la proteína PKR y de diversos componentes de la vía molecular PI3K/AKT. Además, estudiamos si la infección por virus altera esta modificación post-traducciona. Por tanto, los objetivos son:

- Analizar la modificación de PKR por SUMO
- Evaluar el papel de SUMO en la actividad antiviral de PKR
- Analizar la modificación de los componentes de la vía molecular PI3K/AKT p85 β , p110 β y AKT1 por SUMO
- Investigar las consecuencias funcionales de la modificación de p85 β , p110 β y AKT1 por SUMO
- Analizar si la infección viral altera la SUMOilación de las proteínas estudiadas

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y medios de cultivo

Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo (Tabla 1) son adherentes, se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco “DMEM” (Gibco) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (Gibco), 5 mmol/L de L-glutamina (Invitrogen) y 5×10^4 U/ml penicilina-estreptomicina (Invitrogen). Las células se crecieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Tabla 1. Líneas celulares

Nombre	Origen
HEK-293	Riñón de embrión humano
MCF-7	Tumor de mama humano
PKR -/-	Fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratones carentes de PKR
HeLa	Adenocarcinoma de cuello uterino humano
BSC-40	Epiteliales de riñón de mono verde africano
NIH-3T3	Fibroblastos embrionarios inmortalizados de ratón
COS-7	Riñón de mono verde africano transformadas con un mutante de SV40
PC3	Adenocarcinoma de próstata humano
U251	Glioblastoma humano
CEF	Fibroblastos embrionarios de pollo

2. Transfección celular

La transfección de las células se realizó con agentes lipídicos capaces de formar liposomas y encapsular ácidos nucleicos en un ambiente acuoso. Las células HEK-293, MCF-7, PKR -/-, NIH-3T3, COS-7, U251, PC3 y CEF se sembraron al 80% de confluencia y se transfectaron con el reactivo Xtreme GENE9 (Roche). La mezcla de transfección se preparó en medio OPTIMEM: el reactivo de transfección se diluyó en OPTIMEM y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se añadió el ADN plasmídico siguiendo una relación de $1 \mu\text{g}/10^6$ células y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla de transfección se añadió sobre las células. Las células HeLa se sembraron al 90% de confluencia y se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El reactivo de transfección y el ADN plasmídico se diluyeron por separado en OPTIMEM y tras incubarlos durante 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron. La solución

resultante se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió sobre las células. Transcurridas entre 4 y 6 horas, se sustituyó el medio con lipofectamina por medio de cultivo fresco. Los ARN pequeños de interferencia se transfectaron con lipofectamina según lo descrito anteriormente, independientemente del tipo celular.

3. Generación de líneas celulares estables

3.1 Células estables para la expresión de PKR-WT y PKR-SUMOmut

Co-transfectamos células PKR $-/-$ con los plásmidos que codifican para la proteína PKR silvestre (HA-PKR-WT) o el mutante en SUMOilación de PKR (HA-PKR-SUMOmut) junto con el plásmido pBabe-puro que permite la selección con puromicina, en proporción 10:1, respectivamente. Las células transfectadas se incubaron durante 72 horas y a continuación se seleccionaron mediante su incubación en medio de cultivo suplementado con puromicina (3 $\mu\text{g/ml}$). La expresión de HA-PKR-WT y HA-PKR-SUMOmut en las células seleccionadas se comprobó mediante un ensayo de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-HA.

3.2 Células estables para la expresión de las proteínas p110 β silvestre y mutantes

Co-transfectamos células NIH-3T3 con el plásmido que codifica para la proteína p110 β silvestre (Myc-p110 β -WT) o el mutante en SUMOilación Myc-p110 β -K952R junto con el plásmido pBabe-puro siguiendo una relación 10:1, respectivamente. Transcurridas 48 h de la transfección las células se seleccionaron mediante su incubación en medio de cultivo suplementado con puromicina (1 $\mu\text{g/ml}$). La expresión de Myc-p110 β -WT o el mutante Myc-p110 β -K952R se comprobó mediante inmunoprecipitación seguido de Western-blot, ambos con anticuerpo anti-Myc.

3.3 Células estables para la expresión de las proteínas p85 β silvestre y mutantes

Transfectamos células NIH-3T3 con el plásmido que codifica para la proteína p85 β silvestre (HA-p85 β -WT) o los mutantes en SUMOilación HA-p85 β -K535R, HA-p85 β -K592R o HA-p85 β -K535R/K592R. Transcurridas 48 h de la transfección, las células se seleccionaron mediante su incubación en medio de cultivo suplementado con el agente de selección genética (G418, SIGMA) (800 $\mu\text{g/ml}$). La expresión de los plásmidos transfectados se comprobó mediante un ensayo de Western-blot utilizando un anticuerpo anti-HA.

4. Infección viral

Se emplearon los siguientes virus: la cepa Indiana del virus de la estomatitis vesicular (VSV) cedida por el laboratorio del Dr. Mariano Esteban (CNB), el virus vaccinia recombinante que expresa PKR en respuesta al tratamiento con isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (VV-PKR) cedido por el laboratorio del Dr. Mariano Esteban (Lee et al., 1996) y la cepa PR8 del virus influenza y la carente de la proteína NS1 del virus influenza (Influenza Δ NS1) cedidos por el laboratorio de Amelia Nieto (CNB). En todos los casos las células se incubaron durante 1 h con el virus indicado a una multiplicidad de infección (MOI) que varió entre 1 y 10 unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula), como se especifica en cada experimento. Después, se retiró el virus y las células se incubaron en medio de cultivo suplementado con 2% de suero, si se trataba de VSV o VV-PKR, y medio de cultivo suplementado con tripsina cuando se trataba de influenza. El tiempo de incubación post-infección dependió de cada experimento.

5. Titulación viral

La titulación se realizó por triplicado en placas de 12 pocillos por el método de formación de placas. Se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes que contenían los virus y con ellos se infectaron las células como se describió anteriormente. Después de la hora de incubación con el virus, las células se incubaron en agar 0,9% en DMEM suplementado con 2% de suero, cuando se trataba de VSV o VV-PKR, y en agar 0,9% en DMEM sin suero y suplementado con tripsina, cuando se trataba de influenza. Después de solidificado el agar, las células se incubaron a 37°C durante 24 a 72 h dependiendo del virus a titular. Finalmente, la mezcla de agar-DMEM se retiró de los pocillos teniendo cuidado de no perturbar la monocapa de células y se tiñeron las placas con cristal violeta al 0,1%. El título viral se expresó como unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml).

6. Ensayo MTT de proliferación celular

En este ensayo, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células metabólicamente activas a formazán, un compuesto de color azul que puede ser solubilizado y cuantificado por espectrofotometría. Se sembraron por quintuplicado en placas de 96 pocillos entre 1000 a 100 000 células por pocillo en DMEM sin suero o suplementado con 10% de suero, dependiendo de cada experimento. A distintos

tiempos después de sembrar añadimos el MTT (1 mg/ml) a las células y las incubamos a 37°C durante 5 h. Transcurrido este tiempo se retiró el medio, las células se resuspendieron en dimetil sulfóxido (DMSO, 50 µl/pocillo) y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro.

7. Ensayo de formación de focos

Las células no transformadas crecen en monocapa y dejan de crecer al establecer contacto con otras células, mientras que las células transformadas crecen unas sobre otras, eventualmente formando focos de crecimiento. En este ensayo se evalúa si las células han perdido la inhibición por contacto, un indicativo de transformación celular. Las células NIH-3T3 (5×10^5) a ensayar se sembraron en placas de 60 mm de diámetro y se incubaron en medio de cultivo suplementado con 5% de suero durante 14 días (cambiando el medio cada tres días). Transcurrido este tiempo las células se lavaron con PBS, se fijaron y se tiñeron con cristal violeta para realizar el conteo de focos.

8. Ensayo de formación de colonias en agar blando

Este ensayo evalúa la capacidad de las células para crecer sin adherirse al plástico de la placa de cultivo, indicativo de transformación celular. Placas de 60 mm de diámetro se cubrieron con 3 ml de agarosa 0,5% en DMEM suplementado con suero al 10% y se dejaron enfriar. A continuación, 3×10^5 células se resuspendieron en 4 ml agarosa 0,3% en DMEM suplementado con 10% de FBS y se sembraron sobre la capa de agarosa de la placa. Las células se incubaron a 4°C durante 15 min para que la agarosa se solidificara. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C durante 2 a 3 semanas hasta observar la formación de colonias, añadiendo 1 ml de agarosa 0,3% en DMEM cada semana.

9. Bacterias competentes

Las cepas bacterianas *Escherichia coli* DH5α y BL21 se utilizaron para obtener bacterias competentes, aptas para ser transformadas con ADN plasmídico. Se inoculó 1 colonia aislada en 10 ml de medio de cultivo LB y se incubó toda la noche a 37°C en agitación a 170 rpm (pre-cultivo). Al día siguiente, se inoculó 1 ml del pre-cultivo en 100 ml de medio LB y se incubó a 18°C en agitación a 400 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 - 0,7 (a 580 nm). A continuación, las bacterias se incubaron en hielo durante 10 min, se centrifugaron a 4°C durante 20 min a 4500 x g y se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 32 ml de tampón TB (apartado 35-A) frío y se incubaron en hielo durante 10 min. Después las bacterias se centrifugaron a 4°C durante 20 min a

4500 x g y se descartó el sobrenadante. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 8 ml de tampón TB-DMSO 7 %, se incubaron en hielo durante 10 min y se repartieron en tubos de 1,5 ml previamente enfriados. Los tubos con bacterias competentes se guardaron a -80°C hasta su uso.

10. Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes se descongelaron en hielo y se incubaron con el ADN plasmídico de interés durante 30 min en hielo. A continuación, se sometieron a choque térmico incubándolas a 42°C durante 45 s y posteriormente se incubaron en hielo durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 500 µl de caldo de cultivo LB sin antibióticos a las bacterias y se incubaron a 37°C en agitación a 500 rpm durante 1 h. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico de interés y se incubaron a 37°C durante 16 h.

11. Extracción del ADN plasmídico

La extracción y purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos se llevó a cabo en función de la cantidad de ADN requerida, utilizando los distintos kits comerciales disponibles en el laboratorio siguiendo las indicaciones del fabricante (Qiagen o JetStar). Para cuantificar el ADN se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

12. Purificación de proteínas fusionadas a GST

Se inoculó 1 colonia de bacterias transformadas con el plásmido que codifica para la proteína de interés fusionada a GST en 20 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de resistencia (pre-cultivo) y se incubó toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, el pre-cultivo se refrescó en 200 ml de medio LB suplementado con antibiótico y se incubó a 37°C con agitación a 225 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 - 0,7 (a 580 nm). Entonces, se añadió IPTG (1 mM) y se incubó a 25°C en agitación a 225 rpm durante 4 h. Transcurrido este tiempo, las bacterias se centrifugaron a 4°C y a una velocidad de 4500 x g durante 20 min y posteriormente se descartó el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 20 ml de PBS frío y se centrifugaron nuevamente. A partir de este punto, los pasos subsecuentes se realizaron en hielo y con los tampones fríos. Las bacterias se resuspendieron en 4 ml de PBS suplementado con NaCl (0,5 M), EDTA (1 mM) e inhibidores de proteasas (IPr, Sigma) (PBS-NaCl-EDTA-IP) y se sonicaron 5 veces durante 20 s a una

amplitud de 10. A continuación, añadimos Tritón X-100 hasta una concentración del 1 %. El lisado se centrifugó a 4°C a una velocidad de 20000 x g durante 20 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo frío. Al sobrenadante se le añadieron 200 µl de bolitas de glutation sefarosa previamente lavadas en una solución de PBS-NaCl-EDTA-IPr, y se incubó a 4°C en agitación durante 2 h. Las bolitas unidas a la proteína GST se centrifugaron a 880 x g a 4°C durante 2 min y a continuación se lavaron dos veces con PBS-NaCl-EDTA-IPr y 3 veces con una solución de Tris (50 mM) pH 7,5, NaCl (0,5 M). El análisis de la proteína purificada se realizó en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS) teñido posteriormente con azul de Coomassie.

13. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo son:

- pcDNA3.1
- pcDNA3-PKR-HA (Cedido por el Dr. B Y Ahn, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University)
- pcDNA-His6-SUMO1 (cedido por el Dr. Manuel S. Rodríguez, Inbiomed, San Sebastián)
- pcDNA-His6-SUMO2 (cedido por el Dr. Manuel S. Rodríguez, Inbiomed, San Sebastián)
- pcDNA-Ubc9-SV5 (cedido por el Dr. Manuel S. Rodríguez, Inbiomed, San Sebastián)
- pGL3 (Promega)
- pBabe-Puro (Addgene)
- pcDNA-HA-AKT1 (Addgene)
- pcDNA3-Myr-HA-AKT1 (Addgene)
- HA-PML (Cedido por el Dr. Jin-Hyun Ahn, Sungkyunkwan University School of Medicine, Korea)
- pSG5L-HA-PTEN (Addgene)
- pcDNA-HA-p85β (HA-p85β fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido pCEFL-HA-p85β como molde y los oligos p85βEcoRI-F 5´ - gggaattc gatgtaccggtacgatgtcccgg – 3´ y p85βNotI-R 5´ - gggcggccgctcagcgtgctgcagacggtggg – 3´. Posteriormente fue cortado con las enzimas EcoRI y NotI e insertado en el vector pcDNA)
- Myc-p110β (cedido por el Dr. Jonathan M. Backer del Albert Einstein College of Medicine de New York)

- pcDNA-NS1-HA (cedido por el laboratorio de Cesar Muñoz Fontela, Heinrich Pette Institut, Hamburgo)
- GST-NS1 (cedido por el laboratorio de Amelia Nieto, CNB-CSIC, Madrid)

14. Mutagénesis dirigida

Para generar las mutaciones de residuos aminoacídicos específicos en los plásmidos que codifican las proteínas estudiadas en este trabajo, se utilizó la ADN polimerasa de alta fidelidad (Roche) y los oligonucleótidos que se muestran en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de PKR

Oligonucleótido	Secuencia
PKR-K60R-F	5' – ggtgaaggtagatcaaggaaggaagcaaaaaatgccg – 3'
PKR-K60R-R	5' – cggcatttttggcttccttcttgatctacctcacc – 3'
PKR-K150R-F	5' – ggtacaggttctactagacaggaagcaaaacaattggcc – 3'
PKR-K150R-R	5' – ggccaattgtttgcttcctgtctagtagaacctgtacc – 3'
PKR-K304R-F	5 – gttaaataataaacgagagggcggagcgtgaag – 3'
PKR-K304R-R	5' – cttcacgctccgccctctcgttattatattaac – 3'
PKR-K440R-F	5' – ggactgtaacatctctgagaaatgatggaaagcg – 3'
PKR-K440R-R	5' – cgctttccatcatttctcagagatgttacaagtcc – 3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de la PI3K

Oligonucleótido	Secuencia
p85β-K535R-F	5' – cacgaaagccgcacgaggttgagcaggatctgc – 3'
p85β-K535R-R	5' – gcagatcctgctccaacctcgtgcggctttcgtg – 3'
p85β-K592R-F	5' – gaatggctgggaatcaggaacgagactgaggacc – 3'
p85β-K592R-R	5' – ggtcctcagtctcgttctgattcccagccattc – 3'
p110β-K647R-F	5' – gtgcaagtgttaagatatgaccttttc – 3'
p110β-K647R-R	5' – gaaaaggctcatatcttaacacttgac – 3'
p110β-K952R-F	5' – ctaagtttggcattagaaggagcgagtg – 3'
p110β-K952R-R	5' – cactcgctcccttctaatgccaaacttag – 3'

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el estudio de AKT1

Oligonucleótido	Secuencia
AKT1-K64R-F	5' – gccagctgatgaggacggccc – 3'
AKT1-K64R-R	5' – gggccgctcctcatcagctggc – 3'
AKT1-K182R-F	5' – cgccatgaagatcctcaggaggaagtcatcg – 3'
AKT1-K182R-R	5' – cgatgacttcctcctgaggatcttcatggcg – 3'
AKT1-K189R-F	5' – cgtggccaggacgaggtggccc – 3'
AKT1-K189R-R	5' – gggccacctcgtccctggccacg – 3'
AKT1-K276R-F	5' – ccgggacctcaggctggagaacc – 3'
AKT1-K276R-R	5' – ggttctccagcctgaggtcccgg – 3'

Una vez realizada la PCR, el producto de la misma se trató con DpnI durante al menos 1 hora y posteriormente se transformó en DH5 α . Los resultados de la mutagénesis se secuenciaron para comprobar la presencia de la mutación deseada y la no incorporación de cambios adicionales en la secuencia.

15. ARN

El conjunto de ARNs pequeños de interferencia específicos para silenciar la E2 SUMO ligasa Ubc9 (SiUbc9) y los ARNs pequeños de interferencia control (SiC) se adquirieron en Dharmacon (Thermo Scientific). El ácido poliinosínico-policitidílico (poli-IC) estructuralmente similar al ARN de doble cadena se adquirió de Sigma. La agarosa-poli-IC se obtuvo al mezclar un volumen de ácido poliinosínico (2 mg/ml) y dos volúmenes de ácido policitidílico fusionado a Agarosa (2 mg/ml) (Sigma) en tampón de ARN (apartado 35-B). La mezcla se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente, la agarosa-poli-IC se centrifugó a 990 x g a 4°C durante 2 min y se lavó 4 veces en tampón de ARN.

16. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo son:

- Anti-HA, monoclonal de ratón (Covance)
- Anti-HA, monoclonal de rata (Roche)
- Anti-PKR, monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology)

- Anti-PKR, policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-fosfo-PKR (Thr451), policlonal de conejo (Life Technologies)
- Anti-fosfo-eIF2 α (Ser51), policlonal de conejo (Life Technologies)
- Anti-eIF2 α , policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-SUMO1, policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-SUMO1, monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-SUMO2/3, policlonal de conejo (Life Technologies)
- Anti-SV5, monoclonal de ratón (Cell Signaling)
- Anti-VSV-M, monoclonal de ratón (KeraFAST)
- Anti-VSV-G, de conejo (Cedido por el Dr. Ivan Ventoso del CBM Severo Ochoa)
- Anti-AKT, policlonal de conejo (Cell Signaling)
- Anti-fosfo-AKT (Ser473), policlonal de conejo (Cell Signaling)
- Anti-FOXO3a, policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-fosfo-FOXO1/3A (Thr24/32), policlonal de conejo (Cell Signaling)
- Anti-fosfo-AKT-Sustrato, monoclonal de conejo (Cell Signaling)
- ANTI-PTEN, monoclonal de ratón (Cell Signaling)
- Anti-PML, policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-B23, monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-GAPDH, monoclonal de ratón (Millipore)
- Anti-actina, monoclonal de ratón (MP Biomedicals)
- Anti-alfa-tubulina, monoclonal de ratón (Serotec)
- Anti-p85 β , policlonal de rata (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-fosfo-p85 β (Tyr458), policlonal de conejo (Cell Signaling)
- Anti-p110 β , monoclonal de ratón (Millipore)
- Anti-Myc, monoclonal de ratón (Roche)
- Anti-talina, policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-E-cadherina, policlonal de conejo (Abcam)
- Anti-NS1, policlonal de conejo (Cedido por la Dra. Amelia Nieto del CNB)

17. Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios que se utilizaron en este trabajo son: anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (HRP), anti-IgG-HRP de conejo y anti-IgG-HRP de rata de GE Healthcare, anti-IgG/IgM-HRP de ratón de Millipore, anti-IgG-HRP de oveja de Molecular Probes, “True-blot Ultra” anti-IgG-HRP de ratón y “True-blot Ultra” anti-IgG-HRP de conejo de eBioscience y los anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia anti-IgG de ratón, conejo, rata o cabra conjugados con Alexa (A-488, A-546, A-594 y A-647) de Invitrogen.

18. Proteínas recombinantes y enzimas

Las proteínas recombinantes y enzimas utilizadas en este trabajo son: SAE 1/2 y SENP1 de Enzo Life Sciences, GST-PKR de MERK-Millipore, eIF2 α de Prospec, λ -fosfatasa, NotI y EcoRI de New England Biolabs, AKT1 de Calbiochem, DpnI de Roche Life Science. Las proteínas recombinantes SUMO1, SUMO2 y Ubc9 fueron cedidas por el Dr. Manuel S. Rodríguez (Inbiomed, San Sebastián). La proteína GST-p27 fue cedida por el Dr. Anxo Vidal (CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela). Las proteínas GST-SUMO1 y GST-NS1 se produjeron siguiendo el protocolo de purificación de proteínas fusionadas a GST descrito anteriormente.

19. Transcripción-Traducción de proteínas *in vitro*

La síntesis *in vitro* de proteínas se llevó a cabo utilizando el kit de transcripción-traducción *in vitro* “TnT Quick Coupled Transcription/Translation System” (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante, en presencia de metionina sin marcaje o de [³⁵S]-metionina radioactiva (Easy Tag Express Protein Labeling Mix [³⁵S], Perkin Elmer). Para comprobar la síntesis de las proteínas, 1 μ l de la proteína sintetizada se analizó en un gel de poliacrilamida-SDS seguido de Western-blot con anticuerpos específicos si las proteínas no estaban marcadas o se secó el gel y se analizó por autorradiografía si las proteínas estaban marcadas con [³⁵S]-metionina.

20. Ensayo de SUMOilación *in vitro*

Este ensayo consistió en una reacción que contenía la proteína a analizar sintetizada *in vitro*, 1 μ g de SUMO1 o SUMO2, 0,3 μ g de la enzima activadora de SUMO SAE 1/2 (Enzo Life Sciences), 600 ng de la enzima SUMO ligasa Ubc9 y ATP 2 mM junto con un sistema de regeneración (Tris 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 5mM, creatina fosfato 10 mM, creatina quinasa 3,5 U/ml y pirofosfatasa inorgánica 0,6 U/ml). Las reacciones se incubaron a 30°C durante 60-90 min. A continuación se añadió tampón de carga,

las muestras se hirvieron durante 5 min y se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS seguido de autorradiografía o Western-blot.

21. De-SUMOilación y de-fosforilación

Para comprobar que las bandas que se detectan tras una reacción de SUMOilación se corresponden verdaderamente con proteínas SUMOiladas, las proteínas sometidas a reacciones de SUMOilación *in vitro* se incubaron con 1 µg de la deSUMOilasa SENP1 (Enzo, Life Sciences) a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo tampón de carga e hirviéndolas durante 5 min.

Para remover los grupos fosfato de las proteínas fosforiladas, las muestras se incubaron con 400 U de λ-fosfatasa (New England Biolabs) durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo tampón de carga e hirviéndolas durante 5 min.

22. Ensayo de interacción con proteínas fusionadas a GST

Se utilizaron proteínas fusionadas a GST o la proteína GST control unidas a bolitas de glutation sefarosa (GE Healthcare). Antes de usar dichas proteínas se bloquearon incubándolas con albumina sérica bovina (BSA) (Sigma) al 2% en tampón de interacción (apartado 35-C) y en rotación durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavaron 4 veces con tampón de interacción (880 x g durante 2 min a 4°C) y se incubaron con la proteína de interés sintetizada *in vitro* en presencia de [³⁵S]-metionina durante 2 h a 4°C en rotación. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 880 x g durante 2 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y las bolitas se lavaron con 500 µl de tampón de interacción, cuatro veces. Finalmente, las bolitas se resuspendieron en tampón de carga, se hirvieron durante 5 min y se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS seguido de autorradiografía.

23. Ensayo de interacción con ARN

Para los ensayos de interacción con ARN de doble cadena se utilizó agarosa-poli-IC preparada como se describió anteriormente. Como control negativo se utilizó agarosa. La agarosa-poli-IC se incubó en tampón de interacción con la proteína de interés sintetizada *in vitro* en presencia de [³⁵S]-metionina, durante 2 h a 4°C en rotación. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 990 x g a 4°C durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se lavó con tampón de interacción cuatro veces. Finalmente, la agarosa se

resuspendió en tampón de carga, se hirvió durante 5 min y las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS seguido de autorradiografía.

24. Purificación de proteínas fusionadas a una cola de histidinas

Transcurridas entre 24 y 72 h de la transfección de las células con los plásmidos que codifican para las proteínas fusionadas a una cola de histidinas, se recogió un 10% de las células, se resuspendieron en tampón de carga y se hirvieron durante 5 min. Esta fracción se utilizó como control de expresión. El resto de las células se resuspendieron en tampón de lisis desnaturizante G (apartado 35-D) y se incubaron con 50 µl de bolitas de níquel agarosa-Ni²⁺-NTA (Invitrogen) o bolitas de cobalto Talon (Clontech) durante 2 h a temperatura ambiente en una rueda giratoria. Posteriormente, la resina se lavó cuatro veces con 1 ml de tampón U (apartado 35-E) recién preparado. Finalmente, las muestras se resuspendieron en tampón de carga, se hirvieron durante 5 min y se analizaron mediante geles de poliacrilamida-SDS y posterior Western-blot.

25. Inmunoprecipitación

Se recogió en PBS el 10% de las células que se van a usar en el ensayo, se resuspendieron en tampón de carga y se hirvieron durante 5 min. Esta fracción se utilizó como control de expresión. El resto de las células se resuspendieron en tampón de lisis RIPA (apartado 35-F) al que se añadió previamente inhibidores de proteasas (Sigma), fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF) (1 mM) y el inhibidor de las proteasas de SUMO, N-etilmaleimida (NEM) (2 mM). El lisado se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a 4°C a una velocidad de 16000 x g durante 5 min. El sobrenadante se incubó con el anticuerpo correspondiente a la concentración recomendada por el fabricante a 4°C durante toda la noche en rotación constante. Al día siguiente, se añadieron bolitas de proteína A-sefarosa (BioVision) previamente lavadas con tampón RIPA, y se incubó a 4°C durante 2 h en rotación. Posteriormente, las bolitas se precipitaron por centrifugación a 990 x g durante 2 min y a 4°C y se lavaron 4 veces con tampón RIPA. Finalmente, las bolitas se resuspendieron en tampón de carga, se hirvieron durante 5 min y se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS seguido de Western-blot.

26. Inmunofluorescencia

Las células crecidas sobre cristales estériles insertados en placas de 24 pocillos se fijaron durante 20 min con paraformaldehído al 2% en PBS, se permeabilizaron durante 30 min con Tritón X-100 al 0,25% en PBS y se bloquearon durante 30 min con BSA al 2% en PBS. Posteriormente, las células se

incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en BSA al 2% en PBS a la concentración sugerida por el fabricante, durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación, se hicieron cuatro lavados de 5 min cada uno con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa diluidos 1:500 en BSA al 2% en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI durante 10 min. Finalmente, los cristales se lavaron y se montaron sobre portaobjetos con Prolong (Invitrogen). Las preparaciones fueron analizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE-200) o un microscopio confocal (Leica).

27. Ensayo de estabilidad proteica

Las células se transfectaron con los plámidos que codifican para las proteínas a evaluar y se incubaron entre 24 y 48 h a 37°C. A continuación, se añadió cicloheximida (CHX) (30 µg/ml) al medio de cultivo y se fueron recogiendo las células a distintos tiempos de añadido el compuesto. Para ello las células se resuspendieron en tampón de carga y se hirvieron durante 5 min. Los extractos de proteína total se analizaron empleando geles de poliacrilamida-SDS seguido de Western-blot con los anticuerpos indicados en cada caso.

28. Autorradiografía y Western-blot

Para revelar por autorradiografía, los geles se secaron en un secageles (BioRad) durante 1 h a 80°C y se expusieron a una película radiográfica (Konica Minolta) durante el período de tiempo necesario para su visualización. Para revelar por Western-blot, las proteínas presentes en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con leche desnatada preparada al 5% en tampón TTBS (apartado 35-G) durante 1 h y se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en leche desnatada preparada al 5% en TTBS. A continuación, las membranas se lavaron sucesivas veces con TTBS durante 1 h y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a HRP diluido en leche desnatada preparada al 5% en TTBS, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron sucesivas veces con TTBS durante 1 h, se incubaron con el sustrato de la peroxidasa para detección quimioluminiscente (ECL) y se expusieron sobre una película radiográfica. Las películas radiográficas se revelaron de manera automática en un procesador Fujifilm.

29. Ensayos con el gen reportero de la luciferasa

Las células se co-transfectaron con el plásmido pGL3 que contiene el gen que codifica para la luciferasa junto con los plásmidos de interés y se trataron de acuerdo a cada experimento. Los niveles de luciferasa que se expresaron en cada caso se determinaron con el kit comercial “Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity” (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en tampón de lisis pasivo incluido en el kit y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, los lisados se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 s y 20 µl de los sobrenadantes se transfirieron a pocillos de una placa de 96 pocillos (Costar). Por último se añadieron 50 µl del sustrato de la luciferasa a cada muestra y se realizó la cuantificación de los niveles de luciferasa presentes en cada muestra empleando un luminómetro (Optocomp, MGM Instruments).

30. Cuantificación de apoptosis

La apoptosis se evaluó utilizando el kit comercial “PE-Conjugated Monoclonal Active Caspase-3 Antibody Apoptosis Kit” (BD Pharmigen) y posterior análisis mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante. 1×10^6 células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500 µl de tampón cytofix/cytoperm incluido en el kit y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se lavaron dos veces con 500 µl de tampón perm/wash incluido en el kit. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón perm/wash al que se le añadieron 20 µl del anticuerpo anti-caspasa 3 marcado con ficoeritrina (PE) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con 1 ml de tampón perm/wash, se resuspendieron en 500 µl del mismo tampón y se analizaron por citometría de flujo.

31. Fraccionamiento subcelular

Para separar las fracciones nuclear y citoplásmica de las células se utilizó el kit comercial “Nuclear/Cytosol Fractionation kit” (BioVision) siguiendo las indicaciones del fabricante. 2×10^6 células se resuspendieron en 200 µl de tampón CEB-A (incluido en el kit), suplementado con DTT e inhibidores de proteasas y se incubaron en hielo durante 10 min. A continuación, se añadieron 11 µl de tampón B de extracción de citoplasma (incluido en el kit) frío, se incubaron en hielo durante 1 min y se centrifugaron a 16000 x g durante 5 min. Inmediatamente, el sobrenadante que contenía la fracción citoplásmica se transfirió a un tubo nuevo frío. El precipitado que contenía los núcleos celulares se resuspendió en 100 µl del tampón de extracción nuclear (incluido en el kit) frío, se

centrifugó a 16000 x g durante 5 min y el sobrenadante, que contenía la fracción nuclear, se transfirió a un tubo nuevo frío.

32. Ensayo de migración celular

La migración celular se evaluó mediante el ensayo de “transwell”. Las células se colocaron en la cámara superior de una placa transwell con membrana permeable de 8 μm (Corning) en medio sin suero y se incubaron durante 18 h para permitir la migración de las células hacia la cámara inferior de la placa que contenía medio suplementado con suero, el cual se utilizó como estímulo para la migración celular. Las células que migraron hacia la cámara inferior se cuantificaron tras su tinción con calceína AM. La calceína AM, que no es fluorescente, es absorbida por las células vivas y transformada por las enzimas estereasas a calceína, la cual es fuertemente fluorescente.

33. Purificación de proteínas de membrana

La purificación de proteínas de membrana se realizó empleando el kit comercial “ProteoExtract Native Membrane Protein” (Calbiochem) siguiendo las indicaciones del fabricante. 5×10^6 células se resuspendieron en el tampón de lavado (incluido en el kit) frío, se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se añadió sobre las células 1 ml del tampón de extracción I (incluido en el kit) suplementado con inhibidores de proteasas. Tras incubar las células durante 10 min a 4°C en agitación suave en dicho tampón, se centrifugaron a 16000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante, que contenía las proteínas solubles, se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 1 ml del tampón de extracción II (incluido en el kit) frío suplementado con inhibidores de proteasas y se incubó a 4°C durante 30 min en agitación suave. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 16000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante, que contenía las proteínas de membrana, se transfirió a un tubo nuevo.

34. Programas informáticos y análisis estadísticos

Para identificar los residuos aminoacídicos con mayor probabilidad de conjugar SUMO se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- SUMOplot Analysis Program (<http://www.abgent.com/sumoplot>)
- SUMOsp SUMOylation site Prediction (<http://sumosp.biocuckoo.org>)

La densitometría de las bandas de los Western-blot o de las autorradiografías se realizó con el programa:

- ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la prueba paramétrica t de Student. Los análisis se consideraron significativamente distintos cuando el valor de p fue menor a 0,05.

35. Tampones

A) TB para bacterias competentes

Para 1 L: 3 g de PIPES (10 mM), 62,5 ml KCL 1M (250 mM), 15 ml CaCl₂ 1M (15 mM), 55 ml MnCl₂ 1M (55 mM). Añadir H₂O milli-Q y agitar para disolver, ajustar el pH a 6,7 con KOH o HCl y enrasar con H₂O. Guardar a 4°C.

B) Tampón de interacción con ARN

Para 100 ml: 5 ml Tris-HCl 1M pH 7,5 (50 mM), 3 ml NaCl 5 M (150 mM), 200 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 (1 mM), 1 ml de NP-40 (1%) y 99,8 ml de H₂O milli-Q. Guardar a 4°C.

C) Tampón de interacción de proteínas

Para 100 ml: 1 ml de Tris-HCl 1M pH 8,0 (20 mM), 2 ml de NaCl 5M (100 mM), 10 ml de glicerol (10%), 40 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0 (0,2 mM), 0,5 ml de Triton X-100 (0,05%) y 86,46 ml de H₂O milli-Q. Guardar a 4°C.

D) Tampón G

Para 200 ml: 114,63 g de hidrocloreuro de guanidina (6M), 18,64 ml de Na₂HPO₄ 1M, 1,36 ml de NaH₂PO₄ 1M (fosfato de sodio 100 mM), 5 ml de Tris-HCl 2M pH 8,0 (50 mM). Agitar para disolver y enrasar con H₂O milli-Q. Guardar a 4°C.

E) Tampón U

Para 100 ml: 48 g de urea (8M), 9,32 ml de Na₂HPO₄ 1M, 0,68 ml de NaH₂PO₄ 1M (fosfato de sodio 100 mM), 50 µl de Tris-HCl 2M pH 8,0 (50 mM). Añadir H₂O milli-Q y agitar para disolver, enrasar con H₂O. Preparar al momento de usarlo.

F) Tampón RIPA

Para 100 ml: 2 ml de Tris-HCl 1M pH 8,0 (20 mM), 3 ml de NaCl 5M (150 mM), 1 g de desoxicolato de sodio (1%), 400 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0 (2mM), 1 ml de NP-40 (1%), 1 ml de SDS 10% (0,1%). Añadir H₂O milli-Q y agitar para disolver, enrasar con H₂O. Guardar a 4°C.

G) TBS 20X, pH 7.5

Para 1 L: 48,4 g de Tris, 58,4 g de NaCl. Añadir H₂O destilada y agitar para disolver, ajustar pH y enrasar. Para TBS – Tween 0,05% 1X (TTBS): 50 ml de TBS 20X, 0,5 ml de Tween 20 y 950 ml de H₂O destilada, agitar para disolver.

H) Tampón de electroforesis 10X

Para 2 L: 60, 57 g de Tris, 289,2 g de glicina, 20 g de SDS, añadir 1,6 L de H₂O destilada. Agitar para disolver y enrasar.

RESULTADOS



RESULTADOS

1. Regulación de la activación de PKR por SUMO

1.1 PKR interacciona con SUMO de forma covalente

La unión de PKR al ARN de doble cadena induce la autofosforilación y activación de PKR. Además, la actividad de PKR también se regula a través de su interacción con ubiquitina y con la proteína de tipo ubiquitina ISG15 (Okumura et al., 2013). Por ello, decidimos analizar si PKR también se regulaba a través de su interacción con la proteína de tipo ubiquitina SUMO. Primero, realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* utilizando como sustrato proteína PKR sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina. En ausencia de SUMO, PKR se detectaba como una banda de alrededor de 68 kDa y cuando añadimos SUMO1 a la reacción observamos la aparición de, por lo menos, tres bandas de mayor peso molecular que se corresponden con PKR conjugada a SUMO1 (Figura 10A). De igual forma, cuando añadimos SUMO2 a la reacción, observamos numerosas bandas de alto peso molecular correspondientes a PKR-SUMO2 (Figura 10A). Para confirmar que dichas bandas se corresponden con PKR conjugada a SUMO, la proteína PKR-SUMO1 obtenida en un ensayo de SUMOilación *in vitro* se incubó con la proteasa específica de SUMO, SENP1, en una reacción de deSUMOilación. La incubación de PKR-SUMO1 con SENP1 resultó en la desaparición de las bandas de mayor peso molecular lo que confirmaba que la proteína PKR se SUMOilaba *in vitro* (Figura 10B).

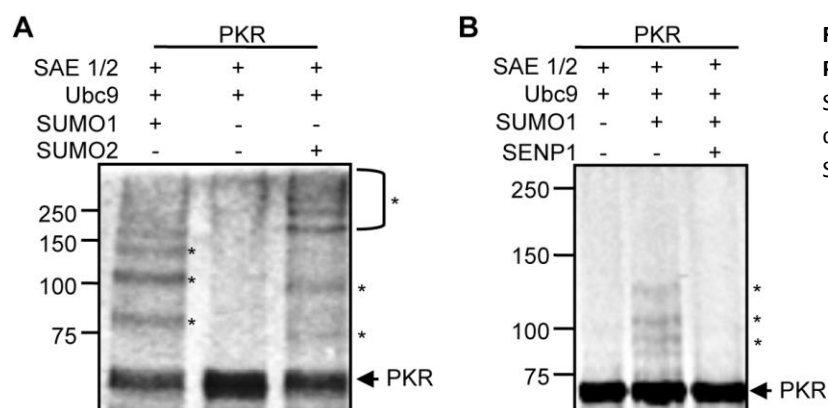


Figura 10. SUMOilación *in vitro* de PKR. A) Modificación de PKR por SUMO1 y SUMO2. B) De-SUMOilación de la proteína PKR-SUMO1 por SENP1.

La visualización de las proteínas PKR-SUMO1 y PKR-SUMO2 como bandas poco definidas y las múltiples bandas de migración que fueron detectadas en los ensayos de SUMOilación *in vitro* nos llevaron a pensar que la proteína PKR SUMOilada podría estar fosforilada. Para evaluar esta hipótesis, incubamos la proteína PKR-SUMO1 obtenida de una reacción de SUMOilación *in vitro* con

λ -fosfatasa. Dicho tratamiento ocasionó un incremento en la movilidad electroforética de dichas bandas (Figura 11A). Además, analizamos mediante Western-blot el estado de fosforilación de la proteína PKR-SUMO1 obtenida en un ensayo de SUMOilación *in vitro* con el anticuerpo anti-fosfo-PKR. Dicho anticuerpo reconoció una de las bandas correspondientes con PKR-SUMO1, identificadas empleando el anticuerpo anti-PKR (Figura 11B). En conjunto estos resultados demostraron que PKR se SUMOila *in vitro* y que la proteína PKR SUMOilada también está fosforilada.

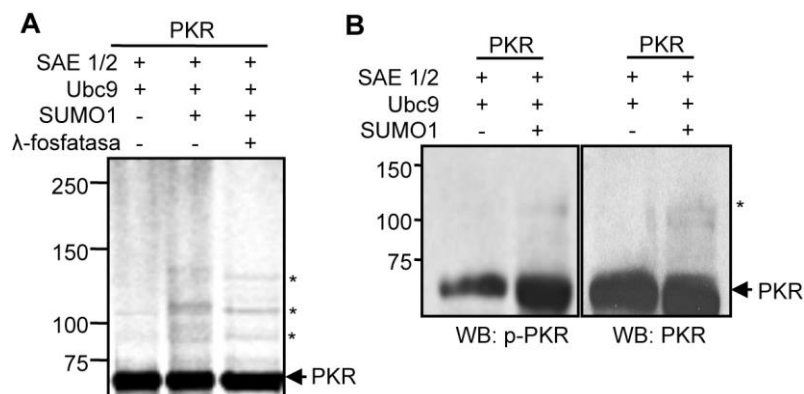


Figura 11. La proteína PKR SUMOilada está fosforilada. A) Tratamiento con λ -fosfatasa de PKR-SUMO1 obtenida en un ensayo de SUMOilación *in vitro*. B) Análisis por Western-blot de la proteína PKR-SUMO1 obtenida en un ensayo de SUMOilación *in vitro* con anticuerpo anti-fosfo-PKR.

A continuación, evaluamos la SUMOilación de la proteína PKR expresada a partir de un virus vaccinia recombinante (VV-PKR). Para ello, transfectamos células HEK-293 con el plásmido pcDNA o con los plásmidos que codifican Ubc9 (pcDNA-Ubc9) y His6-SUMO1 (pcDNA-His6-SUMO1) o Ubc9 y His6-SUMO2 (pcDNA-His6-SUMO2) y transcurridas 36 h de la transfección las células se infectaron con VV-PKR durante 16 horas. A continuación, analizamos los extractos de proteína total y las proteínas conjugadas a His6-SUMO1 o His6-SUMO2, purificadas mediante el uso de columnas de níquel, mediante Western-blot con anticuerpo anti-PKR. El análisis de las proteínas purificadas reveló la presencia de bandas de PKR de alto peso molecular correspondientes con PKR-SUMO1 y PKR-SUMO2 únicamente en las células co-transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, respectivamente (Figura 12A). Posteriormente, evaluamos si la proteína PKR expresada desde un plásmido también se modificaba por SUMO. Co-transfectamos células HEK-293 con el plásmido que codifica para HA-PKR (pcDNA-HA-PKR) junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 y transcurridas 48 h de la transfección recogimos los extractos de proteína total y purificamos las proteínas fusionadas a histidina para su análisis mediante Western-blot. Cuando empleamos el anticuerpo anti-HA observamos la presencia de bandas con un peso molecular que se correspondía con el esperado para PKR-SUMO1 y PKR-SUMO2 únicamente en las células co-transfectadas con

Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, respectivamente (Figura 12B). Finalmente, evaluamos la SUMOilación de la proteína PKR endógena. Para ello transfectamos células HEK-293 con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, y transcurridas 48 h recogimos los extractos de proteína total y realizamos la purificación de proteínas conjugadas a histidina. El análisis mediante de Western-blot con un anticuerpo anti-PKR de dichas proteínas reveló la presencia de bandas de alto peso molecular correspondientes con PKR conjugada a SUMO1 o SUMO2 solo en las células transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 (Figura 12C). En conjunto, estos resultados confirmaron que la proteína PKR se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*.

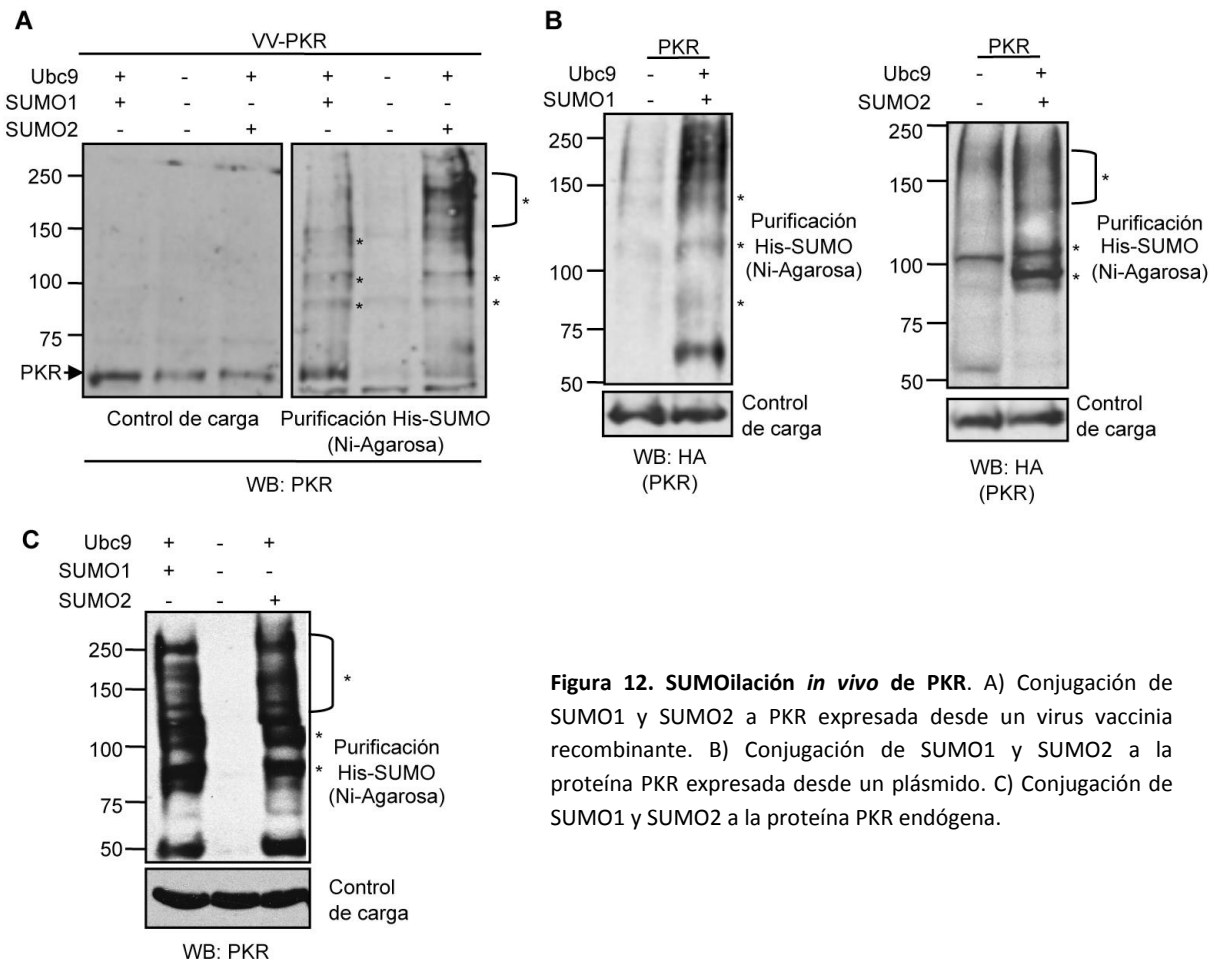


Figura 12. SUMOilación *in vivo* de PKR. A) Conjugación de SUMO1 y SUMO2 a PKR expresada desde un virus vaccinia recombinante. B) Conjugación de SUMO1 y SUMO2 a la proteína PKR expresada desde un plásmido. C) Conjugación de SUMO1 y SUMO2 a la proteína PKR endógena.

1.2 Identificación de los residuos aminoacídicos de PKR que conjugan SUMO

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de PKR reveló al menos 5 residuos de lisina como sitios putativos de SUMOilación, incluyendo los residuos K60 y K150, previamente identificados como necesarios para la interacción de PKR con ARN de doble cadena (Zhang F et al., 2000), y las lisinas K304 y K440 implicadas en la unión a heparina (Anderson et al., 2011). Por lo tanto, generamos una

serie de mutantes de PKR en estos residuos de lisina y evaluamos su SUMOilación *in vitro* con SUMO1. Observamos una clara reducción en la conjugación de SUMO1 a los mutantes de PKR en las lisinas K60, K150 y K440 (Figura 13A). A continuación, generamos un triple mutante PKR-K60R/K150R/K440R (PKR-SUMOmut) y evaluamos su SUMOilación *in vivo*. Para ello co-transfectamos células HEK-293 con HA-PKR-SUMOmut o HA-PKR silvestre (PKR-WT), junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, y analizamos mediante Western-blot los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina purificadas mediante columnas de níquel utilizando un anticuerpo anti-HA. Observamos la presencia de bandas con un peso molecular correspondiente al de las proteínas PKR-SUMO1 (Figura 13B) y PKR-SUMO2 (Figura 13C) solo en las células co-transfectadas con PKR-WT junto con Ubc9 y SUMO1 o Ubc9 y SUMO2, respectivamente. En conjunto estos resultados indicaron que las lisinas K60, K150 y K440 de PKR están involucradas en la conjugación a SUMO y que el triple mutante en estos residuos no se SUMOila *in vivo*.

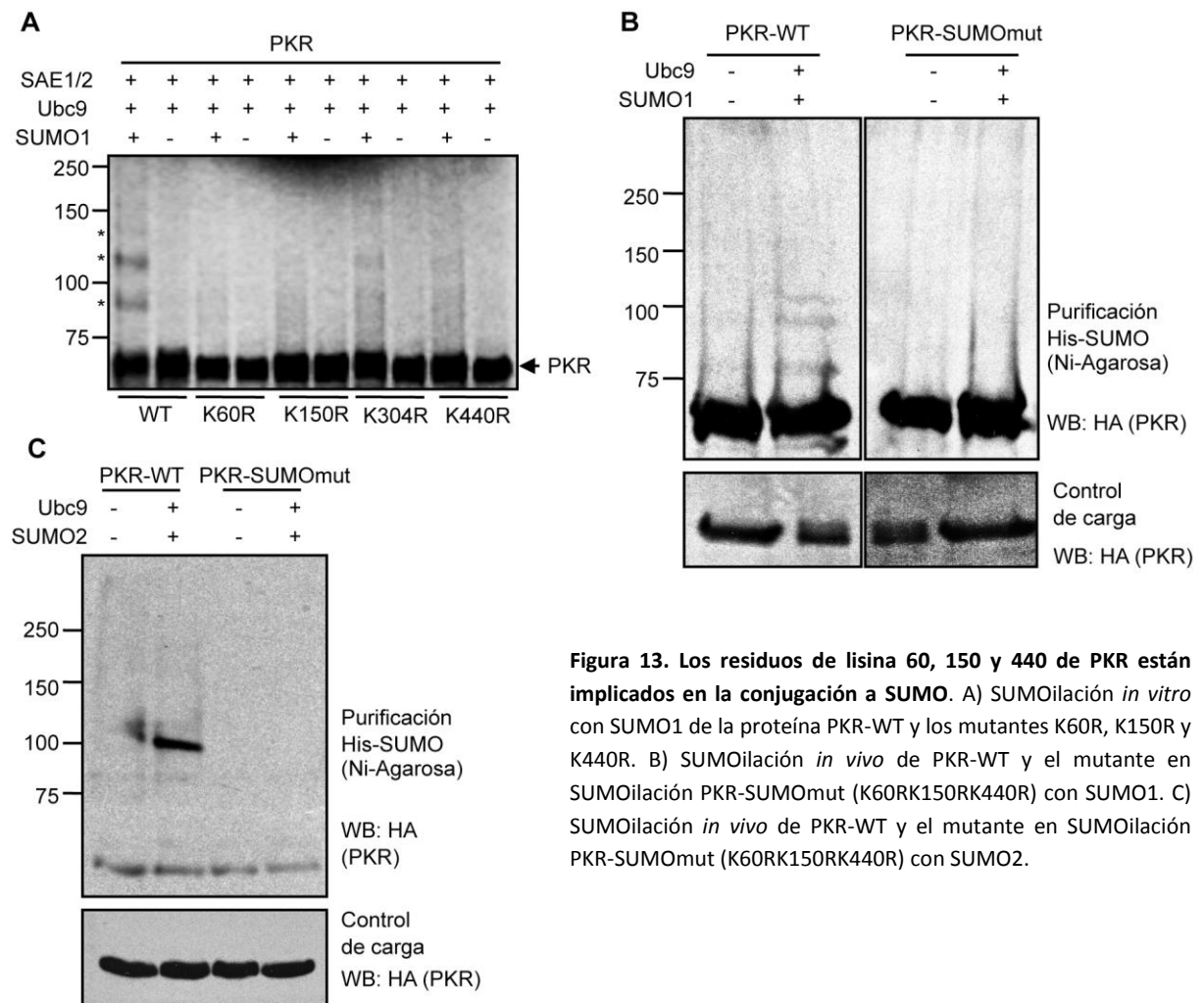


Figura 13. Los residuos de lisina 60, 150 y 440 de PKR están implicados en la conjugación a SUMO. A) SUMOilación *in vitro* con SUMO1 de la proteína PKR-WT y los mutantes K60R, K150R y K440R. B) SUMOilación *in vivo* de PKR-WT y el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut (K60R/K150R/K440R) con SUMO1. C) SUMOilación *in vivo* de PKR-WT y el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut (K60R/K150R/K440R) con SUMO2.

1.3 SUMO promueve la unión de PKR al ARN de doble cadena, la dimerización y la activación de PKR

La modificación por SUMO puede regular interacciones entre proteínas o interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos (Johnson, 2004). Por lo tanto, evaluamos el papel de SUMO en la dimerización de PKR y en su interacción con ARN de doble cadena. Primero realizamos un ensayo de interacción *in vitro* entre PKR y ARN de doble cadena utilizando agarosa-poli-IC y proteína PKR sin modificar o proteína PKR-SUMO1 marcadas con [S^{35}]-metionina. Como era de esperar, PKR interaccionó con la agarosa-poli-IC (Figura 14A). Además, observamos que dicha interacción aumentaba en presencia de SUMO1 (Figura 14A). Para confirmar este resultado, repetimos dicho ensayo utilizando la proteína PKR-WT o la mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut, previamente incubadas con SUMO1 en una reacción de SUMOilación. Nuevamente observamos que SUMO favorecía la interacción entre la proteína PKR-WT y el ARN de doble cadena. Además, detectamos la interacción entre la proteína PKR-SUMO1 y la agarosa-poli-IC (Figura 14B). Por el contrario, no observamos un aumento en la interacción del mutante PKR-SUMOmut con el ARN en presencia de SUMO1 (Figura 14B). Estos resultados demostraron que SUMO favorece la interacción de PKR con el ARN de doble cadena.

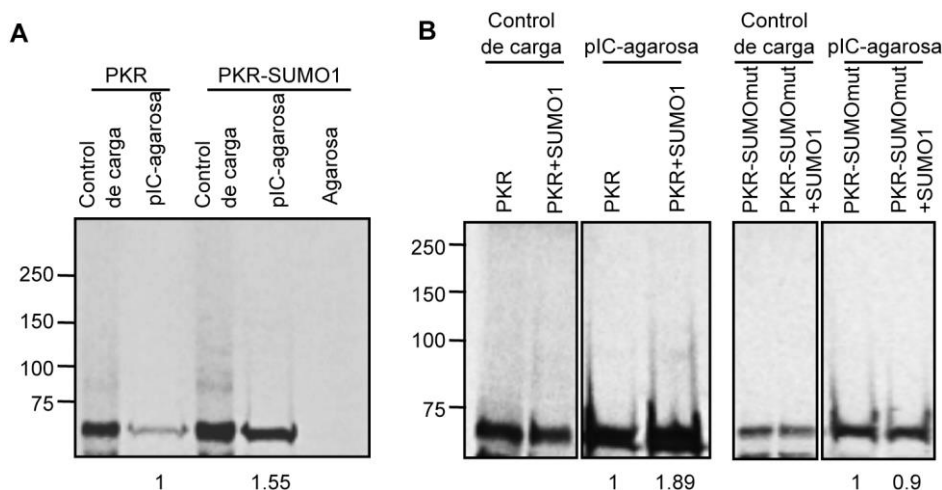


Figura 14. SUMO favorece la interacción de PKR con ARN de doble cadena. Ensayos de interacción *in vitro* entre PKR-WT o el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut sometidas a un ensayo de SUMOilación *in vitro* en presencia o ausencia de SUMO1 y el ARN de doble cadena (pIC).

Con el fin de determinar si SUMO favorece la dimerización de PKR, realizamos un ensayo de interacción *in vitro* entre la proteína PKR-WT recombinante fusionada a GST (GST-PKR-WT) y las proteínas PKR-WT o PKR-SUMOmut sintetizadas *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina y sometidas

a un ensayo de SUMOilación *in vitro* en presencia o ausencia de SUMO1 y en presencia o ausencia de poli-IC. En ausencia de SUMO no observamos diferencias en la interacción entre PKR-WT o PKR-SUMOmut y GST-PKR-WT (Figura 15). Sin embargo, en presencia de SUMO la cantidad de PKR-WT que interactuaba con GST-PKR era mayor que la del mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut, tanto en presencia como en ausencia de poli-IC (Figura 15). Estos resultados indicaron que SUMO promueve la dimerización de PKR.

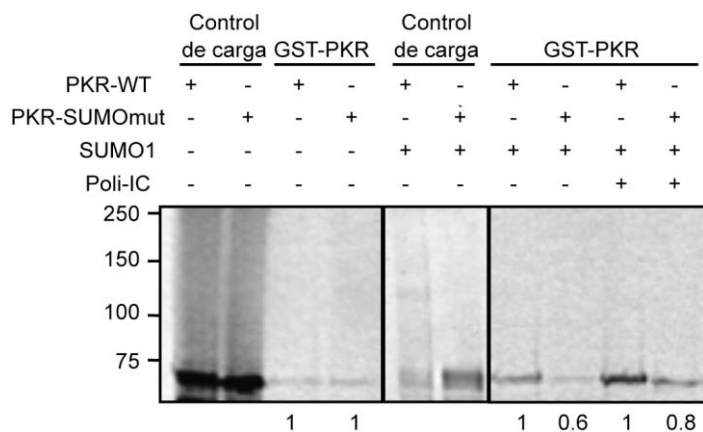


Figura 15. SUMO promueve la dimerización de PKR. Ensayo de interacción *in vitro* entre GST-PKR-WT y PKR-WT o el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut sometidas previamente a SUMOilación *in vitro* en presencia o ausencia de SUMO1 como se indica.

Dado que SUMO favorecía la dimerización de PKR decidimos evaluar si también favorecía la activación de PKR. Para ello realizamos un ensayo quinasa *in vitro* utilizando la proteína recombinante GST-PKR-WT sometida previamente a SUMOilación *in vitro* en ausencia o presencia de SUMO1 (Figura 16A) y la proteína recombinante eIF2 α como sustrato. Como se esperaba, GST-PKR fosforiló a eIF2 α . Además, observamos un claro aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado cuando utilizamos la proteína GST-PKR conjugada a SUMO1 como quinasa (Figura 16A). Con el fin de confirmar este resultado, repetimos el ensayo empleando como quinasa la proteína PKR-WT o PKR-SUMOmut sintetizadas *in vitro* y sometidas a un ensayo de SUMOilación *in vitro* en presencia o ausencia de SUMO1 (Figura 16B). De nuevo observamos un claro aumento en los niveles de eIF2 α fosforilado en el carril correspondiente con PKR-WT en presencia de SUMO1. Por el contrario, no observamos diferencias en los niveles de eIF2 α fosforilado por el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut en presencia o ausencia de SUMO1 (Figura 16B). No obstante, es importante resaltar que el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut mostró una eficiencia similar a la de PKR-WT no conjugada a SUMO1 para fosforilar eIF2 α (Figura 16B). Estos resultados confirmaron que SUMO favorece la actividad quinasa de PKR *in vitro*.

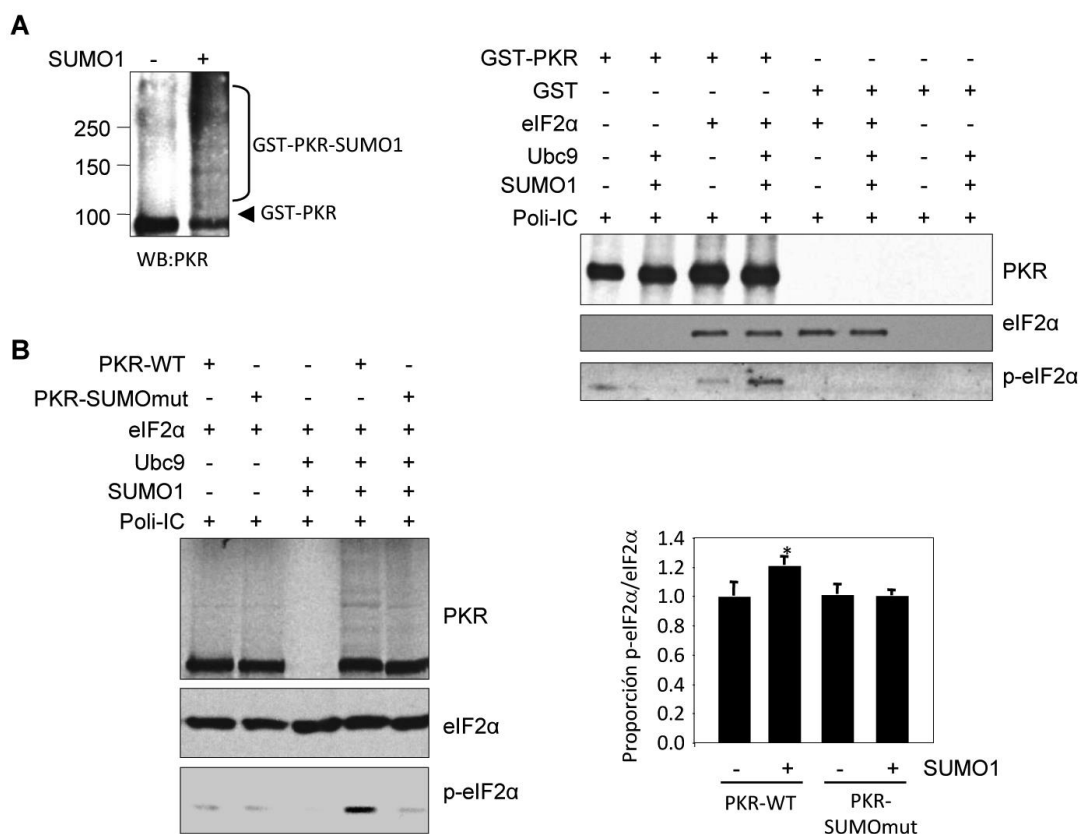


Figura 16. SUMO aumenta la actividad quinasa de PKR *in vitro*. A) Análisis por Western-blot de la proteína recombinante PKR y PKR conjugada a SUMO1 empleadas en el ensayo quinasa (panel de la izquierda) y del resultado de dicho ensayo utilizando como sustrato proteína recombinante eIF2 α (panel de la derecha). B) Análisis por Western-blot del resultado del ensayo quinasa empleando como sustrato eIF2 α y como quinasas PKR-WT o el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut sintetizados *in vitro* sometidas a un ensayo de SUMOilación *in vitro* en presencia o ausencia de SUMO1 (panel de la izquierda). Cuantificación de la relación entre los niveles de eIF2 α fosforilado y eIF2 α total en ensayos quinasa (panel de la derecha). *p < 0,05.

1.4 SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas por PKR

La modificación covalente por SUMO puede regular la localización celular o la estabilidad de la proteína SUMOilada. Por ello estudiamos la localización y estabilidad del mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut. Transfectamos células PKR $-/-$ con un plásmido que codifica para PKR-WT o PKR-SUMOmut y realizamos un ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-PKR. Asimismo, transfectamos células HEK-293 con HA-PKR-WT o HA-PKR-SUMOmut y realizamos un ensayo de estabilidad a distintos tiempos en presencia de cicloheximida (CHX). La estabilidad de PKR-WT y PKR-SUMOmut se evaluó mediante Western-blot con anticuerpo anti-HA. No observamos diferencias en la localización subcelular (Figura 17A) o estabilidad (Figura 17B) de PKR-SUMOmut con respecto a PKR-WT.

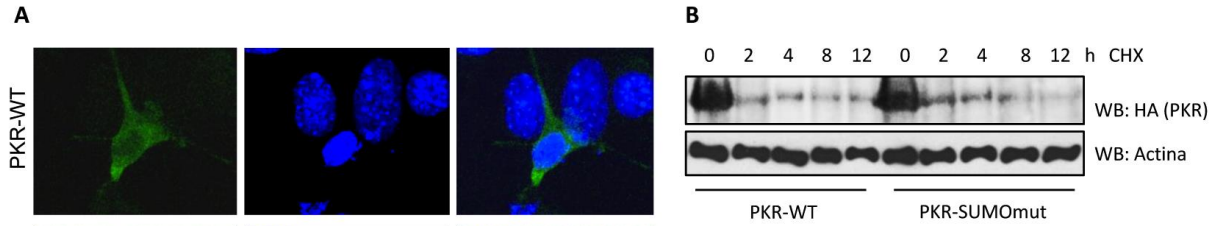


Figura 17. SUMO no afecta a la localización o estabilidad de PKR. A) Inmunofluorescencia mostrando la localización subcelular de PKR-WT y el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut. B) Estabilidad proteica de PKR-WT y el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut.

A continuación decidimos analizar el efecto de SUMO sobre la actividad de PKR *in vivo*. Primero, evaluamos si la transfección de Ubc9 y SUMO1 o SUMO2 en las células afectaba al control de la síntesis de proteínas inducida por VV-PKR utilizando un sistema reportero de luciferasa. Co-transfectamos células HEK-293 con el plásmido que codifica para luciferasa pGL3 junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, y a las 36 h de la transfección infectamos las células con VV-PKR y las tratamos con IPTG para inducir la expresión de PKR. Como se esperaba (Lee and Esteban, 1994), detectamos una bajada en los niveles de luciferasa en aquellas células infectadas con VV-PKR en presencia de IPTG (Figura 18). Además, esta bajada fue significativamente mayor en aquellas células co-transfectadas con Ubc9 y SUMO1 o Ubc9 y SUMO2 en comparación con las células co-transfectadas con pcDNA (Figura 18). Estos resultados sugerían que SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas inducida por PKR.

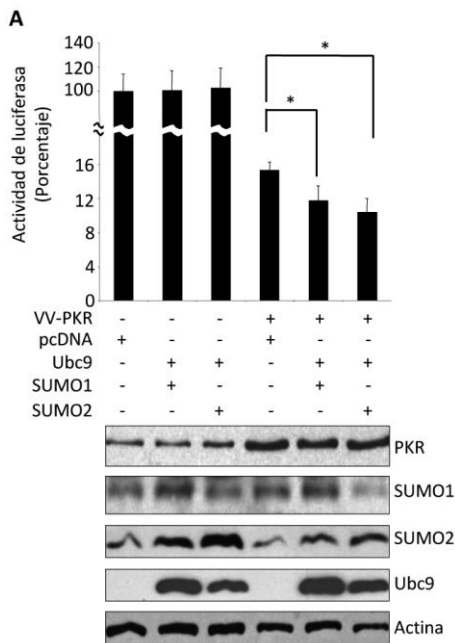


Figura 18. SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas ejercido por PKR cuando se expresa desde un virus vaccina recombinante. Ensayo luciferasa en células HEK-293 transfectadas con los plásmidos que se indican e infectadas con VV-PKR. *p < 0,05.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, decidimos analizar si una disminución en los niveles de Ubc9, la enzima que conjuga SUMO a las proteínas diana afectaba a la actividad de la PKR endógena. Transfectamos células HEK-293 con ARN de silenciamiento específico para Ubc9 (siUbc9) o un ARN de silenciamiento inespecífico (siC) y a las 48 h post-transfección infectamos las células con VSV. Los extractos de proteína total recogidos a las 8 h de la infección se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos de interés. La infección con VSV indujo la fosforilación de PKR y eIF2 α en las células transfectadas con siC (Figura 19A). Dicha fosforilación disminuyó claramente en las células transfectadas con siUbc9 (Figura 19A) lo que de nuevo sugería que SUMO favorecía la actividad de PKR *in vivo*. A continuación decidimos estudiar la actividad del mutante de SUMOilación PKR-SUMOmut *in vivo*, evaluando su capacidad para inducir la fosforilación de eIF2 α en respuesta al ARN de doble cadena. Transfectamos fibroblastos inmortalizados de ratón deficientes en PKR (PKR -/-) con un plásmido de expresión de HA-PKR-WT, HA-PKR-SUMOmut o GFP y a las 36 h post-transfección tratamos las células con poli-IC durante 8 h. Como se esperaba, el análisis por Western-blot de los extractos de proteína total reveló que el poli-IC indujo eficientemente la fosforilación de eIF2 α en las células en las que reintroducimos PKR-WT (Figura 19B). Tras el tratamiento con poli-IC, los niveles de eIF2 α fosforilado detectados en las células transfectadas con PKR-SUMOmut fueron ligeramente mayores que los observados en las células transfectadas con GFP pero claramente menores que los observados en las células transfectadas con PKR-WT (Figura 19B). Estos resultados sugirieron que SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas ejercido por PKR en respuesta al ARN de doble cadena.

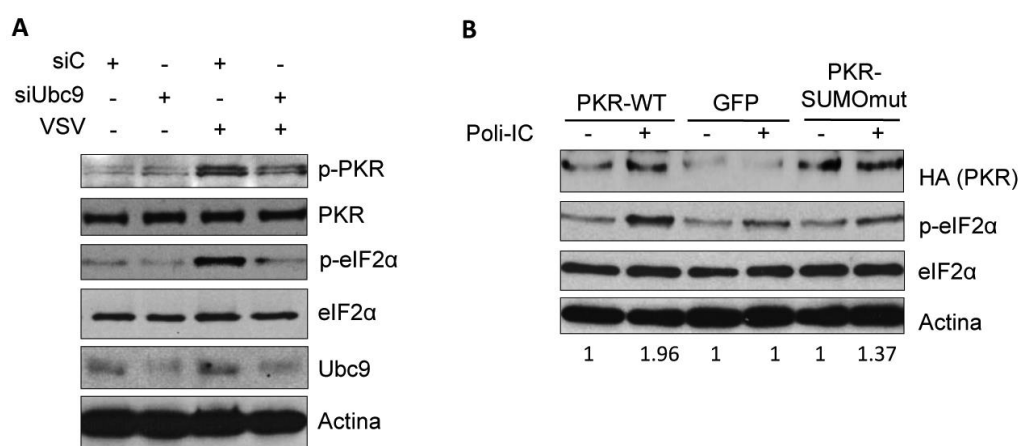


Figura 19. SUMO favorece la actividad de PKR *in vivo*. A) Análisis por Western-blot de células HEK-293 transfectadas con siUbc9 o siC control e infectadas o no con VSV como se indica. B) Análisis por Western-blot de células PKR^{-/-} transfectadas con PKR-WT, GFP o PKR-SUMOmut y tratadas o no con Poli-IC como se indica.

A continuación decidimos estudiar la capacidad del mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut para controlar la síntesis de proteínas empleando un sistema reportero de luciferasa. Co-transfectamos células HEK-293 o PKR $-/-$ con el plásmido pGL3 y dosis crecientes de PKR-WT o PKR-SUMOmut. A las 48 h post-transfección cuantificamos los niveles de luciferasa y observamos que dichos niveles disminuían en función de los niveles de PKR-WT que se expresaban, tanto en células HEK-293 como en PKR $-/-$ (Figura 20). Sin embargo, en estas condiciones no detectamos una disminución significativa de los niveles de luciferasa en las células transfectadas con PKR-SUMOmut, independientemente de la dosis y del tipo celular (Figura 20), indicando que la proteína deficiente en SUMOilación PKR-SUMOmut no es capaz de controlar la síntesis de proteínas en ausencia de estímulo.

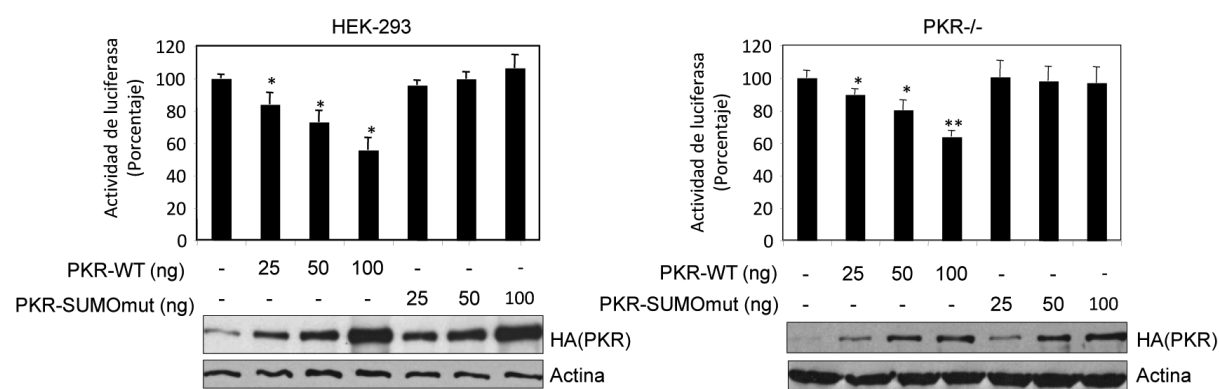


Figura 20. In capacidad del mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut para controlar la síntesis de proteínas *in vivo* en ausencia de estímulo. Ensayo luciferasa en células HEK-293 o PKR $-/-$ transfectadas con dosis crecientes de los plásmidos PKR-WT o PKR-SUMOmut. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

A continuación evaluamos las consecuencias de sobreexpresar los componentes de la maquinaria de SUMOilación en la actividad de PKR-WT y PKR-SUMOmut utilizando el mismo tipo de ensayo. Co-transfectamos células HEK-293 y PKR $-/-$ con pGL3 junto con pcDNA, His-SUMO1, His-SUMO2, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2. Transcurridas 36 h después de la transfección, tratamos o no las células con poli-IC durante 8 h y a continuación evaluamos la expresión de luciferasa. La co-transfección de los componentes de la maquinaria de SUMOilación no causó alteraciones en los niveles de luciferasa detectados en las células transfectadas con PKR-WT o PKR-SUMOmut en ausencia de estímulo (Figura 21A). Sin embargo, detectamos una reducción significativa en los niveles de luciferasa obtenidos en las células transfectadas con PKR-WT cuando las co-transfectamos con los componentes de la maquinaria de SUMOilación, tanto en HEK-293 como en PKR $-/-$, cuando se tratan con poli-IC (Figura 21B). Por el contrario, sólo se detectó un cambio significativo en los niveles de luciferasa obtenidos en las células co-transfectadas con PKR-SUMOmut después del tratamiento con

poli-IC en células HEK-293 y co-transfectadas con SUMO2, posiblemente debido a la activación en estas condiciones de la proteína PKR endógena (Figura 21B). En conjunto, estos resultados indicaron que SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas por PKR en respuesta al ARN de doble cadena *in vivo*.

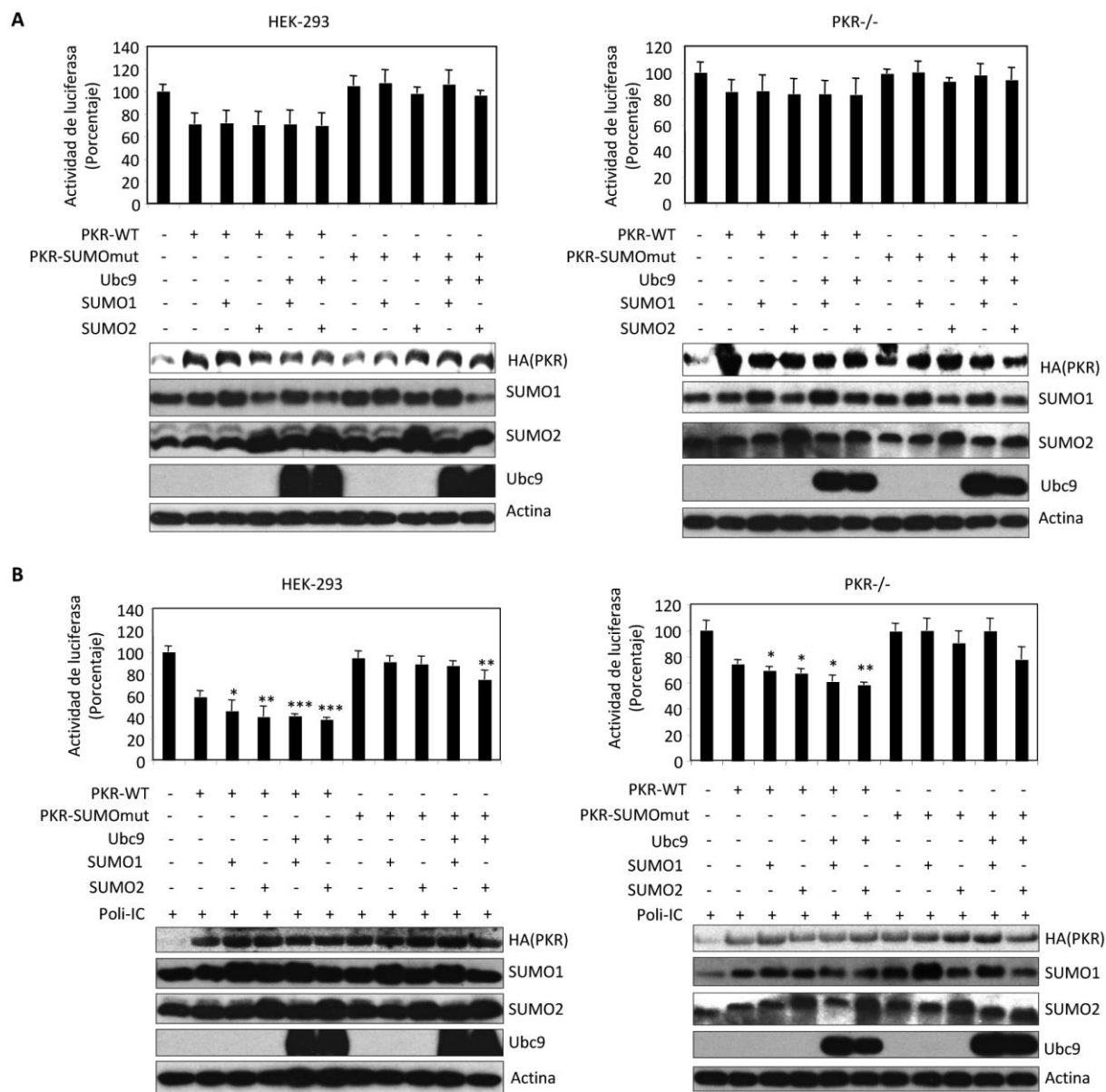


Figura 21. SUMO favorece el control de la síntesis de proteínas por PKR *in vivo*. A) Ensayo luciferasa en células HEK-293 o PKR -/- co-transfectadas con los plásmidos que se indican en ausencia de estímulo. B) Ensayo luciferasa en células HEK-293 o PKR -/- co-transfectadas con los plásmidos que se indican y estimuladas con poli-IC. *p < 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,0005.

1.5 SUMO favorece la actividad antiviral de PKR

Se ha descrito que la infección con VSV promueve la SUMOilación de diferentes proteínas celulares (González-Santamaría et al., 2012; Kubota et al., 2008; Marcos-Villar et al., 2013). Por lo tanto, evaluamos si la infección con VSV también induce la SUMOilación de PKR. Transfectamos células HEK-293 con Ubc9 y His6-SUMO1 y transcurridas 36 h después de la transfección, infectamos las células con VSV durante 6 h o las dejamos sin infectar. Los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina purificadas mediante columnas de níquel se analizaron mediante Western-blot utilizando un anticuerpo anti-PKR. El análisis reveló que la infección con VSV indujo un aumento en los niveles de PKR-SUMO1 respecto a las células sin infectar (Figura 22A). Además, evaluamos si VSV favorecía la modificación de PKR por SUMO2 mediante un ensayo de inmunoprecipitación. El análisis mediante Western-blot con anticuerpo anti-SUMO2 de la proteína PKR endógena inmunoprecipitada reveló la presencia de las bandas esperadas correspondientes con PKR-SUMO2 (Figura 22B). La intensidad de dichas bandas era mayor en las células infectadas con VSV (Figura 22B). Estos resultados indicaban que la infección con VSV favorece la SUMOilación de PKR.

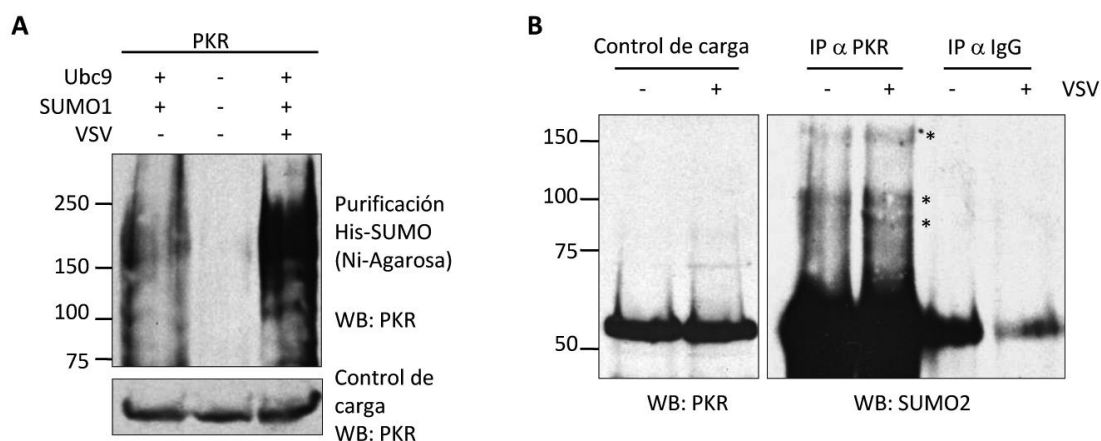


Figura 22. La infección con VSV induce la SUMOilación de PKR. A) Análisis de la modificación por SUMO1 de PKR endógena *in vivo* en células infectadas o no con VSV. B) Análisis de la modificación por SUMO2 de PKR endógena *in vivo* en células infectadas o no con VSV.

A continuación evaluamos el papel de SUMO en la actividad antiviral de PKR. Para ello generamos células PKR $-/-$ que expresan de forma estable PKR-WT o PKR-SUMOmut o transfectadas de forma estable con el vector vacío. Infectamos dichas células con VSV a una moi de 10 y analizamos por Western-blot la síntesis de las proteínas virales M y G a diferentes tiempos después de la infección. Como se había descrito previamente (Balachandran et al. 2000; Durbin et al., 2002; Stojdl et al., 2000), en las células que expresaban PKR-WT los niveles de proteínas de VSV eran menores que los

detectados en las células deficientes en PKR (Figura 23A). Los niveles de las proteínas de VSV en las células transfectadas con PKR-SUMOmut fueron menores que los observados en las células transfectadas con pcDNA, pero mayores que los detectados en las células transfectadas con PKR-WT (Figura 23A). Estos resultados sugerían que el mutante en SUMOilación PKR-SUMOmut tiene una actividad antiviral reducida en comparación con la proteína PKR-WT. Para comprobar esta hipótesis, infectamos las células estables mencionadas con VSV a una *moi* de 10 durante 24 h y a continuación determinamos la cantidad de virus presente en el sobrenadante. En concordancia con el resultado obtenido mediante el análisis por Western-blot, observamos que el título viral detectado en las células que expresaban PKR-WT era significativamente menor con respecto al detectado en las células deficientes en PKR (Figura 23B). Asimismo, el título viral en las células transfectadas con PKR-SUMOmut fue menor que el observado en las células transfectadas con pcDNA, pero mayor que el título detectado en las células transfectadas con PKR-WT (Figura 23B). En conjunto, estos resultados confirmaron que SUMO contribuye a la actividad antiviral de PKR.

La actividad antiviral de PKR se atribuye a su capacidad de inhibir la síntesis de proteínas e inducir la apoptosis de las células infectadas (Donnelly et al., 2013). Por lo tanto, realizamos un ensayo para evaluar la inducción de apoptosis en respuesta a la infección con VSV de las células PKR *-/-* transfectadas establemente con PKR-WT, PKR-SUMOmut o pcDNA. La apoptosis detectada en las células que expresaron PKR-SUMOmut fue significativamente mayor que la detectada en las células transfectadas con pcDNA lo que indicaba que el mutante en SUMOilación mantiene cierta capacidad para inducir la apoptosis de las células infectadas. Sin embargo, la apoptosis detectada en las células transfectadas con PKR-WT fue significativamente mayor que la detectada en las células transfectadas con PKR-SUMOmut o con pcDNA (Figura 23C) lo que indicaba que SUMO contribuye a la inducción de apoptosis mediada por PKR en respuesta a la infección por VSV.

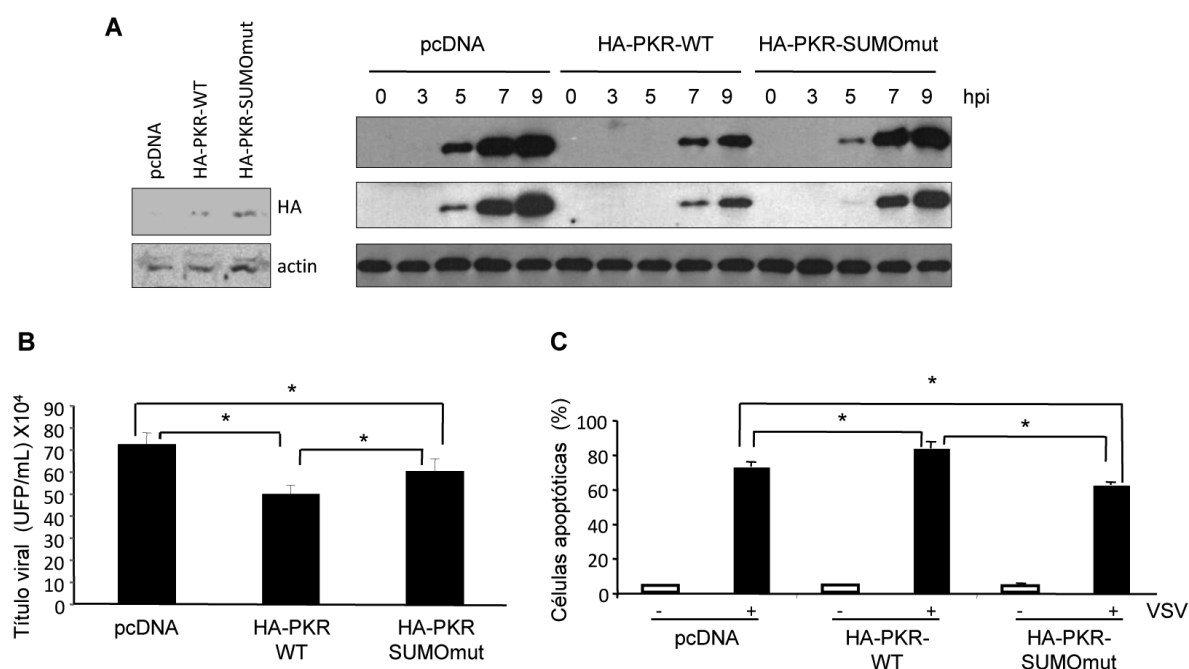


Figura 23. SUMO favorece la actividad antiviral de PKR. Las células PKR ^{-/-} transfectadas de forma estable con HA-PKR-WT, el mutante en SUMOilación HA-PKR-SUMOmut o pcDNA se infectaron con VSV y se analizó: A) la síntesis de proteínas virales por Western-blot, B) el título viral y C) la inducción de apoptosis por citometría de flujo. *p < 0,05.

2. Modulación de la PI3K por SUMO

2.1 p85 β interacciona con SUMO de forma covalente

SUMO regula la activación de la vía de PI3K puesto que como ha sido demostrado por nuestro laboratorio y por otros grupos, el regulador negativo de la activación de PI3K, PTEN, se regula por SUMO (González-Sanarmaría et al. 2012; Huang et al., 2012). Por lo tanto nos propusimos evaluar si otros componentes de la vía de PI3K también se regulaban a través de su conjugación a SUMO. En primer lugar decidimos evaluar la posible conjugación de SUMO a la subunidad p85 β . Para ello, realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* utilizando proteína p85 β sintetizada *in vitro* en presencia de [³⁵S]-metionina como sustrato. p85 β se detectaba como una proteína de aproximadamente 85 kDa. Cuando agregamos SUMO1 o SUMO2 a la reacción aparecían unas bandas adicionales de aproximadamente 105 y 120 kDa que se correspondían con la proteína p85 β conjugada a SUMO (Figura 24A). Además, la aparición de varias bandas de p85 β -SUMO1 indicaba que SUMO se puede conjugar a más de una lisina en p85 β . Sin embargo, el hecho de que la banda de 105 kDa presentara una intensidad mucho mayor que las bandas de mayor peso molecular también

sugería que la proteína p85 β se conjuga predominantemente solo a una molécula de SUMO a la vez. Para demostrar que dichas bandas se correspondían con la proteína p85 β SUMOilada, las proteínas p85 β -SUMO1 y p85 β -SUMO2 obtenidas en un ensayo de SUMOilación *in vitro* se incubaron con SENP1, la proteasa específica de SUMO, lo que resultó en la desaparición de dichas bandas adicionales (Figura 24A). Estos resultados demostraron que la proteína p85 β se SUMOila *in vitro*.

A continuación, evaluamos si p85 β se modificaba por SUMO *in vivo*. Para ello, co-transfectamos células HEK-293 con el plásmido que codifica para p85 β fusionado al antígeno HA (pcDNA-HA-p85 β) junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2. El análisis por Western-blot con anticuerpo anti-HA de los extractos de proteína total y de las proteínas fusionadas a histidina reveló la presencia de bandas de p85 β del tamaño esperado correspondientes con p85 β -SUMO1 y p85 β -SUMO2 solo en las células co-transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, respectivamente (Figura 24B). Finalmente, evaluamos la SUMOilación de la proteína p85 β endógena. Para ello transfectamos células HEK-293 con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 y a las 48h de la transfección realizamos la purificación de proteínas conjugadas a histidina y las analizamos por Western-blot con anti-HA. Detectamos la presencia de las bandas correspondientes con la proteína p85 β conjugada a SUMO1 o SUMO2 solo en las células transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, respectivamente (Figura 24C). En conjunto, estos resultados confirmaron que la proteína p85 β se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*.

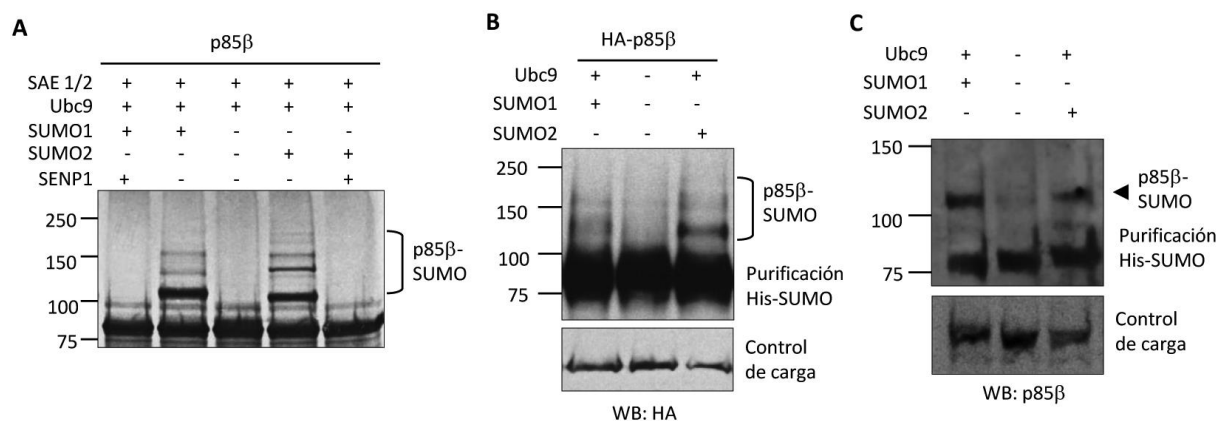


Figura 24. SUMOilación de p85 β . A) Ensayo de SUMOilación y de-SUMOilación *in vitro* de p85 β . B) Conjugación de SUMO1 y SUMO2 a la proteína p85 β transfectada en células HEK-293. C) SUMOilación de la proteína p85 β endógena con SUMO1 y SUMO2 en células HEK-293.

2.2 Identificación de los residuos aminoacídicos de p85β que conjugan SUMO

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de p85β identificó los residuos de lisina 535 y 592 localizados en el dominio iSH2 de la proteína como probables sitios de SUMOilación. Por lo tanto, generamos los mutantes de p85β en estos residuos de lisina y evaluamos su conjugación a SUMO *in vitro* e *in vivo*. No detectamos la aparición de la principal banda correspondiente con la proteína p85β conjugada a SUMO en los ensayos de SUMOilación *in vitro* llevados a cabo con ninguno de los mutantes ensayados (Figura 25A). Obtuvimos un resultado similar en el ensayo de SUMOilación *in vivo* (Figura 25B). A continuación generamos un mutante en ambos residuos (p85β-K535RK592R) y evaluamos su conjugación a SUMO *in vitro* e *in vivo*. El análisis de la SUMOilación del mutante p85β-K535RK592R reveló de nuevo que dicha proteína no se conjugaba a SUMO *in vitro* (Figura 25C) ni *in vivo* (Figura 25D). En conjunto estos resultados indicaban que los residuos K535 y K592 de p85β están implicados en la conjugación a SUMO y que SUMO se puede conjugar a estas lisinas en una forma mutuamente excluyente.

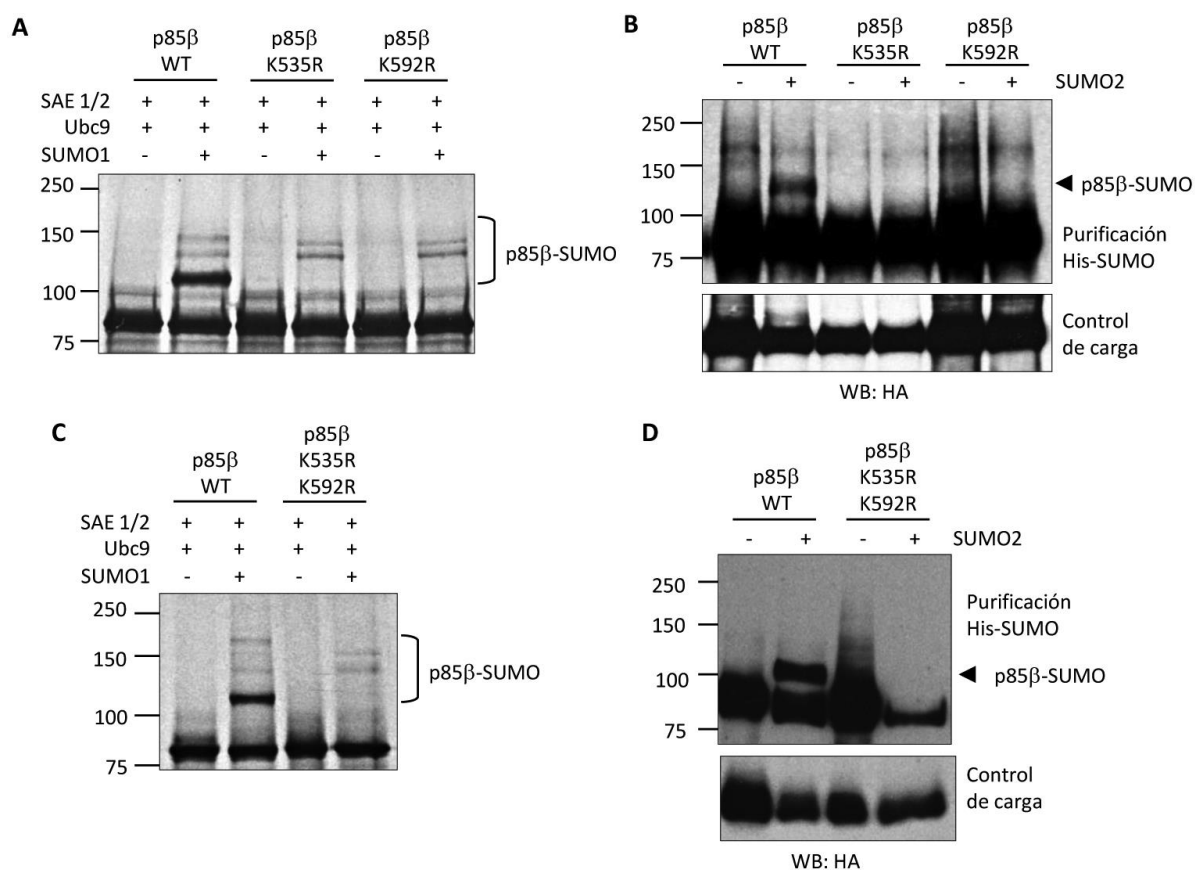


Figura 25. Los residuos K535 y K592 de p85β están implicados en su conjugación a SUMO. Ensayos de SUMOilación *in vitro* de p85β-WT y los mutantes K535R, K592R y K535RK592R con SUMO1 (A y C). SUMOilación *in vivo* de p85β-WT y los mutantes K535R, K592R y K535RK592R en células HEK-293(B y D).

2.3 La mutación de los residuos de SUMOilación de p85 β favorece su actividad oncogénica

La conjugación a SUMO puede regular la localización subcelular o estabilidad de la proteína SUMOilada. Para analizar si SUMO regulaba la localización subcelular o estabilidad de p85 β , transfectamos células NIH-3T3 o HEK-293 con p85 β -WT o p85 β -K535RK592R y realizamos ensayos de inmunofluorescencia y estabilidad proteica, respectivamente. No observamos diferencias ni en la localización subcelular ni en la estabilidad entre el mutante p85 β -K535RK592R y la proteína p85 β -WT (Figura 26A y 26B). A continuación, analizamos mediante Western-blot con anticuerpo anti-HA la fracción nuclear y citoplásmica obtenidas a partir de células HEK-293 transfectadas con p85 β -WT y SUMO2. Observamos que tanto la proteína p85 β -WT como p85-SUMO2 se localizan en el núcleo y en el citoplasma (Figura 26C).

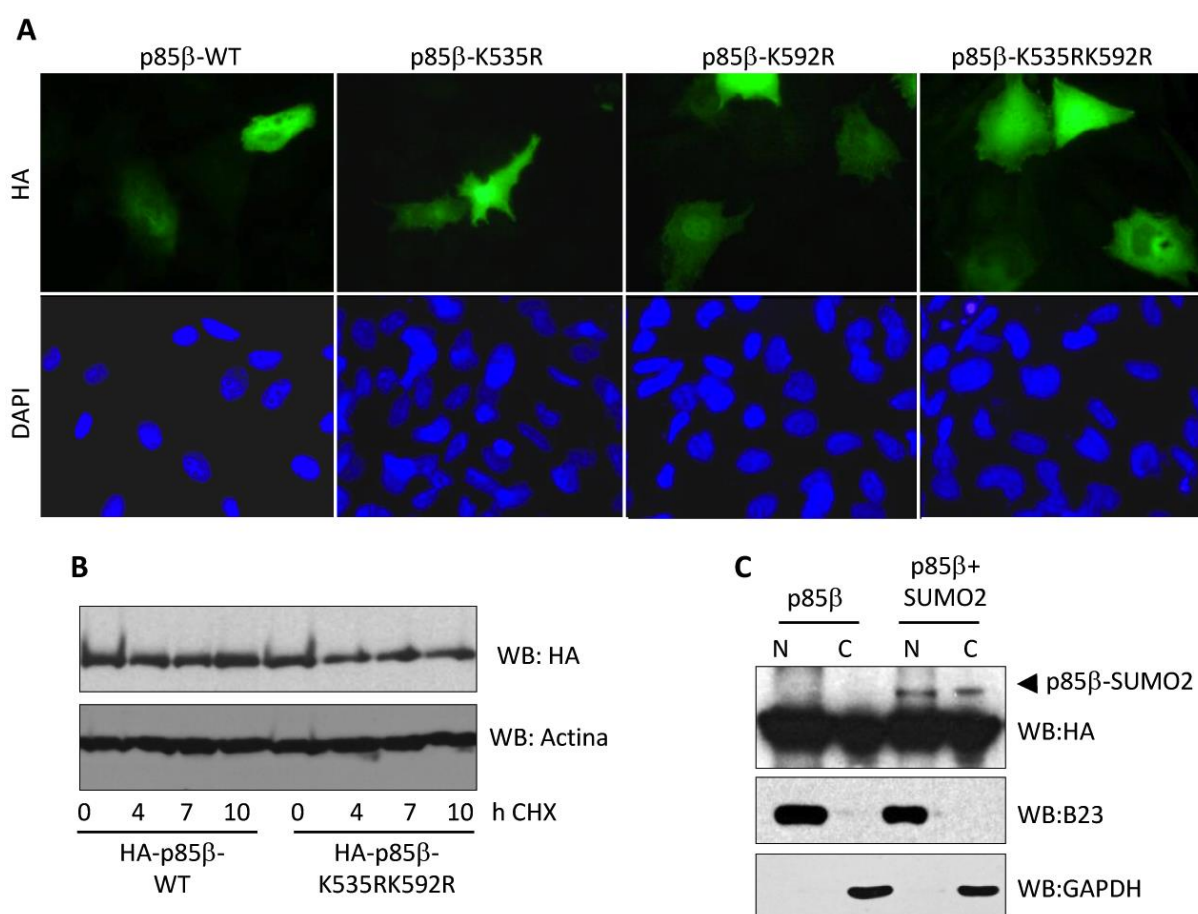


Figura 26. Localización subcelular y estabilidad de la proteína silvestre y los mutantes en SUMOilación de p85 β . A) Inmunofluorescencia de la proteína silvestre y los mutantes en SUMOilación de p85 β en células NIH-3T3. B) Estabilidad proteica de p85 β -WT y el mutante p85 β -K535RK592R en células HEK-293. C) Fraccionamiento subcelular de células HEK-293 transfectadas con p85 β en presencia o ausencia de SUMO2.

La sobreexpresión de p85 β en células NIH-3T3 induce la formación de focos (Cortés et al., 2012). Para evaluar el efecto de SUMO en dicha actividad de p85 β generamos células NIH-3T3 transfectadas de forma estable con el vector pcDNA, p85 β -WT o los mutantes en SUMOilación de p85 β y a continuación realizamos un ensayo de formación de focos. Observamos que la transfección estable de p85 β -WT en células 3T3 indujo la formación de focos, que no se observaron en las células transfectadas con el vector vacío (Figura 27A). Además, el número de focos detectado en las células transfectadas con los mutantes en SUMOilación de p85 β fue significativamente mayor que el observado en las células transfectadas con p85 β -WT (Figura 27A). Una de las posibles causas de la mayor actividad oncogénica de los mutantes en SUMOilación de p85 β podría ser que no interaccionaran con la subunidad catalítica p110. Para evaluar esta hipótesis co-transfectamos células HEK-293 con Myc-p110 β y HA-p85 β -WT o HA-p85 β -K535RK592R, inmunoprecipitamos la proteína p85 β empleando anticuerpo anti-HA y evaluamos la presencia de p110 en el inmunoprecipitado revelando el Western-blot con anticuerpo anti-Myc. Observamos que tanto la proteína p85 β -WT como el mutante p85 β -K535RK592R interaccionaban con p110 β (Figura 27B), lo que indicaba que SUMO no afecta a la interacción entre ambas proteínas.

Con el fin de determinar si la mayor actividad oncogénica de los mutantes en SUMOilación de p85 β correlacionaba con una mayor activación de AKT por dicho mutante, analizamos por Western-blot el estado de fosforilación de AKT y de su sustrato FOXO, en extractos de proteína total obtenidos a partir de células CEF transfectadas de forma transitoria con pcDNA, p85 β -WT o p85 β -K535RK592R. Observamos que la expresión de p85 β -WT inducía un aumento en los niveles de p-AKT y p-FOXO, en comparación con los niveles detectados en las células transfectadas con el vector vacío, como se había descrito (Cortés et al., 2012) (Figura 27C). Además, detectamos una mayor fosforilación de AKT y FOXO en las células que expresaron el mutante p85 β -K535RK592R en comparación con la observada en las células que expresaron la proteína p85 β -WT (Figura 27C). En conjunto estos resultados sugerían que SUMO modula positivamente la actividad inhibitoria de p85 β .

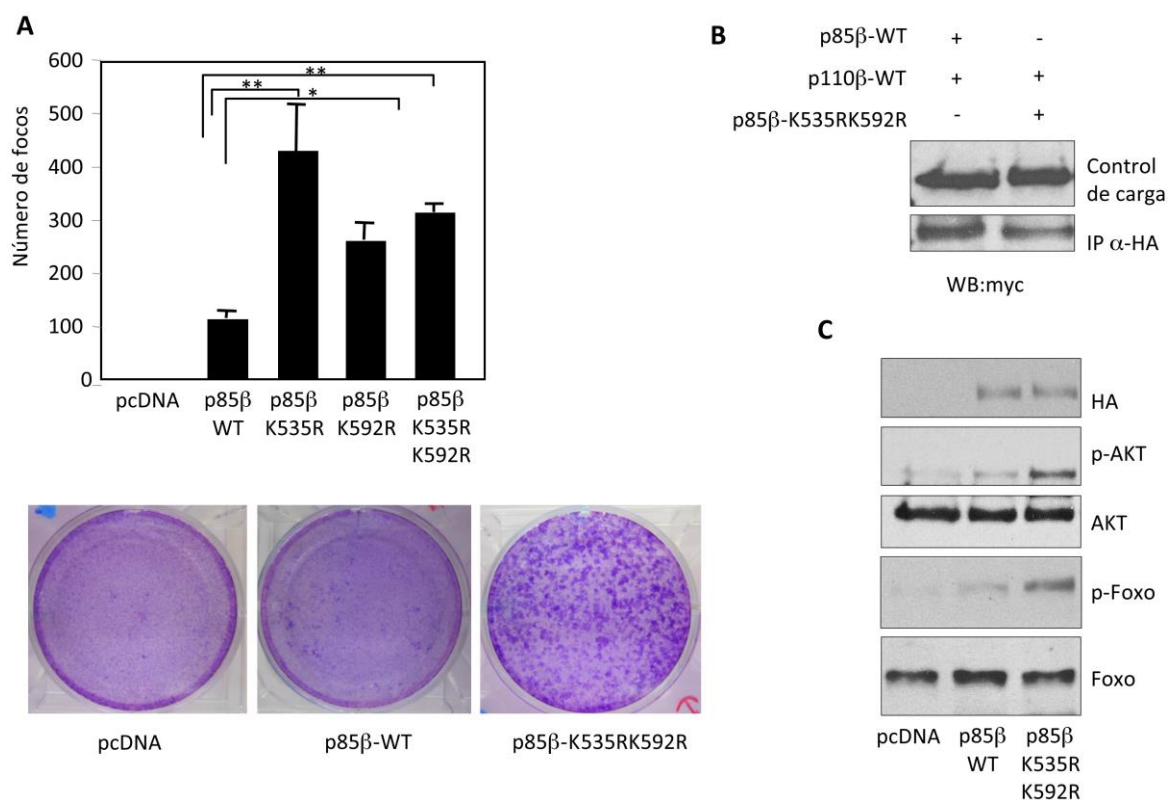


Figura 27. SUMO regula negativamente la actividad oncogénica de p85β. A) Ensayo de formación de focos en células NIH-3T3 transfectadas con pcDNA, p85β-WT o los mutantes en SUMOilación de p85β (panel superior). Imagen representativa de focos detectados en células 3T3 transfectadas con los plásmidos indicados. B) Co-inmunoprecipitación de p110β con p85β-WT o p85β-K535RK692R. C) Análisis por Western-blot de CEF transfectados de forma transitoria con pcDNA, p85β-WT o p85β-K535RK692R con los anticuerpos indicados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

2.4 La mutación de los residuos de SUMOilación de p85β favorece la migración celular

La activación de la vía PI3K/AKT favorece la migración celular (Cain and Ridley, 2009) y p85β incrementa la estabilidad y maduración de los focos de adhesión celulares (Cariaga-Martínez et al., 2014). Por lo tanto, evaluamos la presencia de focos de adhesión y la migración celular de células que expresaban la proteína silvestre o los mutantes de SUMOilación de p85β. Primero, analizamos por inmunofluorescencia las células NIH-3T3 que expresaban establemente p85β-WT o los mutantes en SUMOilación de p85β, utilizando un anticuerpo anti-talina. Observamos que las células que expresaban la proteína p85β-WT presentaban un mayor número de adhesiones focales y de mayor tamaño que aquellas transfectadas con el vector vacío (Figura 28A). Notablemente, el número de dichas adhesiones aumentó significativamente en aquellas células que expresaban los mutantes de SUMOilación de p85β (Figura 28A). A continuación, evaluamos la migración celular de las células estables con la técnica de “transwell” o cámara de Boyden. El análisis reveló un claro aumento en la

migración de las células que expresaron los mutantes de p85 β en comparación con las células que expresaron la proteína p85 β -WT (Figura 28B). Estos resultados indicaban que la SUMOilación de p85 β regula negativamente la formación de adhesiones celulares y la migración celular.

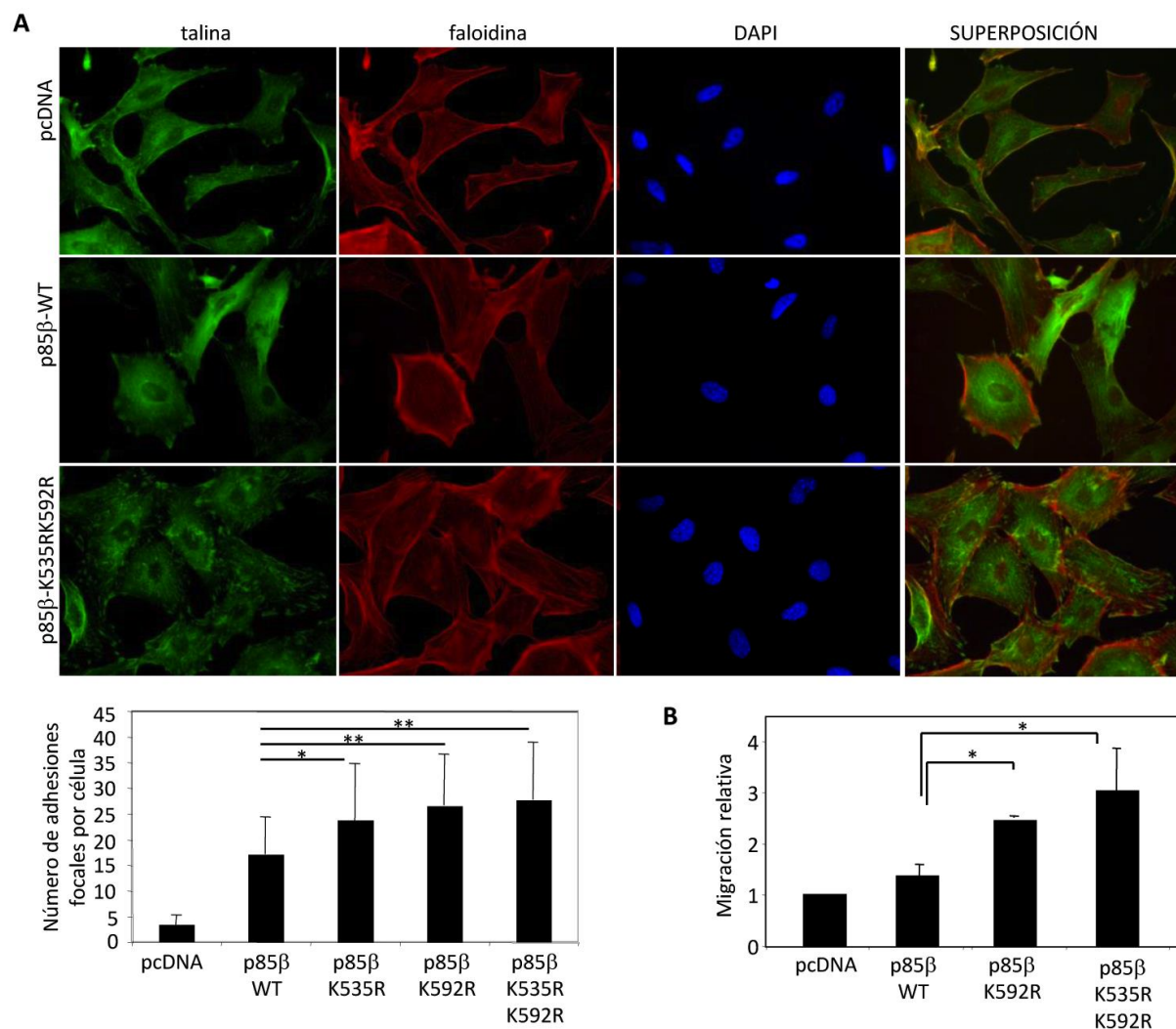


Figura 28. SUMO regula la formación de adhesiones focales y la migración celular dependientes de p85 β . A) Inmunofluorescencia de células NIH-3T3 establemente transfectadas con pcDNA, p85 β -WT o p85 β -K535RK592R teñidas con anti-talina y faloidina (panel superior). Cuantificación de las adhesiones focales por célula (panel inferior) B) Ensayo de migración celular en “transwell” de células NIH-3T3 que expresan de forma estable p85 β -WT y los mutantes en SUMOilación de p85 β . * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

2.5 SUMO regula negativamente la fosforilación de p85 β

Para evaluar la posible interacción entre la SUMOilación y la fosforilación de p85 β , primero realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* utilizando proteína p85 β sintetizada *in vitro* y tratada o no con λ -fosfatasa. No observamos efecto del tratamiento con λ -fosfatasa sobre la conjugación de p85 β a SUMO1 o SUMO2 (Figura 29A), lo cual sugería que la fosforilación de p85 β no afecta la

SUMOilación de la proteína. A continuación evaluamos si la proteína p85 β SUMOilada estaba fosforilada. Para ello, analizamos por Western-blot con anticuerpo anti-fosfo-p85 la proteína p85 β -SUMO2 obtenida en una reacción de SUMOilación *in vitro*. No detectamos la proteína p85 β -SUMO2 con dicho anticuerpo, lo cual indicaba que la proteína p85 β SUMOilada no estaba fosforilada (Figura 29B). Sin embargo, sí observamos una ligera disminución en la fosforilación de la banda correspondiente a p85 β no modificada cuando añadimos SUMO2 a la reacción (Figura 29B). Por lo tanto, analizamos la fosforilación de la proteína p85 β silvestre y del mutante p85 β -K535RK592R traducidos *in vitro* mediante Western-blot con anticuerpo anti-fosfo-p85 y observamos que la proteína mutante estaba intensamente fosforilada, en comparación con la proteína silvestre, como se confirmó después del tratamiento con λ -fosfatasa (Figura 29C).

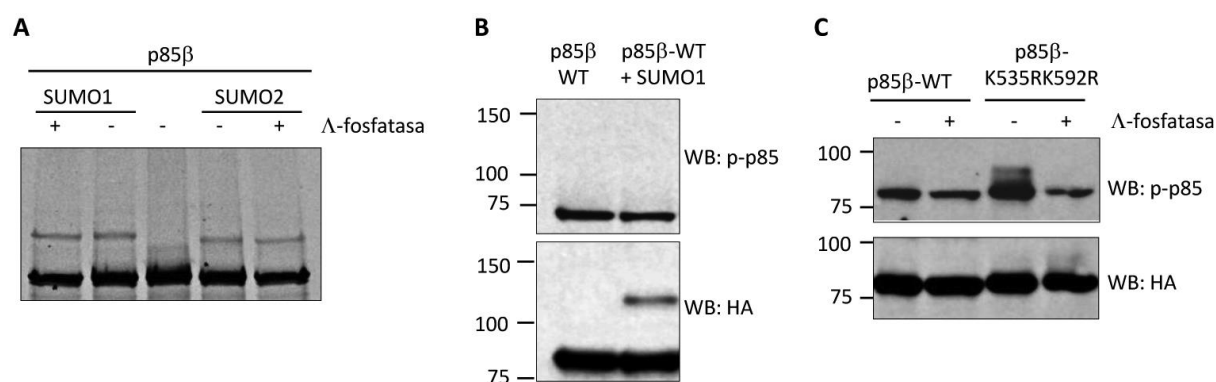


Figura 29. SUMO regula negativamente la fosforilación de p85 β *in vitro*. A) SUMOilación *in vitro* de p85 β incubada previamente o no con λ -fosfatasa. B) Western-blot del resultado de SUMOilación *in vitro* de p85 β empleando anticuerpo anti-fosfo-p85. C) Análisis por Western-blot de la proteína p85 β silvestre y la mutante en SUMOilación sintetizadas *in vitro* y tratadas o no con λ -fosfatasa con anticuerpo anti-fosfo-p85.

A continuación, evaluamos el efecto de SUMO en la fosforilación de p85 β *in vivo*. Para ello, transfectamos células HEK-293 con HA-p85 β -WT, los mutantes de p85 β en SUMOilación o co-transfectamos HA-p85 β -WT junto con pcDNA o Ubc9 y SUMO2 y las analizamos por Western-blot empleando anticuerpo anti-fosfo-p85. Observamos que los mutantes de SUMOilación de p85 β estaban altamente fosforilados en comparación con la proteína silvestre (Figura 30). Además, detectamos una reducción en los niveles de p85 fosforilado cuando co-transfectamos SUMO2 junto con HA-p85 β -WT (Figura 30). En conjunto estos resultados indicaban que SUMO modula negativamente la fosforilación de p85 β , parámetro relacionado con la activación de PI3K.

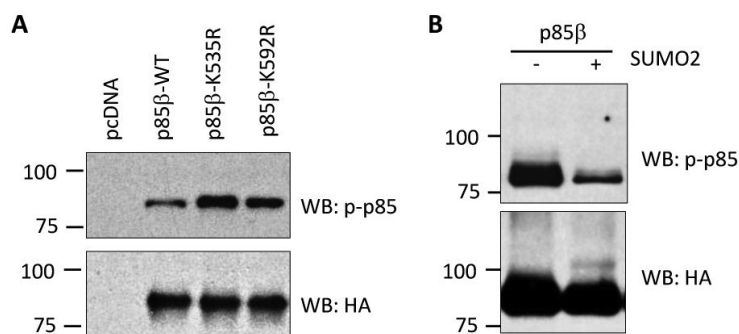


Figura 30. SUMO regula negativamente la fosforilación de p85β *in vivo*. A) Análisis por Western-blot de células HEK-293 transfectadas con HA-p85β-WT o los mutantes en SUMOilación de p85β empleando el anticuerpo anti-fosfo-p85. B) Análisis por Western-blot de células HEK-293 transfectadas con HA-p85β-WT en presencia o ausencia de SUMO2 empleando el anticuerpo anti-fosfo-p85.

2.6 El virus Influenza A modula negativamente la SUMOilación de p85β

Estudios previos indican que la activación de la vía de PI3K/AKT por el virus influenza requiere de la interacción de la proteína viral NS1 con el dominio iSH2 de p85β (Hale et al., 2008; Li et al., 2008). Como nuestros resultados indican que dicho dominio contiene los residuos de SUMOilación de p85β, decidimos analizar si SUMO modulaba la interacción entre NS1 y p85β. Primero realizamos un ensayo de interacción *in vitro* entre GST-NS1 y la proteína p85β SUMOilada. Observamos que NS1 interaccionaba tanto con la proteína p85β no modificada como con p85β-SUMO1 (Figura 31A). A continuación evaluamos la interacción de NS1 con p85β en células HEK-293 co-transfectadas con NS1 y HA-p85β-WT o HA-p85β-K535RK592R, mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación. NS1 co-inmunoprecipitó tanto con la proteína silvestre como con el mutante en SUMOilación de p85β (Figura 31B). Estos resultados indicaban que SUMO no interrumpe la interacción de NS1 con p85β.

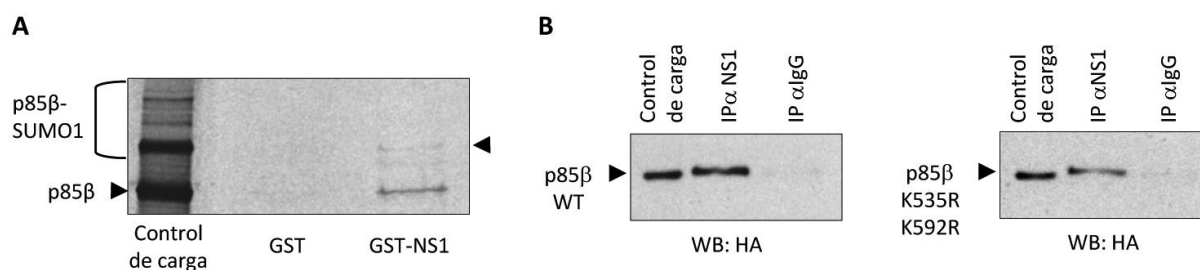


Figura 31. Interacción de NS1 con p85β en presencia o ausencia de SUMO. A) Ensayo de interacción *in vitro* entre la proteína p85β sometida a un ensayo de SUMOilación *in vitro* y GST-NS1. B) Co-inmunoprecipitación entre NS1 y p85β-WT o p85β-K535RK592R en células HEK-293.

A continuación, decidimos evaluar si NS1 afectaba a la SUMOilación de p85β. Primero realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* con la proteína p85β como sustrato y en presencia o ausencia de NS1. Observamos mediante Western-blot una reducción de los niveles de p85β SUMOilado cuando añadimos NS1 a la reacción (Figura 32A). A continuación analizamos la SUMOilación de p85β en

células HEK-293 co-transfectadas o no con NS1. El análisis por Western-blot reveló nuevamente una reducción en los niveles de p85 β -SUMO2 en las células co-transfectadas con NS1 (Figura 32B). Finalmente, analizamos el efecto de NS1 en la SUMOilación de p85 β en células HEK-293 transfectadas con p85 β y SUMO2 e infectadas con el virus Influenza A o con virus Influenza A carente de NS1. Una vez más, el análisis por Western-blot reveló una reducción en los niveles de p85 β -SUMO2 en las células infectadas con el virus influenza que expresaba NS1, y no observamos cambios significativos en los niveles de p85 β -SUMO2 en las células infectadas con el virus influenza que carecía de NS1 (Figura 32C). En conjunto estos resultados indicaron que la proteína NS1 regula negativamente la SUMOilación de p85 β .

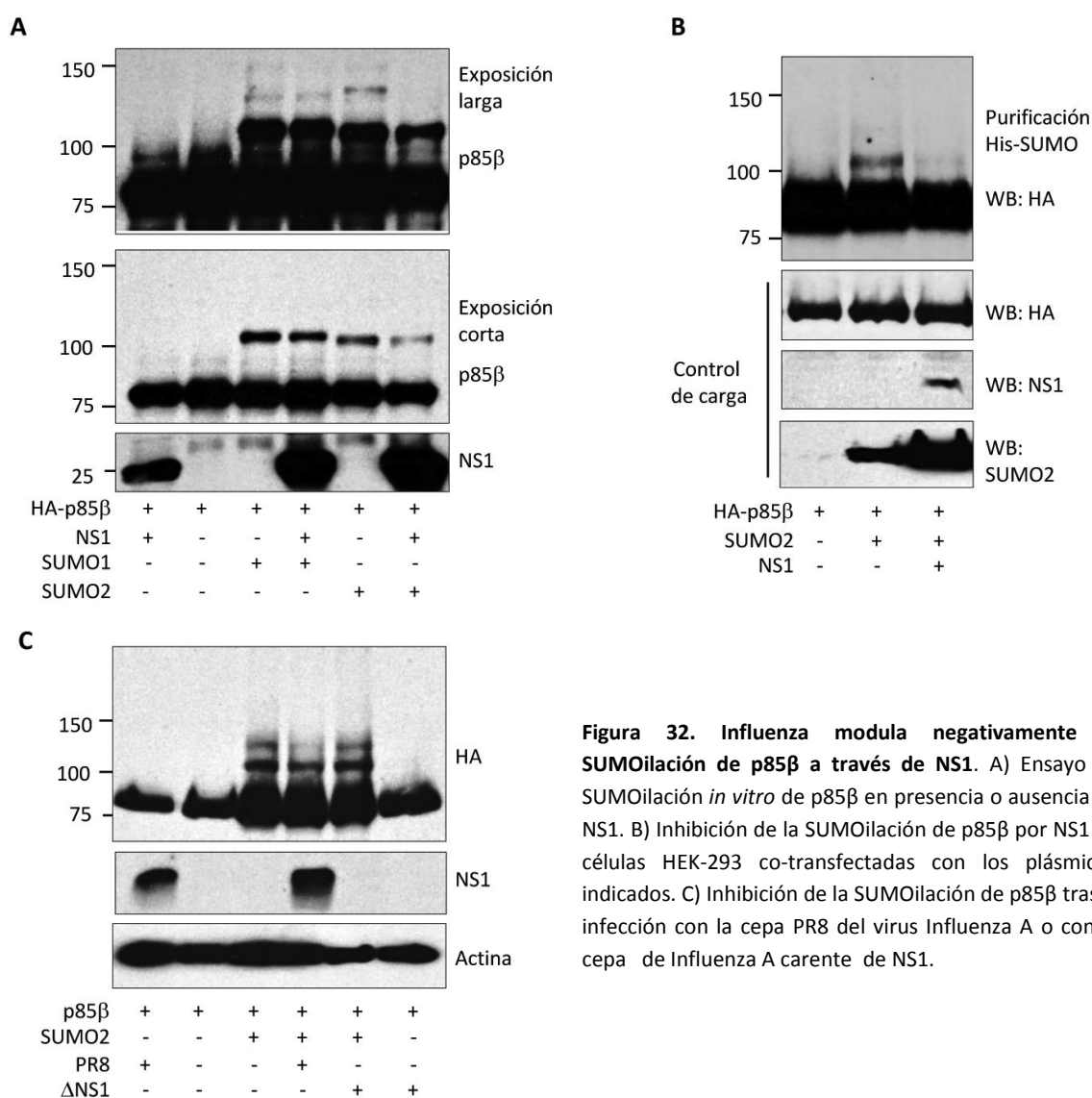


Figura 32. Influenza modula negativamente la SUMOilación de p85 β a través de NS1. A) Ensayo de SUMOilación *in vitro* de p85 β en presencia o ausencia de NS1. B) Inhibición de la SUMOilación de p85 β por NS1 en células HEK-293 co-transfectadas con los plásmidos indicados. C) Inhibición de la SUMOilación de p85 β tras la infección con la cepa PR8 del virus Influenza A o con la cepa de Influenza A carente de NS1.

2.7 El virus Influenza A promueve la interacción de p85β con la quinasa Src e induce la fosforilación de p85β

De acuerdo con nuestros resultados, SUMO regula negativamente la fosforilación de p85β y NS1 regula negativamente la SUMOilación de p85β. Por lo tanto decidimos evaluar si NS1 afecta a la fosforilación de p85β. Para ello, co-transfectamos células HEK-293 con p85β junto con pcDNA o NS1 y analizamos por Western-blot el estado de fosforilación de p85β. El análisis reveló que la transfección de NS1 inducía un aumento en la fosforilación de p85β (Figura 33A). Para evaluar si NS1 expresado desde el virus también inducía la fosforilación de p85β, transfectamos células A549 con p85β o pcDNA, las infectamos con el virus Influenza A y analizamos por Western-blot la fosforilación de p85β. Observamos el aumento en la fosforilación de p85β en las células infectadas con la cepa PR8 del virus Influenza A (Figura 33B). Se ha descrito que las quinasas Src interaccionan con p85 y modulan la activación de PI3K (Karnitz et al., 1992), por lo que decidimos analizar la interacción entre Src y la proteína HA-p85β-WT o HA-p85β-K535RK592R en presencia o ausencia de NS1. Para ello co-transfectamos células HEK-293 con HA-p85β-WT o HA-p85β-K535RK592R junto con pcDNA o NS1 y analizamos la interacción entre ambas proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. La cantidad de proteína p85β mutante en SUMOilación que co-inmunoprecipitaba con Src fue mayor que la de la proteína p85β silvestre. Además, observamos que NS1 aumentaba la interacción de la proteína p85β silvestre con Src (Figura 33C). En conjunto, estos resultados indicaron que NS1 favorece la interacción entre p85β y Src e induce la fosforilación de p85β.

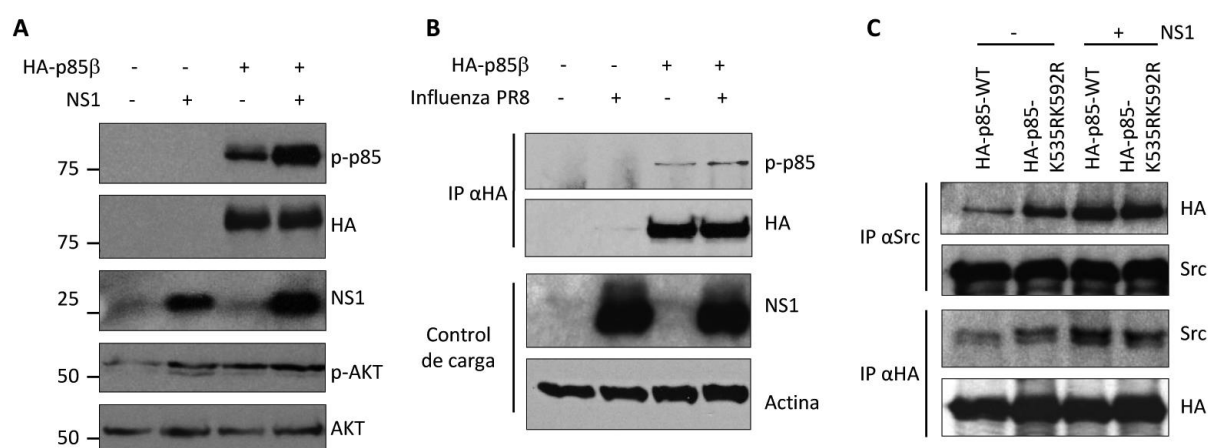


Figura 33. Influenza A promueve la interacción de p85β con la quinasa Src e inducir su fosforilación. A) La proteína NS1 induce la fosforilación de p85β cuando se co-transfecta con p85β B) La infección con PR8 induce la fosforilación de p85β. C) Co-inmunoprecipitación de p85β-WT o del mutante en SUMOilación de p85β con la quinasa Src endógena en presencia o ausencia de NS1.

2.8 p110 β interacciona con SUMO de forma covalente

Los resultados anteriores indicaban que SUMO interactuaba covalentemente con p85 β a través de su dominio iSH2, a través del cual también interactúa con p110 β . Por lo tanto, decidimos evaluar si la interacción de p85 β con p110 β afectaba a la SUMOilación de p85. Para ello realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* utilizando como sustrato la proteína p85 β sintetizada *in vitro* en presencia de metionina no marcada y previamente incubada o no con la proteína p110 β sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina. p85 β se analizó mediante Western-blot con anticuerpo anti-HA y p110 β por autorradiografía. El análisis por Western-blot reveló que la SUMOilación de p85 β tenía lugar independientemente de la presencia o no de p110 β . Cuando analizamos la proteína p110 β añadida a la reacción observamos la aparición de una banda del tamaño esperado para la proteína p110 β conjugada a SUMO1 en presencia de SUMO1, lo que sugería que la subunidad catalítica p110 β también se SUMOilaba (Figura 34A). Con el fin de determinar si p110 β podía conjugarse a SUMO, realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* utilizando como sustrato la proteína p110 β sintetizada *in vitro* en presencia de [S^{35}]-metionina y observamos la aparición de bandas del tamaño esperado correspondientes a p110 β -SUMO cuando agregamos SUMO1 o SUMO2 a la reacción de SUMOilación (Figura 34B). Para demostrar que dichas bandas se corresponden con la proteína p110 β SUMOilada, la proteínas p110 β -SUMO1 y p110 β -SUMO2 se incubaron con la proteasa específica de SUMO, SENP1. El resultado fue la desaparición de las bandas correspondientes con p110 β -SUMO (Figura 34B). Estos resultados demostraban que la proteína p110 β se SUMOila *in vitro*.

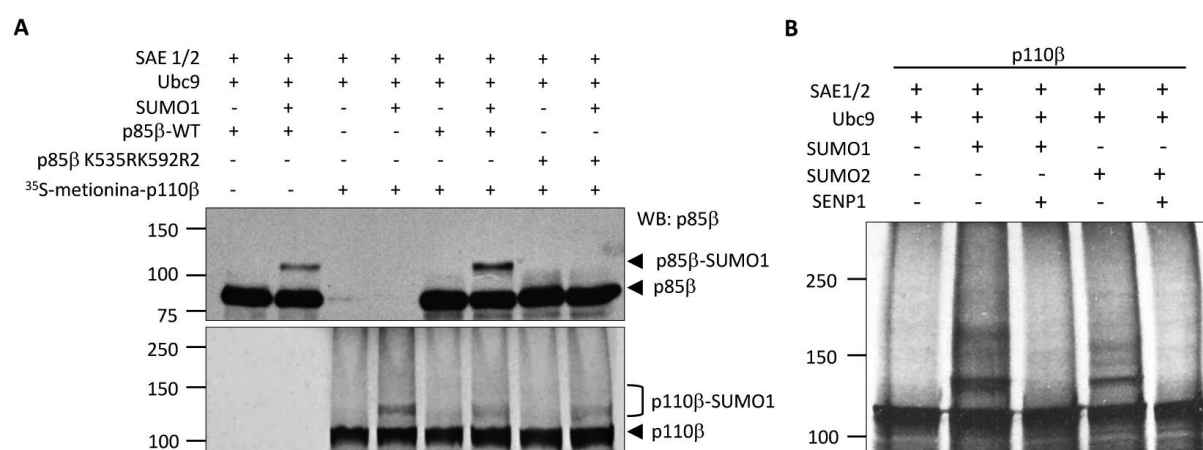


Figura 34. SUMOilación *in vitro* de p110 β . A) SUMOilación *in vitro* de p85 β frío y de p110 β marcado con ^{35}S -metionina por SUMO1 y SUMO2. La conjugación de p85 β a SUMO se reveló por Western-blot y la de p110 β por autorradiografía. B) Ensayo de SUMOilación y de-SUMOilación de p110 β por SENP1 *in vitro*.

Para evaluar la SUMOilación de p110 β *in vivo*, co-transfectamos células HEK-293 con el plásmido que codifica para la proteína p110 β fusionada a Myc (Myc-p110 β) junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 y analizamos por Western-blot con anticuerpo anti-Myc los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina obtenidas de dichas células. El análisis reveló la presencia de bandas del tamaño esperado para la proteína p110 β conjugada a SUMO en las células co-transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 (Figura 35A). A continuación, evaluamos si la proteína p110 β endógena se modificaba por SUMO. Transfectamos células HEK-293 con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, realizamos la purificación de proteínas conjugadas a histidina y analizamos por Western-blot con anticuerpo anti-p110 β los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina. Observamos la presencia de las bandas correspondientes con p110 β -SUMO1 y p110 β -SUMO2 en las células transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2, respectivamente (Figura 35B). En conjunto, estos resultados demostraron que la proteína p110 β se modifica por SUMO1 y SUMO2 *in vivo*.

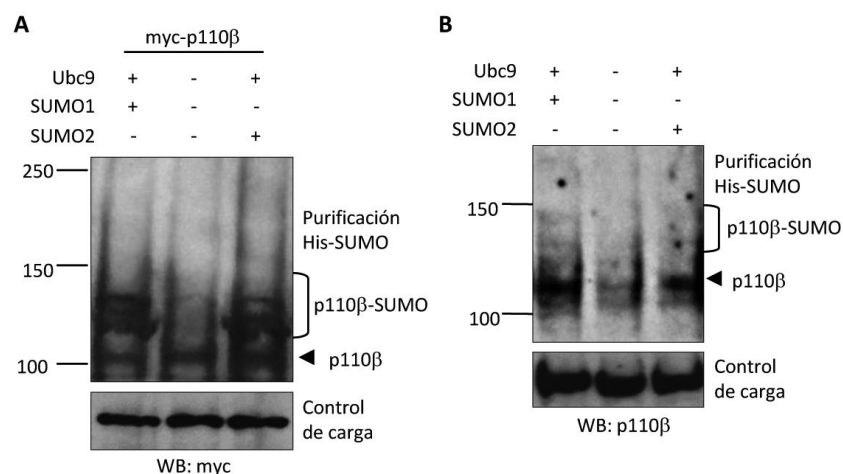


Figura 35. SUMOilación *in vivo* de p110 β . A) SUMOilación *in vivo* de la proteína p110 β en células HEK-293 co-transfectadas con myc-p110 β y pcDNA o Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2. B) SUMOilación de p110 β endógena en células HEK-293 co-transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o His6-SUMO2.

2.9 Identificación de los residuos aminoácidos de p110 β que conjugan SUMO

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de p110 β identificó los residuos de lisina 647 y 952 como probables sitios de SUMOilación. Por lo tanto, generamos los mutantes p110 β -K647R y p110 β -K952R y analizamos su conjugación a SUMO1 *in vitro* utilizando ambas proteínas sintetizadas *in vitro* en presencia de [³⁵S]-metionina como sustrato. Observamos que la banda correspondiente con la conjugación de SUMO1 al mutante p110 β -K952R era casi indetectable (Figura 36A). Por el contrario, no observamos diferencias entre la SUMOilación de la proteína p110 β -WT y el mutante p110 β -K647R (Figura 36A). Para comprobar que el mutante p110 β -K952R no se SUMOila *in vivo*, transfectamos

células HEK-293 con Myc-p110 β -WT o Myc-p110 β -K952R junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 y analizamos por Western-blot con anticuerpo anti-Myc los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina purificadas. Observamos la presencia de bandas correspondientes con p110 β -SUMO1 o p110 β -SUMO2 solo en las células co-transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2 y la proteína Myc-p110 β -WT, pero no en aquellas transfectadas con la forma mutante p110 β -K952R (Figura 36B). Estos resultados indicaban que el residuo de lisina K952 en p110 β está implicado en la conjugación a SUMO.

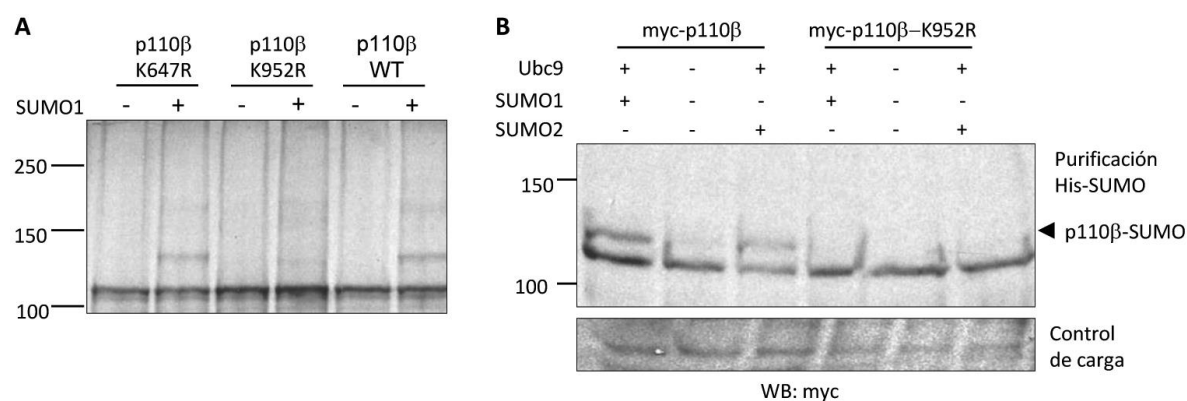


Figura 36. El residuo de lisina 952 de p110 β está implicado en la conjugación a SUMO. A) Ensayo de SUMOilación *in vitro* de p110 β -WT y los mutantes K647R y K952R de p110 β con SUMO1. B) SUMOilación *in vivo* de p110 β -WT o el mutante p110 β -K952R en células HEK-293 co-transfectadas con los plásmidos que se indican.

2.10 La mutación del sitio de SUMOilación reduce la actividad transformante de la proteína silvestre

En primer lugar, decidimos analizar si SUMO afecta a la localización de p110 β . Transfectamos fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) o células HEK-293 con Myc-p110 β -WT o Myc-p110 β -K952R y realizamos ensayos de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular, respectivamente. No observamos diferencias en la localización subcelular del mutante p110 β -K952R con respecto a la proteína p110 β -WT, pues ambas proteínas localizaban mayoritariamente en el citoplasma celular (Figura 37).

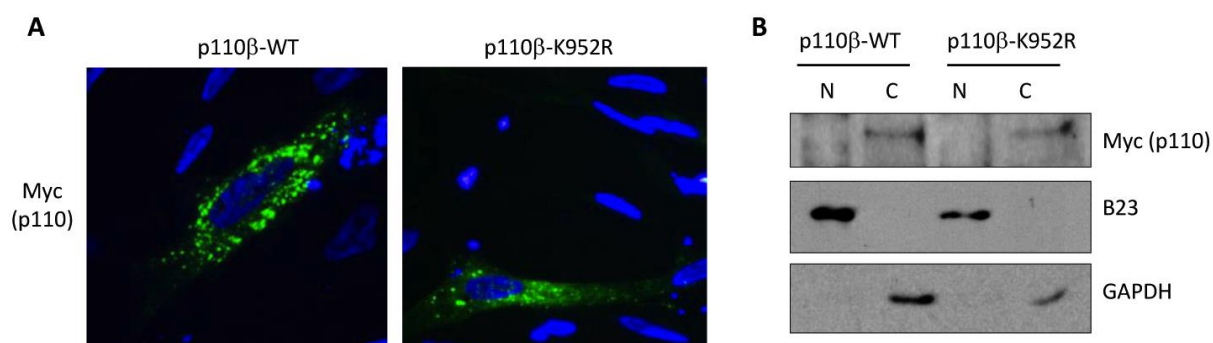


Figura 37. Localización subcelular de p110 β -WT y el mutante en SUMOilación p110 β -K952R. A) Ensayos de inmunofluorescencia en células CEF transfectadas con p110 β -WT o el mutante p110 β -K952R con anticuerpo anti-myc. B) Análisis por Western-blot con anti-myc del resultado del fraccionamiento subcelular de células HEK-293 transfectadas con p110 β -WT o el mutante p110 β -K952R.

A continuación evaluamos si la mutación de los sitios de SUMOilación en p110 β afecta a su interacción con p85 β . Co-transfectamos células HEK-293 con HA-p85 β -WT junto con Myc-p110 β -WT o Myc-p110 β -K952R, inmunoprecipitamos p110 β con anticuerpo anti-Myc y analizamos mediante Western-blot con anticuerpo anti-HA la presencia de p85 β en el inmunoprecipitado. El análisis reveló que tanto la proteína Myc-p110 β -WT como el mutante Myc-p110 β -K952R interaccionaban con p85 β (Figura 38A). Además, evaluamos la localización en membrana de la proteína Myc-p110 β -WT y el mutante Myc-p110 β -K952R cuando se co-transfectan con HA-p85 β -WT o el mutante en SUMOilación de p85 β . Para ello, realizamos un ensayo de purificación de proteínas de membrana a partir de células HEK-293 transfectadas con los plásmidos correspondientes y analizamos por Western-blot las fracciones resultantes con los anticuerpos indicados. No observamos diferencias en la localización en membrana entre la proteína p110 β -WT y el mutante p110 β -K952R en presencia de la proteína p85 β -WT o del mutante p85 β -K535RK592R (Figura 38B). En conjunto, estos resultados indicaban que SUMO no afecta a la interacción entre p110 β y p85 β ni a su localización en la membrana celular.

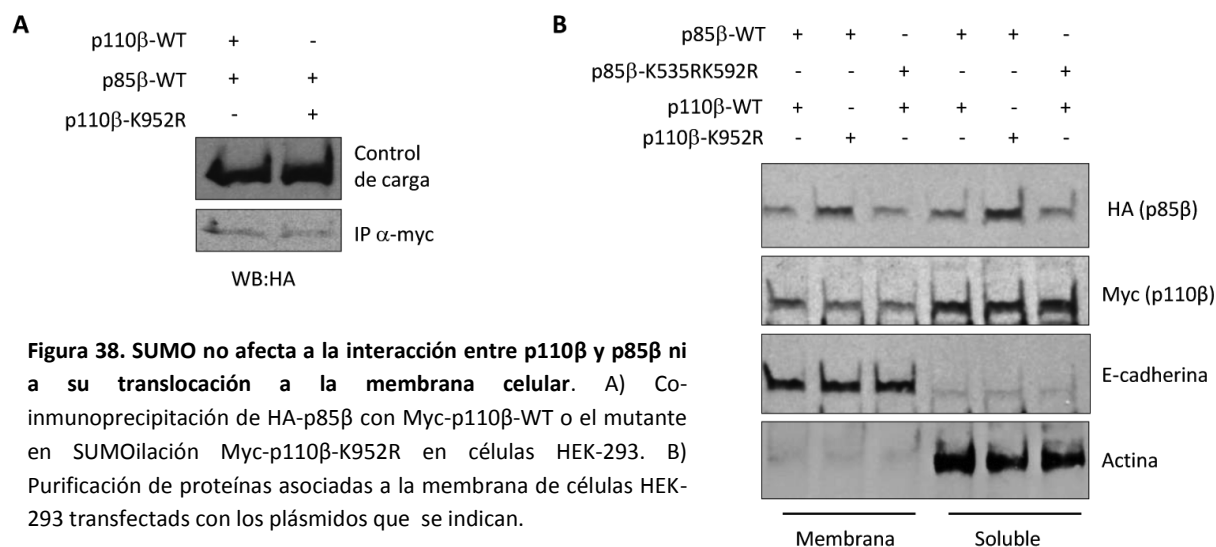
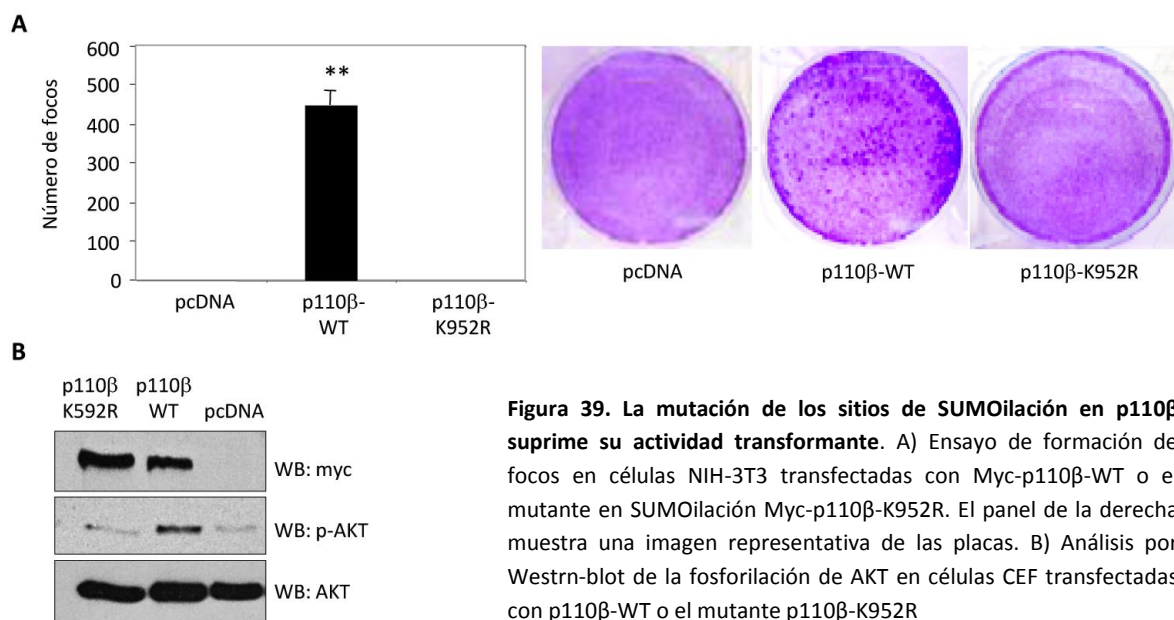


Figura 38. SUMO no afecta a la interacción entre p110 β y p85 β ni a su translocación a la membrana celular. A) Co-inmunoprecipitación de HA-p85 β con Myc-p110 β -WT o el mutante en SUMOilación Myc-p110 β -K952R en células HEK-293. B) Purificación de proteínas asociadas a la membrana de células HEK-293 transfectadas con los plásmidos que se indican.

Con el fin de evaluar el efecto de SUMO en la actividad quinasa y transformante de p110 β , generamos células NIH-3T3 que expresan establemente Myc-p110 β -WT, Myc-p110 β -K952R o transfectadas con el vector pcDNA y a continuación realizamos un ensayo de formación de focos. Como se esperaba (Kang et al., 2006), la sobreexpresión de Myc-p110 β -WT indujo la formación de focos, mientras que las células transfectadas con el vector no (Figura 39A). Además, la expresión del mutante Myc-p110 β -K952R no indujo la formación de focos (Figura 39A). A continuación, analizamos por Western-blot la activación de AKT en los extractos de proteína total de células CEF transfectadas de forma transitoria con el vector pcDNA o con los plásmidos myc-p110 β -WT o myc-p110 β -K952R. El análisis reveló un aumento en la fosforilación de AKT en las células transfectadas con Myc-p110 β -WT en comparación con aquellas transfectadas con el vector (Figura 39B). Este aumento en la activación de AKT no se observó en las células transfectadas con el mutante Myc-p110 β -K952R (Figura 39B). Estos resultados sugerían que SUMO modula positivamente la actividad quinasa y la actividad transformante de p110 β .



3. SUMO regula la actividad de AKT1

3.1 AKT1 interacciona con SUMO de forma covalente

Dado que SUMO parece ser importante en la regulación de distintos componentes de la vía PI3K/AKT, decidimos evaluar la SUMOilación del principal efector de la vía de PI3K, la quinasa AKT. Primero realizamos un ensayo de SUMOilación *in vitro* utilizando como sustrato proteína AKT1 sintetizada *in vitro* (~56 kDa) en presencia de [S^{35}]-metionina. Cuando agregamos SUMO1 o SUMO2 a la reacción de SUMOilación, observamos la aparición de bandas correspondientes con AKT1 conjugado a SUMO (Figura 40A). Para demostrar que dichas bandas se corresponden con AKT1 SUMOilada, la proteína AKT1-SUMO1 se incubó con la proteasa específica de SUMO, SENP1, lo cual resultó en la desaparición de las bandas de mayor peso molecular correspondientes con la proteína AKT1 SUMOilada (Figura 40B). Estos resultados indicaron que la proteína AKT1 sintetizada *in vitro* se SUMOila. Además, la aparición de diferentes bandas correspondientes con AKT1-SUMO1 en la reacción de SUMOilación indicaba que SUMO se conjuga a más de una lisina en AKT1.

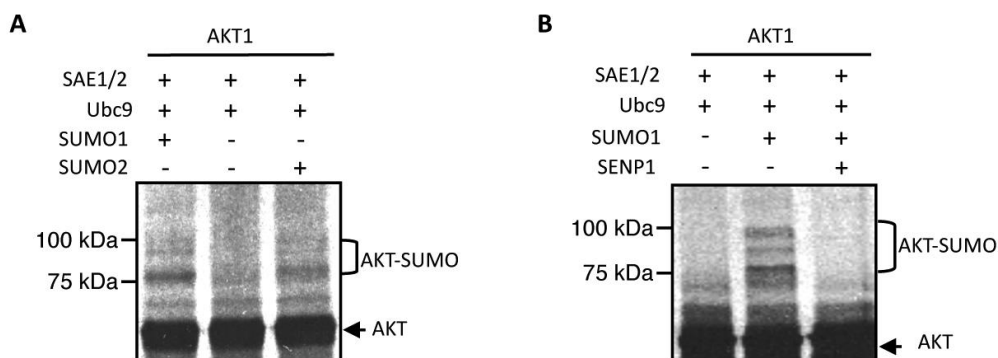


Figura 40. SUMOilación *in vitro* de AKT1. A) Ensayo de SUMOilación *in vitro* de AKT1 con SUMO1 y SUMO2. B) Ensayo de SUMOilación de AKT1-SUMO1 *in vitro* por SENP1.

A continuación, para evaluar si AKT1 se SUMOila *in vivo*, co-transfectamos células HEK-293 con el plásmido que codifica para la proteína AKT1 fusionada a HA (pcDNA-HA-AKT1) junto con pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2. Los extractos de proteína total y las proteínas unidas a histidina, purificadas mediante columnas de níquel, fueron analizadas por Western-blot utilizando anticuerpo anti-HA. El análisis de las proteínas purificadas reveló bandas del tamaño esperado correspondientes con AKT1-SUMO2 solo en las células transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO2 (Figura 41A). Sin embargo, no detectamos las bandas esperadas de AKT1-SUMO1 en las células transfectadas con Ubc9 y His6-SUMO1 (Figura 41A) en ninguno de los múltiples intentos y después de realizar el ensayo en diferentes líneas celulares, lo cual sugería que AKT1 no es modificado por SUMO1 en estas condiciones. Se ha descrito que ciertas condiciones de estrés pueden inducir la conjugación a SUMO (Golebiowski et al., 2009; Hong et al., 2001), por ello decidimos evaluar la conjugación de AKT1 a SUMO1 en células sometidas a estrés. Co-transfectamos células HEK-293 con HA-AKT1 junto con pcDNA o Ubc9 y His6-SUMO1 y 36 después de la transfección las células fueron sometidas a choque térmico que consistió en incubarlas a 45°C durante 20 min. Posteriormente, analizamos por Western-blot los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina purificadas, utilizando anticuerpo anti-HA. No detectamos AKT1-SUMO1 en las células no tratadas. Sin embargo, observamos la aparición de las bandas correspondientes con AKT1-SUMO1 en células sujetas a estrés térmico (Figura 41B). Estos resultados demostraron que AKT1 puede ser conjugado a SUMO1 *in vivo* bajo condiciones de estrés. Asimismo, en un experimento similar, observamos un aumento en la conjugación de AKT1 a SUMO2 bajo condiciones de estrés térmico (Figura 41C).

Para confirmar que la proteína AKT1 endógena se SUMOila, los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina purificadas a partir de células HEK-293 transfectadas con Ubc9 y

His6-SUMO2 se analizaron por Western-blot con anticuerpo anti-AKT. El análisis reveló la presencia de bandas del tamaño esperado correspondientes a AKT1-SUMO2 únicamente en aquellas células transfectadas con His6-SUMO2, lo cual indicaba que la proteína AKT1 endógena puede ser modificada por SUMO2 (Figura 41D). La SUMOilación de AKT1 endógena también se evaluó empleando la técnica de inmunoprecipitación. Inmunoprecipitamos el SUMO2 presente en extractos de proteínas de células HEK-293 utilizando un anticuerpo anti-SUMO2 o uno inespecífico. A continuación analizamos los inmunoprecipitados mediante Western-blot con un anticuerpo anti-AKT y observamos la aparición de una banda del tamaño esperado para AKT1-SUMO2 en aquellos inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-SUMO2 (Figura 41E). En conjunto, estos resultados confirmaron que AKT1 se conjuga a SUMO1 y SUMO2 *in vivo*.

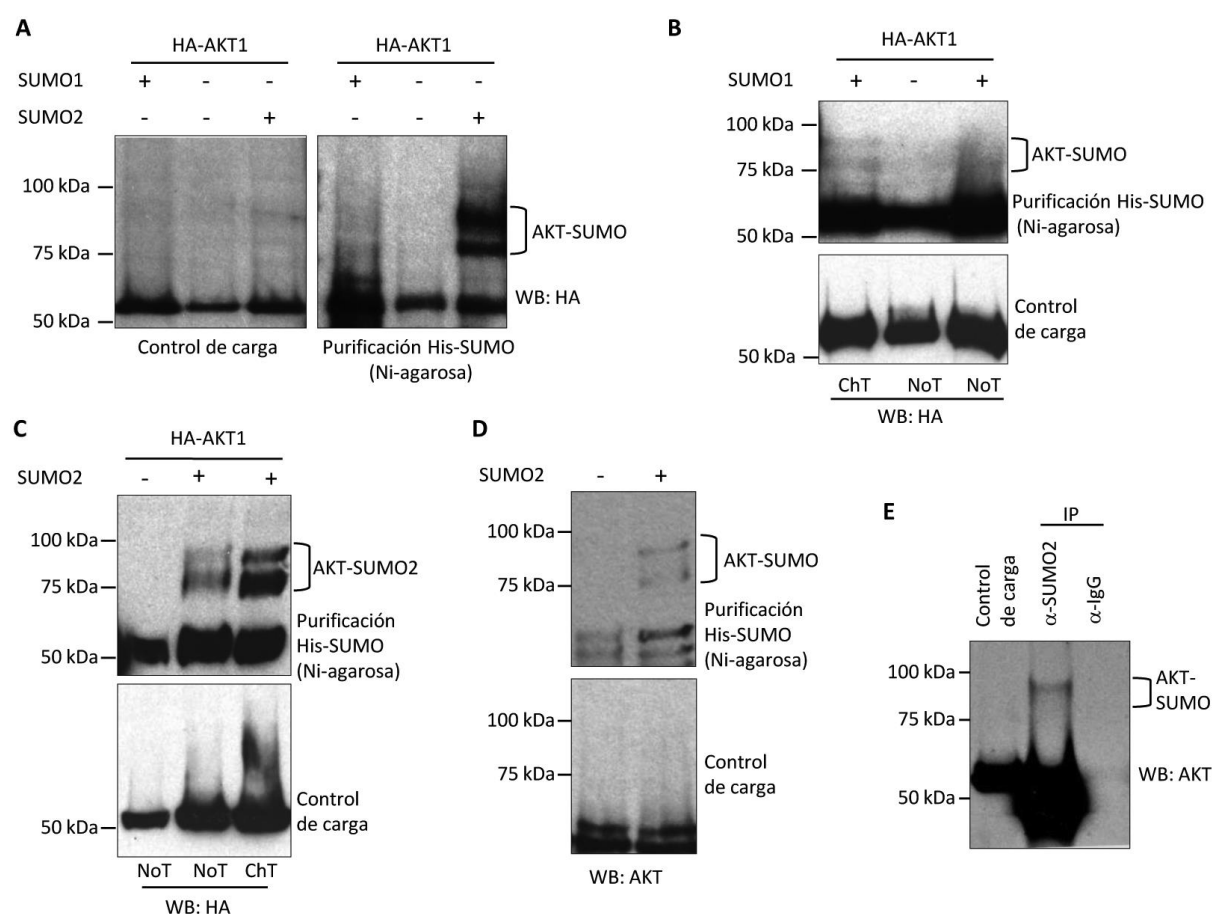


Figura 41. AKT1 se SUMOila *in vivo* y el estrés térmico favorece dicha modificación. A) Análisis de la SUMOilación *in vivo* de AKT1 en células HEK-293 co-transfectadas con HA-AKT1 y pcDNA, Ubc9 y His6-SUMO1 o Ubc9 y His6-SUMO2. B) Análisis de la SUMOilación *in vivo* de AKT1 por SUMO1 en células HEK-293 co-transfectadas con HA-AKT1, Ubc9 y His6-SUMO1 y sometidas o no a choque térmico (ChT). C) Análisis de la SUMOilación *in vivo* de AKT1 por SUMO2 en células HEK-293 co-transfectadas con HA-AKT1, Ubc9 y His6-SUMO2 y sometidas o no a choque térmico (ChT). D) Análisis de la SUMOilación de la proteína AKT endógena en células HEK-293 transfectadas con His6-SUMO2 y Ubc9. E) Análisis de la detección de la proteína AKT-SUMO2 en inmunoprecipitados de SUMO2 obtenidos a partir de células HEK-293.

3.2 Identificación de los residuos de lisina en AKT1 que conjugan SUMO

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de AKT1 identificó 4 residuos de lisina (K64, K182, K189 y K276) como sitios probables de SUMOilación. Por consiguiente, generamos una serie de mutantes individuales y mutantes dobles en estos residuos de lisina y evaluamos su SUMOilación *in vitro*. Observamos una reducción en la conjugación de SUMO2 a los mutantes individuales K64R, K182R y K189R y al mutante doble K182RK189R (Figura 42A). Para confirmar que los residuos de lisina K64, K182 y K189 de AKT1 son sitios de conjugación a SUMO, generamos un triple mutante AKT1 K64RK182RK189R (AKT1-SMUT) y evaluamos su SUMOilación *in vitro* e *in vivo*. En el ensayo de SUMOilación *in vitro* observamos una clara reducción en la conjugación a SUMO1 y SUMO2 de AKT1-SMUT en comparación con la proteína AKT1 silvestre (AKT1-WT) (Figura 42B). El análisis por Western-blot con un anticuerpo anti-HA de las proteínas fusionadas a histidina purificadas a partir de células transfectadas con la proteína AKT1-SMUT o AKT1-WT en presencia o ausencia de Ubc9 y His6-SUMO2 reveló que la conjugación del AKT1-SMUT a SUMO2 era casi indetectable (Figura 42C). Estos resultados indicaban que los residuos de lisina K64, K182 y K189 de AKT1 están implicados en la conjugación a SUMO.

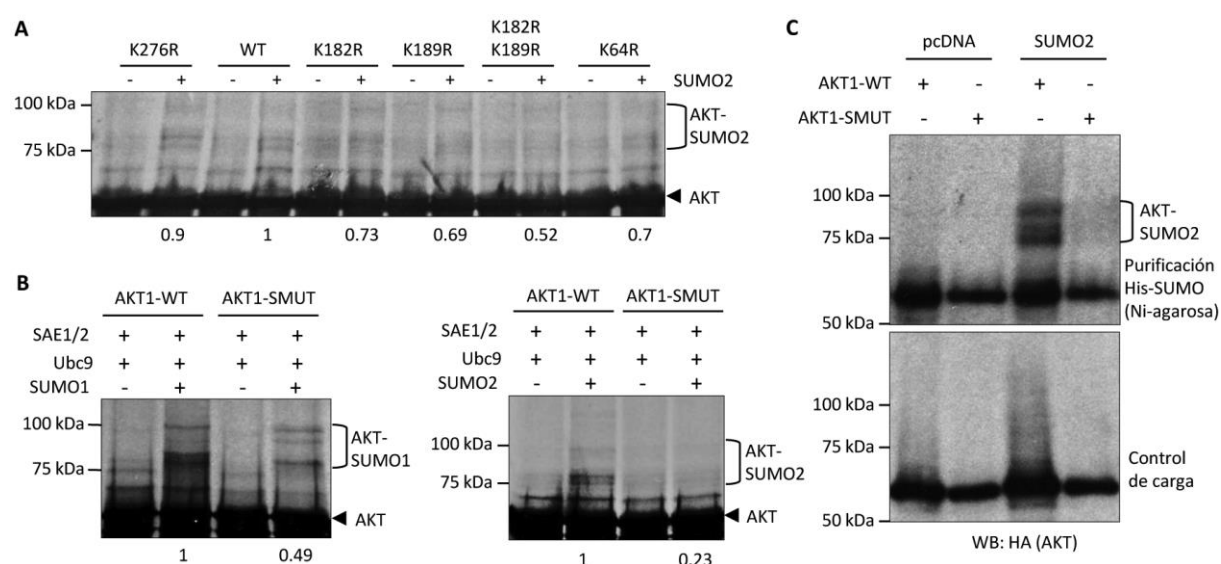


Figura 42. Los residuos K64, K182 y K189 en AKT1 están implicados en su conjugación a SUMO. A) SUMOilación *in vitro* con SUMO2 de la proteína AKT1-WT y los mutantes K64R, K182R y K189R de AKT1. B) Ensayos de SUMOilación *in vitro* de la proteína AKT1-WT o el triple mutante AKT1 K64RK182RK189R (AKT1-SMUT) con SUMO1 (panel de la izquierda) o SUMO2 (panel de la derecha). C) SUMOilación *in vivo* de AKT1-WT o AKT1-SMUT en células HEK-293 transfectadas con los plásmidos que se indican.

3.3 SUMO aumenta la actividad de AKT1

Para evaluar cómo afecta la conjugación de SUMO a la actividad de AKT1, realizamos un ensayo quinasa *in vitro* utilizando proteína AKT1 recombinante no modificada o conjugada previamente a SUMO y como sustrato la proteína p27 recombinante. Como se esperaba, AKT1 fosforiló a p27. Además, observamos un claro aumento en la fosforilación de p27 cuando utilizamos AKT1 previamente incubada en una reacción de SUMOilación *in vitro* tanto en presencia de SUMO2 (Figura 43A) como en presencia de SUMO1 (Figura 43B). Estos resultados indicaban que SUMO favorece la actividad quinasa de AKT1 *in vitro*.

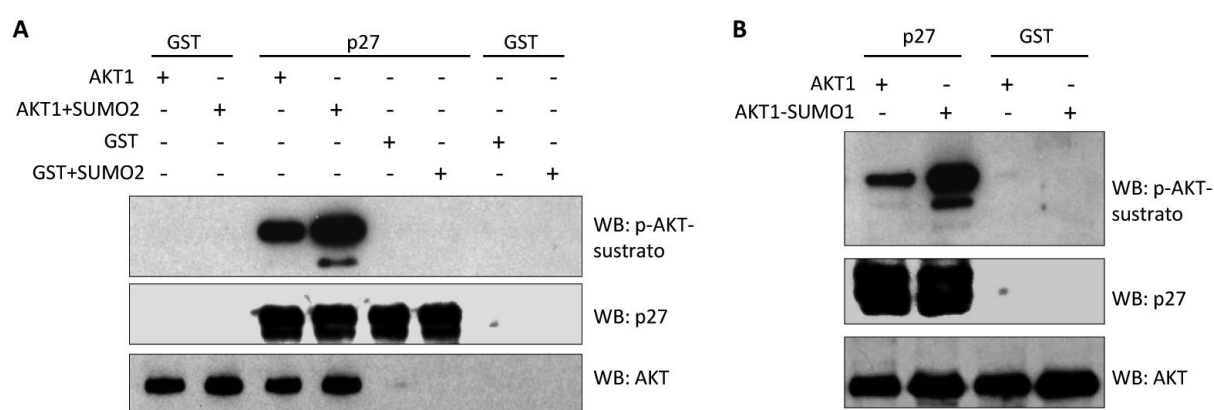


Figura 43. SUMO aumenta la actividad quinasa de AKT1 *in vitro*. Ensayo quinasa *in vitro* empleando como sustrato la proteína p27 y como quinasa la proteína AKT1 no modificada o conjugada a SUMO2 (A) o a SUMO1 (B).

A continuación, evaluamos si la SUMOilación regula la actividad de AKT1 *in vivo*. Primero, transfectamos células MCF7 con pcDNA, AKT1-WT o el mutante en SUMOilación AKT1-SMUT y 24 h después incubamos las células en medio sin suero durante 24 h. Posteriormente, estimulamos o no las células con insulina durante 30 minutos, inmunoprecipitamos la proteína AKT1 transfectada utilizando anticuerpo anti-HA y analizamos por Western-blot los niveles de fosforilación de AKT1 con un anticuerpo que reconoce AKT fosforilado en el residuo serina 473. La relación entre la proteína AKT1-SMUT fosforilada/no-fosforilada fue claramente menor que la relación entre proteína AKT1-WT fosforilada/no fosforilada (Figura 44). Además, aunque el tratamiento con insulina indujo un aumento claro en la relación entre la proteína AKT-SMUT fosforilada/no-fosforilada, esta relación fue claramente menor que la observada para la proteína AKT1-WT (Figura 44). Estos resultados indicaban que la SUMOilación de AKT1 favorece la activación de la proteína *in vivo*.

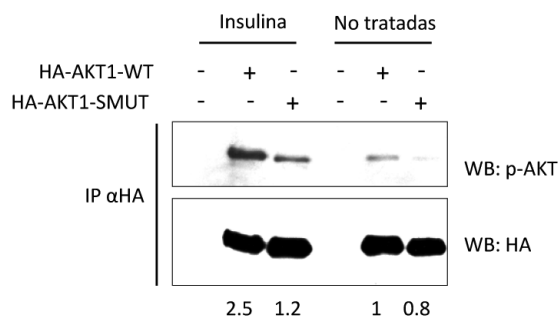


Figura 44. SUMO favorece la fosforilación de AKT1 *in vivo*. Análisis de la fosforilación de la proteína AKT1-WT o AKT1-SMUT inmunoprecipitada a partir de células MCF-7 transfectadas como se indica y tratadas o no con insulina.

Para confirmar la hipótesis de que la SUMOilación de AKT1 favorece su activación, co-transfectamos células MCF7 con AKT1-WT junto con pcDNA o Ubc9 y SUMO2 y 24 h después incubamos las células en medio sin suero durante 24 h y las tratamos con insulina o wortmanina para estimular o inhibir la vía PI3K/AKT, respectivamente. Posteriormente, analizamos mediante Western-blot la fosforilación de AKT1 así como la fosforilación del sustrato de AKT, FOXO. La relación entre fosfo-AKT/AKT que detectamos en las células transfectadas con Ubc9 y SUMO2 fue mayor que la detectada en las células transfectadas con pcDNA, independientemente del tratamiento o no con insulina (Figura 45). De acuerdo con este resultado, observamos un aumento en los niveles de FOXO fosforilado cuando co-transfectamos Ubc9 y SUMO2 (Figura 45). Estos resultados indicaban que SUMO induce la activación de AKT tanto en células no estimuladas como en células estimuladas con insulina.

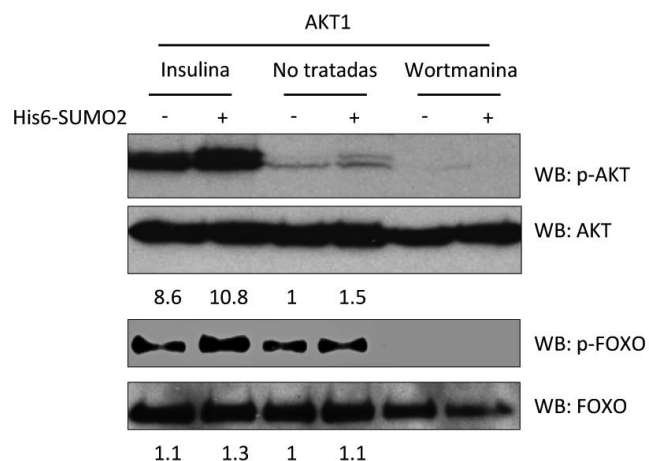


Figura 45. SUMO promueve la activación de AKT1 *in vivo*. Análisis por Western-blot de la fosforilación de AKT y su diana FOXO en células MCF7 co-transfectadas con AKT1 y pcDNA o Ubc9 y SUMO2 y tratadas con los compuestos que se indican.

La conjugación covalente con SUMO puede alterar la localización celular de la proteína SUMOilada. Para evaluar si SUMO altera la localización subcelular de AKT1, transfectamos células HeLa con AKT1-WT o AKT1-SMUT y realizamos un ensayo de inmunofluorescencia empleando anticuerpo anti-HA. No observamos diferencias entre la localización subcelular de la proteína AKT1-WT y el mutante en SUMOilación AKT1-SMUT (Figura 46A). A continuación, evaluamos la distribución subcelular de AKT

después de la transfección de SUMO. Para ello, transfectamos células HeLa con HA-AKT1-WT en presencia o ausencia de Ubc9 y SUMO2, o con el mutante en SUMOilación HA-AKT1-SMUT y realizamos un ensayo de fraccionamiento subcelular. El análisis por Western-blot con anticuerpo anti-HA reveló que tanto AKT1-WT como el mutante AKT1-SMUT se detectaban principalmente en el citoplasma celular (Figura 46B). Sin embargo, también detectamos una disminución de los niveles de AKT1 en el núcleo cuando co-transfectamos Ubc9 y SUMO2 y la aparición de una banda del tamaño de AKT1-SUMO2 únicamente en el citoplasma celular (Figura 46B), lo que indicaba que la proteína AKT1 conjugada a SUMO2 se localiza principalmente en el citoplasma.

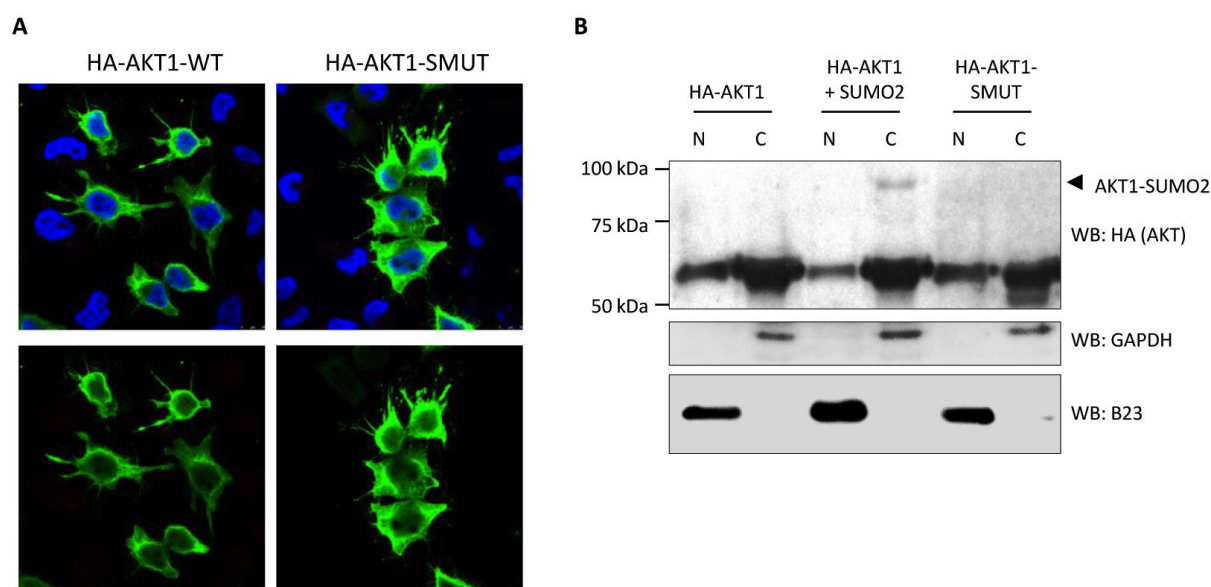


Figura 46. Localización subcelular de AKT1-WT y el mutante en SUMOilación AKT1-SMUT. A) Análisis por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-HA de la localización subcelular de AKT1-WT y AKT1-SMUT en células HeLa. B) Ensayo de fraccionamiento subcelular a partir de células HeLa transfectadas con los plásmidos que se indican.

3.4 Modulación de la SUMOilación de AKT y su activación

Con el fin de determinar el mecanismo por el cual SUMO activa AKT, evaluamos la posible fosforilación de la proteína AKT1-SUMO y su regulación. Co-transfectamos células HEK-293 con HA-AKT1-WT junto con pcDNA o Ubc9 y His-SUMO2, purificamos las proteínas fusionadas a histidina y a continuación las analizamos mediante Western-blot con anticuerpo que reconoce la proteína AKT fosforilada. Observamos que la fracción de AKT1 conjugada a SUMO2 estaba fosforilada (Figura 47A), lo que indicaba que la proteína AKT1-SUMO2 puede ser activada. En un ensayo similar utilizando la proteína AKT1 fusionada a grupo miristilo (Myr-AKT1-WT) encontramos que la SUMOilación de AKT1 no se ve afectada por la migración de la proteína hacia la membrana celular (Figura 47B). Además,

observamos que aunque los niveles de la proteína AKT1 miristilada no conjugada a SUMO y fosforilada eran más altos que los de la proteína no fusionada al grupo miristilo, los niveles de la proteína AKT1-SUMO2 fosforilada no se vieron afectados por la miristilación (Figura 47B).

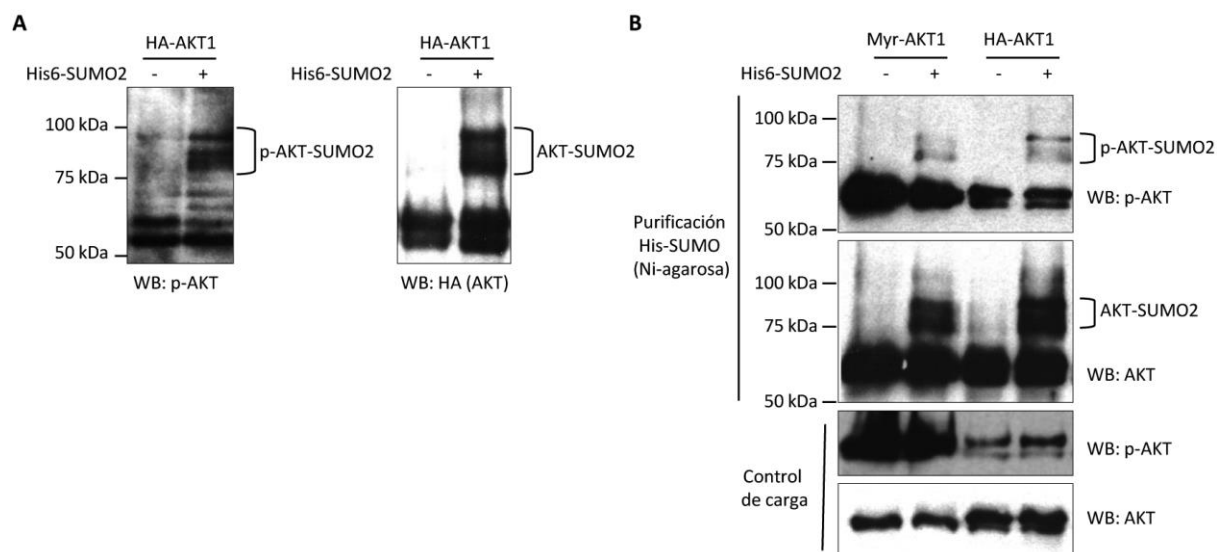


Figura 47. La proteína AKT1 SUMOilada está fosforilada y la migración de AKT1 a la membrana celular no afecta su SUMOilación. A) Análisis por Western-blot del resultado de la purificación con columnas de níquel de las proteínas fusionadas a histidina obtenidas a partir de células HEK-293 co-transfectadas con AKT1 y pcDNA o Ubc9 y His6-SUMO2 B) Análisis de la SUMOilación de la proteína AKT conjugada o no al grupo miristilo en células HEK-293 co-transfectadas con los plásmidos que se indican.

A continuación, decidimos evaluar si la fosforilación de la proteína AKT-SUMO se veía afectada por aquellos estímulos que modulan la vía de PI3K. Co-transfectamos células MCF7 con HA-AKT1-WT y pcDNA o Ubc9 y SUMO2. A las 24 h post-transfección, las células se incubaron en medio sin suero durante 24 h, se trataron con insulina o con wortmanina y los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados. Observamos que la SUMOilación de AKT no se veía afectada por aquellos estímulos que regulan la vía de PI3K (Figura 48A). Además, observamos que el tratamiento con insulina no indujo un incremento en la fosforilación de la proteína AKT1-SUMO2 y que en las células tratadas con wortmanina la proteína AKT-SUMO2 se encontraba fosforilada, incluso cuando los niveles de fosforilación de la proteína AKT no SUMOilada fueron casi indetectables (Figura 48A). Tampoco observamos ningún cambio en la SUMOilación de AKT1 cuando co-expresamos el regulador negativo de la vía PI3K/AKT, la fosfatasa PTEN (Figura 48B). En conjunto, estos resultados indicaron que la SUMOilación de AKT1

no depende de una activación o inhibición de la vía de PI3K y no se encuentra regulada por la migración de AKT a la membrana celular. Además, los resultados también indicaron que la activación de la proteína AKT-SUMO tampoco responde a los estímulos que regulan la vía de PI3K.

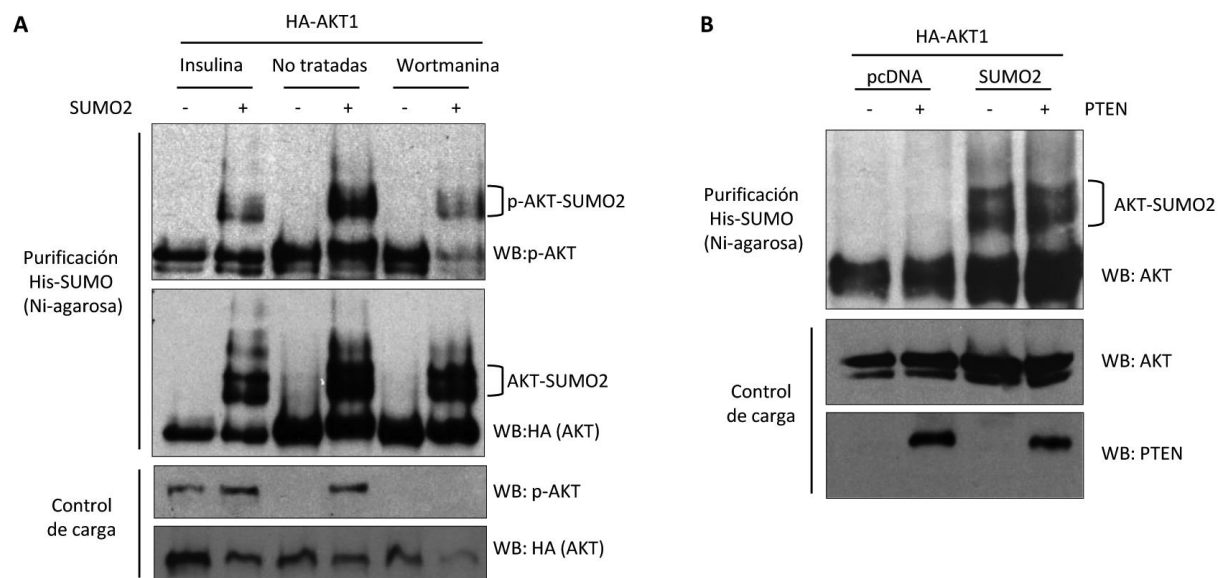


Figura 48. La SUMOilación de AKT no se ve afectada por la activación o inhibición de PI3K ni por los niveles de PTEN. A) Análisis de la SUMOilación de AKT en células MCF-7 co-transfectadas con AKT1, Ubc9 y His6-SUMO2 y tratadas con los compuestos que se indican. B) Análisis de la SUMOilación de AKT en células MCF-7 co-transfectadas con AKT1, Ubc9 y His6-SUMO2 en presencia o ausencia de PTEN.

Recientemente, se ha descrito que la pérdida de PML induce la activación de AKT y su función (Trotman et al., 2006). Los resultados obtenidos hasta ahora indican que SUMO también favorece la activación de AKT. Por lo tanto, evaluamos el efecto de PML en la SUMOilación de AKT. Co-transfectamos células HEK-293 con HA-AKT1-WT junto con pcDNA o Ubc9 y His6-SUMO2, en presencia o ausencia de pcDNA-PML, y analizamos mediante Western-blot los extractos de proteína total y las proteínas fusionadas a histidina. Dicho análisis reveló una reducción de los niveles de proteína AKT1 conjugada a SUMO2 en las células co-transfectadas con PML (Figura 49), lo que sugiere que PML regula negativamente la SUMOilación de AKT1.

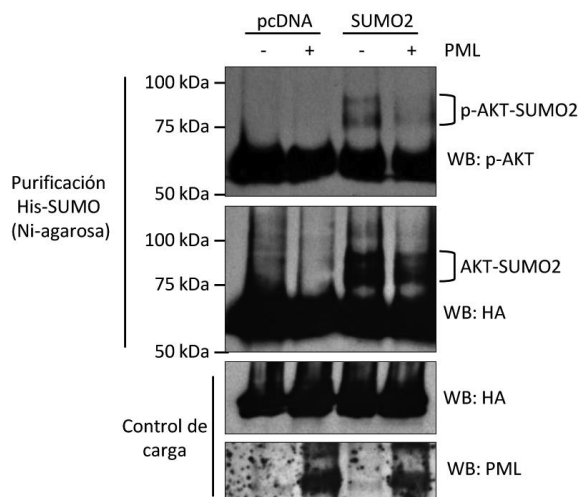


Figura 49. PML regula negativamente la SUMOilación de AKT1. Análisis de la SUMOilación de AKT en células HEK-293 co-transfectadas con AKT1, Ubc9 y His6-SUMO2 en presencia o ausencia de PML.

3.5 SUMO contribuye a la actividad anti-apoptótica y pro-tumoral de AKT

La activación de la vía de PI3K/AKT favorece la proliferación celular e inhibe la apoptosis inducida por diferentes estímulos. Como primera aproximación para analizar el posible efecto de SUMO en la activación de la vía y, por tanto, en la proliferación celular, transfectamos células PC3 con un siRNA específico frente a Ubc9 (siUbc9) o un siRNA que contenía una secuencia inespecífica (siC) como control y evaluamos el estado de fosforilación de AKT y la tasa de proliferación celular. Las células transfectadas con siUbc9 mostraron una reducción significativa en su tasa de proliferación y una disminución de la relación fosfo-AKT/AKT (Figura 50). Además, esta ventaja proliferativa desapareció tras el tratamiento de las células con wortmanina (Figura 50). Estos resultados sugirieron una correlación positiva entre la SUMOilación y la activación de AKT.

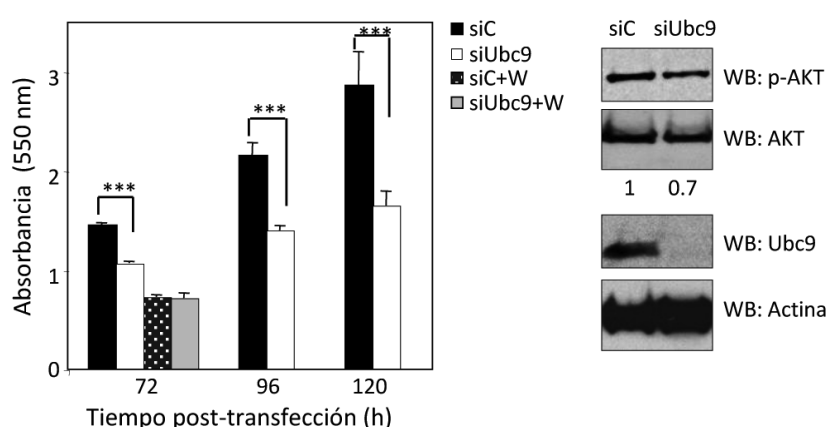


Figura 50. SUMO contribuye a la actividad proliferativa de AKT1. Ensayo de proliferación de células PC3 transfectadas con un ARN de silenciamiento específico para Ubc9 (SiUbc9) o un ARN de silenciamiento inespecífico (SiC) *** $p < 0,0005$. Los paneles de la derecha muestran los niveles de Ubc9 y AKT fosforilado presente en las células ensayadas.

Para evaluar si existe una correlación positiva entre la SUMOilación y la activación de AKT, generamos un plásmido para la expresión del mutante de SUMOilación de AKT1 fusionado al grupo miristilo (Myr-AKT1-WT) y evaluamos su SUMOilación *in vivo*. Como se esperaba, la proteína Myr-

AKT1-WT se conjugó a SUMO2; por el contrario, no detectamos bandas de SUMOilación en el mutante Myr-AKT1-SMUT (Figura 51). Además, observamos que la relación entre fosfo-AKT/AKT detectada en las células transfectadas con Myr-AKT1-WT era claramente mayor que la detectada en las células transfectadas con el mutante Myr-AKT1-SMUT (Figura 51), lo cual sugiere una vez más que SUMO contribuye a la completa activación de AKT.

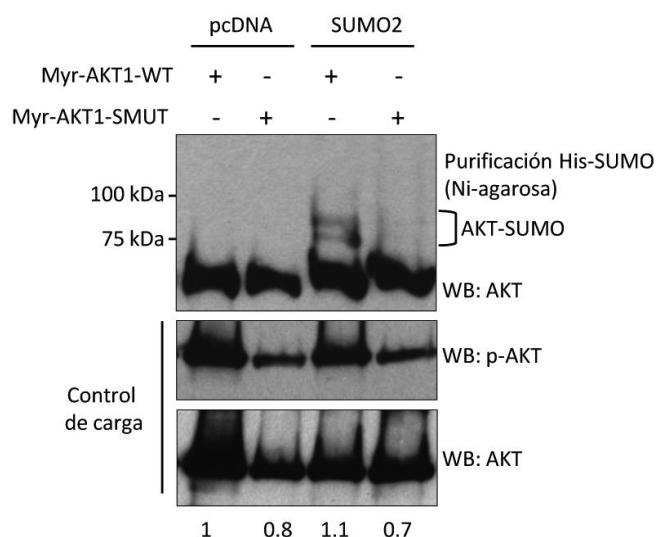


Figura 51. SUMOilación *in vivo* de AKT1-WT y el mutante en SUMOilación AKT1-SMUT fusionados al grupo miristilo. Análisis de la SUMOilación *in vivo* de Myr-AKT1-WT o Myr-AKT1-SMUT en células HEK-293 co-transfectadas con los plásmidos que se indican. En la parte inferior se muestra la relación fosfo-AKT/AKT en cada carril.

A continuación, para evaluar el efecto de la SUMOilación en la actividad anti-apoptótica de AKT, generamos células COS-7 que sobrepresaron Myr-AKT1-WT o Myr-AKT-SMUT, las incubamos en medio sin suero durante 24 h, evaluamos el estado de fosforilación de AKT y expusimos las células a radiación ultravioleta como estímulo de apoptosis. Los niveles de AKT fosforilado observados en las células que expresaron el mutante Myr-AKT-SMUT fueron claramente menores que los observados en las células que expresaron la proteína Myr-AKT1-WT (Figura 52A). Además, también detectamos diferencias significativas en la protección frente a la apoptosis inducida por la radiación ultravioleta entre las células COS-7 que expresaban Myr-AKT1-WT y Myr-AKT1-SMUT (Figura 52B), lo que indicaba que SUMO contribuye a la actividad anti-apoptótica de AKT1.

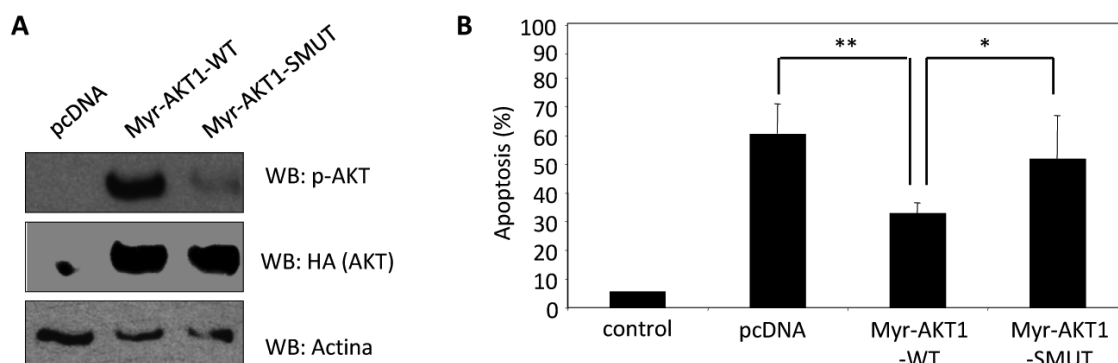


Figura 52. SUMO contribuye a la actividad anti-apoptótica de AKT1. A) Fosforilación de AKT en células COS-7 transfectadas con Myr-AKT1-WT o el mutante en SUMOilación Myr-AKT1-SMUT. B) Ensayo de inducción de apoptosis por radiación ultravioleta en células COS-7 que expresan Myr-AKT1-WT o el mutante Myr-AKT1-SMUT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Finalmente, con el fin de evaluar cómo afecta SUMO a la actividad oncogénica de AKT1, generamos células NIH-3T3 que expresan establemente Myr-AKT1-WT, Myr-AKT1-SMUT o transfectadas con un vector control y realizamos un ensayo de formación de focos. Como era de esperar (Liu et al., 2004; Sakoda et al, 2003; Sun et al., 2001), la expresión de Myr-AKT-WT indujo la formación de focos, mientras que el vector control no lo hizo (Figura 53A). Además, observamos que el número de focos que se detectó en el ensayo realizado con el mutante en SUMOilación Myr-AKT1-SMUT fue significativamente menor que el observado con las células que expresaron la proteína Myr-AKT1-WT (Figura 53A). Estos datos correlacionaban con los menores niveles de AKT fosforilado presentes en las células que expresaban el mutante Myr-AKT1-SMUT en comparación con aquellas células que expresaban la proteína silvestre (Figura 53B). Estos resultados sugerían que la SUMOilación contribuye a la actividad transformante de AKT. En conjunto, los resultados indicaron que la SUMOilación contribuye a la actividad proliferativa y anti-apoptótica de AKT.

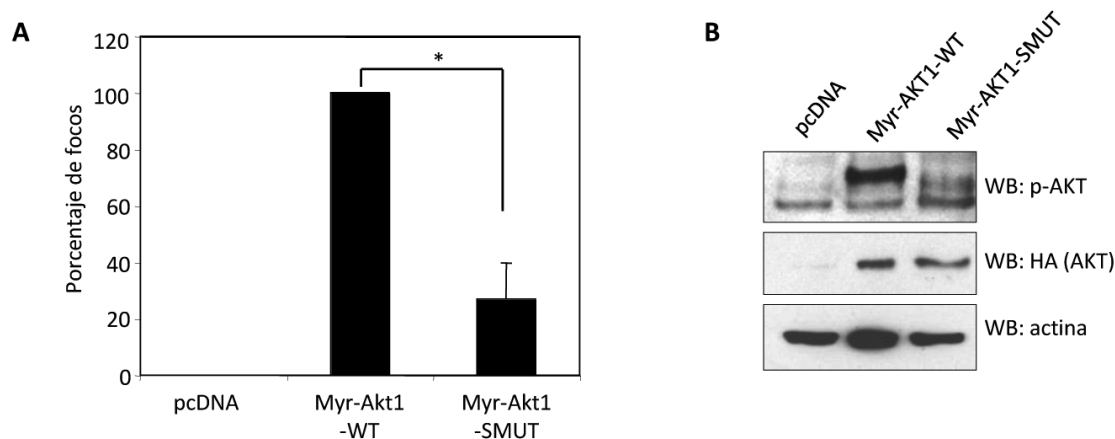


Figura 53. SUMO contribuye a la actividad oncogénica de AKT1. A) Ensayo de formación de focos en células NIH-3T3 transfectadas con Myr-AKT1-WT o el mutante en SUMOilación Myr-AKT1-SMUT. B) Análisis por Western-blot del estado de fosforilación de AKT en las células utilizadas para el ensayo de formación de focos. * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento hace dos décadas, la modificación post-traducciona por SUMO ha ido adquiriendo importancia debido a su relevante papel en la regulación de la actividad de proteínas celulares involucradas en múltiples procesos así como de proteínas expresadas por una gran variedad de patógenos. Con los resultados de este trabajo hemos ampliado la lista de componentes celulares fundamentales para el funcionamiento celular que se modifican por SUMO. Así, demostramos que PKR y los componentes de la vía molecular de PI3K/AKT, p85 β , p110 β y AKT1 son modificadas por SUMO.

En el caso de PKR, identificamos los residuos de lisina 60 y 150, situados en el dominio de unión al ARN, y el residuo K440, situado en el dominio quinasa, como los sitios donde se conjuga SUMO. La localización de las lisinas 60 y 150 en el primer y segundo motivo de unión al ARN, respectivamente, nos condujo a la hipótesis de que la conjugación de PKR a SUMO regula su unión al ARN o su dimerización y en consecuencia, su activación. De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados demostraron que SUMO aumentó la unión al ARN, la dimerización de la proteína y su activación *in vitro* e *in vivo*. Además, la reducción de la expresión de Ubc9 en las células atenuó la activación de PKR y la fosforilación de eIF2 α en respuesta a la infección por VSV lo que reforzaba dicha hipótesis. Asimismo, la mutación de los sitios de SUMOilación en PKR eliminó su capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en respuesta al ARN de doble cadena y redujo significativamente su actividad antiviral y su capacidad de inducir apoptosis en respuesta a la infección viral. En conjunto, nuestros resultados demostraron, por tanto, que SUMO favorece la actividad de PKR.

Existen diferentes modelos para explicar la activación de PKR por ARN de doble cadena (Cole, 2007). Algunos modelos sugieren que la unión al ARN promueve la dimerización de PKR al inducir un cambio conformacional de la proteína. Otros proponen que el ARN aproxima a múltiples monómeros de PKR lo que promueve su dimerización. En cualquier circunstancia, la dimerización de PKR promueve su autofosforilación en el residuo de treonina 446, lo cual es necesario para la interacción con eIF2 α (Dey et al., 2005). Sin embargo, la fosforilación de PKR en residuos de tirosina localizados en el dominio de unión al ARN y en el dominio quinasa también es necesaria para la óptima fosforilación de la treonina 446 y en consecuencia para una mayor eficiencia en la unión al ARN, dimerización y activación de PKR (Su et al., 2006). En base a esta información, SUMO podría contribuir a la completa activación de PKR al favorecer la interacción de la proteína con el ARN o su dimerización,

promoviendo así su autofosforilación (Figura 54). Además de favorecer la fosforilación de PKR, SUMO también podría estar modulando otras modificaciones post-traduccionales de la quinasa. Así, la cercanía de dos de las lisinas susceptibles de conjugar SUMO en PKR (K60 y K150) a los residuos implicados en la conjugación a ISG15 (K69 y K159) y el hecho de que un mutante de PKR en los residuos K60, K61 y K150 se modifica más eficientemente por ISG15 que la proteína silvestre (Okumura et al., 2013) sugieren que ISG15 y SUMO podrían competir por la modificación de PKR.

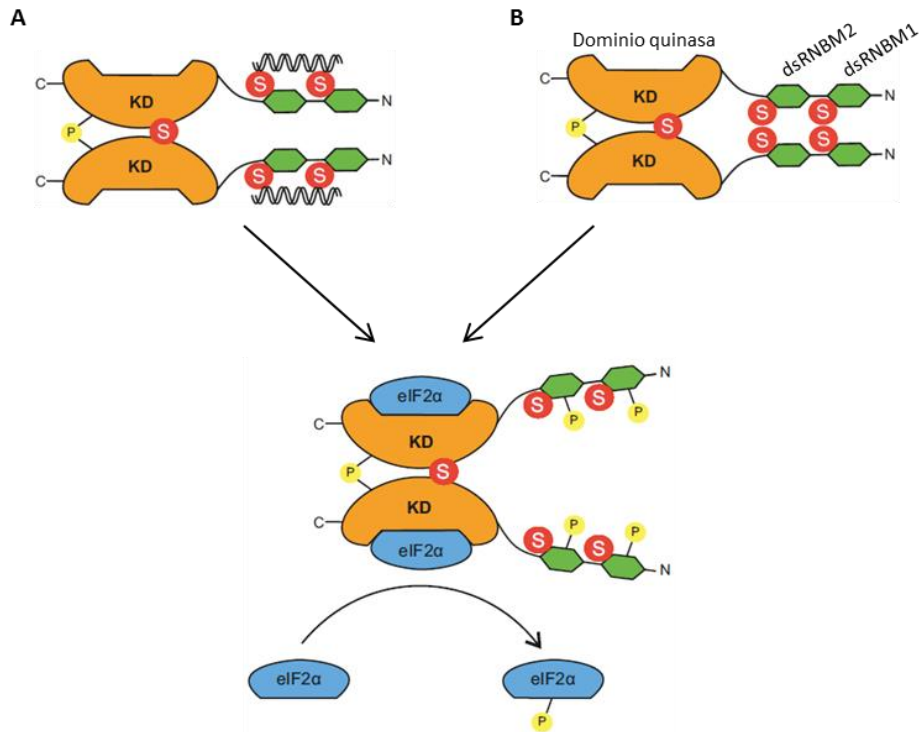


Figura 54. Modelo de la activación de PKR por SUMO. La conjugación de SUMO a PKR podría favorecer su interacción con el ARN de doble cadena (A) y/o su dimerización (B) promoviendo así su autofosforilación y activación.

PKR tiene un papel importante en la respuesta antiviral de la célula, por lo que muchos virus han desarrollado mecanismos para inhibir PKR (Dauber and Wolff, 2009). Nuestros resultados demostraron que la infección con VSV promueve la SUMOilación de PKR y que la SUMOilación de PKR contribuye a la defensa antiviral de la célula, por lo que es posible especular que el reclutamiento de SUMO a las factorías virales descrito para algunos virus (Campagna et al., 2013) o la modulación de la maquinaria de SUMOilación por algunos virus (Everett et al., 2013) podrían servir como mecanismos virales para contrarrestar la actividad antiviral de PKR.

Además de inactivar PKR muchos virus necesitan activar la vía de PI3K/AKT para poder replicar eficientemente (Diehl and Schaal, 2013; Dunn and Connor, 2012). En este trabajo encontramos que tres componentes de la vía PI3K/AKT se regulan por SUMO. En el caso de la subunidad reguladora p85 β la conjugación a SUMO tiene lugar en los residuos de lisina 535 y 592, localizados en el dominio iSH2. Dicho dominio es necesario tanto para la regulación de la subunidad catalítica de PI3K como para su modulación por agentes virales como la ejercida a través de la proteína NS1 del virus influenza A (Hale et al., 2008; Li et al., 2008). Nuestros resultados demostraron que la mutación de los residuos de SUMOilación de p85 β favorece su actividad oncogénica y la migración celular. De esta forma, el aumento de la señalización de PI3K y la mayor actividad transformante y migratoria de las células que expresan la proteína mutante en dichos residuos podría deberse a un menor control de la actividad de la subunidad catalítica, similar a la observada para aquellos mutantes de p85 que carecen del extremo C-terminal (Hoffman and Jücker et al., 2012; Jücker et al., 2002).

Además, en este trabajo demostramos que existe una correlación inversa entre la SUMOilación de p85 β y la fosforilación de p85 β en residuos de tirosina. La fosforilación de tirosinas en p85 β correlaciona con la activación de PI3K (Cuevas et al., 2001) y con la tasa de proliferación de células Jurkat (Martinez-Lorenzo et al., 2000). Una interrelación entre SUMOilación y fosforilación se ha observado en un gran número de proteínas celulares (Wilkinson and Henley, 2010). En base a todos estos datos, nuestros resultados sugieren que SUMO modula la actividad de p85 β a través de la regulación de su fosforilación. Así, la mutación de los residuos que se conjugan a SUMO en el dominio iSH2 de p85 β podría exponer los residuos de tirosina de p85 β para que sean fosforilados.

Aunque la proteína celular SUMO y la proteína del virus Influenza A NS1 interactúan con el dominio iSH2 de p85 β , nuestros resultados indican que la conjugación de SUMO a p85 β no afecta a la interacción entre p85 β y NS1. Sin embargo, sí observamos que NS1 reduce la SUMOilación de p85 β . Dado que una reducción en la SUMOilación de p85 β favorece la activación de la vía PI3K/AKT, esta regulación de la SUMOilación de p85 β por NS1 podría contribuir a la activación de PI3K/AKT por el virus influenza A. De acuerdo con esta hipótesis, NS1 favorece la interacción de p85 β con las quinasas Src e induce la fosforilación de la subunidad reguladora. En base a estos resultados proponemos un modelo para explicar la activación de PI3K/AKT por el virus Influenza A: la proteína NS1 del virus interactúa con el dominio iSH2 de p85 β desplazando a SUMO, el desplazamiento de SUMO permite el acceso a quinasas lo que favorece la fosforilación de p85 β en residuos de tirosina y la consiguiente activación de la vía (Figura 55). Por el contrario, la conjugación de SUMO a p85 β

podría impedir que la quinasa responsable de fosforilar los residuos de tirosina en p85 β tenga acceso a ellos.

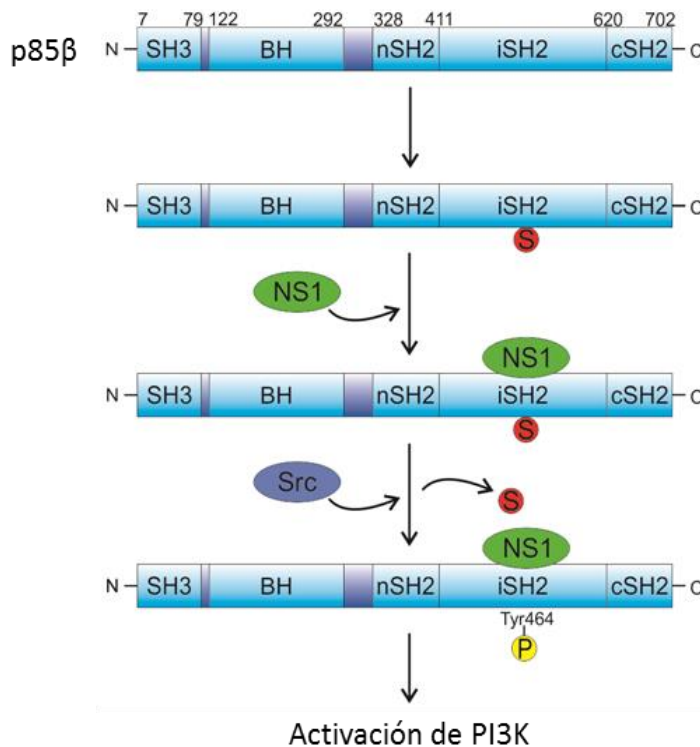


Figura 55. Modelo propuesto para la activación de PI3K por el virus Influenza A. La unión de la proteína viral NS1 al dominio iSH2 de p85 β desplaza a SUMO (S) y permite el acceso a las quinasas Src para que fosforilen p85 β en residuos de tirosina, lo que conduce a la activación de la PI3K.

La subunidad p85 β no es el único componente de la vía PI3K/AKT que se regula por SUMO. PTEN, el regulador negativo de la vía se modifica y se regula por SUMO (González-Santamaría et al., 2012; Huang et al., 2012) y nuestros resultados demuestran que la subunidad catalítica p110 β también se regula a través de esta modificación post-traducciona. Encontramos que el residuo de lisina 952 de p110 β , localizado en el dominio quinasa, es un aceptor de SUMO. La localización del sitio de SUMOilación de p110 β en el dominio quinasa sugiere que SUMO podría tener un importante papel en la regulación de la actividad de p110 β . De hecho, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la mutación del sitio de SUMOilación en p110 β eliminó su capacidad de activar la vía de PI3K/AKT y su capacidad de transformar las células cuando se sobreexpresa. Este mecanismo de regulación podría funcionar para otras subunidades catalíticas de la PI3K ya que p110 α conserva la secuencia consenso de SUMOilación presente en p110 β . Sin embargo, habrá que evaluar cómo afecta la conjugación de SUMO a las funciones de p110 α ya que la regulación de ambas subunidades presenta diferencias. Así, mientras que la subunidad catalítica p110 β es oncogénica cuando se sobreexpresa en su forma silvestre (Kang et al, 2006), sólo ciertas formas mutadas de p110 α son

oncogénicas cuando se sobreexpresan. La subunidad p110 β posee un “loop” de activación (localizado entre los residuos 930-955) responsable de la especificidad de sustrato (Bondeva et al., 1998) que interacciona con el dominio iSH2 de la subunidad reguladora p85 (Zhang et al., 2011). Se especula que esta interacción podría restringir la flexibilidad del “loop” de activación y, por tanto, contribuir a la inhibición de la actividad catalítica de p110 β (Zhang et al., 2011). Dado que la conjugación de SUMO a p110 β tiene lugar en el residuo K952, localizado en dicho “loop” de activación, podríamos especular que la conjugación de SUMO podría interrumpir dicha interacción inhibitoria y liberar el “loop” de activación. Es necesario identificar las enzimas que regulan específicamente la SUMOilación de los distintos componentes de la PI3K y evaluar el estado de SUMOilación de los mismos en los distintos cánceres para conocer la relevancia de este proceso en cada situación. Es importante destacar que en ciertos tipos de cánceres como los de próstata deficientes en PTEN o de seno se ha descrito una desregulación de los niveles de SUMO (Bawa-Khalife and Yeh, 2010).

La quinasa AKT1 es el efector más estudiado relacionado con la activación y señalización por la PI3K. Nuestros resultados indican que AKT1 también se modifica por SUMO. Además, demostramos que esta modificación se ve estimulada en respuesta al estrés, lo que sugiere que la SUMOilación de AKT podría formar parte de la respuesta de la célula frente a determinados estímulos. Demostramos que el residuo de lisina 64 en el dominio PH, involucrado en la interacción de AKT con otras proteínas y/o con lípidos y los residuos K182 y K189 en el dominio quinasa son sitios aceptores de SUMO en AKT1. Los residuos K64 y K189 están presentes en las tres isoformas de AKT mientras que el residuo K182 está conservado en AKT1 y AKT3. Esto sugiere que SUMO podría también regular las otras isoformas de la proteína.

A diferencia de lo que ocurre con p85 β , nuestros resultados indican que la SUMOilación de AKT favorece la activación de la vía PI3K/AKT. Además, al igual que ocurre con p85 β , esta regulación está mediada por la inducción de la fosforilación de la proteína. Sin embargo, la relación entre fosforilación y SUMOilación no ocurre en el mismo sentido: mientras que SUMO parece dificultar la fosforilación en tirosina de p85 β , estimula la fosforilación de AKT1. De entre los mecanismos moleculares que podrían favorecer la fosforilación y activación de AKT está la pérdida de la interacción entre el dominio PH y el dominio quinasa (Warfel et al., 2011) o la dimerización de la proteína (Laine et al., 2000). La unión de SUMO a los sustratos puede inducir un cambio conformacional (Steinacher and Schar, 2005) y con frecuencia favorece la interacción entre proteínas o la formación de complejos multiproteicos (Johnson, 2004). Por lo tanto, es posible especular que la unión de SUMO a AKT puede alterar la conformación de la proteína disminuyendo la interacción

entre el dominio PH y el quinasa, lo cual induciría su activación. SUMO también podría servir como plataforma para el reclutamiento de adaptadores que facilitan la activación de AKT o podría mediar la formación de complejos proteicos que inducen la activación de AKT. Nuestros resultados también indican que PML regula negativamente la SUMOilación de AKT, lo cual se podría relacionar con el aumento en la activación de AKT asociada a la pérdida de PML (Trotman et al., 2006).

La reducción de los niveles de la SUMO ligasa Ubc9 en células PC3 indujo una disminución en la tasa de proliferación y una reducción en los niveles de AKT activado de lo que deducimos que SUMO debe estar proporcionando señales de supervivencia dentro de las células en ausencia de estímulos externos para la activación de AKT. Sería, por tanto, interesante identificar cuáles de los distintos componentes de la vía PI3K/AKT se encuentran afectados por esta disminución en los niveles de Ubc9 en esta línea celular. Por otro lado, nuestros resultado muestran que la fosforilación de la proteína AKT SUMOilada no responde al tratamiento con el inhibidor de la PI3K wortmanina. En base a estos resultados, es posible que la modificación de AKT por SUMO pudiera limitar la eficacia de los inhibidores de la vía PI3K/AKT y pueda tener, por tanto, consecuencias en las estrategias terapéuticas contra el cáncer.

Estudios recientes sugieren que existen varios puntos de interconexión entre la vía del interferón y la vía de PI3K/AKT (Kaur et al., 2008a,b; Kazemi et al., 2007; von Holzen et al., 2007). En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la modificación por SUMO juega un importante papel en la regulación de componentes de estas dos vías. La importancia de SUMO en este proceso se manifiesta por el hecho de que los virus han desarrollado mecanismos para modular la SUMOilación de algunos de sus componentes.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La proteína PKR se SUMOila *in vitro* e *in vivo* en los residuos de lisina K60, K150 y K440.
2. SUMO favorece la unión de PKR al ARN de doble cadena, su dimerización, activación y la inhibición de la síntesis de proteínas en respuesta al ARN de doble cadena.
3. La infección con VSV induce la SUMOilación de PKR, modificación que favorece la actividad antiviral de la quinasa.
4. La subunidad reguladora de la PI3K p85 β se SUMOila *in vitro* e *in vivo* en los residuos de lisina K535 y K592. La mutación de estos residuos en p85 β favorece su actividad oncogénica y promueve la migración celular.
5. SUMO regula negativamente la fosforilación en tirosinas de p85 β , parámetro relacionado con la activación de la vía PI3K
6. El virus Influenza A modula negativamente la SUMOilación de p85 β , promueve la interacción de p85 β con las quinasas Src e induce la fosforilación en tirosinas de p85 β .
7. La proteína p110 β se SUMOila *in vitro* e *in vivo* en el residuo de lisina K952.
8. La mutación del residuo de SUMOilación de p110 β elimina la actividad transformante de la proteína silvestre.
9. La proteína AKT1 se SUMOila *in vitro* e *in vivo* en los residuos de lisina K64, K182 y K189. Dicha modificación es inducida por el estrés térmico e inhibida por PML.
10. SUMO induce la activación de AKT1 contribuyendo a su actividad anti-apoptótica, de proliferación celular y pro-tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, R. R. Gaffney, C. B. Reese, P. Cohen (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol **7**(4): 261-269.

Anderson, E., W. S. Pierre-Louis, C. J. Wong, J. W. Lary, J. L. Cole (2011). Heparin activates PKR by inducing dimerization. J Mol Biol **413**(5): 973-984.

Andreou, A. M. and N. Tavernarakis (2009). SUMOylation and cell signalling. Biotechnol J **4**(12): 1740-1752.

Astoul, E., S. Watton, D. Cantrell (1999). The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement. J Cell Biol **145**(7): 1511-1520.

Bagchi, P., D. Dutta, S. Chattopadhyay, A. Mukherjee, U. C. Halder, S. Sarkar, N. Kobayashi, S. Komoto, K. Taniguchi, M. Chawla-Sarkar (2010). Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. J Virol **84**(13): 6834-6845.

Bagchi, P., S. Nandi, M. K. Nayak, M. Chawla-Sarkar (2013). Molecular mechanism behind rotavirus NSP1-mediated PI3 kinase activation: interaction between NSP1 and the p85 subunit of PI3 kinase. J Virol **87**(4): 2358-2362.

Balachandran, S., P. C. Roberts, T. Kipperman, K. N. Bhalla, R. W. Compans, D. R. Archer, G. N. Barber (2000). Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. J Virol **74**(3): 1513-1523.

Bawa-Khalfe, T. and E. T. Yeh (2010). SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. Genes Cancer **1**(7): 748-752.

Bennett, R. L., Y. Pan, J. Christian, T. Hui, W. S. Jr. May (2012). The RAX/PACT-PKR stress response pathway promotes p53 sumoylation and activation, leading to G₁ arrest. Cell Cycle **11**(2): 407-417.

Bettermann, K., M. Benesch, S. Weis, J. Haybaeck (2012). SUMOylation in carcinogenesis. Cancer Lett **316**(2): 113-125.

Blalock, W. L., A. Bavelloni, M. Piazzini, I. Faenza, L. Cocco (2010). A role for PKR in hematologic malignancies. J Cell Physiol **223**(3): 572-591.

Blalock, W. L., C. Grimaldi, F. Fala, M. Follo, S. Horn, J. Basecke, G. Martinelli, L. Cocco, A. M. Martelli (2009). PKR activity is required for acute leukemic cell maintenance and growth: a role for PKR-mediated phosphatase activity to regulate GSK-3 phosphorylation. J Cell Physiol **221**(1): 232-241.

- Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker, M. P. Wymann (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. Science **282**(5387): 293-296.
- Bose, A., F. Mouton-Liger, C. Paquet, P. Mazot, M. Vigny, F. Gray, J. Hugon (2011). Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. Brain Pathol **21**(2): 189-200.
- Burke, J. E. and R. L. Williams (2015). Synergy in activating class I PI3Ks. Trends Biochem Sci **40**(2): 88-100.
- Cain, R. J. and A. J. Ridley (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. Biol Cell **101**(1): 13-29.
- Calleja, V., D. Alcor, M. Laguerre, J. Park, B. Vojnovic, B. A. Hemmings, J. Downward, P. J. Parker, B. Larijani (2007). Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. PLoS Biol **5**(4): e95.
- Campagna, M., L. Marcos-Villar, F. Arnoldi, C. F. de la Cruz-Herrera, P. Gallego, J. González-Santamaría, D. González, F. Lopitz-Otsoa, M. S. Rodriguez, O. R. Burrone, C. Rivas (2013). Rotavirus viroplasm proteins interact with the cellular SUMOylation system: implications for viroplasm-like structure formation. J Virol **87**(2): 807-817.
- Cariaga-Martínez, A. E., I. Cortés, E. García, V. Pérez-García, M. J. Pajares, M. A. Idoate, J. Redondo-Muñoz, I. M. Antón, A. C. Carrera (2014). Phosphoinositide 3-kinase p85beta regulates invadopodium formation. Biol Open **3**(10): 924-936.
- Carpten, J. D., A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, J. E. Thomas (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. Nature **448**(7152): 439-444.
- Cheung, L. W., B. T. Hennessy, J. Li, S. Yu, A. P. Myers, B. Djordjevic, Y. Lu, K. Stemke-Hale, M. D. Dyer, F. Zhang, Z. Ju, L. C. Cantley, S. E. Scherer, H. Liang, K. H. Lu, R. R. Broaddus, G. B. Mills (2011). High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. Cancer Discov **1**(2): 170-185.
- Cheung, M. and J. R. Testa (2013). Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy. Curr Cancer Drug Targets **13**(3): 234-244.
- Cohen MM Jr. (2013). The AKT genes and their roles in various disorders. Am J Med Genet A **161A**(12): 2931-7.
- Cole, J. L. (2007). Activation of PKR: an open and shut case? Trends Biochem Sci **32**(2): 57-62.

- Cortés, I., J. Sánchez-Ruiz, S. Zuluaga, V. Calvanese, M. Marqués, C. Hernández, T. Rivera, L. Kremer, A. González-García, A. C. Carrera. (2012). p85 β phosphoinositide 3-kinase subunit regulates tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A **109**(28): 11318-11323.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B. A. Hemmings (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature **378**(6559): 785-789.
- Cuddihy, A.R., A. H. Wong, N. W. Tam, S. Li, A. E. Koromilas (1999). The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. Oncogene **18**(17): 2690-2702.
- Cuevas, B. D., Y. Lu, M. Mao, J. Zhang, R. LaPushin, K. Siminovitch, G. B. Mills (2001). Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem **276**(29): 27455-27461.
- Dar, A. C., T. E. Dever, F. Sicheri (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR. Cell **122**(6): 887-900.
- Datta, S. R., A. M. Ranger, M. Z. Lin, J. F. Sturgill, Y. C. Ma, C. W. Cowan, P. Dikkes, S. J. Korsmeyer, M. E. Greenberg. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. Dev Cell **3**(5): 631-643.
- Dauber, B. and T. Wolff (2009). Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures. Viruses **1**(3): 523-544.
- Dawson, C. W., G. Tramontanis, A. G. Eliopoulos, L. S. Young (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. J Biol Chem **278**(6): 3694-3704.
- Denuc, A. and G. Marfany (2010). SUMO and ubiquitin paths converge. Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 34-39.
- Dey, M., C. Cao, A. C. Dar, T. Tamura, K. Ozato, F. Sicheri, T. E. Dever (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. Cell **122**(6): 901-913.
- Diehl, N. and H. Schaal (2013). Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. Viruses **5**(12): 3192-3212.
- Donnelly, N., A. M. Gorman, S. Gupta, A. Samali (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. Cell Mol Life Sci **70**(19): 3493-3511.
- Droescher, M., V. K. Chaugule, A. Pichler (2013). SUMO rules: regulatory concepts and their implication in neurologic functions. Neuromolecular Med **15**(4): 639-660.

- Du, K. and M. Montminy (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J Biol Chem **273**(49): 32377-32379.
- Dunn, E. F. and J. H. Connor (2012). HijAkt: The PI3K/Akt pathway in virus replication and pathogenesis. Prog Mol Biol Transl Sci **106**: 223-250.
- Durbin, R. K., S. E. Mertz, A. E. Koromilas, J. E. Durbin (2002). PKR protection against intranasal vesicular stomatitis virus infection is mouse strain dependent. Viral Immunol **15**(1): 41-51.
- Eckermann, K (2013). SUMO and Parkinson's disease. Neuromolecular Med **15**(4): 737-759.
- Ehrhardt, C., T. Wolff, S. Pleschka, O. Planz, W. Beermann, J. G. Bode, M. Schmolke, S. Ludwig (2007). Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. J Virol **81**(7): 3058-3067.
- Everett, R. D., C. Boutell C, B. G. Hale (2013). Interplay between viruses and host sumoylation pathways. Nat Rev Microbiol **11**(6): 400-411.
- Feng, J., J. Park, P. Cron, D. Hess, B. A. Hemmings (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. J Biol Chem **279**(39): 41189-41196.
- Feng, J., R. Tamaskovic, Z. Yang, D. P. Brazil, A. Merlo, D. Hess, B. A. Hemmings (2004). Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. J Biol Chem **279**(34): 35510-35517.
- Flotho, A. and F. Melchior (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. Annu Rev Biochem **82**: 357-385.
- Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 947-956.
- García, M. A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas, M. Esteban (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 1032-1060.
- García-Sastre, A. and C. A. Biron (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. Science **312**(5775): 879-882.
- Gil, J., J. Alcamí, M. Esteban (2000). Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. Oncogene **19**(11): 1369-1378.
- Golebiowski, F., I. Matic, M. H. Tatham, C. Cole, Y. Yin, A. Nakamura, J. Cox, G. J. Barton, M. Mann, R. T. Hay (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. Sci Signal **2**(72): ra24.

- González-Santamaría, J., M. Campagna, A. Ortega-Molina, L. Marcos-Villar, C. F. de la Cruz-Herrera, D. González, P. Gallego, F. Lopitz-Otsoa, M. Esteban, M. S. Rodríguez, M. Serrano, C. Rivas (2012). Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO. Cell Death Dis **3**: e393.
- Green, S. R. and M. B. Mathews (1992). Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI. Genes Dev **6**(12B): 2478-2490.
- Gu, B. and W. G. Zhu (2012). Surf the post-translational modification network of p53 regulation. Int J Biol Sci **8**(5): 672-684.
- Hale, B. G., D. Jackson, Y. H. Chen, R. A. Lamb, R. E. Randall (2006). Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14194-14199.
- Hale, B. G., I. H. Batty, C. P. Downes, R. E. Randall (2008). Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation. J Biol Chem **283**(3): 1372-1380.
- Handy, I. and R. C. Patel (2013). STAT1 requirement for PKR-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells in response to heparin. Gene **524**(1): 15-21.
- Hers, I., E. E. Vincent, J. M. Tavaré (2011). Akt signalling in health and disease. Cell Signal **23**(10): 1515-1527.
- Hofmann, B. T. and M. Jücker (2012). Activation of PI3K/Akt signaling by n-terminal SH2 domain mutants of the p85 α regulatory subunit of PI3K is enhanced by deletion of its c-terminal SH2 domain. Cell Signal **24**(10): 1950-1954.
- Hong, Y., R. Rogers, M. J. Matunis, C. N. Mayhew, M. L. Goodson, O. K. Park-Sarge, K. D. Sarge (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. J Biol Chem **276**(43): 40263-40267.
- Hsieh, Y. L., H. Y. Kuo, C. C. Chang, M. T. Naik, P. H. Liao, C. C. Ho, T. C. Huang, J. C. Jeng, P. H. Hsu, M. D. Tsai, T. H. Huang, H. M. Shih (2013). Ubc9 acetylation modulates distinct SUMO target modification and hypoxia response. EMBO J **32**(6): 791-804.
- Huang, J., J. Yan, J. Zhang, S. Zhu, Y. Wang, T. Shi, C. Zhu, C. Chen, X. Liu, J. Cheng, T. Mustelin, G. S. Feng, G. Chen, J. Yu (2012). SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. Nat Commun **3**: 911.
- Ill-Raga, G., E. Palomer, M. A. Wozniak, E. Ramos-Fernández, M. Bosch-Morató, M. Tajés, F. X. Guix, J. J. Galán, J. Clarimón, C. Antúnez, L. M. Real, M. Boada, R. F. Itzhaki, C. Fandos, F. J. Muñoz (2011). Activation of PKR causes amyloid β -peptide accumulation via de-repression of BACE1 expression. PLoS One **6**(6): e21456.

- Jabbour, E., O. G. Ottmann, M. Deininger, A. Hochhaus (2014). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. Haematologica **99**(1): 7-18.
- Jaiswal, B. S., V. Janakiraman, N. M. Kljavin, S. Chaudhuri, H. M. Stern, W. Wang, Z. Kan, H. A. Dbouk, B. A. Peters, P. Waring, T. Dela Vega, D. M. Kenski, K. K. Bowman, M. Lorenzo, H. Li, J. Wu, Z. Modrusan, J. Stinson, M. Eby, P. Yue, J. S. Kaminker, F. J. de Sauvage, J. M. Backer, S. Seshagiri (2009). Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. Cancer Cell **16**(6): 463-474.
- Jean, S. and A. A. Kiger (2014). Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. J Cell Sci **127**(Pt 5): 923-928.
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. Annu Rev Biochem **73**: 355-382.
- Jücker, M., K. Südel, S. Horn, M. Sickel, W. Wegner, W. Fiedler, R. A. Feldman (2002). Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). Leukemia **16**(5): 894-901.
- Kang, S., A. Denley, B. Vanhaesebroeck, P. K. Vogt (2006). Oncogenic transformation induced by the p110beta, -gamma, and -delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1289-1294.
- Kaur, S., A. Sassano, A. M. Joseph, B. Majchrzak-Kita, E. A. Eklund, A. Verma, S. M. Brachmann, E. N. Fish, L. C. Platanias (2008b). Dual regulatory roles of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. J Immunol **181**(10): 7316-7323.
- Kaur, S., A. Sassano, B. Dolniak, S. Joshi, B. Majchrzak-Kita, D. P. Baker, N. Hay, E. N. Fish, L. C. Platanias (2008a). Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(12): 4808-4813.
- Kazemi, S., Z. Mounir, D. Baltzis, J. F. Raven, S. Wang, J. L. Krishnamoorthy, O. Pluquet, J. Pelletier, A. E. Koromilas (2007). A novel function of eIF2alpha kinases as inducers of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathway. Mol Biol Cell **18**(9): 3635-3644.
- Kloet, D. E. and B. M. Burgering (2011). The PKB/FOXO switch in aging and cancer. Biochim Biophys Acta **1813**(11): 1926-1937.
- Koromilas, A. E., S. Roy, G. N. Barber, M. G. Katze, N. Sonenberg (1992). Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. Science **257**(5077): 1685-1689.
- Kotamarthi, H. C., R. Sharma, S. R. Koti Ainarapu (2013). Single-molecule studies on PolySUMO proteins reveal their mechanical flexibility. Biophys J **104**(10): 2273-2281.
- Kubota, T., M. Matsuoka, T. H. Chang, P. Taylor, T. Sasaki, M. Tashiro, A. Kato, K. Ozato (2008). Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. J Biol Chem **283**(37): 25660-25670.

- Kumar, A. and R. Purohit (2013). Cancer associated E17K mutation causes rapid conformational drift in AKT1 pleckstrin homology (PH) domain. PLoS One **8**(5): e64364.
- Laine, J., G. Künstle, T. Obata, M. Sha, M. Noguchi (2000). The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator. Mol Cell **6**(2): 395-407.
- Lan, A. and J. Du (2015). Potential role of Akt signaling in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant **30**(3): 385-394.
- Lechward, K., O. S. Awotunde, W. Swiatek, G. Muszyńska (2001). Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. Acta Biochim Pol **48**(4): 921-933.
- Lee, L., E. Dale, A. Staniszewski, H. Zhang, F. Saeed, M. Sakurai, M. Fa', I. Orozco, F. Michelassi, N. Akpan, H. Lehrer, O. Arancio (2014). Regulation of synaptic plasticity and cognition by SUMO in normal physiology and Alzheimer's disease. Sci Rep **4**: 7190.
- Lee, S. B. and M. Esteban (1994). The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. Virology **199**(2): 491-496.
- Lee, S. B., R. Bablanian, M. Esteban (1996). Regulated expression of the interferon-induced protein kinase p68 (PKR) by vaccinia virus recombinants inhibits the replication of vesicular stomatitis virus but not that of poliovirus. J Interferon Cytokine Res **16**(12): 1073-1078.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 99-111.
- Li, S., G. A. Peters, K. Ding, X. Zhang, J. Qin, G. C. Sen (2006). Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 10005-10010.
- Li, Y., D. H. Anderson, Q. Liu, Y. Zhou (2008). Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. J Biol Chem **283**(34): 23397-23409.
- Liu, X., J. Powlas, Y. Shi, A. X. Oleksijew, A. R. Shoemaker, R. De Jong, T. Oltersdorf, V. L. Giranda, Y. Luo (2004). Rapamycin inhibits Akt-mediated oncogenic transformation and tumor growth. Anticancer Res **24**(5A): 2697-2704.
- Maddika, S., S. R. Ande, S. Panigrahi, T. Paranjothy, K. Weglarczyk, A. Zuse, M. Eshraghi, K. D. Manda, E. Wiechec, M. Los (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. Drug Resist Updat **10**(1-2): 13-29.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell **129**(7): 1261-1274.

- Marchal, J. A., G. J. Lopez, M. Peran, A. Comino, J. R. Delgado, J. A. García-García, V. Conde, F. M. Aranda, C. Rivas, M. Esteban, M. A. Garcia (2014). The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. *FASEB J* **28**(5): 1965-1974.
- Marcos-Villar, L., J. V. Pérez-Girón, J. M. Vilas, A. Soto, C. F. de la Cruz-Herrera, V. Lang, M. Collado, A. Vidal, M. S. Rodríguez, C. Muñoz-Fontela, C. Rivas (2013). SUMOylation of p53 mediates interferon activities. *Cell Cycle* **12**(17): 2809-2816.
- Martelli, A. M., G. Tabellini, D. Bressanin, A. Ognibene, K. Goto, L. Cocco, C. Evangelisti (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta* **1823**(12): 2168-2178.
- Martínez-Lorenzo, M. J., A. Anel, I. Monleón, J. J. Sierra, A. Piñeiro, J. Naval, M. A. Alava (2000). Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from the Jurkat leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* **32**(4): 435-445.
- McCormack, S. J., L. G. Ortega, J. P. Doohan, C. E. Samuel (1994). Mechanism of interferon action motif I of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase (PKR) is sufficient to mediate RNA-binding activity. *Virology* **198**(1): 92-99.
- Meier, R., D. R. Alessi, P. Cron, M. Andjelković, B. A. Hemmings (1997). Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem* **272**(48): 30491-30497.
- Momand, J., H. H. Wu, G. Dasgupta (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**(1-2): 15-29.
- Mouton-Liger, F., C. Paquet, J. Dumurgier, C. Bouras, L. Pradier, F. Gray, J. Hugon (2012). Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway. *Biochim Biophys Acta* **1822**(6): 885-896.
- Müller, S., C. Hoege, G. Pyrowolakis, S. Jentsch (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-210.
- Nallagatla, S. R., R. Toroney, P. C. Bevilacqua (2011). Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR. *Curr Opin Struct Biol* **21**(1): 119-127.
- Okumura, F., A. J. Okumura, K. Uematsu, S. Hatakeyama, D. E. Zhang, T. Kamura (2013). Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *J Biol Chem* **288**(4): 2839-2847.
- Pang, Q., T. A. Christianson, W. Keeble, T. Koretsky, G. C. Bagby (2002). The anti-apoptotic function of Hsp70 in the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase-mediated death signaling pathway requires the Fanconi anemia protein, FANCC. *J Biol Chem* **277**(51): 49638-49643.

- Pang, Q., W. Keeble, J. Diaz, T. A. Christianson, S. Fagerlie, K. Rathbun, G. R. Faulkner, M. O'Dwyer, G. C. Jr. Bagby GC (2001). Role of double-stranded RNA-dependent protein kinase in mediating hypersensitivity of Fanconi anemia complementation group C cells to interferon gamma, tumor necrosis factor-alpha, and double-stranded RNA. Blood **97**(6): 1644-1652.
- Park, S. W., Y. Zhou, J. Lee, A. Lu, C. Sun, J. Chung, K. Ueki, U. Ozcan (2010). The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. Nat Med **16**(4): 429-437.
- Perkins, D. J., N. Qureshi, S. N. Vogel (2010). A Toll-like receptor-responsive kinase, protein kinase R, is inactivated in endotoxin tolerance through differential K63/K48 ubiquitination. MBio **1**(5): e00239-10.
- Pindel, A. and A. Sadler (2011). The role of protein kinase R in the interferon response. J Interferon Cytokine Res **31**(1): 59-70.
- Ramana, C. V., N. Grammatikakis, M. Chernov, H. Nguyen, K. C. Goh, B. R. Williams, G. R. Stark (2000). Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. EMBO J **19**(2): 263-272.
- Ravichandran, L. V., H. Chen, Y. Li, M. J. Quon (2001). Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. Mol Endocrinol **15**(10): 1768-1780.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1998). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. Nature **401**(6748): 86-90.
- Ruvolo, V. R., S. M. Kurinna, K. B. Karanjeet, T. F. Schuster, A. M. Martelli, J. A. McCubrey, P. P. Ruvolo (2008). PKR regulates B56(alpha)-mediated BCL2 phosphatase activity in acute lymphoblastic leukemia-derived REH cells. J Biol Chem **283**(51): 35474-35485.
- Ruuska, M., A. S. Sahlberg, R. A. Colbert, K. Granfors, M. A. Penttinen (2012). Enhanced phosphorylation of STAT-1 is dependent on double-stranded RNA-dependent protein kinase signaling in HLA-B27-expressing U937 monocytic cells. Arthritis Rheum **64**(3): 772-777.
- Sadler, A. J. and B. R. Williams (2007). Structure and function of the protein kinase R. Curr Top Microbiol Immunol **316**: 253-292.
- Sadler, A. J. and B. R. Williams (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. Nat Rev Immunol **8**(7): 559-568.
- Sakoda, H., Y. Gotoh, H. Katagiri, M. Kurokawa, H. Ono, Y. Onishi, M. Anai, T. Ogihara, M. Fujishiro, Y. Fukushima, M. Abe, N. Shojima, M. Kikuchi, Y. Oka, H. Hirai, T. Asano (2003). Differing roles of Akt and serum- and glucocorticoid-regulated kinase in glucose metabolism, DNA synthesis, and oncogenic activity. J Biol Chem **278**(28): 25802-25807.

- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science **307**(5712): 1098-1101.
- Saelens, X., M. Kalai, P. Vandenabeele (2001). Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. J Biol Chem **276**(45): 41620-41628.
- Schmedt, C., S. R. Green, L. Manche, D. R. Taylor, Y. Ma, M. B. Mathews (1995). Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). J Mol Biol **249**(1): 29-44.
- Schulz, O., A. Pichlmair, J. Rehwinkel, N. C. Rogers, D. Scheuner, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, R. J. Kaufman, C. Reis e Sousa (2010). Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. Cell Host Microbe **7**(5): 354-361.
- Shin, K. S., E. Y. Shin, C. S. Lee, S. H. Quan, K. N. Woo, N. K. Soung, S. J. Kwak, S. R. Kim, E. G. Kim (2002). Basic fibroblast growth factor-induced translocation of p21-activated kinase to the membrane is independent of phospholipase C-gamma1 in the differentiation of PC12 cells. Exp Mol Med **34**(2): 172-176.
- Steinacher, R. and P. Schär (2005). Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. Curr Biol **15**(7): 616-623.
- Stojdl, D. F., N. Abraham, S. Knowles, R. Marius, A. Brasey, B. D. Lichty, E. G. Brown, N. Sonenberg, J. C. Bell (2000). The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. J Virol **74**(20): 9580-9585.
- Street, A., A. Macdonald, K. Crowder, M. Harris (2004). The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. J Biol Chem **279**(13): 12232-12241.
- Su, Q., S. Wang, D. Baltzis, L. K. Qu, A. H. Wong, A. E. Koromilas (2006). Tyrosine phosphorylation acts as a molecular switch to full-scale activation of the eIF2alpha RNA-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(1): 63-68.
- Sun, M., G. Wang, J. E. Paciga, R. I. Feldman, Z. Q. Yuan, X. L. Ma, S. A. Shelley, R. Jove, P. N. Tschlis, S. V. Nicosia, J. Q. Cheng (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. Am J Pathol **159**(2): 431-437.
- Thorpe, L. M., H. Yuzugullu, J. J. Zhao (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. Nat Rev Cancer **15**(1): 7-24.
- Trotman, L. C., A. Alimonti, P. P. Scaglioni, J. A. Koutcher, C. Cordon-Cardo, P. P. Pandolfi (2006). Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. Nature **441**(7092): 523-527.

- Ullmann, R., C. D. Chien, M. L. Avantaggiati, S. Muller (2012). An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. Mol Cell **46**(6): 759-770.
- Vander Haar, E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin, D. H. Kim (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. Nat Cell Biol **9**(3): 316-323.
- Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. Biochem J **346** Pt 3: 561-576.
- van Opstal, A., J. Bijvelt, E. van Donselaar, B. M. Humbel, J. Boonstra (2012). Inhibition of protein kinase B activity induces cell cycle arrest and apoptosis during early G₁ phase in CHO cells. Cell Biol Int **36**(4): 357-365.
- von Holzen, U., A. Pataer, U. Raju, D. Bocangel, S. A. Vorburger, Y. Liu, X. Lu, J. A. Roth, B. B. Aggarwal, G. N. Barber, K. Keyomarsi, K. K. Hunt, S. G. Swisher (2007). The double-stranded RNA-activated protein kinase mediates radiation resistance in mouse embryo fibroblasts through nuclear factor kappaB and Akt activation. Clin Cancer Res **13**(20): 6032-6039.
- von Roretz, C. and I. E. Gallouzi (2010). Protein kinase RNA/FADD/caspase-8 pathway mediates the proapoptotic activity of the RNA-binding protein human antigen R (HuR). J Biol Chem **285**(22): 16806-16813.
- Wang, J. (2011). Cardiac function and disease: emerging role of small ubiquitin-related modifier. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **3**(4): 446-457.
- Wang, S., J. F. Raven, D. Baltzis, S. Kazemi, D. V. Brunet, M. Hatzoglou, M. L. Tremblay, A. E. Koromilas (2006). The catalytic activity of the eukaryotic initiation factor-2alpha kinase PKR is required to negatively regulate Stat1 and Stat3 via activation of the T-cell protein-tyrosine phosphatase. J Biol Chem **281**(14): 9439-9449.
- Warfel, N. A., M. Niederst, A. C. Newton (2011). Disruption of the interface between the pleckstrin homology (PH) and kinase domains of Akt protein is sufficient for hydrophobic motif site phosphorylation in the absence of mTORC2. J Biol Chem **286**(45): 39122-38129.
- Wasik, U. and A. Filipek (2014). Non-nuclear function of sumoylated proteins. Biochim Biophys Acta **1843**(12): 2878-2885.
- Wilkinson, K. A. and J. M. Henley (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. Biochem J **428**(2): 133-145.
- Wimmer, P., S. Schreiner, T. Dobner (2012). Human pathogens and the host cell SUMOylation system. J Virol **86**(2): 642-654.
- Wolf, D., V. Witte, B. Laffert, K. Blume, E. Stromer, S. Trapp, P. d'Aloja, A. Schürmann, A. S. Baur (2001). HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. Nat Med **7**(11): 1217-1224.

- Wong, A. H., N. W. Tam, Y. L. Yang, A. R. Cuddihy, S. Li, S. Kirchhoff, H. Hauser, T. Decker, A. E. Koromilas (1997). Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J* **16**(6): 1291-1304.
- Xu, Z. and B. R. Williams (2000). The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Mol Cell Biol* **20**(14): 5285-5299.
- Yu, Y. and J. C. Alwine (2002). Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositide 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol* **76**(8): 3731-3738.
- Zamanian-Daryoush, M., T. H. Mogensen, J. A. DiDonato, B. R. Williams (2000). NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* **20**(4): 1278-1290.
- Zhang, F., P. R. Romano, T. Nagamura-Inoue, B. Tian, T. E. Dever, M. B. Mathews, K. Ozato, A. G. Hinnebusch (2001). Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J Biol Chem* **276**(27): 24946-24958.
- Zhang, X., O. Vadas, O. Perisic, K. E. Anderson, J. Clark, P. T. Hawkins, L. R. Stephens, R. L. Williams (2011). Structure of lipid kinase p110 β /p85 β elucidates an unusual SH2-domain-mediated inhibitory mechanism. *Mol Cell* **41**(5): 567-578.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee, M. C. Hung (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**(3): 245-252.

ANEXO



PUBLICACIONES

Producto de este trabajo de tesis se han publicado los siguientes artículos:

de la Cruz-Herrera, C.F., M. Campagna, M. A. García, L. Marcos-Villar, V. Lang, M. Baz-Martínez, S. Gutiérrez, A. Vidal, M. S. Rodríguez, M. Esteban, C. Rivas (2014). Activation of the Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase PKR by Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO). J Biol Chem 289(38): 26357-26367.

de la Cruz-Herrera, C.F., M. Campagna, V. Lang, J. González-Santamaría, L. Marcos-Villar, M. S. Rodríguez, A. Vidal, M. Collado, C. Rivas (2014). SUMOylation regulates AKT1 activity. Oncogene 34(11): 1442-1450.

Se encuentra en revisión el manuscrito:

de la Cruz-Herrera, C. F., M. Baz-Martínez, V. Lang, A. El Motiam, J. Barbazán, R. Couceiro, M. Abal, A. Vidal, M. Esteban, C. Muñoz-Fontela, A. Nieto, M. S. Rodríguez, M. Collado, C. Rivas. SUMO modulates the p85 β -regulatory subunit of PI3K. En segunda revisión en *Oncogene*.

Y están en preparación los manuscritos:

de la Cruz-Herrera, C. F., M. Baz-Martínez, A. Vidal, V. Lang, A. E. Motiam, M. S. Rodríguez, M. Esteban, C. Rivas. Non-covalent interaction with SUMO is necessary for full activation of PKR.

de la Cruz-Herrera, C. F., M. Baz-Martínez, V. Lang, A. E. Motiam, MS Rodríguez, C. Rivas. Modulation of p110 β by SUMO.

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

Marcos-Villar, L.* , **C. F. de la Cruz-Herrera***, A. Ferreirós, M. Baz-Martínez, V. Lang, A. Vidal, C. Muñoz-Fontela, M. Rodríguez, C. Collado, C. Rivas C (2015). KSHV latent protein LANA2 inhibits SUMO2 modification of p53. Cell Cycle 14(2): 277-282. ***Co-primeros autores**

Marcos-Villar, L., P. Gallego, C. Muñoz-Fontela, **C. F. de la Cruz-Herrera**, M. Campagna, D. González, F. Lopitz-Otsoa, M. S. Rodríguez, C. Rivas (2014). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lana2 protein interacts with the pocket proteins and inhibits their sumoylation. Oncogene 33(4): 495-503.

Campagna, M., L. Marcos-Villar, F. Arnoldi, **C. F. de la Cruz-Herrera**, P. Gallego, J. González-Santamaría, D. González, F. Lopitz-Otsoa, M. S. Rodríguez, O. R. Burrone, C. Rivas (2013). Rotavirus viroplasm proteins interact with the cellular SUMOylation system: implications for viroplasm-like structure formation. *J Virol* 87(2): 807-817.

Marcos-Villar, L., J. V. Pérez-Girón, J. M. Vilas, A. Soto, **C. F. de la Cruz-Herrera**, V. Lang, M. Collado, A. Vidal, M. S. Rodríguez, C. Muñoz-Fontela, C. Rivas (2013). SUMOylation of p53 mediates interferon activities. *Cell Cycle* 12(17): 2809-2816.

Da Silva-Ferrada, E., W. Xolalpa, V. Lang, F. Aillet, I. Martin-Ruiz, **C. F. de la Cruz-Herrera**, F. Lopitz-Otsoa, A. Carracedo, S. J. Goldenberg, C. Rivas, P. England, M. S. Rodríguez (2013). Analysis of SUMOylated proteins using SUMO-traps. *Sci Rep* 3: 1690.

González-Santamaría, J., M. Campagna, A. Ortega-Molina, L. Marcos-Villar, **C. F. de la Cruz-Herrera**, D. González, P. Gallego, F. Lopitz-Otsoa, M. Esteban, M. S. Rodríguez, M. Serrano, C. Rivas (2012). Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO. *Cell Death Dis* 3: e393.