



**ESTUDIO DEL PROCESO DE MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE
PROTEÍNAS POR UNIÓN DEL POLIPÉPTIDO SUMO EN CONDICIONES
SIMULADAS DE ISQUEMIA**

**STUDY OF THE POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION OF PROTEINS BY THE POLYPEPTIDE
SUMO IN SIMULATED CONDITIONS OF ISCHEMIA**

Trabajo de tesis para el acceso al título de Doctor en el programa Biología Molecular,
Biomedicina e Investigación Clínica (RD. 2011)

Centro: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Departamento: Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología

Facultad: Facultad de Medicina

Universidad: Universidad de Sevilla

Director: Dr. Mario García Domínguez

Tutor: Dr. Víctor Sánchez Margalet

Doctorando: Francisco de Asís Gallardo Chamizo

Esta tesis va dedicada a toda
mi familia, en especial a mi
Abuela, que es para mí el
ejemplo a seguir, así como
al que dentro de unos pocos
días se convertirá en mi
marido, Jesús.

Os quiero.

*“He llamado a este principio, por el cuál cada pequeña
variación, si es útil, se conserva, con el nombre de Selección Natural”.*

Charles Darwin

Contenido

1	Resumen.....	13
2	Introducción	15
2.1	SUMO (<i>Small Ubiquitin-like MOdifier</i>).....	15
2.2	El ciclo de la SUMOilación	20
2.3	Las proteasas de SUMO.....	23
2.4	Papel de SUMO en células en proliferación y en neuronas adultas.....	29
2.5	Papel de SUMO en isquemia	33
2.6	Papel de las proteínas caspasas en OGD.....	36
2.7	Papel del factor de transcripción OCT4 en OGD y su relación con SUMO.....	37
2.8	Relación entre las proteínas SENP7, HP1 y OCT4.....	38
2.9	Otras proteínas dianas de SUMO y su papel en procesos de muerte celular	41
3	Objetivos.....	43
4	Materiales.....	45
4.1	Organismos y condiciones de cultivo	45
4.2	Vectores de expresión en bacterias	46
4.3	Vectores de transfección en líneas celulares de animales	46
4.4	Anticuerpos.....	49
4.5	Cebadores para PCR en tiempo real o qPCR.....	51
4.6	Cebadores para PCR estándar	52
4.7	Moléculas de ARN interferente	53
5	Métodos.....	54
5.1	Condiciones de cultivo.....	54
5.2	Técnicas de ADN/ARN	54
5.3	Técnicas de cultivos celulares.....	58
5.4	Métodos de síntesis, purificación y análisis de proteínas	60
5.5	Métodos inmunológicos.....	63
5.6	Métodos de medida de viabilidad celular.....	64

5.7	Espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje (<i>Label-Free Quantification</i>)	67
5.8	Métodos bioinformáticos	70
5.9	Análisis estadístico.....	71
6	Resultados.....	72
6.1	Puesta a punto de un método de purificación del SUMOiloma usando el dominio catalítico de la proteasa SENP1 en células P19.....	72
6.2	Identificación del SUMOiloma mediante espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje (<i>Label-Free Quantification</i>).....	77
6.3	Análisis de expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en la ruta de SUMOilación en condiciones de OGD y de ROGD	94
6.4	Función en viabilidad celular de los componentes de la ruta de SUMOilación y de las dianas de SUMO identificadas en condiciones de OGD.....	98
6.5	Análisis de la SUMOproteasa SENP7 en OGD y ROGD.....	106
6.6	El factor de transcripción OCT4 es deSUMOilado en OGD por la SUMOproteasa SENP7 115	
6.7	Análisis de viabilidad celular y de expresión de genes del ciclo de SUMOilación en condiciones de estrés diferentes a OGD	117
6.8	Análisis de la expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en cáncer colorrectal	125
7	Discusión.....	140
8	Conclusiones.....	173
9	Abreviaturas.....	175
10	Apéndice	179
11	Bibliografía	180
12	Agradecimientos	203

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de Ribbon en el que se muestra la representación de la estructura 3D de las proteínas humanas ubiquitina, SUMO1 y SUMO2/3.	16
Figura 2. Funciones potenciales de las cadenas de SUMO unidas covalentemente a proteínas diana.	18
Figura 3. Mecanismo de modificación por SUMO.	22
Figura 4. Funciones catalíticas de las enzimas deSUMOiladoras.	24
Figura 5. Organización de los dominios de las proteínas Ulp, SENP y DESI.	26
Figura 6. Relación evolutiva de las proteínas Ulp y SENP.	27
Figura 7. Actividades de desconjugación y procesamiento de SUMO de los diferentes miembros de la familia de proteínas SENP en los diferentes parálogos de SUMO.	28
Figura 8. Representación esquemática de la distribución subcelular de las isopeptidasas de la familia SENP en mamíferos.	29
Figura 9. SUMO es un regulador de múltiples funciones y enfermedades en las neuronas.	30
Figura 10. Representación esquemática de los dominios de SENP7 de ratón.	39
Figura 11. Los dos motivos P _x V _x L de SENP7 conectan HP1 α contiguas ancladas a nucleosomas modificados por H3K9me3 permitiendo el bloqueo de HP1 en la cromatina. ..	40
Figura 12. Modelo propuesto sobre las interacciones de HP1 γ	41
Figura 13. Protocolo con tratamiento con ácido retinoico para inducción de diferenciación neuronal en células P19.	59
Figura 14. Representación de un análisis aleatorio de citometría (A) junto con los controles de células sin marcar (B), marcadas únicamente con IP (C) o tan solo con anexina (D).	66
Figura 15. Fórmula utilizada para el cálculo de la citotoxicidad en un cultivo celular.	67
Figura 16. Esquema que permite una visión de conjunto del procedimiento llevado a cabo para la purificación de las moléculas de His ₁₀ -SUMO2.	68
Figura 17. Purificación del dominio catalítico de la proteasa SENP1 y de un sustrato de ésta.	73
Figura 18. Protocolo de purificación del SUMOiloma.	75
Figura 19. Ensayo de purificación del SUMOiloma.	77
Figura 20. Creación y selección de la línea estable para la realización del análisis del SUMOiloma en condiciones de OGD.	79
Figura 21. Comprobación de los niveles de proteína HIF1 α mediante análisis por <i>Western blot</i> de extractos de células P19 no diferenciadas tratadas con OGD.	80

Figura 22. Comprobación de la correcta diferenciación de células P19 en el día 7 del protocolo de neurodiferenciación con tratamiento con ácido retinoico a través de imágenes al microscopio óptico.....	81
Figura 23. Comprobación de la correcta diferenciación de células P19 en el día 7 del protocolo de diferenciación con tratamiento con ácido retinoico a través de análisis mediante <i>Western blot</i> con anticuerpos contra las proteínas β III específica de neuronas y OCT4.....	81
Figura 24. Análisis del patrón de modificación de proteínas por SUMO2 a distintos tiempos de OGD y ROGD.....	82
Figura 25. Análisis del patrón de modificación de proteínas por SUMO2 a distintos tiempos de OGD y ROGD en células en estado de proliferación y neurodiferenciadas en las líneas celulares P19 y A5.	84
Figura 26. <i>Heatmap</i> en el que se representan las muestras de células P19 no diferenciadas según las variaciones en los niveles de proteínas SUMOiladas.	87
Figura 27. Diagrama de dispersión en el que se representan las proteínas identificadas en la proteómica de células P19 no diferenciadas y neurodiferenciadas en condiciones de OGD. .	88
Figura 28. Número total de proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en cada condición, se indican las proteínas cuya SUMOilación aumenta y disminuye en cada una de las condiciones estudiadas.....	90
Figura 29. Validación de una selección de proteínas diana de SUMO2 identificadas en el estudio proteómico en condiciones de OGD.	93
Figura 30. Análisis de los niveles de HMG20B mediante <i>Western blot</i> en condiciones de OGD y ROGD.	94
Figura 31. Análisis de expresión de los genes de la ruta de SUMOilación.	97
Figura 32. La sobreexpresión de SUMO2 incrementa la viabilidad celular en células P19..	100
Figura 33. La sobreexpresión de UBC9 y PIAS4 incrementa la viabilidad celular en células P19.	100
Figura 34. La sobreexpresión de SENP7 incrementa la viabilidad celular mientras que la sobreexpresión de SENP3 muestra el efecto contrario en células P19.....	101
Figura 35. El incremento en la viabilidad celular producido por SENP7 es debido tanto a su dominio catalítico (SENP7 C-ter) como a funciones del resto de su estructura en células P19.	101
Figura 36. La disminución de los niveles de SENP7 disminuye la viabilidad celular mientras que la disminución de los niveles de SENP3 muestra el efecto contrario en células P19.....	102

Figura 37. La combinación de niveles opuestos de SENP3 y SENP7 muestra efectos sinérgicos sobre la citotoxicidad por OGD en células P19.	103
Figura 38. La deSUMOilación de PIAS4 inhibe los efectos citoprotectores de dicha ligasa frente a OGD en células P19.....	103
Figura 39. Un mutante de SUMOilación de NAB2 produce un aumento de los niveles de citotoxicidad celular con respecto a la proteína nativa NAB2 en células P19.....	104
Figura 40. Un mutante de SUMOilación de SOX2 disminuye los efectos citoprotectores de SOX2 frente a OGD en células P19.....	105
Figura 41. Un mutante KR de OCT4 produce efectos citoprotectores frente a OGD en células P19.	105
Figura 42. La expresión del gen <i>Senp7</i> se regula por OGD y ROGD.	107
Figura 43. Cambios en el tamaño y nivel de expresión de SENP7 en condiciones de OGD y de ROGD.	108
Figura 44. Empalme alternativo del gen <i>Senp7</i>	109
Figura 45. Análisis de empalme alternativo del gen <i>Senp7</i> en células P19.....	111
Figura 46. Análisis de los niveles de expresión de las variantes de las isoformas 1 y X3 de SENP7.....	113
Figura 47. La SUMOproteasa SENP7 es proteolizada por la enzima caspasa 1.	114
Figura 48. SENP7 actúa como SUMOproteasa de SUMO2-OCT4.	116
Figura 49. SENP7 actúa como SUMOproteasa de SUMO2-OCT4.	117
Figura 50. Los niveles de SUMOilación de proteínas aumentan por el tratamiento con CoCl ₂ en células P19.	118
Figura 51. Los niveles de ARNm de los genes de las ligasas de SUMO PIAS2 y PIAS4 aumentan debido al tratamiento con CoCl ₂ en células P19.....	120
Figura 52. Análisis de apoptosis tardía y necrosis inducida en células P19 por arsenito.	121
Figura 53. Los niveles de ARNm de las ligasas de SUMO PIAS2 y PIAS4 aumentan al tratar con arsenito células P19.....	122
Figura 54. Regulación del gen <i>Senp7</i> en respuesta a distintas condiciones de estrés.....	124
Figura 55. Regulación del gen de la proteasa SENP7 por choque térmico y arsenito.....	125
Figura 56. Análisis de la variación en el número de copias de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en un total de 54.483 muestras existentes en la base de datos cBioportal.	128
Figura 57. Frecuencia de alteraciones del gen de la SUMOproteasa SENP3 en los diferentes tipos de cáncer de la base de datos cBioportal.....	129

Figura 58. Frecuencia de alteraciones del gen de la SUMOproteasa SENP7 en los diferentes tipos de cáncer de la base de datos cBioportal.....	129
Figura 59. Cambios en los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en muestras de distintos cánceres humanos con respecto a los niveles de expresión de dichos genes en tejidos de pacientes sanos.	131
Figura 60. El aumento en los niveles de expresión de <i>Senp7</i> se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal.	134
Figura 61. El aumento en los niveles de expresión de <i>Senp7</i> se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal.	135
Figura 62. La disminución de los niveles de expresión de <i>Senp3</i> se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal.	136
Figura 63. Los pacientes de cáncer colorrectal con niveles de expresión elevados de <i>Senp7</i> y disminuidos de <i>Senp3</i> presentan una menor supervivencia.	137
Figura 64. Relación entre los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 y los estadios de extensión de cáncer colorrectal diferenciados según la American Joint Committee on Cancer (AJCC 2017).	138
Figura 65. Cascada de eventos dañinos durante la isquemia focal cerebral.	141
Figura 66. Coincidencias entre nuestro análisis proteómico y el descrito por Yang <i>et al.</i> , 2012.	148
Figura 67. La mayoría de proteínas que modifican su estado de SUMOilación en OGD se localizan en el núcleo.....	154
Figura 68. La mayoría de proteínas que modifican su estado de SUMOilación en condiciones de OGD están relacionadas con transcripción.	154
Figura 69. Ruta de biosíntesis del ARNm.	156
Figura 70. Rutas en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían tras OGD.	159
Figura 71. Ruta del espliceosoma y proteínas cuyo nivel de SUMOilación varía significativamente en condiciones de OGD.....	159
Figura 72. Estudio de variabilidad de conservación de las secuencias de SENP7 en diferentes especies.	166

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias consenso de los diferentes motivos de reconocimiento de SUMO así como de los motivos SIM.	19
Tabla 2. Lista de vectores de transfección en líneas celulares animales utilizados.	46
Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados.	49
Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados en los experimentos de PCR a tiempo real. ...	51
Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos de PCR estándar.	52
Tabla 6. Secuencia de moléculas de ARN interferente.	53
Tabla 7. Isoformas alternativas de SENP7.	109
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en los análisis de empalme alternativo de <i>Senp7</i> . Pa..	111
Tabla 9. Cambios en los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en muestras de distintos cánceres humanos con respecto a los niveles de expresión de dichos genes en tejidos de pacientes sanos.	132
Tabla 10. Listado comparativo de las proteínas identificadas en el estudio proteómico de Yang <i>et al.</i> , 2012 y las proteínas identificadas en este trabajo.	149
Tabla 11. Distribución por categorías de las proteínas implicadas en transcripción que presentan diferencias en los niveles de SUMOilación en OGD.	157

1 Resumen

SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) es un pequeño polipéptido compuesto por alrededor de 100 aminoácidos que orchestra una variedad de procesos en el interior celular. Se ha descrito que la SUMOilación (modificación postraduccional de proteínas por unión del polipéptido SUMO) tiene efectos neuroprotectores. Sin embargo, las proteínas diana y los mecanismos de regulación han sido poco investigados y se necesita un conocimiento exhaustivo de ello para poder realizar intervenciones con fines terapéuticos a través de la modificación de los niveles de SUMO. Para llevar a cabo esta investigación se sometieron células P19 en estado de proliferación así como neurodiferenciadas a tratamientos de estrés que produjeran escenarios simulados de isquemia, como condiciones de cultivo en ausencia de oxígeno y glucosa (OGD, *Oxygen and Glucose Deprivation*).

Para conocer las proteínas dianas de SUMO es preciso purificarlas selectivamente, por lo que en este trabajo hemos puesto a punto un método para la purificación de las proteínas SUMOiladas (SUMOiloma). Así mismo, a través del uso de una línea celular de células P19 que expresaba de forma estable una construcción de SUMO2 etiquetado con una cola de 10 His hemos conseguido aislar dicho SUMOiloma en condiciones de OGD y tras restablecer las condiciones normales de cultivo (ROGD, *Recover from OGD*). A través de espectrometría de masas hemos hallado más de 200 proteínas diferentes modificadas por SUMO2 que, en gran proporción, realizan funciones relacionadas con el proceso de transcripción.

Para estudiar los mecanismos de regulación por los cuales se producen variaciones en los niveles de SUMO en condiciones de isquemia es importante analizar los cambios en los niveles de expresión de los genes de las proteínas más importantes del ciclo de SUMOilación. En este trabajo hemos hallado que los niveles de expresión de los genes de varias SUMOproteasas descienden mientras que los de varias ligasas ascienden.

La alteración de los niveles de expresión de varias proteínas identificadas en nuestro estudio proteómico (NAB2, OCT4 y SOX2), así como de sus mutantes no SUMOilables, y de proteínas del ciclo de SUMOilación como PIAS4, SENP3 y SENP7 produjo cambios significativos en los niveles de supervivencia celular en condiciones de OGD en células P19. Además, un análisis de supervivencia de pacientes con determinados tipos de cáncer correlacionó en el mismo sentido con los niveles de expresión de algunos de estos genes de proteínas del ciclo de SUMOilación.

Por todo ello, debido a los efectos que produjeron en los niveles de apoptosis celular en condiciones de OGD así como por su correlación con los niveles de supervivencia de pacientes con varios tipos de cáncer, en este trabajo se han identificado una serie de proteínas participantes en el ciclo de SUMOilación que son candidatos prometedores para la intervención terapéutica tanto en relación al cáncer como a la isquemia.

2 Introducción

2.1 SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*)

Las modificaciones post-traduccionales (PTM, por sus siglas en inglés, *Post-Translational Modification*) son modificaciones producidas generalmente por enzimas especializadas realizadas con posterioridad a la biosíntesis de una proteína. Estas pueden ser adición de grupos fosfato, grupos acetilo, ubiquitina, etc., existiendo más de 200 tipos de PTMs diferentes, de forma que prácticamente todas las proteínas sufren algún tipo de PTM (Jensen, 2006). SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) es un pequeño polipéptido compuesto por alrededor de 100 aminoácidos similar a la ubiquitina (razón por la que en su descubrimiento fue denominado de tal manera) ya que comparte una alta similitud con ella en términos de conformación 3D, aunque solo posee un 18 % de identidad al comparar las secuencias de ambas proteínas (Bayer *et al.*, 1998). Es por ello por lo que SUMO pertenece a la familia de proteínas del tipo ubiquitina Ubls (por sus siglas en inglés “*ubiquitin-like proteins*”) (Hochstrasser, 2009), caracterizada por un motivo C-terminal glicina-glicina que es expuesto después de la maduración proteolítica y por presentar el mismo pliegue estructural que la ubiquitina, conocido como pliegue de la ubiquitina o pliegue ubiquitón, que contiene un dominio característico “*fl-grasp*” consistente en cuatro o cinco dominios de hoja fl-plegada junto con un dominio α -helicoidal (Burroughs *et al.*, 2007) (**Figura 1**). SUMO fue descubierto a finales de los años 90 del siglo XX y desde entonces el conocimiento sobre este interesante polipéptido no ha hecho más que aumentar y ya se ha descrito la SUMOilación (proceso por el cual SUMO se une covalentemente a una proteína diana) en cientos de proteínas, lo cual ha desvelado el importante papel de SUMO en numerosos aspectos de la vida en la célula eucariota (Hay, 2005).

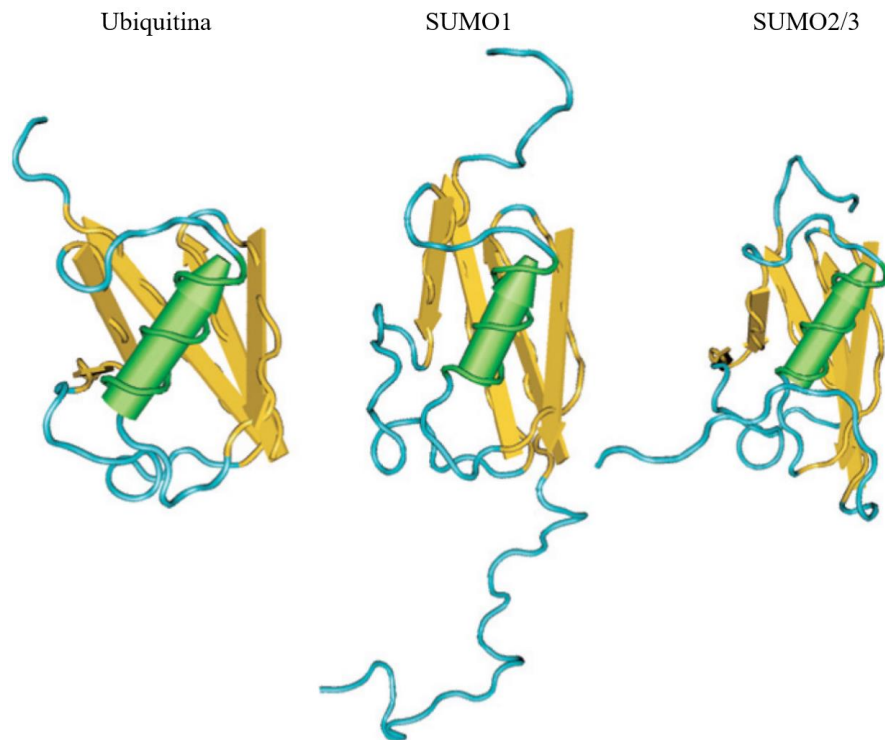


Figura 1. Diagrama de Ribbon en el que se muestra la representación de la estructura 3D de las proteínas humanas ubiquitina, SUMO1 y SUMO2/3. A pesar de que SUMO y la ubiquitina solo presentan un 18 % de identidad, ambas estructuras tridimensionales son muy parecidas entre sí. Adaptada de Martin *et al.*, 2007.

La SUMOilación es un proceso esencial en eucariotas ya que SUMO es necesario para la viabilidad en especies tan lejanas entre sí como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* o *Mus musculus* (Johnson, 2004; Nacerddine *et al.*, 2005; Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). Se han descrito 3 moléculas principales de SUMO altamente conservadas entre especies. En los eucariotas más simples como *Saccharomyces cerevisiae* ha sido identificada una sola isoforma del gen de SUMO, denominada SMT3 (Johnson *et al.*, 1997). Por el contrario, en mamíferos han sido identificadas 5 isoformas diferentes (Melchior, 2000; Guo *et al.*, 2004), denominadas como SUMO1-5. La primera proteína cuya SUMOilación fue descubierta fue la nucleoporina Ran GTPasa activadora de proteína 1 (RanGAP1) (Matunis, Coutavas & Blobel, 1996). Ese mismo año también se apuntó la existencia de SUMO1 mediante ensayos de doble híbrido por su interacción con las proteínas Rad51 y 52 (Shen *et al.*, 1996), PML (Boddy *et al.*, 1996) y Fas/APO-1 (Okura *et al.*, 1996). SUMO1 también es denominado como *AP-modifying protein 1*, GMP1, *SMT3 homolog 3*, *Sentrin*, *Ubiquitin-homology domain protein PIC1*, *Ubiquitin-like protein SMT3C* o *Ubiquitin-*

like protein UBL1. Posteriormente la existencia de las proteínas SUMO2 (también denominado HSMT31, SMT3 homolog 2, *Sentrin-2* o *Ubiquitin-like protein* SMT3B) y SUMO3 (también denominado SMT3 homolog 1 o *Ubiquitin-like protein* SMT3A) se predijo a partir de su identidad frente a SUMO1 y su posterior aislamiento reveló la capacidad de ambas de unirse a diferentes proteínas (Lapenta *et al.*, 1997; Kamitani, Kito, *et al.*, 1998; Kamitani, Nguyen, *et al.*, 1998). Subsiguientemente se produjo el descubrimiento de SUMO4 (Bohren *et al.*, 2004) y hace tan solo dos años se descubrió SUMO5 (Liang *et al.*, 2016).

Mientras que SUMO1 regula múltiples procesos celulares y está conjugado a las proteínas en procesos biológicos habituales, SUMO2 y SUMO3 se han relacionado con respuesta a situaciones de estrés ya que en condiciones normales existe una proporción de SUMO2 y SUMO3 libre que se une rápidamente a las proteínas en respuesta a numerosas condiciones de estrés (Tempé, Piechaczyk & Bossis, 2008). Existen, sin embargo, ejemplos de proteínas dianas tal y como la topoisomerasa II o la CAAT/*enhancer-binding protein-beta* (C/EBP β), que son modificadas específicamente por SUMO2 y 3 bajo condiciones habituales para la célula (Azuma, Arnaoutov & Dasso, 2003; Eaton & Sealy, 2003). En la actualidad existen escasos conocimientos acerca del papel de las isoformas SUMO4 y SUMO5 y no se ha demostrado su presencia de forma ubicua en los vertebrados, tal y como ya ha sido demostrado para las isoformas SUMO1, 2 y 3 (Guo *et al.*, 2004). SUMO4 es codificado por una secuencia localizada dentro del intrón del gen humano TAB2 y se ha descrito la presencia del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) correspondiente a esta isoforma en células de riñón, nódulos linfáticos y bazo, aunque por el momento no se ha descrito la expresión de proteína endógena en dichos tejidos (Wei *et al.*, 2008). La expresión de SUMO5 ha sido demostrada solo en algunas líneas específicas de primates, en las que regula la formación y disociación de cuerpos PML (Proteína de la Leucemia Promielocítica) (Liang *et al.*, 2016). SUMO2 y SUMO3 comparten un 97 % de identidad en su secuencia aminoacídica cuando son madurados y normalmente son mencionados como SUMO2/3 ya que en la actualidad no existen anticuerpos que distingan ambas isoformas. SUMO1 comparte solo un 47 % de identidad con SUMO2 (Saitoh & Hinchey, 2000; Vertegaal *et al.*, 2006).

La SUMOilación comparte varias similitudes con la ubiquitinación, ya que por ejemplo ambas moléculas necesitan ser maduras para ser completamente funcionales. SUMO es madurado por la acción de isopeptidasas específicas, de manera que se exponen dos glicinas en la región C-terminal del polipéptido que serán necesarias para la unión a la proteína diana

(Figura 3). La SUMOilación tiene lugar cuando el extremo C-terminal de SUMO se une de forma covalente al residuo de lisina presente en la proteína diana a través de un enlace isopeptídico. En la mayoría de los casos la SUMOilación tiene lugar en un residuo de lisina contenido en la secuencia consenso Ψ KxE, donde Ψ es un residuo alifático (I, V o L) y X es cualquier aminoácido (Hay, 2005). Es por ello que la mutación KR (siendo K una lisina que se intercambia por una arginina, R) de los residuos de lisina en los que se produce la SUMOilación de una proteína impide la SUMOilación de dicha proteína. Existe un sitio consenso de SUMOilación dentro de la secuencia de SUMO2/3, mientras que en SUMO1 este sitio no existe. Es por ello por lo que se ha descrito que SUMO2/3 forma cadenas *in vitro* e *in vivo*, mientras que SUMO1 no posee esta capacidad (Tatham *et al.*, 2001; Bohren *et al.*, 2004). Todavía se conoce poco acerca de la relevancia funcional de la formación de cadenas por SUMO2/3. Algunas teorías apuntan a que SUMO podría funcionar como un obstáculo para impedir la interacción de ciertos dominios de una proteína diana con otras proteínas o ADN (Figura 2). A parte de la posibilidad de formación de cadenas de poli-SUMO en un sitio concreto de la proteína diana, muchos sustratos de SUMO son SUMOilados en diferentes lisinas dentro de la misma proteína, complicando aún más las consecuencias finales que la unión de SUMO pueda tener en los seres vivos.

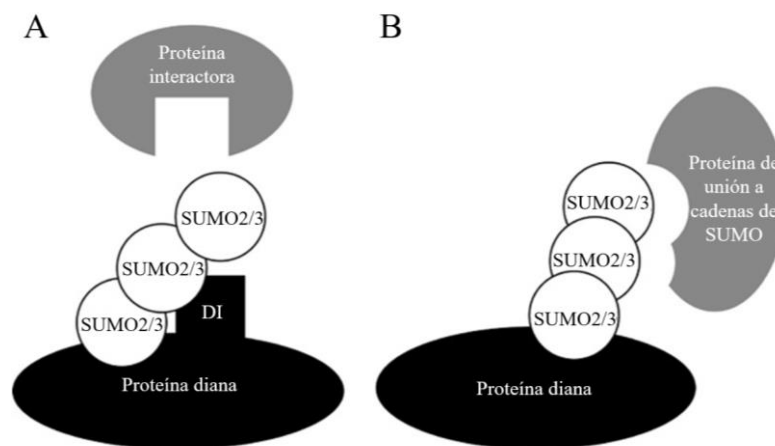


Figura 2. Funciones potenciales de las cadenas de SUMO unidas covalentemente a proteínas diana. A) Las cadenas de SUMO podrían bloquear la interacción de proteínas diana con otras proteínas a través del enmascaramiento de dominios de interacción (DI) que son parte de las proteínas diana. B) Las cadenas de SUMO podrían, además, crear sitios de interacción con proteínas que poseen dominios para unión a cadenas de SUMO. Adaptada de Vertegaal, 2007.

A pesar de la existencia de la secuencia consenso de SUMOilación previamente descrita se ha señalado que no todas las proteínas que contienen un sitio consenso de SUMOilación son SUMOiladas y no todas las proteínas modificadas por SUMO contienen este sitio consenso. De hecho, han sido descritas algunas variantes de este sitio de SUMOilación incluyendo sitios de SUMOilación con motivos invertidos, con aminoácidos hidrofóbicos, con aminoácidos cargados negativamente y otros dependientes de fosforilación (Rodriguez, Dargemont & Hay, 2001; Hietakangas *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Matic *et al.*, 2010; Picard *et al.*, 2012) (**Tabla 1**). Dichos datos indican que otros aspectos tales como la localización subcelular o la propia presentación del sitio de SUMOilación en la estructura 3D de la proteína diana podrían ser requeridos para la unión covalente de la proteína diana a SUMO. SUMO también es capaz de interactuar con proteínas a través de motivos de interacción de SUMO (SIM, SUMO *interacting motif*) sin el establecimiento de una unión covalente. Habitualmente los SIM consisten en extensiones hidrofóbicas con la secuencia (V/I)-X-(V/I)-(V/I) o (V/I) (V/I)-X-(V/I) flanqueada N o C-terminal por residuos de serina y/o por regiones de aminoácidos ácidos (Song *et al.*, 2005; Hecker *et al.*, 2006). Han sido identificados SIMs en numerosas proteínas diana de SUMO y también ha sido descrito que sirven como mediadores de eventos posteriores que requieren la interacción con SUMO (Kerscher, 2007), como por ejemplo para mantener la arquitectura de numerosos complejos represores de cromatina (Garcia-Dominguez & Reyes, 2009).

Tabla 1. Secuencias consenso de los diferentes motivos de reconocimiento de SUMO así como de los motivos SIM. Adaptada de Flotho & Melchior, 2013.

Motivo	Secuencia consenso
Motivo consenso	ψ KX(E/D)
Motivo consenso hidrofóbico	$\psi\psi\psi$ KX(E/D)
Motivo consenso invertido	(E/D)XK ψ
Motivo de SUMOilación dependiente de fosforilación (PDSM)	ψ KX(E/D)XX(pS)P
Motivo de SUMOilación dependiente de aminoácidos con carga negativa (NDSM)	ψ KX(E/D)XXEEEE
Motivo de SUMOilación fosforilado (pSuM)	ψ KX(pS)P
pSuM extendido	ψ KX(pS)P(pS)XXX(pS)P
SIM	(V/I)-X-(V/I)-(V/I) o (V/I) (V/I)-X-(V/I)

2.2 El ciclo de la SUMOilación

Aunque los mecanismos envueltos en la ruta de modificación por SUMO (**Figura 3**) parecen estar elucidados, muchos aspectos de especificidad así como de su dinámica necesitan ser estudiados. De entre las similitudes que SUMO posee con la ubiquitina, la ruta de modificación es una de ellas, aunque en ambas rutas participan enzimas específicas de cada una. Algunas de las enzimas que participan en la modificación por SUMO, como por ejemplo E1 y E2, tienen secuencias similares a las enzimas que participan en el ciclo de la ubiquitinación y están altamente conservadas en eucariotas.

Tal y como la ubiquitina, todas las isoformas de SUMO son sintetizadas como un precursor polipeptídico que necesita ser madurado y activado para convertirse en conjugable a la proteína diana. La maduración inicial de SUMO es llevada a cabo por isopeptidasas específicas de SUMO denominadas *Sentrin Specific Proteases* (SENPs) (Li & Hochstrasser, 1999) que producen un corte proteolítico en la parte C-terminal de la molécula de entre cuatro y once aminoácidos, exponiendo los previamente mencionados residuos glicina-glicina (Kamitani, Nguyen & Yeh, 1997; Bayer *et al.*, 1998). Una vez que es madurado, la región C-terminal de SUMO necesita ser activada en una reacción que es llevada a cabo por la enzima E1. La enzima E1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades: la subunidad 1 de la enzima activadora de SUMO (SUMO-activating enzyme subunit 1, SAE1, también conocida como AOS1) y la subunidad 2 de la enzima activadora de SUMO (SUMO-activating enzyme subunit 2, SAE2, también conocida como UBA2) (Johnson *et al.*, 1997; Desterro *et al.*, 1999; Okuma *et al.*, 1999; Azuma *et al.*, 2001). SAE1 y SAE2 comparten una alta identidad en su secuencia, con las regiones N y C-terminal, respectivamente, de la enzima activadora de la ubiquitina (Dohmen *et al.*, 1995). Al igual que en otras enzimas E1 de otras Ubl, el heterodímero SAE1/SAE2 activa la región C-terminal de SUMO en una reacción compuesta por dos pasos. En el primero, la subunidad SAE1 hidroliza el ATP para unir covalentemente AMP al grupo carboxilo de la región C-terminal de SUMO. En un segundo paso, la rotura del puente SUMO-AMP por un cambio conformacional producido por la subunidad SAE2 lleva a la formación de un intermediario en el cual el grupo carboxilo C-terminal de SUMO forma un enlace tioéster de alta energía con el grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína (C173) localizado en la enzima SAE2 (Olsen *et al.*, 2010).

El siguiente paso en la ruta de SUMOilación requiere la acción de la enzima conjugadora de SUMO Ubc9, la cual es esencial en la mayoría de los organismos estudiados y

está altamente conservada en eucariotas, siendo idéntica en humano y ratón y mostrando alrededor de un 56 % de identidad entre la UBC9 de mamíferos y los ortólogos de *S. cerevisiae* (Jürgen Dohmen, 2004). El siguiente paso en la ruta de SUMOilación consiste en la reacción de transesterificación en la cual el SUMO activado es transferido desde la subunidad SAE2 de la enzima activadora a la cisteína 93 de Ubc9 a través de la formación de un nuevo enlace tioéster (Desterro, Thomson & Hay, 1997; Johnson & Blobel, 1997). Posteriormente tiene lugar la conjugación final de SUMO a la proteína diana gracias a que Ubc9 cataliza la formación de un puente isopeptídico entre el grupo carboxilo de la región C-terminal de SUMO y el grupo ϵ -amino de una lisina presente en la proteína diana, ayudado frecuentemente por la acción de una ligasa E3 de SUMO. Hasta el momento se han descrito varias ligasas de SUMO que posteriormente analizaremos. A pesar de que Ubc9 realiza el reconocimiento directo de muchos sustratos de SUMO la afinidad por estos suele ser baja (Flotho & Melchior, 2013). Es por ello por lo que estas proteínas diana pueden ser SUMOiladas cuando existe una E1 y altas concentraciones de Ubc9 *in vitro*, sin la acción de una ligasa E3. Sin embargo, muy pocas proteínas son eficientemente SUMOiladas *in vivo* sin la asistencia de una ligasa E3. Han sido descritos algunos casos en los que UBC9 actúa sin la ayuda de una ligasa de SUMO gracias a que presenta una alta afinidad con la proteína diana debido al establecimiento de una interacción de superficie adicional con esta proteína (Bernier-Villamor *et al.*, 2002).

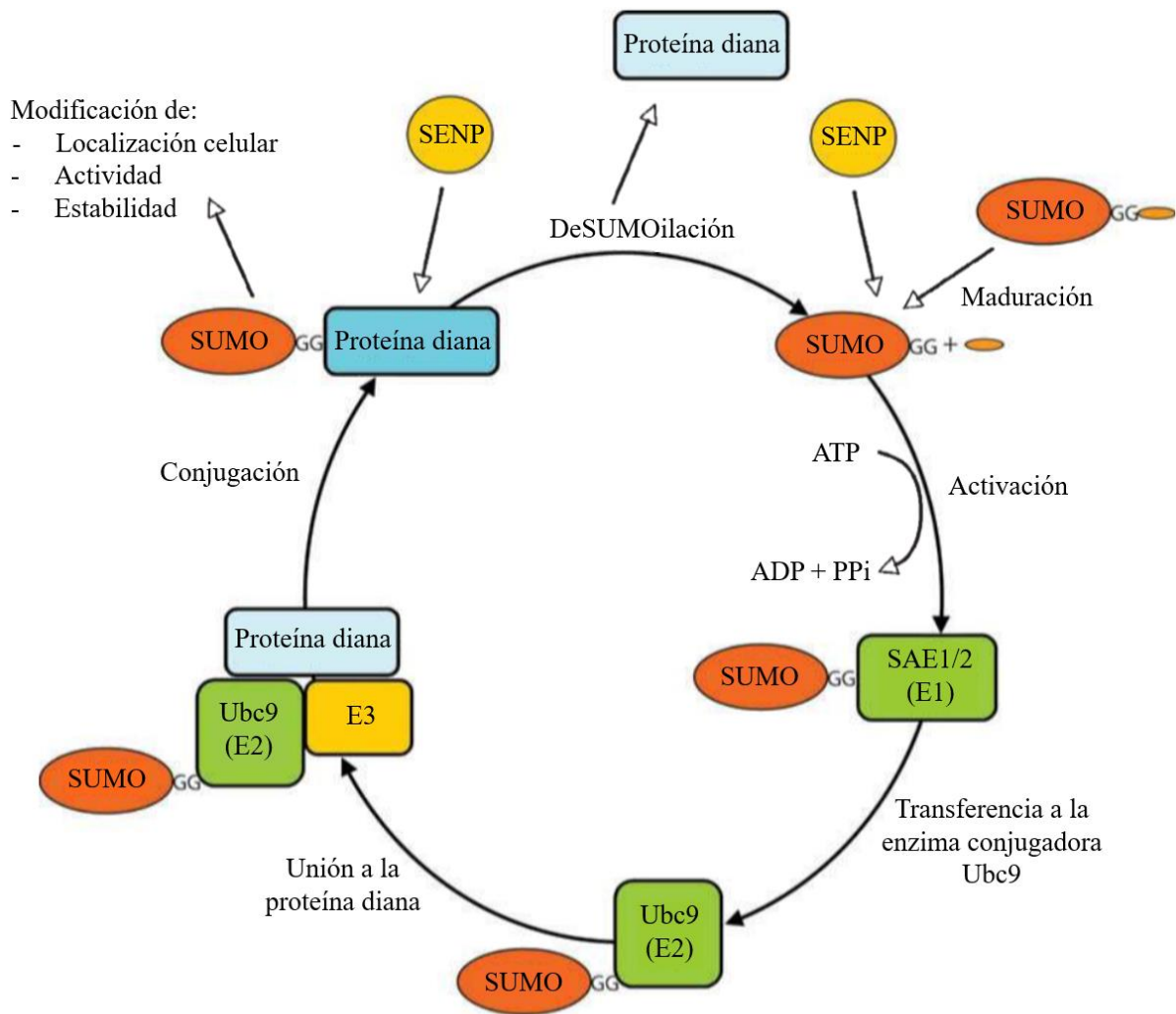


Figura 3. Mecanismo de modificación por SUMO. La SUMOilación es un proceso altamente específico si se tiene en consideración tanto la selección de las proteínas diana como el tiempo y la dinámica de la modificación. Al principio, las moléculas de SUMO recién sintetizadas necesitan ser maduras proteolíticamente por una proteasa específica de SUMO (SENP) que realiza una proteólisis en su extremo carboxilo terminal. El SUMO madurado es entonces activado por la enzima E1 (SAE1/SAE2) de manera dependiente de ATP a través de la formación de un puente tioéster entre la glicina C-terminal de SUMO y la cisteína catalítica de la subunidad SAE2. SUMO es entonces transferido a la enzima conjugante E2 (UBC9) a través de la formación de otro enlace tioéster con la enzima para ser finalmente conjugado a una lisina de la proteína diana, reacción que es normalmente facilitada por una ligasa E3. El proceso de SUMOilación es reversible por la acción de proteasas SENP, que cortan el enlace entre la proteína diana y el polipéptido. La SUMOilación comparte con la modificación por ubiquitinación la intervención de enzimas E1, E2 y ligasas E3 en la reacción. Las proteínas PIAS constituyen un tipo de ligasas de SUMO. Adaptada de Yang *et al.*, 2008.

Hasta el momento han sido descritas solo unas pocas proteínas ligasas E3 de SUMO. Las más importantes son las de la familia de la proteína inhibidora de STAT activado (PIAS),

las cuales están altamente conservadas entre mamíferos. Estas contienen un dominio PINIT que selecciona la lisina diana y un dominio Siz/PIAS-RING (SP-RING) que consiste en un anillo de zinc, clásicamente asociado a la unión de ADN (Kahyo, Nishida & Yasuda, 2001; Azuma *et al.*, 2005; Palvimo, 2007; Takahashi *et al.*, 2011). Hasta el momento se han identificado al menos 4 proteínas PIAS en humanos: PIAS1, PIAS2 (también denominado PIASx, del cual se han descrito dos variantes: PIASx α y PIASx β), PIAS3 y PIAS4 (también denominada PIASy) (Chung *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Kahyo, Nishida & Yasuda, 2001; Sachdev *et al.*, 2001; Sapetschnig *et al.*, 2002; Schmidt & Müller, 2002; Andrews *et al.*, 2005; Potts & Yu, 2005). Otros ejemplos de proteínas ligasas E3 de SUMO son RanBP2 (Saitoh, Pizzi & Wang, 2002; Tatham *et al.*, 2005), la proteína Pc2 (Polycomb protein 2) (Kagey, Melhuish & Wotton, 2003), las proteínas Topors (Grégoire & Yang, 2005; Weger, Hammer & Heilbronn, 2005; Hammer, Heilbronn & Weger, 2007), el factor de transcripción Krox20, el cual es una ligasa E3 de SUMO que SUMOila a su corregulador, NAB2 (García-Gutiérrez *et al.*, 2011), así como los dominios PHD (del inglés “*Plant Homeo Domain*”) de algunas proteínas de plantas y mamíferos, los cuales han mostrado poseer actividad ligasa E3 de SUMO (Ivanov *et al.*, 2007; Garcia-Dominguez, March-Diaz & Reyes, 2008).

2.3 Las proteasas de SUMO

La dificultad en la identificación de sustratos de Ubls está exacerbada por la acción de las isopeptidasas endógenas anteriormente mencionadas, ya que reciclan de forma perpetua las cadenas de Ubls. En el caso de SUMO han sido descritas solo unas pocas isopeptidasas. Estas isopeptidasas tienen tres funciones principales: escindir SUMO de las proteínas SUMOiladas, despolimerizar cadenas de poli-SUMO, y realizar el corte proteolítico inicial para la maduración de SUMO (**Figura 4**).

A. Procesamiento de precursores de SUMO



B. Desconjugación de SUMO



C. Edición de cadenas de SUMO

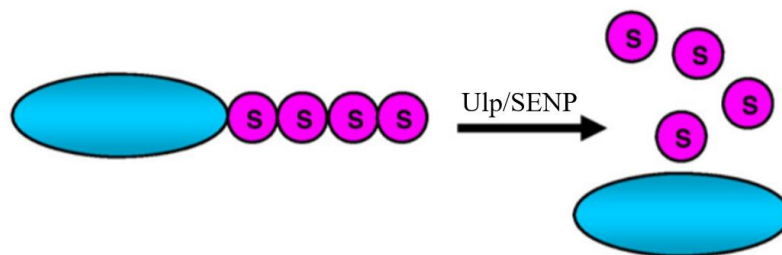


Figura 4. Funciones catalíticas de las enzimas deSUMOiladoras. A) El procesamiento de precursores de SUMO genera monómeros de SUMO libres preparados para la modificación de proteínas. B) La deSUMOilación ocurre por la desconjugación de SUMO de la proteína diana. C) Función en la edición de cadenas de SUMO. Los círculos rojos representan todas las moléculas de SUMO mientras que los morados representan SUMO2/3. Adaptada de Kim & Baek, 2009.

Las isopeptidasas más importantes son las proteínas Ulp (Ubiquitin-like protein) de levaduras Ulp1 y Ulp2, las proteínas SENP de mamíferos SENP1-3 5-7 y las proteínas DESI (*deSUMOylating isopeptidase*) de mamíferos DESI1 y DESI2 (**Figura 5**). El análisis estructural de dichas proteínas reveló que pertenecían al grupo de las proteasas de cisteína, ya que muestran la característica triada His-Asp-Cis presente en la proteasa procesadora de adenovirus (AVP, *AdenoVirus Processing protease*) (Li & Hochstrasser, 1999; Mossessova & Lima, 2000; L. N. Shen *et al.*, 2006; L. Shen *et al.*, 2006; Reverter & Lima, 2006). El sitio activo de Ulp1 está compuesto por una lámina β y dos hélices, lo cual crea una hendidura central en la proteína de aproximadamente la longitud de la cadena lateral de una lisina. La cisteína incluida en la tríada catalítica está localizada en la hélice central N-terminal, mientras que los residuos de histidina y aspártico están localizados en la lámina β . El motivo de SUMO C-terminal compuesto por las dos glicinas previamente mencionadas se introduce en esta

hendidura estableciéndose la unión de esta manera entre isopeptidasas y SUMO. Al observar la estructura de Ulp1, SENP1 y SENP2 se encuentra que el dominio catalítico, bastante similar entre estas, está localizado en el extremo C-terminal (**Figura 5**). Los dominios catalíticos de Ulp2, SENP6 y SENP7 poseen menos de un 30 % de identidad con las anteriores, conformando de esta manera un subgrupo diferente de proteasas específicas de SUMO (Li & Hochstrasser, 1999) (**Figura 6**). Curiosamente, el dominio catalítico de SENP6 y SENP7 está escindido en dos segmentos. Estas últimas proteasas presentan cuatro bucles de inserción conservados en sus dominios catalíticos que podrían estar relacionados con la especificidad por los parálogos SUMO2/3, ya que ha sido descrito que el reconocimiento de estos por el bucle 1 afecta a la actividad diferencial que estas proteasas tienen sobre SUMO2/3 (Lima & Reverter, 2008; Alegre & Reverter, 2011). Al contrario de lo que ocurre con los dominios C-terminales, la parte N-terminal de las diferentes proteínas está pobremente conservada.

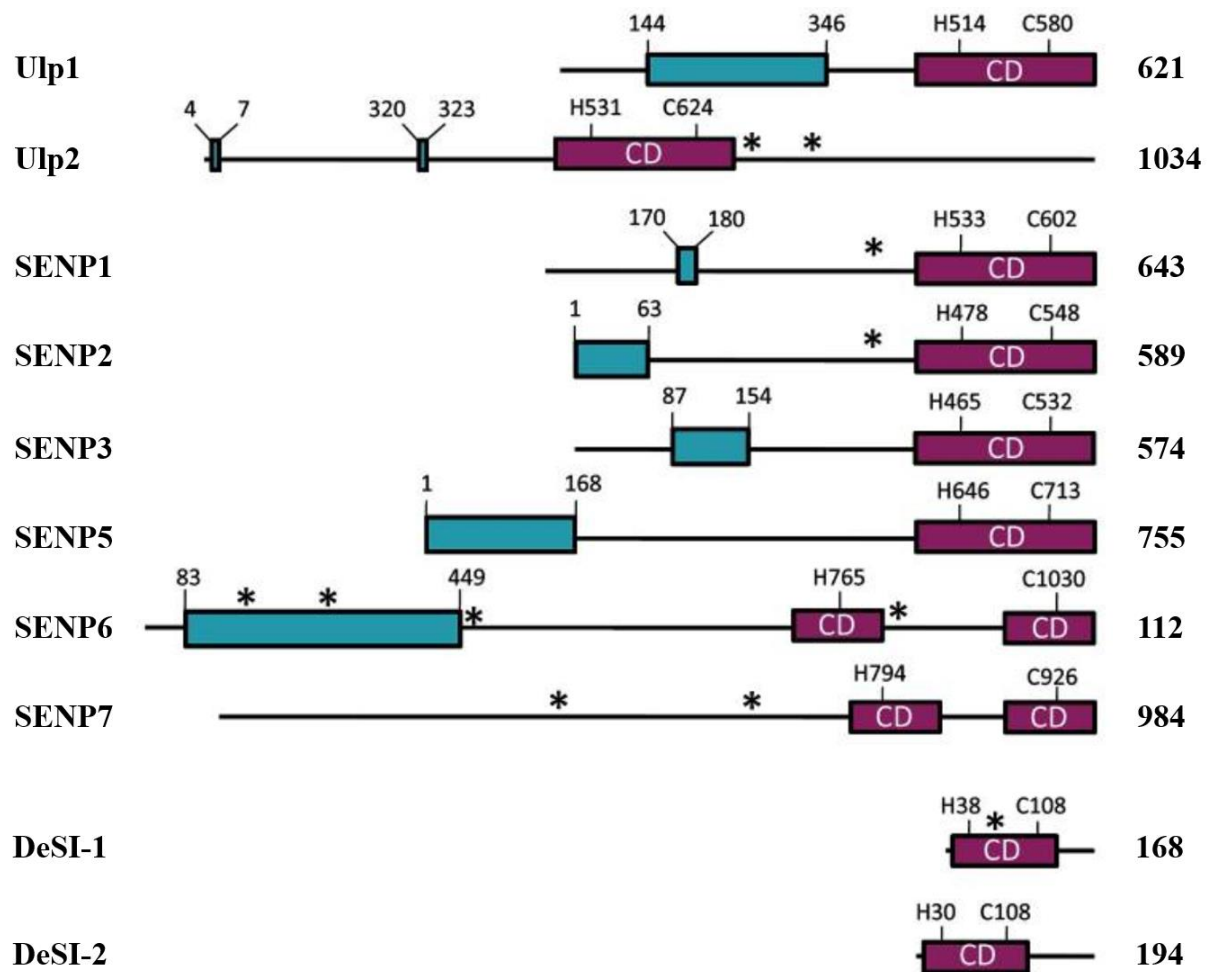


Figura 5. Organización de los dominios de las proteínas Ulp, SENP y DESI. Los rectángulos magenta representan el dominio catalítico, en los que se aprecian los residuos clave de histidina (H) y cisteína (C). Los lugares de SIMs se marcan a través de un asterisco. Las secuencias determinantes que son responsables de la localización subcelular están representadas en color cian. En el caso de Desi1 y Desi2 se representan las proteínas pertenecientes a ratón. La longitud de las proteínas está representada con el número de aminoácidos en el lado derecho de la imagen. Adaptada de Hickey, Wilson & Hochstrasser, 2012.

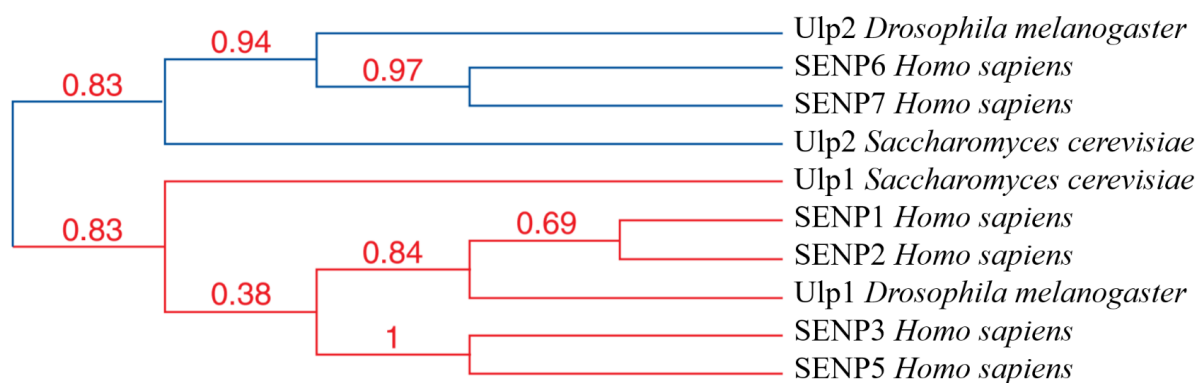


Figura 6. Relación evolutiva de las proteínas Ulp y SENP. Se muestra el árbol filogenético de relación entre las proteínas de las familias Ulp y SENP de *Saccharomyces cerevisiae* y *Drosophila melanogaster* y del ser humano. Los números de confianza generados por el procesamiento informático se localizan en cada brazo del árbol. Adaptada de Nayak & Müller, 2014.

Las proteínas DESI1 y DESI2 (deSUMOylating isopeptidase) son las isopeptidasas descritas más recientemente en humanos (Shin *et al.*, 2012). Ambas comparten poca identidad de secuencia con las proteínas Ulp y SENP y pertenecen a la clase de proteasas PPPDE (del inglés, *Permuted Papain fold Peptidases of Double-stranded RNA viruses and Eukaryotes*). Curiosamente, su actividad catalítica está basada en la habilidad de dimerizar debido a la existencia de una ranura en su superficie que contiene los sitios activos (Suh *et al.*, 2012).

Diferentes hallazgos indican que SENP1 posee un papel tanto en la desconjugación como en el procesamiento de maduración de SUMO (**Figura 7**). Los datos muestran que SUMO1 es procesado más eficientemente que SUMO2/3. Por el contrario, al menos *in vitro*, SENP1 muestra poca especificidad para desconjugar SUMO de la proteína diana (Reverter & Lima, 2004; L. N. Shen *et al.*, 2006; L. Shen *et al.*, 2006). Datos recientes en estudios en ratones, sin embargo, sugieren que *in vivo* SENP1 tiene solo un papel limitado en la desconjugación de SUMO2/3 pero es esencial en deSUMOilar proteínas modificadas por SUMO1 (Sharma *et al.*, 2013). Experimentos bioquímicos han demostrado que SENP2 cataliza la desconjugación de SUMO más eficientemente de lo que realiza el proceso de maduración y que es más eficiente en el caso de SUMO2 que en el caso de SUMO1 y SUMO3 (Reverter & Lima, 2006; Mikolajczyk *et al.*, 2007; Békés *et al.*, 2011). SENP3 y 5 muestran una acusada preferencia por el procesamiento y desconjugación de SUMO2/3 y no parecen tener actividad significativa en el caso de SUMO1 (Gong & Yeh, 2006; Kolli *et al.*, 2010). SENP6 y SENP7 muestran poca actividad tanto en el procesamiento de SUMO como en la desconjugación de

SUMO monoméricos de las proteínas diana. Curiosamente, SENP6, SENP7 y su ortóloga Ulp2 en levaduras son excelentes enzimas en la escisión de cadenas de poli-SUMO2/3 y de proteínas di-SUMOiladas (Shen *et al.*, 2009; Kolli *et al.*, 2010). En contraste con lo que ocurre con las proteínas Ulp y SENP, las proteínas DESI muestran actividad isopeptidasa en sustratos específicos y poseen una actividad extremadamente baja en la maduración de SUMO (Suh *et al.*, 2012) (**Figura 7**).

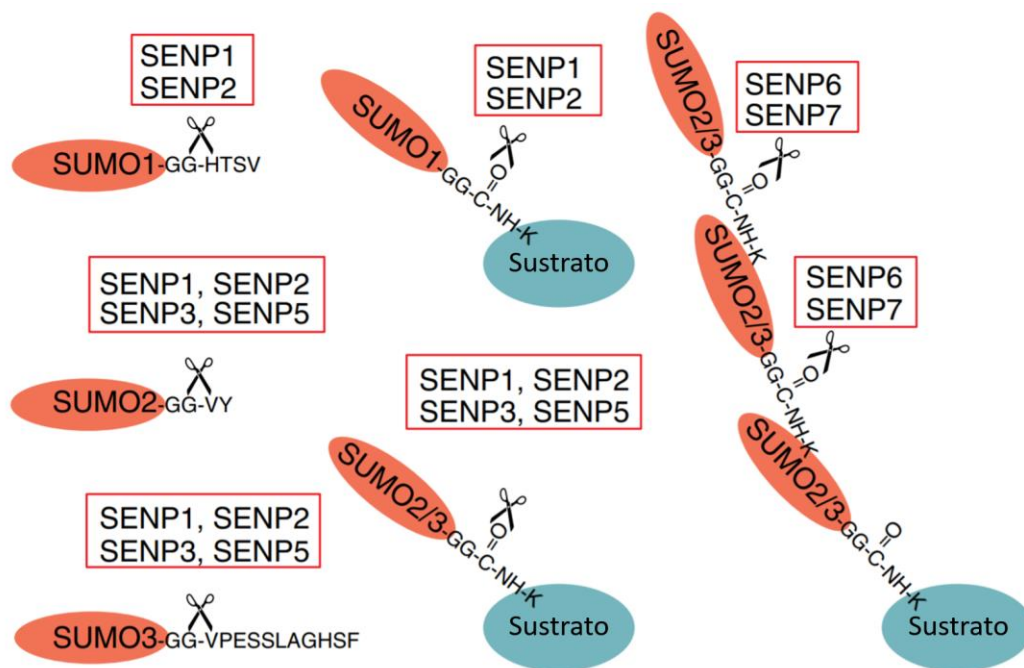


Figura 7. Actividades de desconjunción y procesamiento de SUMO de los diferentes miembros de la familia de proteínas SENP en los diferentes parálogos de SUMO. Las secuencias pertenecen a las moléculas de SUMOs humanas. A la izquierda se observa el proceso de maduración en el que se escinden los aminoácidos del extremo C-terminal, mostrándose así el motivo GG. En la parte central de la imagen se muestra la actividad de desconjunción principal de cada una de las SENP. En la parte de la derecha de la imagen se muestra la actividad de SENP6 y SENP7 de edición de cadenas de poli-SUMO unidas a las lisinas de las proteínas diana. Adaptada de Nayak & Müller, 2014.

Se ha descrito que la parte N-terminal de las diferentes proteasas Ubl y SENP regula la especificidad por los sustratos de SUMO *in vivo* promoviendo la interacción con la proteína diana específica y controlando la localización subcelular de las diferentes proteasas. De tal modo se ha descrito que SENP1 y SENP2 se localizan en poros nucleares, PML y

nucleoplasma, SENP3 y 5 se localizan en el nucléolo, nucleoplasma y mitocondrias. SENP6 y SENP7 se localizan en el nucleoplasma (Hickey, Wilson & Hochstrasser, 2012) (**Figura 8**).

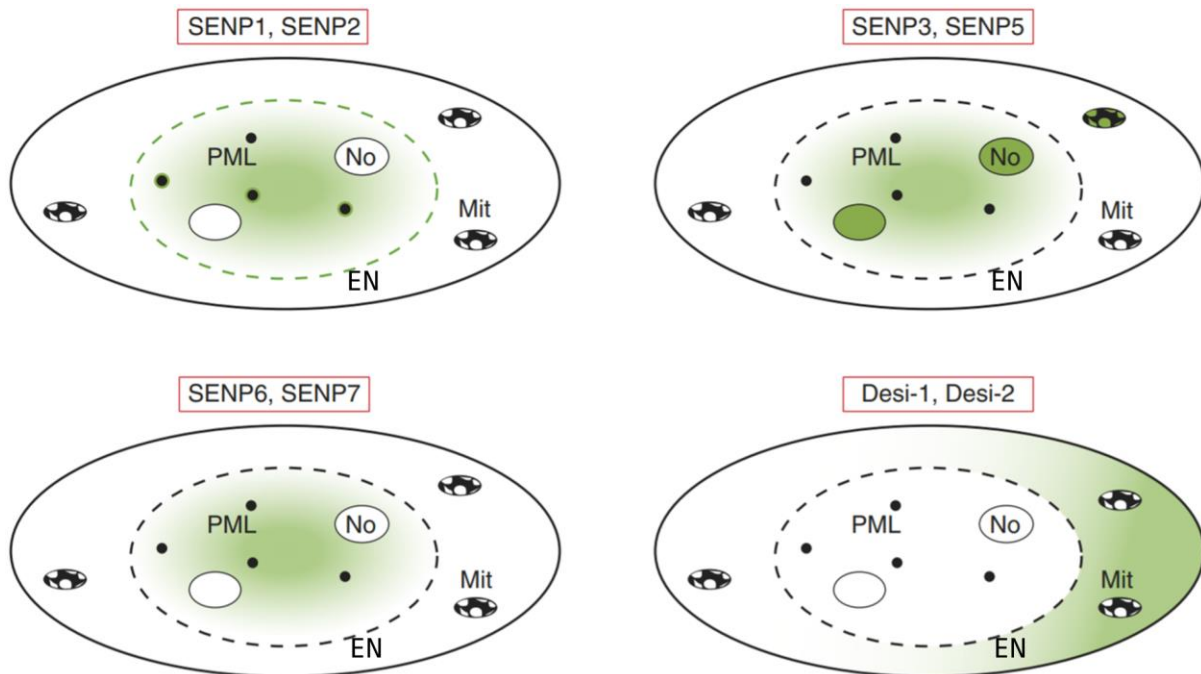


Figura 8. Representación esquemática de la distribución subcelular de las isopeptidasas de la familia SENP en mamíferos. La distribución predominante de las SENP representadas está indicada en color verde. Mit, mitocondria; EN, envuelta nuclear; No, nucléolo; PML, cuerpos PML o de la proteína de la leucemia promielocítica. Adaptada de Nayak & Müller, 2014.

2.4 Papel de SUMO en células en proliferación y en neuronas adultas

La SUMOilación ha sido asociada a múltiples funciones en las células eucarióticas, lo cual es lógico teniendo en consideración el alto número de proteínas diana de SUMO identificadas hasta la fecha y las implicaciones que la adición de un péptido de aproximadamente 100 aminoácidos tiene para una proteína, como por ejemplo la adición de nuevas superficies de interacción o incluso el bloqueo de ciertos dominios presentes en dicha proteína diana.

Los ejemplos de los distintos papeles de SUMO son numerosos: translocación de proteínas entre citosol y nucleoplasma, neurodegeneración, diferenciación neuronal, reparación de ADN, tráfico en sinapsis neuronales, enfermedades de Alzheimer y Parkinson,

plasticidad neuronal y un largo etc. (Droescher, Chaugule & Pichler, 2013; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016) (**Figura 9**). El papel más importante de los atribuidos hasta la fecha de SUMO podría ser el del control de factores de transcripción para el control de la expresión genética, ya que la modificación por SUMO1 se ha asociado típicamente a la represión transcripcional (Garcia-Dominguez & Reyes, 2009). Otro ejemplo conocido del papel de SUMO ha sido el hallazgo de su participación en los procesos de condensación, cohesión y segregación durante la mitosis y meiosis a través de la SUMOilación de factores que mantienen la estabilidad genética en la célula eucariótica (Seeler & Dejean, 2003). SUMO también participa en la translocación de proteínas, tal y como ocurre en el caso de la SUMOilación de RanGAP1 por SUMO1, la cual conlleva a la translocación de dicha proteína desde el citoplasma a los poros nucleares (NPC, *Nuclear Pore Complex*). A pesar de ello es necesario indicar que aunque se han encontrado numerosas proteínas SUMOiladas en el citoplasma, la SUMOilación se produce en el núcleo en la mayoría de los casos estudiados *in vivo* (Rodriguez, Dargemont & Hay, 2001).

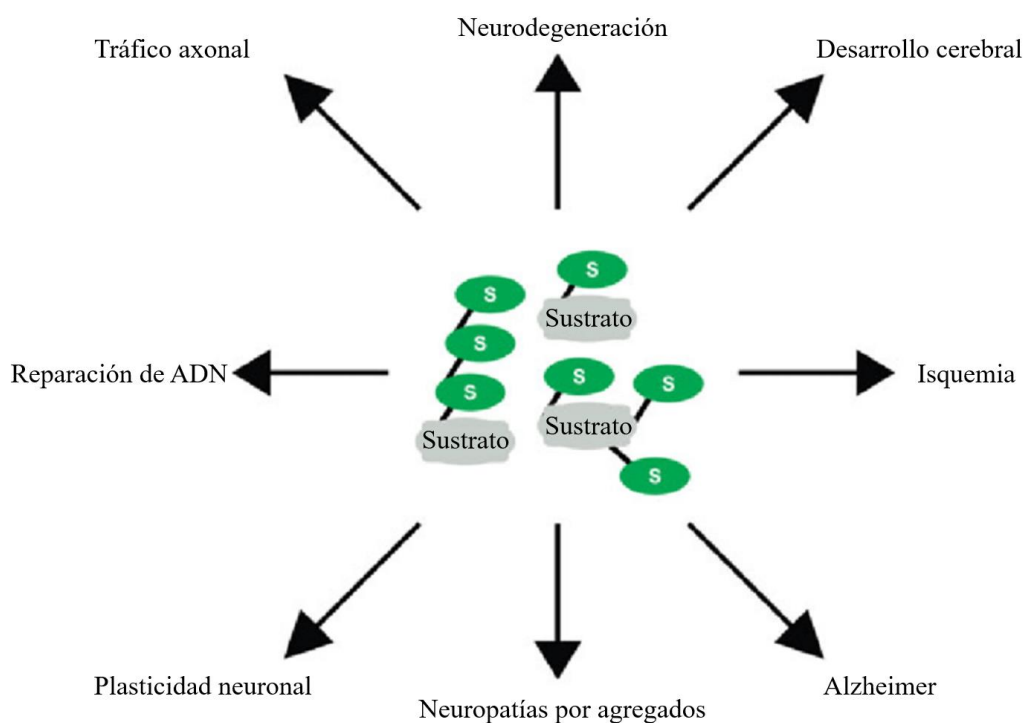


Figura 9. SUMO es un regulador de múltiples funciones y enfermedades en las neuronas. Se muestra una selección de funciones y enfermedades relacionadas con la ruta de SUMOilación en la bibliografía existente. Adaptada de Droescher, Chaugule & Pichler, 2013.

La adición de la molécula de SUMO no es solo importante por la propia función que este péptido tenga sobre la localización o la conformación de la proteína diana sino que también es decisivo el papel de regulación y estabilización de la proteína diana al producir el bloqueo de la lisina SUMOilada de forma que se eviten otras modificaciones como la ubiquitinación, fosforilación, acetilación, etc. Un ejemplo claro de dicho juego entre modificaciones proteicas es el caso de Ikb α , donde la SUMOilación inhibe la unión de la ubiquitina y con ello la degradación de dicha proteína (Desterro, Rodriguez & Hay, 1998).

Así mismo, se han descrito numerosas funciones de SUMO en neuronas adultas, como es el caso de la SUMOilación de componentes participantes en la plasticidad sináptica así como en el tráfico y liberación vesicular en la sinapsis (Martin *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2016). No solo se ha demostrado el papel de la modificación por SUMO de proteínas clave en neuronas adultas sino que también se ha encontrado que enzimas de la ruta de modificación por SUMO como por ejemplo Ubc9, SENP1 y SENP6 se encuentran en los sinaptosomas de ratas (Luo *et al.*, 2013).

Uno de los ejemplos más interesantes del papel que SUMO presenta en neuronas es su implicación en enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo el Alzheimer o el Parkinson, en las que parece que la SUMOilación evita la degradación de productos aberrantes de proteínas acumuladas en el tejido cerebral a través de la competencia con la ubiquitina y, por ello, la degradación mediada por el proteosoma. En el caso del Alzheimer, SUMO modifica importantes proteínas que al acumularse causan la progresión de esta patología y fallos en la sinapsis como es el caso del amiloide β y proteínas tau. De hecho, se ha demostrado la existencia de alteraciones en enzimas de la ruta de SUMOilación tan importantes como SAE2 o SENP3 en tejidos afectados por dicha enfermedad (Lee *et al.*, 2013).

La SUMOilación parece tener un papel fundamental en los procesos de diferenciación neuronal. Un ejemplo de ello es que la SUMOilación de Braf35 (también denominado HMG20B), una subunidad del complejo histona desmetilasa LSD1-CoREST, es necesaria para el mantenimiento del estado de proliferación de precursores neuronales (Ceballos-Chavez *et al.*, 2012). Así mismo, ha sido demostrado que el aumento de expresión de la proteasa de SUMO SENP7 es necesario para la consecución de la diferenciación neuronal (Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016). Estos últimos avances realizados en el estudio de la SUMOilación en condiciones de diferenciación neuronal fueron llevados a cabo gracias a la existencia de líneas de cultivos celulares diferenciables a neuronas mediante un protocolo con

ácido retinoico, como la línea celular P19, la cual sufre un proceso de neurodiferenciación tras la exposición a dicho compuesto.

La neurodiferenciación de células P19 ha sido descrita a través del uso de diferentes protocolos y medios de cultivo celular. Todos los protocolos para la diferenciación de células P19 consultados poseen la característica en común de la utilización de ácido retinoico. Existen variaciones en los medios utilizados, tal es así que se ha utilizado tanto DMEM (Habara-Ohkubo, 1996; Martins *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2010) como DMEM/F12 (1:1) (Pachernik *et al.*, 2005) así como α -MEM (Pyle, Roberts & Reuhl, 2001; Laplante, Béliveau & Paquin, 2004; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016). También existen variaciones en la suplementación con suero en los diferentes protocolos para la neurodiferenciación de células P19, habiendo sido usado tanto una combinación de 7.5 % de suero de ternera más 2.5 % de suero bovino fetal (FBS) (Xie *et al.*, 2010) como con 10 % FBS (Habara-Ohkubo, 1996; Martins *et al.*, 2005), 5 % FBS (Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016), 5 % de suero de vaca más 5 % de suero fetal bovino (Laplante, Béliveau & Paquin, 2004; Solari *et al.*, 2009) incluso sin suero (Pachernik *et al.*, 2005). Así mismo, considerándose el día 0 como el primer día en el que se exponen las células a ácido retinoico, también existen diferencias en cuanto a los días de tratamiento tras los que se considera la aparición de neuronas diferenciadas, siendo por ejemplo 6-7 días (Xie *et al.*, 2010), 6-8 días (Laplante, Béliveau & Paquin, 2004), 7 días (Habara-Ohkubo, 1996), 7-8 días (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983), 8 días (Martins *et al.*, 2005) e incluso hasta 10 días (Pachernik *et al.*, 2005). También existen variaciones en la concentración de ácido retinoico utilizada, que varía levemente entre 0.1 μ M (Pachernik *et al.*, 2005), 0.5 μ M (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983; Laplante, Béliveau & Paquin, 2004; Pachernik *et al.*, 2005; Solari *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016) y 1 μ M (Habara-Ohkubo, 1996; Pyle, Roberts & Reuhl, 2001; Martins *et al.*, 2005). Así mismo, también existen diferencias en el periodo de exposición a ácido retinoico ya que la diferenciación ha sido descrita tanto con el uso de este ácido durante 4 días (Laplante, Béliveau & Paquin, 2004; Pachernik *et al.*, 2005; Solari *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016), 3 días (Habara-Ohkubo, 1996) e incluso 2 días (Martins *et al.*, 2005). Existe consenso en el uso de placas de cultivo no adherentes durante el periodo de tratamiento con ácido retinoico como, por ejemplo, placas de Petri bacteriológicas (Jones-Villeneuve *et al.*, 1983; Habara-Ohkubo, 1996; Laplante, Béliveau & Paquin, 2004; Martins *et al.*, 2005; Solari *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016). Cuando se desea estudiar las neuronas diferenciadas

durante un periodo prolongado, a partir del día 8 suele ser común la adición de arabinósido C para evitar la proliferación de células no neuronales (Martins *et al.*, 2005). Los marcadores proteicos para diferenciar entre células P19 no diferenciadas y neurodiferenciadas varían, aunque entre los más utilizados se encuentra OCT4 para la señalización del estado de células no diferenciadas (Schoorlemmer *et al.*, 1995; Babuška *et al.*, 2010; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016) y β III tubulina neuroespecífica para la señalización del estado de células neurodiferenciadas (Martins *et al.*, 2005; Pachernik *et al.*, 2005; Solari *et al.*, 2009; Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016).

2.5 Papel de SUMO en isquemia

La isquemia cerebral aguda se presenta cuando el riego sanguíneo es insuficiente en una determinada zona del cerebro, disminuyendo el aporte de glucosa y oxígeno a las células adyacentes. En estas condiciones se producen graves daños en las neuronas que conducen a su muerte. Dependiendo de la zona infartada, las consecuencias en el paciente pueden llegar a ser realmente dramáticas: hemiplejias, parálisis facial, afasia, etc. (Luengo-Fernandez *et al.*, 2013). Debido a su frecuencia (tercera causa de muerte en personas mayores) y al grado de dependencia que puede adquirir el paciente, el impacto de esta dolencia en nuestra sociedad y sistema de salud es considerable. Por ello, desarrollar terapias y fármacos neuroprotectores son aspectos de enorme interés actual.

Los efectos de la patología cerebral producida debida a isquemia pueden ser provocados *in vitro* a través de diversos métodos. El más aceptado es la carencia de oxígeno y glucosa (*Oxygen and Glucose Deprivation*, OGD) (Villalonga, 2008), de forma que se pueden simular en laboratorio mediante el uso de medios sin glucosa e incubadores de hipoxia las condiciones de la isquemia cerebral, sirviendo así para generar modelos celulares de isquemia.

Recientemente se ha descrito que la SUMOilación de proteínas en respuesta a OGD tiene un papel neuroprotector. Una serie de observaciones recientes sustentan claramente el papel neuroprotector de la SUMOilación de proteínas. En el cerebro de ardillas, en las que se reduce dramáticamente el flujo sanguíneo en condiciones de hibernación (similar a OGD), los niveles de SUMOilación detectados mediante *Western blot* se incrementan significativamente (Lee *et al.*, 2007). De forma similar, en cerebro de rata tras un episodio de isquemia y en modelos celulares en condiciones de isquemia simulada, se observa un incremento en la

SUMOilación (Cimarosti *et al.*, 2008; Loftus *et al.*, 2009). Igualmente se han detectado incrementos de SUMOilación tras episodios de isquemia en neuronas espinales (Z. Wang *et al.*, 2013). La sobreexpresión de SUMO1 provoca una mayor resistencia frente a OGD en modelos celulares (Ja Lee *et al.*, 2009), mientras que la reducción de los niveles de SUMO mediante interferencia por ARN de cadena corta (siRNA, del inglés, *small interfering RNA*) reduce la supervivencia celular tras OGD, tanto en modelos celulares como en cultivos primarios de neuronas corticales (Ja Lee *et al.*, 2009; Datwyler *et al.*, 2011). La deSUMOilación por sobreexpresión de la proteasa SENP1 en neuronas de hipocampo sensibiliza las células considerablemente frente a OGD (Cimarosti *et al.*, 2012). Ratones transgénicos que sobreexpresan Ubc9 muestran mayores niveles basales de SUMOilación de proteínas, correlacionando con una mayor protección neuronal frente a OGD (Lee *et al.*, 2011). Además de ello, el factor transcripcional HIF-1, que es clave en la respuesta frente a condiciones de hipoxia, es sustrato de SUMO. El estado de SUMOilación de la subunidad HIF-1 α es crítico para su función ya que la SUMOilación de HIF-1 α induce su estabilización y actividad transcripcional (Bae *et al.*, 2004; Carbia-Nagashima *et al.*, 2007) y tiene efectos beneficiosos frente a hipoxia aguda en el tronco cerebral (Chan *et al.*, 2011).

Todos los precedentes mencionados sugieren fuertemente un papel neuroprotector de la SUMOilación de proteínas. Sin embargo, apenas se ha investigado la función del incremento generalizado de proteínas SUMOiladas (“SUMOiloma”) en la célula. SUMO regula múltiples procesos celulares, por lo que un incremento indiscriminado de la SUMOilación tendrá graves consecuencias para numerosos aspectos del metabolismo.

Hasta el momento se dispone de pocos conocimientos acerca de la identidad de las proteínas que se SUMOilan frente a condiciones de isquemia. En el año 2012 se llevó a cabo una proteómica utilizando la técnica de SILAC y células que sobreexpresaban de forma estable una versión etiquetada de SUMO3 que apuntó a incrementos de SUMOilación en condiciones de ROGD (recuperación tras OGD, *Recover from OGD*), y no de OGD, en un total de 22 proteínas (Yang *et al.*, 2012). Cabe destacar que diversos estudios han mostrado incrementos de SUMOilación por OGD y no por ROGD (Guo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Es por ello por lo que estudios más exhaustivos deberían realizarse en pro del aumento del conocimiento de este proceso debido a sus importantes repercusiones.

Además de las dudas acerca de las proteínas que están siendo SUMOiladas en procesos de OGD, solo existen unos pocos trabajos que intenten explicar los mecanismos moleculares

que puedan estar detrás de los incrementos de SUMOilación registrados en OGD. En uno de estos trabajos se demostró que la deSUMOilación mediada por SENP3 de la proteína DNMI1 (*DyNaMin-related protein 1*), una GTPasa que regula la fusión mitocondrial, promueve la muerte celular posterior a OGD (Guo *et al.*, 2013). En un estudio más reciente se ha comprobado que los incrementos de SUMOilación globales facilitan la neuroprotección multimodal llevada a cabo por la quercetina contra los efectos deletéreos de OGD y de la ROGD (Lee *et al.*, 2016).

Debido a los pobres conocimientos de biología molecular acerca del papel de SUMO en procesos con OGD, para actuar de forma específica sobre el sistema y minimizar los efectos secundarios, resulta primordial identificar cuáles son las proteínas SUMOiladas en dicho estrés. En definitiva, es esencial identificar las dianas de intervención terapéutica, tal y como se indica en una reciente revisión (Silveirinha, Stephens & Cimarosti, 2013).

La existencia de un compuesto químico que ha demostrado mimetizar las condiciones de hipoxia en la célula, el CoCl₂ (Jones & Bergeron, 2001), ha permitido la realización de algunos experimentos preliminares en los que se demuestra que aumenta la expresión de una de las ligasas de SUMO, PIAS4, tras el tratamiento con CoCl₂ (Cai *et al.*, 2010), por lo que sería una herramienta simple para realizar los estudios experimentales enfocados hacia el proceso de hipoxia exclusivamente. Además de producirse condiciones de OGD en la zona afectada, en la isquemia se produce un aumento del estrés oxidativo (Valko *et al.*, 2007). Después de la muerte provocada por la falta de oxígeno y glucosa, el estrés oxidativo es la siguiente razón por la cual se produce la muerte neuronal (Barone & Feuerstein, 1999; Castillo & Rodríguez, 2004). Existen evidencias de la modificación de los niveles de SUMOilación en respuesta a estrés oxidativo, como por ejemplo tras el tratamiento con el veneno arsenito, agente productor de estrés oxidativo (Yang, Sheng, Warner, *et al.*, 2008). Debido a que la SUMOilación está involucrada en la regulación de diversos procesos biológicos, el aumento masivo de SUMOilación post-isquémica en respuesta a arsenito también puede desempeñar un papel crítico en la respuesta final de las neuronas expuestas a isquemia transitoria. Por otro lado, desde ya hace tiempo se ha detectado, así mismo, un incremento masivo del nivel de SUMOilación tras exposiciones a altas temperaturas (43° C) (Saitoh & Hinchey, 2000). Temperaturas elevadas en pacientes en estados tempranos después de un evento isquémico han sido frecuentemente asociadas a mayores daños del tejido cerebral y, con ello, peores repercusiones clínicas por dicho infarto (Reith *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 1998; Boysen &

Christensen, 2001; Audebert *et al.*, 2004; Leira *et al.*, 2006; Idicula *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2008; Den Hertog *et al.*, 2011; Geurts *et al.*, 2016). Es por todo ello interesante estudiar la acción y regulación de ligasas y proteasas de SUMO en tratamientos con CoCl₂, arsenito e incrementos de temperatura para abarcar un mayor conocimiento del posible papel neuroprotector de las moléculas de SUMO durante el infarto cerebral.

2.6 Papel de las proteínas caspasas en OGD

Al realizar una oclusión de la arteria media cerebral (MCAo) en roedores se produce un área de isquemia cerebral que puede ser dividida entre un área isquémica central y un área de penumbra. En la central ocurre una rápida muerte celular mientras que en la penumbra ocurre un daño neuronal que se desarrolla más lentamente (Furlan *et al.*, 1996). Entre los factores contribuyentes a la progresión del infarto cerebral en el área de penumbra, tanto la apoptosis como la inflamación tienen un papel clave (Linnik, Zobrist & Hatfield, 1993; Du *et al.*, 1996; MacManus & Linnik, 1997; Becker, 1998). Las caspasas, una familia de cisteín-proteasas (Namura *et al.*, 1998), que incluyen numerosos miembros, tienen un papel esencial en los procesos de muerte por apoptosis. Numerosos grupos han estudiado los efectos de la inhibición de caspasas en la neurodegeneración provocada por isquemia usando un amplio espectro de inhibidores, como por ejemplo el Z-VAD o el Z-DVED-FMK. Estos, y otros ejemplos más han demostrado ser neuroprotectores en modelos de ratón de isquemia cerebral transitoria y permanente (Loddick, MacKenzie & Rothwell, 1996; H Hara *et al.*, 1997; H. Hara *et al.*, 1997; Bose *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1998; Ma, Endres & Moskowitz, 1998; Han *et al.*, 2002). Ha sido demostrado que la reacción inflamatoria, en la cual participan moléculas como IL-1 β , TNF- α o MCP-1, ocurre en la isquemia cerebral permanente y contribuye al daño neuronal (Liu *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1994; Schroeter *et al.*, 1994; Stroemer & Rothwell, 1998). El juego entre inflamación y apoptosis es un evento clave en la neurodegeneración inducida por isquemia y es que, de hecho, los primeros pasos de ambos procesos son comunes. Por ejemplo, la IL-1 β tiene ambas actividades, proapoptótica y proinflamatoria, y es madurada por el corte de la caspasa 1 (Rothwell & Relton, 1993). Por otro lado, la caspasa 1 es responsable de la activación de las caspasas “verdugos”, directamente relacionadas con la progresión de la apoptosis (Denner, 1999). Además de ello, existen evidencias de que la actividad de la caspasa 1 tiene un papel pivotante en la neurodegeneración isquémica ya que ratones caspasa 1 -/- o bien mutantes dominantes negativos del gen de la caspasa 1 son más

resistentes al daño isquémica que los silvestres (H Hara *et al.*, 1997; Schielke *et al.*, 1998; Rabuffetti *et al.*, 2000). La citoquina proinflamatoria IL-1 β , la cual es la principal diana de la caspasa 1, es rápidamente inducida por isquemia focal y global. La disminución de los niveles de expresión de IL-1 β provoca más de un 80 % de protección frente a daño isquémico (Di Cera, 2011).

La relación entre caspasas y OGD ha sido también estudiada, conociéndose que la glucosa promueve la muerte celular dependiente de caspasas después de un episodio transitorio de OGD en células SH-Sy5Y (Serra-Pérez *et al.*, 2008). Así mismo, se ha comprobado que la caspasa 11 (la cual necesita ser activada por la caspasa 1) media la muerte de astrocitos inducida por OGD (Fradejas *et al.*, 2010). Ratones genéticamente modificados deficientes en caspasa 3 poseen propiedades neuroprotectivas contra OGD (Le *et al.*, 2002). También ha sido evidenciada la activación de las caspasas 3, 7 y 9 en OGD tanto en neuronas como en la microglía y se ha comprobado que el proceso de muerte celular apoptótica por OGD es dependiente de caspasas ya que la adicción de un inhibidor de múltiples caspasas bloquea el componente apoptótico de la muerte celular mediada por OGD (Malagelada *et al.*, 2005).

2.7 Papel del factor de transcripción OCT4 en OGD y su relación con SUMO

El factor de transcripción OCT4 (*OCTamer-binding transcription factor 4*) también conocido como OCT-3 y como POU5F1 (*POU domain, class 5, transcription factor 1*) es un factor de transcripción que contiene un dominio POU (Okamoto *et al.*, 1990; Rosner *et al.*, 1990) a través del cual se une a una secuencia compuesta por 8 bases (ATGCAAAT) u octámero. Se localiza en promotores y *enhancers* de genes que regulan la pluripotencialidad (Herr & Cleary, 1995). OCT4 se expresa tan solo en células no diferenciadas (Palmieri *et al.*, 1994; Nichols *et al.*, 1998), de forma que se trata de un factor esencial para el mantenimiento de la pluripotencialidad celular. Ejerce su función a través de la activación de otros factores esenciales para el mantenimiento de la pluripotencialidad como Nanog y Sox2, concretamente a través de los extremos N y C-terminal, los cuales poseen función transactivadora (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005; Rodda *et al.*, 2005). Se ha descrito la existencia de sitios de unión para OCT4 en numerosos genes, como por ejemplo Utl1 (factor de transcripción de células pluripotentes) o Fgf4 (miembro de la familia FGF, necesario para el desarrollo embrionario), sobre los que actúa sobre represor o activador (Johnson, Rathjen & Rathjen, 2006).

La SUMOilación de OCT4 por SUMO1 está descrita durante diversos procesos. Ha sido demostrado que la SUMOilación por SUMO1 de OCT4 promueve su estabilización, unión al ADN así como la transactivación (Wei, Schöler & Atchison, 2007). De hecho, la SUMOilación reprime la expresión de Nanog a través de la modulación de los factores transcripcionales OCT4 y Sox2 (Y. Wu *et al.*, 2012). La proteína encargada de la deSUMOilación de SUMO1 en el caso de OCT4 es SENP1 (Y. C. Wu *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna evidencia de la SUMOilación de OCT4 por parte de SUMO2. Interessantemente, los niveles de OCT4 aumentan en condiciones simuladas de hipoxia, mediante la adición de cloruro de cobalto al medio celular (Yao *et al.*, 2014), por lo que sus niveles podrían variar en los procesos en los que la célula sufriera OGD, aunque todavía no ha sido estudiado. Interessantemente OCT4 parece estar implicado, además, no solo en el mantenimiento de la pluripotencia celular sino que también promueve la tumorigénesis e inhibe la apoptosis de células de cáncer cervical a través de la ruta microARN-125b/BAK1 (Y. D. Wang *et al.*, 2013).

2.8 Relación entre las proteínas SENP7, HP1 y OCT4

En los últimos años se ha descrito una característica muy peculiar acerca de SENP7 y su relación con la familia de proteínas de la heterocromatina HP1 (*Heterochromatin Protein 1*, *Chromobox Homolog*, CBX) en células de ratón, en la que se supone nada tiene que ver su actividad como SUMOproteasa y que ha cambiado considerablemente la idea que se tenía acerca de esta proteína. Existen 3 isotipos de HP1 denominados HP1 α , HP1 β y HP1 γ (Jones, Cowell & Singh, 2000). A partir de ahora, cuando mencionemos HP1 nos referiremos a la familia de proteínas de la heterocromatina, mientras que cuando hablemos de un isotipo concreto nos referiremos a este mencionando HP1 seguido de α , β o γ . HP1 es un componente de la heterocromatina (regiones de la cromatina más compactas y condensadas) altamente conservado entre especies, desde levaduras hasta mamíferos (Allshire & Karpen, 2008; Probst, Dunleavy & Almouzni, 2009), que mantiene la integridad del genoma a través de interacciones con diferentes proteínas. Las funciones de HP1 incluyen la represión de genes a través de la formación de heterocromatina, la activación y desactivación transcripcional, la regulación de la unión de complejos a los centrómeros y el secuestro de genes a la periferia nuclear, entre otras (Maison & Almouzni, 2004; Hiragami & Festenstein, 2005; Hediger & Gasser, 2006; Motamedi *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2009; Loyola *et al.*, 2009). HP1 posee un cromodominio

que reconoce la lisina 9 de la histona 3 trimetilada (H3K9me3) (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001; Jacobs & Khorasanizadeh, 2002) así como un dominio carboxiterminal CSD (*Carboxy-terminal ChromoShadow domain*) responsable de la dimerización de HP1, ya que crea una superficie hidrofóbica a través de la cual se unen motivos PxVxL presentes en las proteínas de unión a HP1 (HP1-binding proteins, HPBPs) (Smothers & Henikoff, 2000; Thiru *et al.*, 2004; Lechner *et al.*, 2005). En el año 2010 se llevó a cabo un avanzado estudio proteómico con HP1 α etiquetada con un FLAG en el que se identificaron 82 HPBPs (Nozawa *et al.*, 2010). Entre ellas, se encontró la SUMOproteasa SENP7. Al año siguiente fue descubierto que la SUMOilación de HP1 α promueve su unión a heterocromatina pericentromérica (Maison *et al.*, 2011), elevándose así la pregunta acerca de si la deSUMOilación de HP1 α podría favorecer el mantenimiento de esta en la cromatina. Fue unos meses más tarde cuando se confirmó que SENP7 era la responsable de la deSUMOilación de HP1 α *in vivo* (Maison *et al.*, 2012). Sin embargo, SENP7 no solo realiza esta actividad, sino que se comprobó que su interacción promueve el enriquecimiento de HP1 α en los dominios pericéntricos de la cromatina mientras que la disminución de los niveles de SENP7 deslocaliza HP1 α de la heterocromatina sin la afectación de los niveles de H3K9me3 (Maison *et al.*, 2012). Poco después se reveló que SENP7 presenta dos motivos de interacción con la proteína HP1 α que actúan como dos brazos que actúan a modo de candado (Romeo *et al.*, 2015) (**Figuras 10 y 11**), de forma que restringe la movilidad de HP1 α en los dominios pericéntricos. De esta forma, H3K9me3 es solo capaz de provocar un enriquecimiento en HP1 α a través del sistema candado que crea la unión con SENP7.

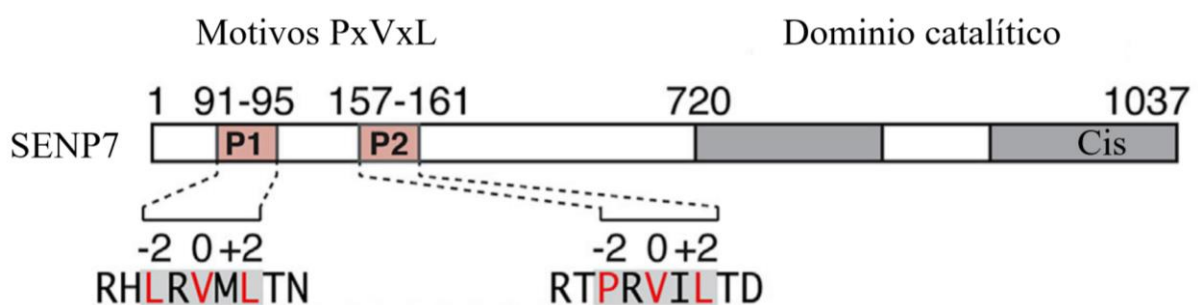


Figura 10. Representación esquemática de los dominios de SENP7 de ratón. La cisteína 979 indicada es la cisteína crítica para la actividad SUMOproteasa de SENP7. Los dos motivos PxVxL de SENP7 (P1 y P2) están indicados. Dichos motivos se corresponden con péptidos de interacción con HP1 (Smothers & Henikoff, 2000). Los residuos importantes para la interacción con HP1 α están coloreados en rojo dentro de la caja gris. Adaptada de Romeo *et al.*, 2015.

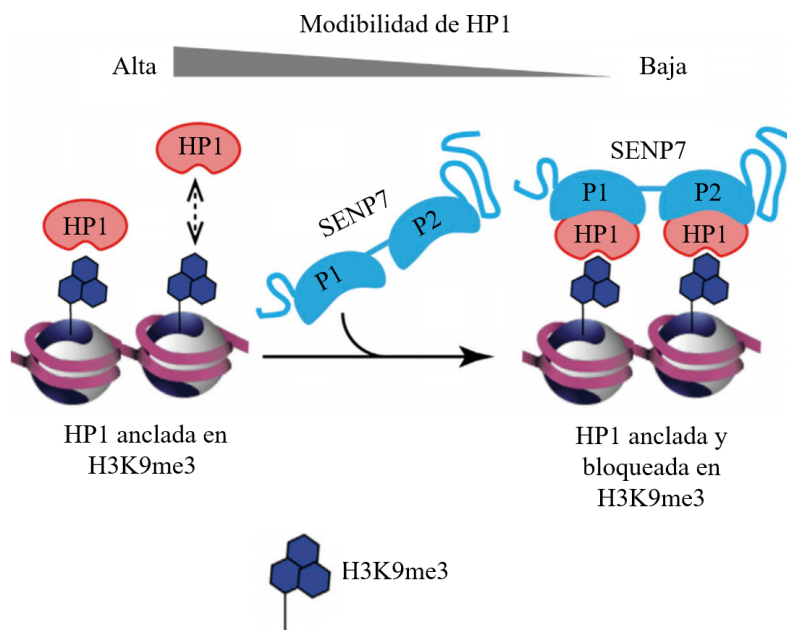


Figura 11. Los dos motivos PxVxL de SENP7 conectan HP1 α contiguas ancladas a nucleosomas modificados por H3K9me3 permitiendo el bloqueo de HP1 en la cromatina. Solo se representa la región de SENP7 que contiene el módulo con los dos motivos PxVxL, los cuales están indicados por P1 y P2. Adaptada de Romeo *et al.*, 2015.

Hace tan solo unos meses se ha demostrado que durante la reprogramación somática celular la disminución temprana de HP1 γ reduce la generación de células pluripotentes mientras que la disminución tardía de HP1 γ incrementa esta generación, con el consecuente cambio de localización desde el nucleoplasma al centrómero (Zaidan *et al.*, 2018). Tal y como se esperaba, la disminución de SENP7 produce las mismas consecuencias que la disminución de HP1 γ , indicando así la importancia de la separación de HP1 γ de la cromatina para la correcta adquisición del estado de pluripotencia. Interesantemente, en el mismo estudio se observó que HP1 γ interacciona con OCT4 independientemente de H3K9me2/3. De esta forma se propuso el modelo que aparece en la **Figura 12**. En dicho modelo SENP7 actuaría como un candado sobre HP1 γ unida a histonas con H3K9me2/3 en el estado de reprogramación intermedia así como en células no pluripotentes. Durante la reprogramación se produciría la pérdida del anclaje de HP1 γ por parte de SENP7, con lo que se elongaría la cromatina para transcribir los genes necesarios para el estado de pluripotencia celular, entre los cuales, tal y como se dijo anteriormente, se encuentran los genes activados por OCT4, factor esencial para el mantenimiento de la pluripotencialidad celular. Tal y como se ha indicado anteriormente, ha sido descrito que la SUMOilación de OCT4 incrementa su unión a ADN (Wei, Schöler &

Atchison, 2007), por lo que SENP7 podría promover la deSUMOilación de OCT4 de forma que impidiese la reprogramación celular a través de una segunda vía diferente a la del anclaje realizado sobre HP1 γ . Aunque SENP7 y OCT4 presentarían localizaciones similares en la célula, por el momento no ha sido descrito si SENP7 podría deSUMOilar OCT4.

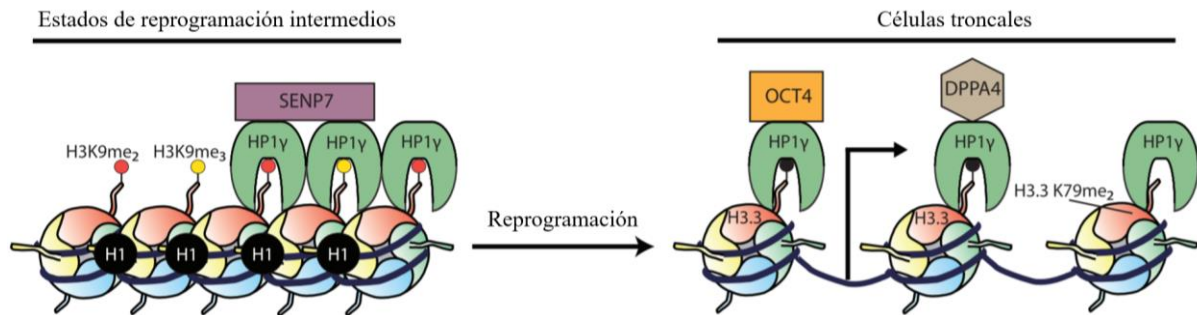


Figura 12. Modelo propuesto sobre las interacciones de HP1 γ . En células no pluripotentes y en estados de reprogramación intermedios HP1 γ interacciona con SENP7, la cual ancla HP1 γ a histonas H3K9me2/3 en la heterocromatina, señaladas en los círculos con color rojo y amarillo. Durante la reprogramación, la liberación de HP1 γ de su anclaje en la heterocromatina por parte de SENP7 es requerida para la adquisición del estado de célula pluripotente. En estas células pluripotentes, HP1 γ interacciona con H3K79me2. Además, OCT4 está entre los interactores de HP1 γ en células pluripotentes y esta unión es independiente de H3K79me3 pero podría ser dependiente de otras modificaciones (marcadas con círculos negros). Adaptada de Zaidan *et al.*, 2018.

2.9 Otras proteínas dianas de SUMO y su papel en procesos de muerte celular

2.9.1 La proteína NAB2

La proteína NAB2, miembro de la familia de proteínas NGFI-A binding (NAB), se ha descrito como un regulador crítico de la transcripción de genes durante el desarrollo y la función y muerte celular de células inmunes (Collins *et al.*, 2006, 2008; Laslo *et al.*, 2006; Balzarolo *et al.*, 2012). NAB2 es inducido a través de una variedad de estímulos extracelulares a través de receptores específicos localizados en la superficie celular. Factores extracelulares como por ejemplo factores de crecimiento o cambios en el microambiente celular como hipoxia o irradiación provocan aumentos de la expresión de NAB2 en células inmunes y no inmunes (Svaren *et al.*, 1996; Lucerna *et al.*, 2003). Se ha demostrado que NAB2 activa la expresión de TRAIL (TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand) (Balzarolo *et al.*, 2012, 2013). TRAIL es una proteína que funciona como ligando induciendo procesos de muerte celular por apoptosis

(Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996). A pesar de que se ha descrito que NAB2 es SUMOilado (García-Gutiérrez *et al.*, 2011), todavía no se ha estudiado si la SUMOilación de esta proteína podría alterar positiva o negativamente la función de NAB2 promoviendo la apoptosis celular.

2.9.2 El factor de transcripción SOX2

SOX2, cuyo nombre deriva del inglés “*Sex determining region Y-box 2*”, es un miembro de la familia de factores de transcripción SOX (Pevny & Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999; Kamachi, Uchikawa & Kondoh, 2000) crítico en la autorenovación de células troncales embrionarias (Masui *et al.*, 2007; Fong, Hohenstein & Donovan, 2008), mantenimiento de la pluripotencia y generación de células troncales inducidas (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Yamanaka, 2007). SOX2 presenta también un papel en la regulación de los procesos de apoptosis. Se ha demostrado que su silenciamiento causa parada en la proliferación y pérdida de la tumorigenicidad (Ben-Porath *et al.*, 2008; Bass *et al.*, 2009). Su expresión aberrante se ha demostrado en tumores neurológicos (Gangemi *et al.*, 2009), respiratorios (Güre *et al.*, 2000; Hussenet *et al.*, 2010), reproductivos (Jia *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011) y digestivos (Bass *et al.*, 2009; Saigusa *et al.*, 2009). SOX2 promueve la tumorigenicidad y la resistencia a drogas de quimioterapia (Tian, 2012; Rao *et al.*, 2013). La sobreexpresión de SOX2 ha demostrado promover la resistencia a tratamientos quimioterápicos como el paclitaxel en líneas celulares de cáncer de próstata debido a su acción promoviendo la proliferación celular y exhibiendo un efecto antiapoptótico (Li *et al.*, 2014). Es por ello que terapias dirigidas contra SOX2 podrían promover la eficiencia de quimioterapias en pacientes con resistencia a dichas drogas (Liu *et al.*, 2013). A pesar de que se ha descrito que SOX2 es SUMOilado (Tsuruzoe *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013), todavía no se ha estudiado en detalle si la SUMOilación de esta proteína podría alterar positiva o negativamente la función de SOX2 promoviendo la apoptosis celular.

3 Objetivos

Tal y como se ha indicado en la introducción, todos los precedentes mencionados sugieren fuertemente un papel neuroprotector de la SUMOilación de proteínas. Sin embargo, apenas se ha investigado la función del incremento generalizado de proteínas SUMOiladas y hasta el momento se dispone de pocos conocimientos acerca de la identidad de las proteínas que se SUMOilan frente a condiciones de isquemia. Por lo tanto, para actuar de forma específica sobre el sistema resulta primordial identificar cuáles son estas proteínas. Por ello, nuestro objetivo es identificar proteínas concretas que se SUMOilen en condiciones modeladas de isquemia, conocer los mecanismos implicados en la modificación, comprobar la SUMOilación de estas proteínas frente a isquemia en modelos celulares y verificar que el incremento específico en la SUMOilación de éstas tiene propiedades neuroprotectoras. Sólo de este modo se podrá abordar con precisión y eficacia el estudio de drogas terapéuticas como tratamientos de neuroprotección frente a isquemia que permitan modular estos procesos con efectos beneficiosos para la salud.

Para llevar a cabo esta tarea en primer lugar es esencial corroborar el aumento del nivel de SUMOilación de proteínas en respuesta al tratamiento OGD. Además, sería interesante estudiar cómo estos niveles van recuperándose tras suspender el tratamiento después de que la célula se vea sometida a este estrés. El estudio se realizará en células P19 de ratón ya que son fáciles de manejar y de diferenciar a neuronas.

En segundo lugar, para estudiar la regulación del proceso es fundamental identificar dianas de SUMOilación claras en respuesta a OGD, por lo que es esencial poner a punto una herramienta para caracterizar el “SUMOiloma”, es decir, las proteínas SUMOiladas en respuesta a OGD. Llevaremos a cabo esta aproximación proteómica con líneas celulares que expresen de forma estable moléculas de SUMO etiquetadas con una cola de histidina para purificar el SUMOiloma.

En tercer lugar, caracterizaremos mediante PCR en tiempo real el patrón de expresión de ligasas y proteasas de SUMO en condiciones normales de crecimiento y en respuesta a OGD. Esto nos permitirá conocer qué proteínas pueden estar implicadas en el proceso de señalización frente a esta respuesta.

En último lugar, en nuestro laboratorio también estamos interesados en conocer el papel que pueden tener los restos citotóxicos celulares que actúan en el infarto neuronal junto con los

procesos de hipoxia y falta de glucosa así como en estudiar la repercusión sobre la SUMOilación de otros estreses similares a OGD. Para ello, estudiaremos tanto la supervivencia celular en células P19 como la expresión de las proteínas clave del ciclo de SUMOilación tras tratamientos con arsenito y cloruro de cobalto a través de citometría de flujo y mediante qPCR respectivamente, así como después de dichos tratamiento, durante el proceso de recuperación.

En este contexto y en el marco del proyecto que presentamos proponemos los siguientes objetivos concretos a alcanzar:

1. Estudio del cambio en el nivel de SUMOilación de proteínas durante tratamientos de estrés simuladores de isquemia y tras la vuelta a condiciones normales en células P19.
2. Puesta a punto de un método de purificación del SUMOiloma utilizando la proteasa SENP1 en células P19.
3. Identificación del SUMOiloma mediante Espectrometría de Masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje (*Label-Free Quantification*) en tratamientos de estrés simuladores de isquemia en células P19.
4. Caracterización mediante qPCR del patrón de expresión de proteínas clave del ciclo de SUMOilación en respuesta a tratamientos de estrés simuladores de isquemia en células P19.
5. Estudio de la muerte celular durante tratamientos de estrés simuladores de isquemia así como durante la modificación de los niveles de expresión de las proteínas del ciclo de SUMOilación, de las proteínas modificadas por SUMO y de mutantes KR no SUMOilables en células P19.

4 Materiales

4.1 Organismos y condiciones de cultivo

4.1.1 Líneas celulares animales:

- Línea celular P19, derivada de un teratocarcinoma embrionario de *Mus musculus* (ratón casero) (McBurney & Rogers, 1982). Fue suministrada por el Dr. José Carlos Reyes Rosa (Laboratorio de Epigenética, CABIMER. Sevilla).
- Línea HS1, que expresa de forma estable SUMO1 etiquetado con una cola de 6 histidinas, la cual fue derivada de la línea de ratón P19, fabricada en nuestro laboratorio por Francisco de Paula Juárez Vicente.
- Línea A5, que expresa de forma estable SUMO2 etiquetado con una cola de 10 histidinas, la cual fue derivada de la línea de ratón P19, fabricada en nuestro laboratorio por Noelia Luna Peláez.
- Línea HEK293T, deriva de riñón embrionario humano (Graham *et al.*, 1977) y se utilizó principalmente para la expresión de proteínas. Fue suministrada igualmente por el Dr. José Carlos Reyes Rosa.
- Hela-His10-SUMO2, derivada de la línea HeLa, la cual fue utilizada como control positivo para los experimentos de realización de la línea A5. Fue suministrada por el Dr. Alfred Vertegaal.

4.1.2 Bacterias

- En este proyecto se han utilizado dos estirpes de *Escherichia coli* como herramientas para técnicas de clonación molecular del ADN así como para la inducción y purificación de proteínas, respectivamente: DH5 α y BL-21(DE3). Sus características genotípicas son:
 - DH5 α : *supE44 Δ alac U169 (Φ 80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*
 - BL21 (DE3): *hsdS gal (λ cIs857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1)*

4.2 Vectores de expresión en bacterias

La secuencia de GFP para la fusión SUMO1-GFP se derivó del vector pEGFP-C2 (Clontech). Las construcciones de expresión de proteínas de fusión a GST en bacterias estaban basadas en el vector pGEX-6P-3 (GE Healthcare). Para la construcción de la proteína GST-SENPC se utilizó la región carboxilo-terminal catalítica de la proteína SENP1 (SENPC). Todas las construcciones se realizaron mediante técnicas estándar de clonación molecular.

4.3 Vectores de transfección en líneas celulares de animales

Tabla 2. Lista de vectores de transfección en líneas celulares animales utilizados.

Molécula transfectada	Nombre	Promotor	Resistencia	Uso
Diferentes moléculas shARN	pTER	H1	Amp	Clonación de moléculas shARN
HIF1a mt (mutante que no se degrada en presencia de O₂)	pcDNA3-HIF1a mt	CMV	Amp	Sobreexpresión de HIF α
Nab2	RSV-FLAG-NAB2	RSV	Amp	Sobreexpresión de Nab2
Nab2 KRKR	RSV-FLAG-NAB2KRKR	RSV	Amp	Sobreexpresión del mutante de Nab no SUMOilable
OCT4	pRSV-FLAG-hOCT4wt	RSV	Amp	Sobreexpresión de OCT4
OCT4 KR	pRSV-FLAG-hOCT4KR	RSV	Amp	Sobreexpresión del mutante de no SUMOilable

PIAS1	RSV-HA-PIAS1	RSV	Amp	Sobreexpresión de PIAS1
PIAS2	RSV-HA-PIASx β	RSV	Amp	Sobreexpresión de PIAS2
PIAS3	RSV-HA-PIAS3	RSV	Amp	Sobreexpresión de PIAS3
PIAS4	RSV-FLAG-Pias4wt	RSV	Amp	Sobreexpresión de PIAS4
PIAS4 KR	RSV-FLAG-Pias4KR	RSV	Amp	Sobreexpresión del mutante de PIAS4 no SUMOilable
Plásmido vacío	pBluescript	T7	Amp	Control negativo
Plásmido vacío	pAdRSV-Sp	RSV	Amp	Control negativo
SENP1	pRSV-FLAG-SENP1	RSV	Amp	Sobreexpresión de SENP1
SENP3	pRSV-FLAG-SENP3	RSV	Amp	Sobreexpresión de SENP3
SENP7	pRSV-FLAG-SENP7	RSV	Amp	Sobreexpresión de SENP7
Dominio catalítico de SENP7	pRSV-Fl-Senp7CterNLS	RSV	Amp	Sobreexpresión del dominio catalítico de SENP7 fusionado a la NLS monopartita del virus SV40
SOX2	RSV-FLAG-Sox2wt	RSV	Amp	Sobreexpresión de SOX2

SOX2 KR	RSV-FLAG- Sox2KR	RSV	Amp	Sobreexpresión del mutante de SOX2 no SUMOilable
SUMO1 etiquetado con una cola de 6 histidinas	RSV-SUMO1	RSV	Amp	Sobreexpresión de SUMO1 así como creación de la línea estable HS1
SUMO2	RSV-His- SUMO2	RSV	Amp	Sobreexpresión de SUMO2
SUMO2 etiquetado con una cola de 10 histidinas	pLV-CMV- His10-SUMO-2	CMV	Amp	Creación de la línea estable A5
UBC9	pAdRSV-Sp- FLAG- Ubc9C93S	RSV	Amp	Sobreexpresión de Ubc9

Los plásmidos obtenidos por donaciones de otros laboratorios son: pBluescript (José Carlos Reyes Rosa, Laboratorio de Epigenética, CABIMER, Sevilla), pLV-CMV- His10-SUMO-2 (Laboratorio del Dr. Alfred Vertegaal, LUMC, Leiden, Holanda), cDNA3-HIF1 α mt (Laboratorio del Dr. Alberto Pascual Bravo, IBIS, Sevilla). El resto de las construcciones de los vectores de expresión fueron realizadas en nuestro laboratorio y se basaron en el plásmido pAdRSV-S (Giudicelli et al., 2003), cuya fuente fue el laboratorio del Dr. Patrick Charnay (IBENS, CNRS, Paris, Francia). Para realizarlas se utilizaron técnicas estándar de PCR para clonar las ORF concretas y posteriormente las mutaciones de las lisinas para crear los mutantes KR (mutantes no SUMOilables) se realizaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos que portaban la mutación correspondiente. Los mutantes KR de cada proteína contienen las mutaciones en los siguientes residuos de lisina: PIAS4KR: K35R (Ihara, Yamamoto & Kikuchi, 2005), SOX2KR: K247R (Guo *et al.*, 2009), NAB2: K379R, K517R (García-

Gutiérrez *et al.*, 2011), OCT4: K118R (Tsuruzoe *et al.*, 2006). Todos los plásmidos poseen secuencias de las proteínas de ratón (*Mus musculus*) excepto los de la proteína OCT4, el cual es de origen humano. Las moléculas de ARN de interferencia fueron clonadas en pTER.

4.4 Anticuerpos

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados.

Nombre	Antígeno	Especie	Fuente	Dilución
Anti-FLAG M-2 (F1804)	Péptido FLAG (DYKDD DDK)	Ratón, monoclonal	Sigma-Aldrich	1:2000 (WB)
NAB2 Anticuerpo (1C4): sc-23867	Nab2	Ratón, monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:1000 (WB)
Anti-SUMO 2+3 antibody [8A2] (ab81371)	SUMO2	Ratón, monoclonal	DSHB, Iowa, IA, USA	1:2000 (WB)
SUMO-1 Anticuerpo (D-11): sc-530	SUMO1	Ratón, monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:3000 (WB)
ab187126 anti-SEN7 C-terminal	SEN7	Conejo, policlonal	Abcam	1:1000 (WB de SEN7 endógena)
SAB4502484 SIGMA Anti-SEN7, C-Terminal	SEN7	Conejo, policlonal	Sigma-Aldrich	1:500 (WB de SEN7 sobreexpresada)

(DM1A) Anti-α-tubulin (T9026)	Tubulina	Ratón, monoclonal	Sigma-Aldrich	1:10000 (WB)
(H-134) Anti-Oct3/4 (sc-9081)	Oct-4	Conejo, polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:1000 (WB)
Anti-beta III Tubulin antibody (ab18207)	β III tubulina específica de neuronas	Conejo, policlonal	Abcam	1:2000 (WB)
MAB1536	HIF	Ratón, monoclonal	R&D Systems	1:5000 (WB)
Anti-SOX2 antibody [EPR3131] (ab92494)	SOX2	Conejo, monoclonal	Abcam	1:1000 (WB)
PA5-20954	PIAS4	Conejo, policlonal	Thermo Fisher Scientific	1:500 (WB)
N-CoR (C-20): sc- 1609	NCOR1	Cabra, policlonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500 (WB)
BRAF35 (4.21): sc- 53123	Braf35	Ratón, monoclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500 (WB)
GE27-4710- 01 SIGMA	Histidina	Ratón, monoclonal	Sigma-Aldrich (27-4710-01)	1:3000 (WB)

Anti-His Antibody				
Anti-mouse IgG A4416 HRP	Ratón	Cabra, policlonal	Sigma-Aldrich	1:10000 (WB)
Anti-rabbit IgG A6154 HRP	Conejo	Cabra, policlonal	Sigma-Aldrich	1:10000 (WB)
Anti-rat IgG A9037 HRP	Rata	Cabra, policlonal	Sigma-Aldrich	1:10000 (WB)
Anti-goat IgG A50-201P HRP	Cabra	Burro, policlonal	Bethyl Laboratories, Inc.	1:10000 (WB)

4.5 Cebadores para PCR en tiempo real o qPCR

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados en los experimentos de PCR a tiempo real.

Nombre	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
SUMO1	GGCGATAAGAAGGAAGGAGAA	CATTGGAACTCCCTGTCTTTG
SUMO2	GGACAGGATGGTTCTGTGGT	CGGAATCTGATCTGCCTCA
SUMO3	ATTCCGGTTTGATGGACAAC	GAGGCTGATCCTCCTGTCTG
SAE1	GCTGGACCACGAACAGGTAT	CCCACAGACCCAGTCTGAAT
SAE2	GCATCGTATGGGCCAAGTAT	GCTTCAGCCTCTGTTGGTTC
UBC9	GTCCCAACAAAGAACCCTGA	GGTGGTGAGGACGGATAGTC
PIAS1	TCACCTCACTTGTCGGATTG	CCCTTTGCTCGTAACCTCTG
PIAS2	AGTCCAACCAAAGGGGTTCT	CGTGTGGTGGAATGGTACTG

PIAS3	AGTTTCGATGCTGCCCTTTA	TCATCACAATCCGAACAGGA
PIAS4	CACTGAACTGGTCCCACAGA	CTGCACAGCTTTCCTCCAG
SENP1	CAGAGGCGACATTTTCAGCAC	AGAAGTCTCCCTGTGACC
SENP2	AAGGTTCTCGGCACCATTCTT	TTTGGCTGGGATCTCATCAGT
SENP3	TTTGACTCCCAGCGAACTCT	TTTGACTGCCTCTGCCTGTA
DESI1	GCGGTATTTCCAGCTGTACC	CAGGGAGGACAGGTATTCCA
SENP5	GGCGAGCTGATAATGGATGC	ACAAGTCCACCTTCTTCGTCC
SENP6	TGGAAGTGTGGTTCATGGGAG	ACCTTGGCCATGACTTAGCA
SENP7 (para todas las isoformas excepto X2)	ACAGTTCCAGGGTCAGCAGT	ATGGCCGCTTACACATTTTC
SENP7 isoforma 1	GTCGGCGAGCTTCATCAGA	TGGACAATGGTGACTGAGCA
SENP7 isoforma X3	GTCGGCGAGCTTCATCAGA	ATTTCTTAGGCTTCTTGTCAC TTC
RpLp0	GCCAGCTCAGAACACTGGTCTA	ATGCCCAAAGCCTGGAAGA
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT

4.6 Cebadores para PCR estándar

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos de PCR estándar.

Nombre	Secuencia
S7exon2-F	CGGCGAGCTTCATCAGAGAT

S7exon7-R	CTCCTCCATCATCACCCCTGC
S7exon5-F	TGGACGGACTTAGGACGAGA
S7exon6-R	TGCTCTGATTCAGGTTGGCT
S7exon17-F	TGGAGAAGGCATCAGATGAACT
S7exon20-R	CGTGGACACAGTTGAAGTGG
S7exon23-R	CCTGCTTAGGGACTTTGGGG

4.7 Moléculas de ARN interferente

Tabla 6. Secuencia de moléculas de ARN intereferente.

Nombre	Secuencia
sh control	CCATCAAGACTCATAGATG
sh SENP1	GGAAAGAGTTTGACACCAA
sh SENP3	GGAAGAGTCTGGTACTACA
sh SENP5	GCAGTTCCAGCTTAACCAA
sh SENP7	TCAGACTCATTGCCTTCGA

5 Métodos

5.1 Condiciones de cultivo

5.1.1 Condiciones de cultivo de bacterias

El medio de cultivo utilizado habitualmente para las estirpes bacterianas fue el medio Luria-Bertani (LB: 10 g/l de NaCl; 10 g/l de bacto-triptona; 5 g/l de extracto de levadura; 15 g/l de bacto-agar para el medio sólido.). El antibiótico utilizado para la selección de bacterias transformadas fue ampicilina (100 µg/ml). Los cultivos en medios líquidos crecieron en incubadores con una temperatura estable de 37° C y una agitación continua de 200 rpm. Para los cultivos en medio sólido se utilizaron estufas a 37° C.

5.1.2 Condiciones de cultivo de líneas celulares animales

Todas las líneas se mantuvieron en incubadores HEPA *Class 100* (Thermo), a 37° C y con una atmósfera húmeda de CO₂ al 5 %. Como medio de cultivo rutinario se utilizó *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* D6429 SIGMA provisto comercialmente de 4500 mg/l de glucosa, L-Glutamina, bicarbonato sódico y piruvato sódico suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (PAA Laboratories) y 10 ml/l de una solución de antibióticos compuesta por penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (10 mg/ml) (PAA Laboratories).

5.2 Técnicas de ADN/ARN

5.2.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante PCR utilizando el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) en el termociclador TC3000 (Techne). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores fueron sintetizados por la firma Sigma-Aldrich. Para una reacción típica se utilizaban concentraciones de 1 µM de cada cebador, 2 mM de cada desoxirribonucleótido y 1 mM de MgCl₂, así como 5 µl del tampón comercial 10X de la ADN polimerasa, de 20 a 50 ng de ADN molde, 2,5 U de ADN polimerasa y H₂O Milli-Q hasta un

volumen final de 50 µl. Los programas de PCR consistieron en un paso de desnaturalización a 94° C durante 5 min seguido de 30 ciclos de amplificación y un paso final de elongación a 72° C durante 10 min. Cada ciclo de amplificación fue iniciado por un paso de 1 min a 94° C seguido de un paso de hibridación de ADN a temperatura variable (dependiendo de la T_m de cada oligonucleótido) durante 1 min y un paso final de polimerización a 72° C durante un tiempo dependiente de la longitud del fragmento a elongar (1 min/Kb).

5.2.2 Manipulaciones enzimáticas de fragmentos de ADN

Para la digestión de fragmentos de ADN fueron utilizadas diversas enzimas de restricción (Fermentas, Takara, New England Biolabs) según las instrucciones del fabricante junto con el tampón y la temperatura adecuados para cada enzima. Para las clonaciones se utilizó 1 µg de ADN o 1/10 del volumen total de una PCR digerida con 5-10 unidades de enzima de restricción durante 2 h a la temperatura requerida. Antes de la ligación de ADN, la desfosforilación requerida de los vectores se realizó utilizando fosfatasa alcalina (Promega) según las instrucciones del fabricante. Para la ligación de fragmentos de ADN, la ligasa T4 de ADN (Promega) fue utilizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ligaciones fueron realizadas durante la noche a 15° C, siguiéndose posteriormente su transformación en bacterias *E. coli* DH5α competentes.

5.2.3 Método de aislamiento de ARN

El aislamiento de ARN de células animales se llevó a cabo con el sistema RNeasy® (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. La integridad de las muestras fue revisada mediante electroforesis.

5.2.4 Experimentos de qPCR

Antes de la síntesis de ADNc se eliminaba el ADN contaminante con el kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) según las instrucciones del fabricante. Para la obtención de ADNc a partir de ARN se utilizaba el sistema *Super-Script™ First-Strand Synthesis for qPCR* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron a partir de 1 µl de la reacción de retrotranscripción en un volumen total de 20 µl.

5.2.5 Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa

La electroforesis de muestras de ADN en geles de agarosa fue realizada para el aislamiento de fragmentos de ADN, reacciones de PCR y análisis de restricción de

construcciones de ADN. La electroforesis de fragmentos de ARN fue realizada para la monitorización del aislamiento de ARN. Para la electroforesis de ADN en geles de agarosa se utilizaron aparatos *Mini-Sub Cell GT* (Bio-Rad) y geles de agarosa al 0,7-2 % (p/v) en tampón Trisborato/EDTA (TBE) 0,5X (Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM pH 8). El porcentaje de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se pretendían analizar. A todos los geles se les añadió bromuro de 3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenantridio (etidio) a una concentración final de 5 µg/ml. Antes de realizar las electroforesis se añadía a cada muestra 1/10 de su volumen en tampón de carga 10X (azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xileno-cianol FF 0,25 % (p/v); glicerol 30 % (v/v)). La intensidad en el voltaje de la electroforesis fue entre 60 y 100V. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN analizados se utilizaba el patrón comercial *Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder*. El ADN se visualizó con un aparato transiluminador *Universal Hood II* (Bio- Rad), se fotografió con la ayuda de la aplicación informática *Quantity One 1-D Analysis Software* (Bio-Rad) y se imprimió con un equipo *Digital Graphic Printer UPD895MD* (Sony). Las electroforesis de ARN se realizaron de la misma manera que las de ADN, aunque el porcentaje de los geles de agarosa siempre fue del 1 % (p/v) y nunca se utilizó patrón.

5.2.6 Cuantificación de ADN/ARN

Para la cuantificación de ácidos nucleicos, se analizó 1 µl utilizando el espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher) teniendo en cuenta que los valores DO260 y DO280 no podían exceder de un valor de 2,0 para asegurar la correcta pureza del ácido nucleico.

5.2.7 Secuenciación de ADN

Las muestras de ADN fueron enviadas a SECUGEN S.L. (Madrid, España) para su secuenciación de acuerdo con los requerimientos de dicha compañía.

5.2.8 Transformación de ADN en bacterias

Se utilizaron dos métodos de transformación de *E. coli*, el choque térmico y la electroporación. Para la transformación en bacterias *E. coli* DH5α competentes por choque térmico se combinaba 0,1-0,5 µg de ADN plasmídico con 100 µl de células competentes. Tras 15 min en hielo, las células se calentaban a 42° C durante 2 min, se volvían a enfriar y se les añadía 900 µl de LB. Después, y en función del gen de resistencia que portase el plásmido

introducido, la mezcla se incubaba a 37° C entre 60 y 90 min. Finalmente las células se sembraban en cajas o matraces de LB con el antibiótico de selección correspondiente.

Para la electroporación en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) electrocompetentes se combinaban de 0,05-0,25 µg de ADN plasmídico con 50 µl de células electrocompetentes. Las células se colocaban en una cubeta *Gene Pulser* de 2 mm de separación entre electrodos (Bio-Rad) y se sometían a un choque eléctrico de 2500 V y 15 µF en un aparato *Easyject optima* (Equibio). Inmediatamente tras el pulso se añadía a la mezcla 1 ml de LB y se incubaba a 37° C entre 60 y 90 min. Finalmente las células se sembraban en cajas o matraces de LB con el antibiótico de selección correspondiente. La preparación de *E. coli* BL21 (DE3) electrocompetentes fue realizada tal y como se describe en (Green & Sambrook, 2012).

5.2.9 Aislamiento de ADN plasmídico bacteriano

Las extracciones a pequeña escala de ADN plasmídico se llevaron a cabo mediante el método de la lisis alcalina. Si se requería ADN de mayor calidad, por ejemplo para secuenciar, se utilizaba el kit *GFX Micro Plasmid Prep* (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para mayores cantidades de ADN de alta calidad se utilizaron rutinariamente los sistemas JET star (GENOMED), según las instrucciones del fabricante.

5.2.10 Purificación de ADN

La purificación de ADN de geles de agarosa o en el caso de que se requiriese ADN de alta calidad (por ejemplo para secuenciación) fue realizada con el kit *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit* (FAVORGEN Biotech Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.11 PCR en tiempo real, PCR cuantitativa o qPCR

Para la PCR en tiempo real se utilizaban placas de 384 pocillos (Applied Biosystems) y el kit comercial SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes en un termociclador ViiA 7 Real-Time PCR System Thermo Fisher Scientific. Se siguieron las instrucciones del fabricante. Para el análisis del ADNc de células P19, se analizaban 3 µl de una dilución 1/10 del ADNc total, por triplicado en cada caso. Para la normalización se utilizaba la expresión del gen *GAPDH* (GlicerAldehído-3-Fosfato DesHidrogenasa) (en los experimentos donde así se indique) o *RpLp0* (*Ribosomal Protein Large P0*) endógeno (en el resto de experimentos). El algoritmo para el análisis relativo está descrito en (Pfaffl, 2001). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich y testados mediante análisis de curva estándar con diluciones seriadas 10x de la muestra de ADNc. La eficiencia de amplificación adecuada se marcó en

valores entre $-3,3$ y $-3,4$. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C de 10 min, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno consistente en un primer paso a 95°C durante 15 s y un segundo paso a 65°C durante 1 min. El ciclo de disociación final fue de 15 s a 95°C , 1 min a 65°C , 15 s a 95°C y 15 s a 60°C , fue realizado para detectar posibles contaminantes.

5.3 Técnicas de cultivos celulares

5.3.1 Transfección transitoria de cultivos de células animales

Para la realización de transfecciones transitorias se utilizó Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) y su solvente correspondiente, OptiMEM® (Gibco). Las células P19 eran sembradas el día anterior a la transfección y cultivadas en medio normal durante todo el proceso. Esta se realizaba según las instrucciones del fabricante.

5.3.2 Protocolo para la neurodiferenciación de células P19

Para la obtención de neuronas diferenciadas se procedió de la siguiente manera: $1,5 \times 10^6$ células P19 se sembraban en cajas de cultivo no adherentes (placas de Petri para el cultivo de bacterias) con medio DMEM (D6429 SIGMA) suplementado con un 5 % de suero fetal bovino (v/v) y $0,5 \mu\text{M}$ de ácido retinoico trans (Sigma-Aldrich) durante 4 días, con un cambio de medio a los 2 días, obteniéndose así cuerpos embrioides formados por un centro de células mitóticamente activas rodeadas de células diferenciándose (**Figura 13**). Posteriormente se tripsinizaban las células y se sembraban a una densidad de 10^5 células por ml en placas adherentes con medio DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (v/v), sin ácido retinoico, hasta llegar a los 7 días desde el inicio del tratamiento con ácido retinoico, con cambio de medio cada dos días. En este momento las células alcanzan un estado avanzado de diferenciación y muestran dendritas y procesos axonales (**Figura 13**).

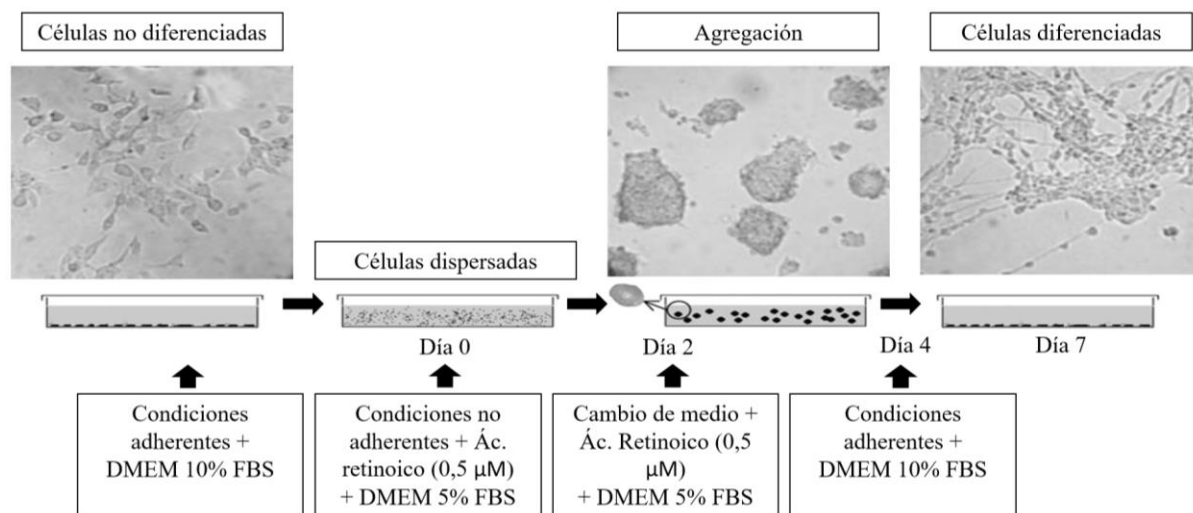


Figura 13. Protocolo con tratamiento con ácido retinoico para inducción de diferenciación neuronal en células P19. Las células P19 se cultivaron en suspensión con medio DMEM con 5 % de suero suplementado con ácido retinoico para inducir la respuesta primaria. Las células crecieron en estas condiciones durante 4 días (con reemplazo del ácido retinoico el día 2) en los cuales formaron cuerpos embrioides (señalado con una flecha) y la diferenciación inicial se llevó a cabo. Finalmente, las células P19 fueron disgregadas y sembradas en placas de adherencia con medio DMEM complementado con suero y sin ácido retinoico para llegar a la fase de diferenciación terminal, en la cual se observaron procesos axonales y dendríticos. Adaptada de Paquin et al., 2002 y Wu et al., 2009.

5.3.3 Condiciones de tratamientos de estrés celular

El tratamiento con CoCl_2 se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de $150 \mu\text{M}$ durante los tiempos indicados en el correspondiente apartado de resultados. Dicho compuesto fue preparado en agua purificada.

El tratamiento con arsenito se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de $100 \mu\text{M}$ durante los tiempos indicados en el correspondiente apartado de resultados. Dicho compuesto fue preparado en agua purificada.

El tratamiento con DMOG se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de $100 \mu\text{M}$ durante los tiempos indicados en el correspondiente apartado de resultados. Como control, en todos los experimentos se utilizaron cultivos a los que se añadió el mismo volumen de DMSO que el añadido de DMOG, ya que este compuesto fue diluido en DMSO.

Para producir condiciones de hipoxia se utilizó la cámara de cultivos Baker Ruskin's InvivO2 400 así como incubadores HEPA Class 100 (Thermo), seleccionando en ambos casos un nivel de oxígeno del 1 %. El medio de tratamiento OGD fue DMEM sin glucosa 11966025

de Thermo Fisher Scientific suplementado con piruvato sódico a una concentración final de 0.11 g/L (PAA Laboratories), un 10 % de suero fetal bovino (PAA Laboratories) y 10 ml/l de una solución de antibióticos compuesta por penicilina (100 U/ml) y estreptomina (10 mg/ml) (PAA Laboratories). De esta forma la única diferencia entre el medio OGD y el medio control en la composición fueron los niveles de glucosa. El medio OGD utilizado en el tratamiento era incubado durante la noche anterior al experimento dentro de la cámara de hipoxia para equilibrar los niveles de oxígeno adecuados. Para realizar el tratamiento se lavaba la placa de cultivo 3 veces con medio OGD y posteriormente las células se dejaban incubando en dicho medio en la cámara de hipoxia en los tiempos indicados en el apartado de resultados.

El tratamiento de hipertermia se realizó incubando las células en incubadores HEPA Class 100 (Thermo), a 42° C y con una atmósfera húmeda de CO₂ al 5 %.

5.4 Métodos de síntesis, purificación y análisis de proteínas

5.4.1 Inducción de la síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli*

Para la expresión de polipéptidos fusionados con la proteína Glutación S transferasa (GST) se clonaba la secuencia del polipéptido de interés en el vector pGEX-6P-3 (GE Healthcare) se transformaba la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* y se inducía la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG. El ensayo a pequeña escala tenía como objetivo comprobar que la inducción de la síntesis de la proteína funcionaba correctamente. Para ello se electroporaba un vial de la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* con el plásmido de interés y se inoculaba 1/10 del volumen en 25 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se dejaba crecer el cultivo hasta una DO₆₀₀ de 0,6, se recogía 1 ml como control (muestra 1) y al resto se le añadía IPTG 1 mM para inducir la síntesis de la proteína de fusión. Tras 2 h de inducción, se recogía 1 ml del cultivo (muestra 2). Se añadían entre 300 y 500 µl de tampón de carga desnaturante 1X y las muestras se sometían a una electroforesis en gel de acrilamida y en presencia de SDS (SDS-PAGE) para comprobar *de visu* la inducción de la síntesis en la muestra 2. Si se observaba que la proteína de fusión se sintetizaba en buena cantidad se podía proceder a su purificación repitiendo previamente el proceso de inducción a gran escala. En

estos casos se solía inocular una fracción del volumen del vial completo de BL21 (DE3) por cada 250 ml de LB.

5.4.2 Purificación de Proteínas Recombinantes

Las células se resuspendían en 30 ml de PBS (NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄·12H₂O 10 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM) suplementado con 1 mM del inhibidor de proteasas PMSF y se rompían mediante 6 pulsos de ultrasonidos de 30 s cada uno, separados por intervalos de reposo de la misma duración y siempre en frío para mitigar el calentamiento. Los ultrasonidos se suministraban mediante un dispositivo *Digital Sonifier S-450D* (Branson) dotado con una bocina de 13 mm y una micropunta de 3 mm. La amplitud del aparato se fijaba al 40 % W y Hz. Tras centrifugar a 15000 x g y 4° C durante 10 min las proteínas recombinantes fusionadas con la GST se purificaron a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad por glutatión con la matriz *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. En el caso de la proteína GST-SUMO-GFP, para su elución se utilizó tratamiento con la enzima PreScission (GE Healthcare), siguiendo instrucciones del fabricante para la obtención de la proteína recombinante SUMO-GFP sin la proteína GST.

5.4.3 Tratamiento con SENPC

El tratamiento con la proteína SENPC se realizó añadiendo a la reacción 500 ng de sustrato purificado (SUMO-GFP), 1 µg de proteasa GST-SENPC purificada, el tampón de SENPC (50 mM Tris pH8, 50mM NaCl, 2 mM DTT, 5 % glicerol) y H₂O Milli-Q hasta un volumen final de 30 µl. La reacción se llevaba a cabo en tubos de 1,5 ml a 37° C durante los tiempos indicados para cada experimento. La muestra se sometía a SDS-PAGE y se analizaba por *Western blot*.

5.4.4 Purificación del SUMOiloma con la proteasa SENPC

Tras un lavado con PBS 1X, las células de una caja de 10 cm de diámetro (5·10⁶ células) se desprendían mediante un rascador en presencia de 1 ml de PBS. Después, se centrifugaban durante 2 min a 10.000xg y el *pellet* se congelaba en N₂ líquido y se guardaba a -80°C. Posteriormente se añadía 1 ml de tampón de urea (Tris 10 mM (pH 8); urea 8 M) y si el extracto resultaba demasiado viscoso se podía terminar de homogeneizar con jeringuillas de 1 ml. La muestra se centrifugaba a 10.000xg durante 10 min. Posteriormente se añadía al *pellet* 75 µl de matriz de histidina (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma) en un volumen de 1 ml de tampón de urea. Se realizaba entonces la unión durante 30 min. Posteriormente la muestra se

centrifugaba durante 30 s a 5.000xg. En la primera centrifugación se descartaba el sobrenadante y se añadía una mezcla 1:1 tampón de urea:tampón SENP1. En la segunda centrifugación se descartaba el sobrenadante y se añadía una mezcla 1:3 tampón de urea:tampón SENP1. En la tercera centrifugación se descartaba el sobrenadante y se añadía solamente tampón para la SENP1. En la cuarta centrifugación se descartaba el sobrenadante y también se añadía solamente tampón para la SENP1. De esta manera se cambió el tampón en el que se encontraba la matriz de histidinas. Si era de interés para la comprobación del método, los sobrenadantes producidos en las anteriores centrifugaciones podían recogerse para su posterior estudio a través de *Western blot* (**Figura 19A**). A posteriori el precipitado de la cuarta centrifugación se sometía a tratamiento con SENPC durante 45 min. La muestra podía someterse a cromatografía de afinidad por glutatión con la matriz *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) durante 1 hora para eliminar la proteína GST-SENPC. Posteriormente se añadía Laemmli a la muestra. Se centrifugaba a 10.000xg durante 1 min. El sobrenadante se observaba mediante coloración en *Coomassie blue* o *Western blot*.

5.4.5 SDS-PAGE

Se siguió el protocolo de Laemmli para geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Gel de empaquetamiento: Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8); poliacrilamida (Acrilamida y bis-Acrilamida 29:1) 4 % (v/v); SDS 0,1 % (p/v). Se polimerizó con APS 0,1 % (p/v) y TEMED 0,05 % (v/v). Gel de separación: Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8); poliacrilamida (acrilamida y bis-acrilamida 29:1) 7-12 % (v/v); SDS 0,1 % (p/v). Se polimerizó con APS 0,1 % (p/v) y TEMED 0,05 % (v/v)). Para preparar los extractos de células animales apropiados para esta técnica, las células se recogían y resuspendían con tampón de urea (Tris 10 mM (pH 8); urea 8 M) para los experimentos relativos al método de purificación del SUMOiloma utilizando SENPC. Para los experimentos relacionados con caspasa 1 en los que así se indica las células se recogían y resuspendían con tampón de reacción de caspasa 1, compuesto por 50 mM Hepes, pH 7,2, 50 mM NaCl, 0,1 % Chaps, 10 mM EDTA, 5 % glicerol y 10 mM DTT. En el resto de experimentos las células se recogían en *IP buffer* (0,01 % (w/v) SDS, 1,1 % (v/v) Triton X-100, 1,2 mM EDTA pH 8,0, 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1, 167 mM NaCl) suplementado con inhibidores de proteasas (*cOmplete™*, *Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma-Aldrich, Inc.). Si se trataba de células de crecimiento adherente, antes era necesario desprenderlas de sus cajas. Para ello, y tras un lavado con PBS 1X, se rascaba la superficie de las mismas con un trozo de goma plana y estéril, en presencia de este mismo tampón. Si el extracto resultaba demasiado viscoso, se podía terminar de homogeneizar con

jeringuillas de 1 ml antes de proceder a su cuantificación. Para asegurar la desnaturalización proteica, las muestras se hervían durante 5 min en tampón de carga desnaturalizante 1X justo antes de ser aplicadas al gel (Tampón de carga desnaturalizante 4X: Tris-HCl 0,2 M (pH 6,8); glicerol 32 % (v/v); SDS 6,4 % (p/v); 2-mercaptoetanol 16 % (v/v); azul de bromofenol 0,005 % (p/v)). En los experimentos de *Western blot* realizados para la verificación de la SUMOilación de las proteínas halladas en la proteómica realizada con HIS-SUMO2 fue necesario concentrar la muestra tras los ensayos de *pull-down* utilizando filtros *Microcon® Centrifugal Filters YM-3*. Se añadieron los siguientes patrones de masas moleculares: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* (Bio-Rad Laboratories), con proteínas entre los 97,4 (Fosforilasa B) y los 14,4 kDa (Lisozima), *SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard* (Thermo Fisher Scientific), con 10 polipéptidos en el intervalo de 4 a 250 kDa, y *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories), con pesos moleculares 10–250 kD. Los geles se colocaban inmersos en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM (pH 8,3); SDS 0,1 % (p/v)). Las proteínas se visualizaban tras incubar el gel en una solución de azul de *Coomassie* a RT (*Coomassie* R-250 (SIGMA) 0,1 % (p/v); ácido acético 10 % (v/v); metanol 40 % (v/v)), durante 15 min y en agitación suave. El exceso inespecífico de tinción se contrarrestaba con 2 o 3 lavados con la solución desteñidora (ácido acético 10 % (v/v); metanol 40 % (v/v)).

5.4.6 Determinación de la Concentración de Proteínas

Los extractos de células para SDS-PAGE se cuantificaron según el método de Bradford, usando el reactivo de Bio-Rad según las instrucciones del fabricante. Para las rectas patrón se utilizaban cantidades crecientes de una solución comercial de BSA de concentración conocida (TaKaRa).

5.5 Métodos inmunológicos

5.5.1 Experimentos de *Western blot*

Para realizar los ensayos de *Western blot*, en vez de teñir las proteínas analizadas mediante SDS-PAGE, éstas se transferían a una membrana de PVDF (Biorad). La transferencia

se llevaba a cabo con el aparato Trans-Blot Transfer Cell (BIORAD) con una potencia marcada de 90 V durante 1,5 h o bien, para proteínas de alto peso molecular, 20 V durante 17 h. El proceso se verificaba tiñendo las proteínas de la membrana con una solución de rojo Ponceau S (Solución de rojo Ponceau S: Ponceau S (SIGMA) 0,1 % (p/v); ácido acético 5 % (v/v)), tras lo cual se añadía solución de bloqueo durante 1 h (Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) 5 % (p/v) en solución de lavado o BSA (SIGMA) 5 % (p/v) en solución de lavado). Los anticuerpos contra la proteína problema (anticuerpos primarios) se añadían en la misma solución, y se dejaban actuar *overnight* en una cámara húmeda. Posteriormente, la membrana se lavaba durante 3 periodos de 8 min con solución de lavado (Solución de lavado (PBT): monolaurato de polioxietilensorbitano (TWEEN-20) 0,1 % (v/v) en PBS 1X.) y se incubaba de nuevo durante 1 h con anticuerpos conjugados con peroxidasa, capaces de reconocer la región constante de los anticuerpos primarios. Tras 3 nuevos lavados, la membrana se revelaba con el sistema de inmunodetección quimioluminiscente *ECL Plus Western blotting Detection System* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de la señal luminosa se utilizaban películas fotográficas *Hyperfilm MP* (GE Healthcare) y el aparato *Hyperprocessor SRX-101A* (GE Healthcare), así como el *ChemiDoc™ Imaging Systems* de Bio-Rad.

5.6 Métodos de medida de viabilidad celular

Para este propósito se contó con tres métodos diferentes de medida de la supervivencia celular: método con la enzima LDH, método con anexina y método con yoduro de propidio.

5.6.1 Método con anexina-yoduro de propidio

La adquisición de cambios en la superficie celular es un paso crítico en el proceso de apoptosis. Dichos cambios implican emergencia de nuevas glicoproteínas como la trombospondina, pérdida de la asimetría en la membrana celular, cambios en la hidrofobicidad y carga de la superficie de la célula, así como pérdida de restos de ácido siálico en las cadenas de dichas glicoproteínas. En las células sin estrés, los lípidos de la membrana plasmática se distribuyen en ella de forma asimétrica, de modo que en la cara interna se localizan los

fosfolípidos aniónicos como por ejemplo la fosfatidilserina (PS). En la cara externa se localizan fundamentalmente los fosfolípidos neutros. En las primeras etapas de la apoptosis (apoptosis temprana, en la cual todavía se mantiene la integridad de la membrana plasmática) se produce una traslocación de PS hacia la cara externa de la membrana, exponiéndola al exterior. La proteína anexina-V posee una alta afinidad por la PS, por lo que ésta se une a ella cuando es accesible, en el exterior, de tal manera que es un método habitual para discriminar entre células normales y apoptóticas. Para detectar la apoptosis se utilizó el kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* (Immunostep), en el cual la anexina-V está conjugada con un fluorocromo (Isotiocianato de fluoresceína, FITC), pudiendo ser detectada su fluorescencia a través de citometría de flujo. Debido a que la membrana celular en necrosis se permeabiliza, las células necróticas también pueden ser teñidas con anexina. Para diferenciarlas se utiliza el colorante de unión al ADN yoduro de propidio (IP), el cual tiñe solamente las células con la membrana permeabilizada. De esta manera es posible distinguir en el cultivo entre los siguientes tipos celulares: Células viables (no teñidas), células en apoptosis temprana (unen anexina pero excluyen IP), células en apoptosis tardía (incorporan tanto anexina como IP) y células necróticas (incorporan solo IP).

Para la recogida y procesamiento de células se procedió de la siguiente manera: Se recogía el medio de cultivo de cada placa (el cual contenía las células que se despegan por los diferentes procesos de muerte celular) y con este mismo medio se levantaban las células adherentes a través de levantamiento mecánico absorbiéndolo en repetidas ocasiones hasta la visualización del correcto levantamiento de todas las células adherentes así como de la correcta homogenización de la suspensión celular. Posteriormente las células se centrifugaban a 500 g durante 5 min. El *pellet* resultante era resuspendido en PBS para lavar restos del medio de cultivo. Posteriormente las células se volvían a centrifugar a la misma velocidad y tiempo y se resuspendían finalmente en tampón de unión a anexina a una concentración de 100.000 células/ml. En el siguiente paso se añadían 5 μ l de anexina y 5 μ l de yoduro de propidio por cada 100 μ l de suspensión celular. Posteriormente las células eran incubadas durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para algunos experimentos se utilizó solo tinción con yoduro de propidio. En este caso se procedió de igual manera que en el anterior, pero las células eran resuspendidas en PBS en vez de en tampón de unión a anexina. Finalmente las muestras se analizaban en un citómetro *BD FACSCalibur* (BD Biosciences). En primer lugar las células eran seleccionadas según la detección de tamaño (*Forward Scatter, FSC*) y complejidad o granulosidad celular (*Side Scatter, SSC*) característicos de la línea celular P19. La emisión de

luz de excitación fue de 488 nm con un láser de argón. La señal FITC (fluorescencia verde) fue detectada a 518 nm, y el log de fluorescencia se representó en el eje X. La señal del IP (fluorescencia roja) era detectada a 620 nm y el log se representaba en el eje Y. De esta forma el gráfico resultante (*dot plot*) estaba dividido en cuatro cuadrantes: en el cuadrante superior izquierdo se visualizaban las células necróticas, en el superior derecho las células apoptóticas tardías, en el inferior izquierdo las células vivas, mientras que en el inferior derecho aparecían las células en apoptosis temprana (**Figura 14**).

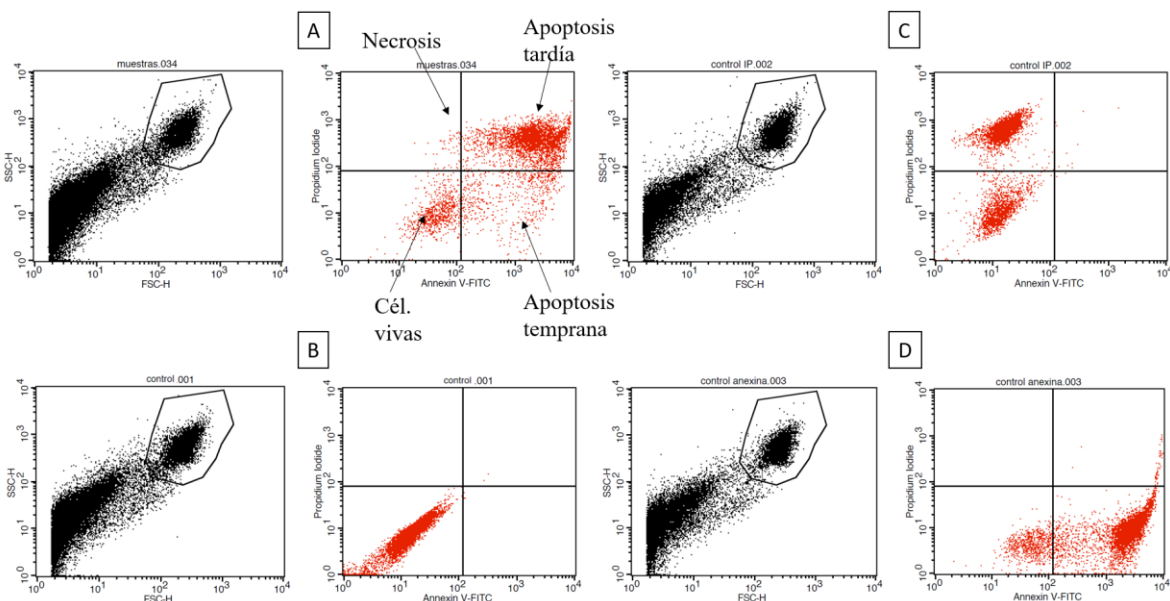


Figura 14. Representación de un análisis aleatorio de citometría (A) junto con los controles de células sin marcar (B), marcadas únicamente con IP (C) o tan solo con anexina (D). En la figura (A) se muestra el resultado de un análisis aleatorio de citometría en el que se diferencian células necróticas, apoptóticas y vivas. En el control sin añadir IP ni anexina (B), todas las células se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo ya que las células no muestran fluorescencia para el canal de IP ni tampoco para el canal de anexina. Se observa cómo en el control de células apoptóticas teñidas con IP (C) una gran parte de la población se encuentra en el cuadrante superior izquierdo al ser positivas para el canal de IP, mientras que con las células apoptóticas teñidas únicamente con anexina (D) una gran parte de la población se encuentra en el cuadrante inferior derecho, correspondiente al de células con anexina.

5.6.2 Método con LDH

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una oxidoreductasa citoplasmática que cataliza la interconversión entre lactato y piruvato. En los organismos animales, cuando un tejido es dañado sus células liberan la enzima al torrente circulatorio, donde es detectada en niveles más

altos de lo normal. Por ello, la LDH es medida habitualmente en práctica clínica para evaluar la presencia de daño celular o tisular. Así, valorando la cantidad de LDH liberada al medio extracelular, se puede medir la citotoxicidad de un determinado tratamiento. Los niveles de dicha enzima son evaluados espectrofotométricamente con un kit comercial (*Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific) ya que la LDH cataliza la reducción de NAD^+ a NADH en presencia de lactato y dicha formación puede medirse con la reacción acoplada en la que la sal de tetrazolio INT es reducida hasta un producto de color rojo, el formazán, el cuál se cuantifica por espectrofotometría. Para realizar dicho ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante. En primer lugar se extraían 50 μl de medio de la placa de células y se añadían a una placa de 96 pocillos de poliestireno (M2186 SIGMA). A continuación se añadían 50 μl de la mezcla de reacción del kit, el cual contenía los componentes químicos anteriormente mencionados, y se incubaba durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se añadían 50 μl de la solución “*stop*” para parar la reacción enzimática y se medía la absorbancia a 490 y 680 nm. El valor obtenido a 680 nm era restado al obtenido en 490 nm. La citotoxicidad se calculaba a través de la fórmula representada en la **Figura 15**. Finalmente los resultados eran referenciados a los obtenidos en la transfección del plásmido control.

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{Actividad LDH en células tratadas} - \text{Actividad LDH espontánea}}{\text{Actividad LDH máxima} - \text{Actividad LDH espontánea}} \times 100$$

Figura 15. Fórmula utilizada para el cálculo de la citotoxicidad en un cultivo celular. La actividad LDH en células tratadas es la medida de la cantidad total de enzima LDH del medio en las células transfectadas con un plásmido determinado. La actividad LDH espontánea es la cantidad de enzima LDH encontrada en el medio en células control, es decir, sin exposición a OGD. La actividad LDH máxima es la cantidad de enzima LDH hallada en células tratadas con la solución de lisis celular del kit *Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific.

5.7 Espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje (*Label-Free Quantification*)

El método de captura por afinidad (“*pull-down*”) para realizar el aislamiento de las proteínas SUMOiladas en la línea A5 se realizó según el protocolo detallado en el artículo

Label-Free Identification and Quantification of SUMO Target Proteins, de los doctores Ivo A. Hendriks y Alfred C. O. Vertegaal (Hendriks & Vertegaal, 2016). El resumen del protocolo se esquematiza en la **Figura 16**.

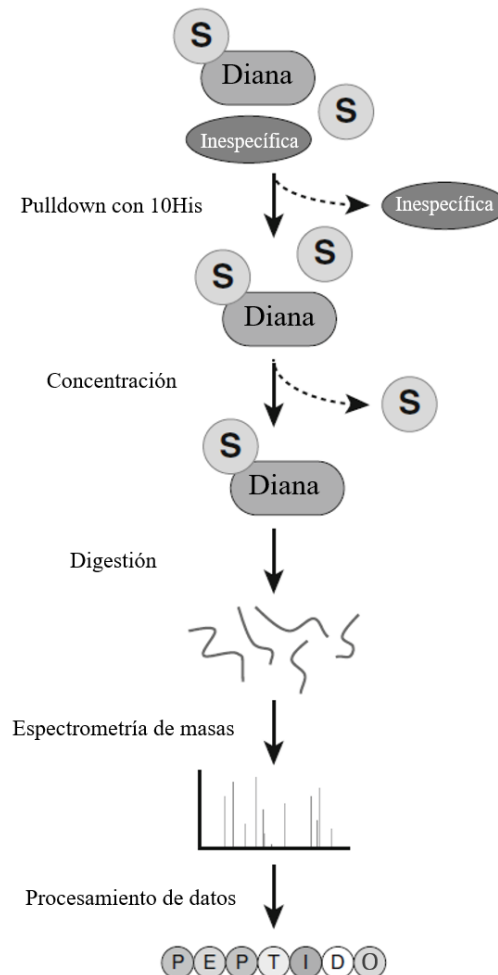


Figura 16. Esquema que permite una visión de conjunto del procedimiento llevado a cabo para la purificación de las moléculas de His10-SUMO2. Gracias al decámero de histidinas se realiza un ensayo *pull-down* en condiciones altamente restrictivas que facilitan la eliminación de la gran mayoría de proteínas contaminantes. La concentración bajo condiciones desnaturalizantes en filtros 100K MWCO (Thermo Scientific Pierce) separa SUMO libre de las proteínas conjugadas con SUMO. El concentrado de proteínas diana de SUMO es digerido y los péptidos resultantes son desalinizados y analizados por espectrometría de masas. Se representa SUMO2 como “S”, las proteínas del SUMOiloma como “Diana” y el resto de componentes celulares como “Inespecífica”. Adaptada de Hendriks and Vertegaal, 2016.

Todos los experimentos se realizaron en un sistema EASY-nLC 1000 (Proxeon, Odense, Dinamarca) conectado a un Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Alemania) a través de una fuente de ionización por electrospray. El Q-Exactive se acopló a una columna

analítica de 15 cm con un diámetro interior de 75 μm , empaquetado internamente con perlas de C18-AQ de 1,9 μm (Reprospher-DE, Pur, Dr. Manish, Ammerbuch-Entringen, Alemania).

La longitud del gradiente fue de 120 min desde 2 % hasta 95 % de acetonitrilo en ácido fórmico al 0,1 % a un caudal de 200 nL/minuto. El espectrómetro de masas fue utilizado en modo de adquisición dependiente de los datos con un método Top 10. Los espectros de MS de exploración completa se adquirieron a un valor objetivo de 3×10^6 y una resolución de 70.000, y los espectros de masas en tándem de mayor disociación colisional (HCD, “*Higher-Collisional Dissociation*”) (MS / MS, “*Mass Spectra*”) se registraron a un valor objetivo de 1×10^5 y con una resolución de 17.500 con una energía de colisión normalizada (NCE, “*Normalized Collision Energy*”) del 25 %. Los tiempos máximos de inyección de MS1 y MS2 fueron 20 ms y 60 ms, respectivamente. Las masas de iones precursores de iones escaneados se excluyeron dinámicamente (DE, “*Dynamically Excluded*”) del análisis MS / MS durante 60 segundos. Los iones con carga 1 y más de 6 se excluyeron del análisis de MS2.

Todos los datos brutos se analizaron utilizando MaxQuant (versión 1.5.5.1) según Tyanova et al (Tyanova, Temu & Cox, 2016). Realizamos la búsqueda utilizando un proteoma de referencia UniProt digerido *in silico* de *Mus musculus* (10 de octubre de 2016).

Para las muestras de células P19 no diferenciadas, las búsquedas en la base de datos se realizaron con tripsina/P, permitiendo tres cortes omitidos y carbamidometilo (C) como modificación fija. Para las muestras de células P19 diferenciadas, las búsquedas se realizaron con ArgC, permitiendo cuatro cortes omitidos y carbamidometilo (C) como modificación fija. Oxidación (M) y Acetilo (N-terminal) se permitieron como modificaciones variables con un número máximo de 5 y en las muestras diferenciadas también se incluyó la modificación carbamil (K). La coincidencia entre péptidos se realizó con una ventana de tiempo de coincidencia de 0,7 min y una ventana de tiempo de alineación de 20 min. La masa máxima de péptido se estableció en 5000. La cuantificación sin etiqueta (“*Label Free Quantification*”) se realizó utilizando el enfoque *MaxLFQ*, no permitiendo *Fast LFQ* (Cox et al., 2014). El tipo de instrumento se configuró en Orbitrap.

Las listas de proteínas generadas por MaxQuant fueron analizadas adicionalmente por Perseus (versión 1.5.5.3) (Tyanova et al., 2016). Las proteínas identificadas como contaminantes comunes se filtraron y posteriormente todas las intensidades de LFQ se transformaron a \log_2 . Diferentes repeticiones biológicas de los experimentos fueron agrupadas

y solo fueron incluidos para el posterior análisis grupos de proteínas identificadas en 3 réplicas biológicas en al menos un grupo. Los valores faltantes se calcularon utilizando el software Perseus mediante valores distribuidos normalmente con un cambio descendente de 1.8 (\log_2) y un ancho aleatorio de 0.3 (\log_2) considerando valores de matriz completa. Los mapas de calor se representaron en base a puntajes Z. Las diferencias estadísticamente significativas se estimaron utilizando pruebas *t-test* para un valor de $p < 0,05$.

5.8 Métodos bioinformáticos

- Las secuencias de ADN y proteínas estudiadas en este trabajo se obtuvieron de bases de datos disponibles en Internet, principalmente la del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).
- Para la búsqueda de pautas abiertas de lectura, localización de dianas de restricción o traducción de secuencias nucleotídicas se utilizó la aplicación *DNA Strider 1.3*, diseñada por Christian Mark (*Service de Biochimie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay*, Francia).
- Para el diseño de cebadores de PCR se utilizó la aplicación *Amplify 1.2*, diseñada por B. Engels (*Department of Genetics, University of Wisconsin*, EE.UU.).
- La búsqueda de secuencias similares a una dada entre las contenidas en las bases de datos se realizó con la aplicación *The Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del NCBI.
- Para el cálculo del peso molecular esperado de una proteína a partir de su secuencia se utilizó la herramienta *Protein Molecular Weight Calculator* (© 2018 Science Gateway).
- Para la alineación de secuencias y comparación de genes ortólogos se utilizó el programa Clustal Omega (© EMBL-EBI 2018).
- Para analizar los cortes de enzimas en las distintas proteínas analizadas se utilizó el algoritmo de predicción de sitios de corte de enzimas *PeptideCutter* del servidor ExPASy (© SIB Swiss Institute of Bioinformatics).
- La cuantificación de proteínas visualizadas mediante *Western blot* se realizó con la versión 6.0.1 del programa *Image Lab™ Software* (Life Science Research, Bio-Rad).

- Los análisis de ontología genética fueron llevados a cabo con el programa DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (DAVID, 2016).
- Las bases de datos de muestras de tumores utilizadas fueron cBioportal, el cual integra información procedente de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) así como de otras bases de datos (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013) y Oncomine (Rhodes *et al.*, 2004, 2007). Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier realizadas con datos procedentes de las anteriores bases de datos fueron llevadas a cabo con el programa SPSS (IBM Analytics).

5.9 Análisis estadístico

En todas las gráficas mostradas en este trabajo se representan los datos de las medias de los respectivos experimentos más una barra de error en la que se indica la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Los resultados de *Western blot* muestran una figura representativa de al menos tres ensayos independientes. Las comparaciones de los valores entre tratamientos y controles fueron analizadas utilizando las pruebas t de Student o bien análisis de varianza de una vía (ANOVA), utilizando la prueba post-test de Bonferroni. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Todo ello se llevó a cabo con el paquete SPSS (IBM Analytics).

6 Resultados

6.1 Puesta a punto de un método de purificación del SUMOiloma usando el dominio catalítico de la proteasa SENP1 en células P19

Para llevar a cabo el análisis del SUMOiloma en condiciones de isquemia cerebral aguda es fundamental identificar dianas de SUMOilación claras en respuesta a condiciones de isquemia, por lo que es esencial poner a punto una herramienta adecuada para caracterizar el SUMOiloma. Se llevó a cabo esta aproximación proteómica a través del uso del dominio catalítico de la proteína SENP1 y la línea celular estable HS1, la cual expresa moléculas de SUMO1 etiquetadas con una cola de histidinas para purificar el SUMOiloma. La adición de dicha etiqueta le otorga una afinidad a la molécula de SUMO que no poseía antes, de forma que dicha proteína recombinante etiquetada se puede separar y purificar utilizando una resina adecuada. La etiqueta de histidinas otorga a la proteína fuerte afinidad hacia iones de níquel, los cuales se colocan inmovilizados en una resina (matriz). Al exponer los extractos a dicha matriz las proteínas con la cola de histidinas interactúan con el ión metálico y el resto de proteínas pasan a través de ella. Posteriormente se realizan una serie de lavados y finalmente las moléculas de His-SUMO son eluidas con imidazol, el cual compite con His-SUMO ya que las histidinas tienen un anillo imidazólico en la cadena lateral. En nuestro caso, nos propusimos poner a punto un método alternativo de elución más específico utilizando el dominio catalítico de la proteína SENP1.

6.1.1 Purificación del dominio catalítico de la proteína SENP1 (SENPC) y de un sustrato de ésta. Comprobación del método de corte por SENPC utilizando dicho sustrato

Para la puesta en marcha del método de purificación del SUMOiloma utilizando la proteasa SENPC en células P19 fue necesario, en primer lugar, purificar una fusión de la proteína GST con la región carboxilo-terminal catalítica de la proteína SENP1 mediante cromatografía de afinidad, así como un sustrato tipo. Dicho sustrato consistió en una fusión entre SUMO1 y GFP, expresada como fusión GST, pero purificada mediante escisión de la proteína GST por elución con la proteasa PreScission (Ver sitios de corte en **Figura 17C**). En la **Figura 17 (A, B)** se muestran las fracciones del proceso de purificación del análisis en geles de acrilamida mediante coloración con *Coomassie blue* para las construcciones GST-SENPC

y SUMO1-GFP. Una vez aisladas las proteínas mencionadas se procedió al ensayo de proteólisis de SENPC sobre el sustrato SUMO-GFP. Los ensayos fueron realizados a los tiempos de 0,5, 1 y 2 h y se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos anti-SUMO1 por lo que no se detectó la proteína GFP. La observación de SUMO1 libre desde el primer periodo del tratamiento, así como la desaparición de la banda de SUMO-GFP indicaron que el sustrato fue convertido a SUMO1 más GFP con bastante eficacia tan solo con 30 min de tratamiento (**Figura 17D**).

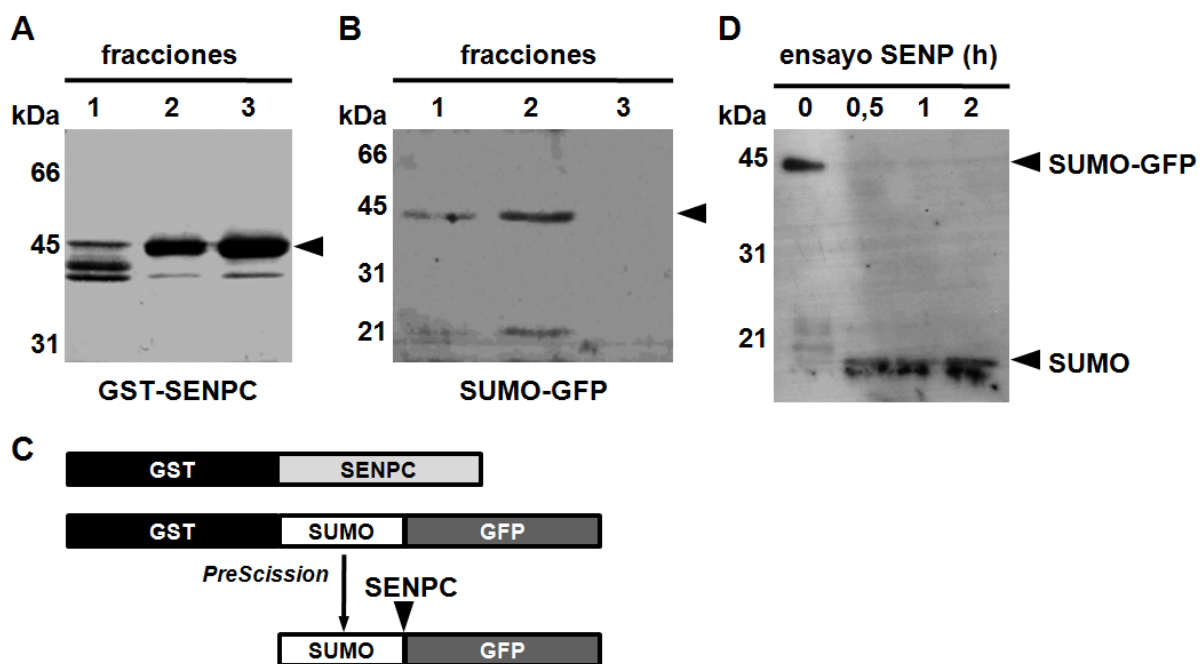


Figura 17. Purificación del dominio catalítico de la proteasa SENP1 y de un sustrato de ésta. (A) Mediante cromatografía de afinidad se purificó una fusión de la proteína GST con la región carboxilo-terminal catalítica de la proteína SENP1 (SENPC). (B) Como sustrato para poner a punto el ensayo de proteólisis se purificó una fusión entre SUMO y GFP, expresada como fusión GST, pero purificada mediante escisión de la GST. Las proteínas purificadas en (A, B) se indican con una punta de flecha. Distintas fracciones del proceso de purificación se analizaron en geles de acrilamida mediante coloración con *Coomassie blue*. (C) Esquema de las proteínas purificadas en (A, B) indicando que SENPC se purificó como fusión a GST y SUMO-GFP mediante elución con la proteasa PreScission que elimina la GST. Se indica así mismo el punto de corte de SENPC. (D) Ensayo de proteólisis de SENPC sobre el sustrato SUMO-GFP. Los distintos ensayos realizados a los tiempos indicados se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos contra SUMO por lo que no se detecta la proteína GFP. Se observa que en 0,5 h la práctica totalidad del sustrato es convertido a SUMO más GFP, según se observa mediante la detección de SUMO libre.

6.1.2 Protocolo de purificación del SUMOiloma. Análisis del proceso de eliminación de GST-SENPC de los eluatos

Una vez que se comprobó el correcto funcionamiento de la construcción GST-SENPC sobre el sustrato SUMO-GFP, se procedió al análisis del proceso de eliminación de GST-SENPC de los eluatos durante el protocolo de purificación del SUMOiloma (**Figura 18**). Las proteínas SUMOiladas se unieron a una matriz de histidina a través de la cola de histidinas de la molécula SUMO1 a la que se encontraban unidas en condiciones desnaturalizantes con el fin de evitar la acción de las proteasas endógenas de SUMO. Posteriormente a través del cambio de tampón se llevó a cabo la renaturalización a condiciones favorables para la actuación de la enzima recombinante GST-SENPC, la cual escindió las proteínas SUMOiladas de SUMO1, el SUMOiloma, quedando estas libres. Posteriormente se retiró la enzima GST-SENPC por unión a la matriz GST (**Figura 18**) (Véase el protocolo más detalladamente en “Materiales y Métodos”). El sobrenadante obtenido tras incubar el eluato derivado del corte con GST-SENPC, el cual contenía el SUMOiloma purificado más la proteína GST-SENPC, se observa en el carril 1 de la **Figura 18B**. En el carril 2 de la **Figura 18B** se observa el contenido del sobrenadante tras incubar con la matriz GST. Se observó una drástica disminución de la cantidad de GST-SENPC, por lo que la matriz GST atrapó dicha proteína. En el carril 3 de la **Figura 18B**, se corroboró esta afirmación, ya que cuando se analizó el contenido de la matriz de GST, apareció la banda correspondiente a la proteína GST-SENPC.

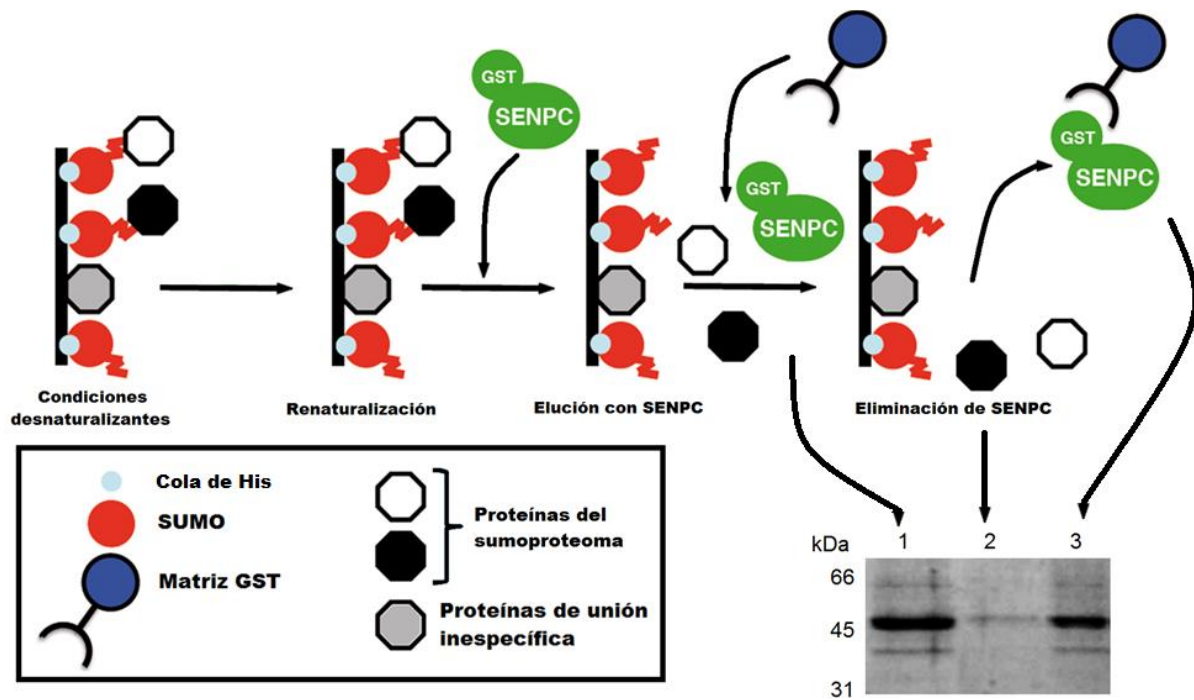


Figura 18. Protocolo de purificación del SUMOiloma. (A) Esquema del protocolo diseñado para la purificación del SUMOiloma celular. A partir de una línea estable que expresa SUMO etiquetado con una cola de histidinas (His) se prepararon extractos en condiciones desnaturalizantes para evitar la acción de las proteasas de SUMO endógenas. Los extractos se sometieron a cromatografía de afinidad para captar las colas de His de SUMO y por lo tanto a las proteínas SUMOiladas. Se procedió a continuación a la renaturalización de las muestras para poder utilizar la proteasa SENPC en el proceso de elución. Para eliminar SENPC de los eluatos, éstos se incubaron con matriz de afinidad por GST, ya que SENPC se purificó como fusión GST-SENPC. (B) Análisis en gel de acrilamida y coloración con *Coomassie blue* del proceso de eliminación de GST-SENPC de los eluatos. Las líneas indicadas corresponden a: 1) eluato con SENPC, 2) sobrenadante tras incubar el eluato anterior con matriz GST, 3) precipitado correspondiente a la matriz GST tras ser incubada con el eluato.

6.1.3 Ensayo de purificación del SUMOiloma utilizando la proteína SENPC

Una vez que se comprobó el correcto funcionamiento de la construcción GST-SENPC sobre el sustrato SUMO-GFP, así como el análisis del proceso de eliminación de GST-SENPC de los eluatos durante el protocolo de purificación del SUMOiloma, se procedió a la realización del ensayo de purificación del SUMOiloma. Mediante *Western blot* con anticuerpos contra la cola de histidinas se analizó el patrón de SUMOilación en extractos celulares de la línea estable HS1, que expresa SUMO1 etiquetado con una cola de histidinas, por lo que se observó un bandeo continuo, y de la línea celular parental P19. Debido a que esta última línea celular carece de SUMO1 etiquetado con colas de histidina, no se observaron bandas en el carril de *Western blot* correspondiente. También se observó que tras la unión a la matriz, el proceso de

renaturalización previo a la elución no desprendió las proteínas SUMOiladas de la matriz (**Figura 19A**) ya que no se observa ninguna banda en dichos carriles. En la **Figura 19B** se muestra el análisis en geles de acrilamida mediante coloración con *Coomassie blue* de la elución de proteínas SUMOiladas a partir de las muestras mostradas en la **Figura 19A**, mediante incubación con GST-SENPC. En este caso no se ha eliminado la proteína GST-SENPC de los eluatos. El asterisco muestra una región en la que se observó un enriquecimiento de proteínas eluidas a partir de la línea HS1 en comparación con la línea control P19, correspondientes a proteínas diana de SUMO1. También se analizó mediante *Western blot* con anticuerpos contra la cola de histidinas la presencia de la molécula de SUMO1 recombinante de la línea HS1 durante el proceso de purificación comparando con la línea P19 utilizada como control negativo. Se observó la banda correspondiente a dicha molécula en los extractos de la línea HS1, frente a su ausencia en P19. Así mismo, se analizó dicha molécula en una muestra tomada tras el proceso de renaturalización y tratamiento con SENPC, en la que se comprobó que no se produjo su desprendimiento de la matriz debido a la ausencia de la banda correspondiente. Se analizó también mediante *Western blot* la presencia de la molécula de SUMO1 recombinante en la matriz de histidinas. La observación de la banda correspondiente indicó que tras la elución continuó asociada a la matriz de purificación (**Figura 19C**). Los resultados obtenidos en los análisis correspondientes a la **Figura 19** fueron obtenidos tal y como se esperaba según el esquema de la **Figura 18A**.

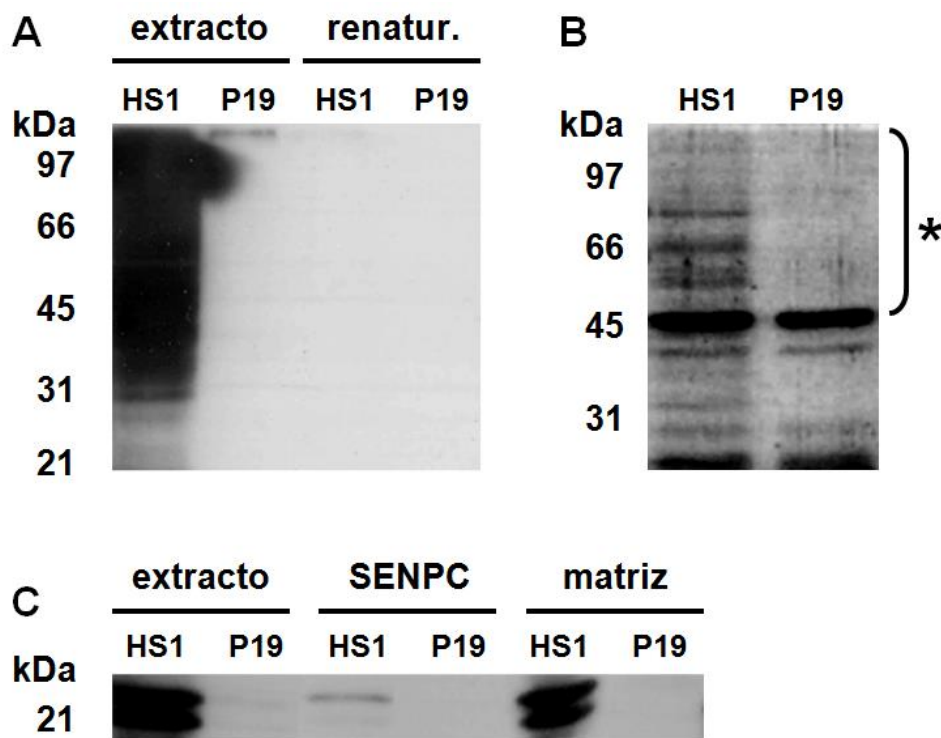


Figura 19. Ensayo de purificación del SUMOiloma. (A) Mediante *Western blot* con anticuerpos contra la cola de histidinas se analizó el patrón de SUMOilación en extractos celulares de la línea estable HS1, que expresa SUMO1 etiquetado con una cola de histidinas, y de la línea celular parental P19. Se muestra además que tras la unión a la matriz, el proceso de renaturalización previo a la elución no desprende las proteínas SUMOiladas de la matriz. (B) Análisis en geles de acrilamida mediante coloración con *Coomassie blue* de la elución de proteínas SUMOiladas a partir de las muestras mostradas en (A), mediante incubación con GST-SENPC. En este caso no se ha eliminado la proteína GST-SENPC de los eluatos. El asterisco muestra una región en la que se observa un enriquecimiento de proteínas eluidas a partir de la línea HS1 en comparación con la línea control P19, correspondientes a proteínas diana de SUMO1. (C) Análisis mediante *Western blot* con anticuerpos contra la cola de histidinas de la molécula de SUMO1 recombinante de la línea HS1 durante el proceso de purificación comparando con la línea P19 utilizada como control negativo. Se observa la presencia de dicha molécula en los extractos de la línea HS1, que el proceso de renaturalización y tratamiento con SENPC no la desprende de la matriz, y que tras la elución continúa asociada a la matriz de purificación.

6.2 Identificación del SUMOiloma mediante espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje (*Label-Free Quantification*)

6.2.1 Creación de una línea celular estable con la construcción His10-SUMO2 a partir de células P19

Como ya se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo el análisis del SUMOiloma en condiciones de isquemia, es decir, identificar dianas de SUMOilación claras en respuesta a

condiciones de isquemia, es esencial poner a punto una herramienta para caracterizar el SUMOiloma y es por ello que este proyecto de tesis contempla identificar proteínas diana de SUMO en condiciones de OGD mediante aproximación proteómica. Conforme se realizó la puesta a punto del método de purificación del SUMOiloma usando la proteasa SENP1 en células P19 (anteriormente descrito) se contactó con el grupo del Dr. Vertegaal de la Universidad de Leiden (Países Bajos), el cual es experto y posee una dilatada experiencia en la realización de proteómicas para análisis del SUMOiloma (van Hagen *et al.*, 2009; Matic *et al.*, 2010; Hendriks *et al.*, 2014, 2015; Xiao *et al.*, 2015). En colaboración con el Dr. Vertegaal se decidió realizar el estudio del SUMOiloma a través de una técnica que está proporcionando excelentes resultados en este grupo consistente en analizar mediante espectrometría de masas muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje (*Label-Free Quantification*). Para aplicar con éxito esta técnica es importante utilizar líneas celulares estables que expresen versiones etiquetadas de SUMO que permitan una purificación limpia y eficaz de proteínas SUMOiladas. Dichas líneas celulares deben poseer la molécula de SUMO etiquetada con el decámero de 10 histidinas, de tal forma que sea posible el aislamiento de proteínas unidas covalentemente a SUMO a través de una matriz de aislamiento de proteínas con histidinas.

Tal y como se ha descrito anteriormente en la introducción, la respuesta frente a isquemia parece estar mediada principalmente por SUMO2/3 y es por ello por lo que se utilizó una línea con una construcción con SUMO2 etiquetado con 10 His. La realización de dicha línea estable se llevó a cabo mediante selección en medio con puromicina (**Figura 20**). En primer lugar se transfectó un plásmido de expresión de SUMO2 etiquetado con una cola de 10 histidinas en células P19. Se realizaron varios pases y se seleccionaron diferentes colonias resistentes a puromicina que presentaran dicha resistencia de forma perdurable, de modo que el ADN correspondiente a la secuencia His10-SUMO2 estuviera insertado en el genoma. Fueron estudiados 11 clones diferentes así como dos subconjuntos de células no provenientes de una sola colonia (“*pools*”) (**Figura 20**). Para que los niveles de SUMOilación de proteínas se vieran mínimamente alterados debido a la creación de la línea estable con SUMO2, se seleccionó para la realización de la proteómica la línea A5 (proveniente del clon n° 5), ya que dicha línea mostró unos niveles de SUMO2 similares a los del control negativo. En el análisis de la línea A5 se aprecia una doble banda a la altura del tamaño de SUMO2 correspondiente a los dos tamaños diferentes del SUMO2 endógeno y del His10-SUMO2 insertado en el genoma celular (**Figura 20**).

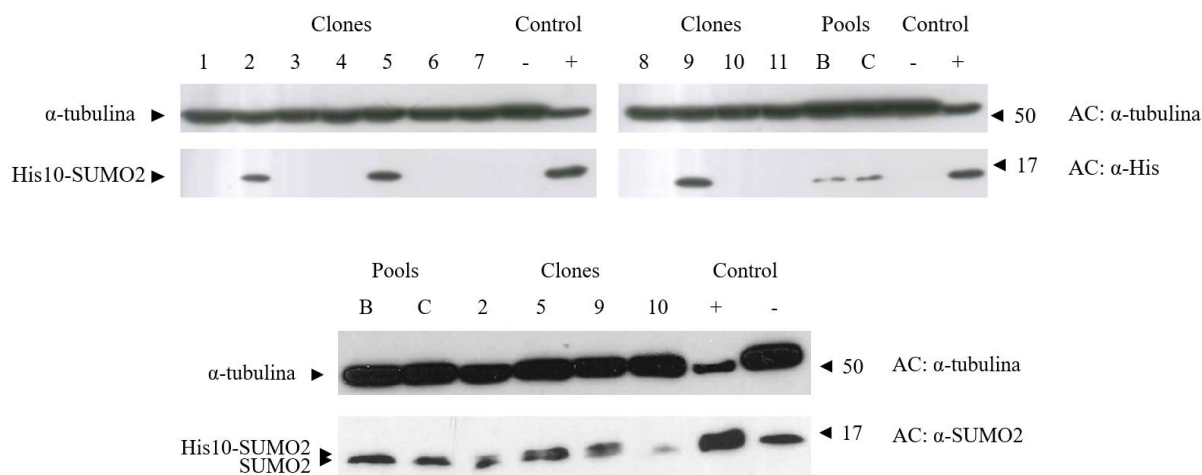


Figura 20. Creación y selección de la línea estable para la realización del análisis del SUMOiloma en condiciones de OGD. Análisis mediante *Western blot* de diferentes clones resistentes a puromicina con la construcción His10-SUMO2 en células P19. Los clones que expresaron la construcción de His10-SUMO2 fueron el 2, 5 y 9, tal y como se aprecia en los western realizados con anticuerpo contra histidina. Se utilizó como control positivo (+) células de la línea celular HeLa-His10-SUMO2. Como control negativo (-) se utilizaron extractos de células P19. Fueron añadidos 20 μ g de proteína total en cada carril.

6.2.2 Comprobación de las correctas condiciones de tratamiento OGD así como de neurodiferenciación en células P19

Una vez creada la línea A5, el siguiente paso para la realización de los experimentos de análisis del SUMOiloma propuestos fue la comprobación de las correctas condiciones de tratamiento OGD. En normoxia, prolinas específicas de HIF son dianas de las prolilhidroxilasas (Bruick & McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Al producirse la hidroxilación de las prolinas se provoca la ubiquitinación y posterior degradación de HIF por el proteosoma 26S (Huang *et al.*, 1996; Salceda & Caro, 1997; Maxwell *et al.*, 1999). Cuando existe un déficit en los niveles de oxígeno, la inhibición de las prolilhidroxilasas (PHDs) provoca la estabilización de HIF. Por ello se llevó a cabo la comprobación de los niveles de proteína HIF1 α mediante análisis por *Western blot* de extractos de células P19 no diferenciadas tratadas con OGD a diferentes tiempos (**Figura 21**). Se observó un incremento de los niveles de HIF1 α desde 1 h de exposición a OGD. Desde las 2 h de OGD hasta las 5 h de OGD se observó la presencia de HIF1 α de forma constante. No se observó dicha proteína en ninguno de los puntos analizados en ROGD, tal y como era esperado. Dichos resultados verifican la bajada de oxígeno en el cultivo celular en el tratamiento de OGD.

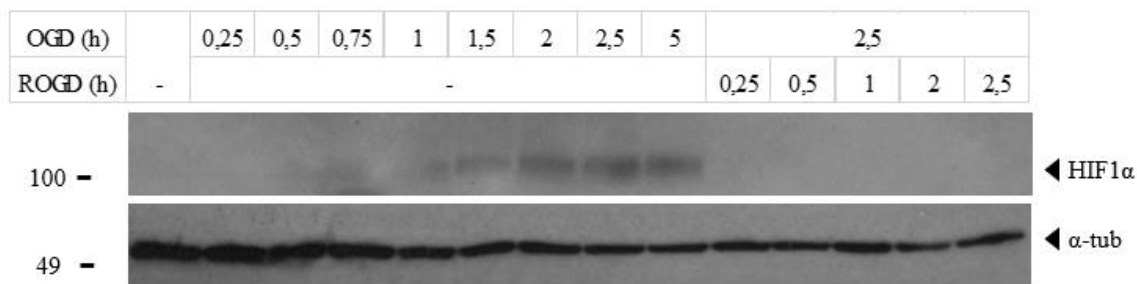


Figura 21. Comprobación de los niveles de proteína HIF1 α mediante análisis por Western blot de extractos de células P19 no diferenciadas tratadas con OGD. Las células P19 creciendo en condiciones normales fueron sometidas a OGD mediante incubación en los tiempos indicados en 1 % O₂ en medio carente de glucosa. Se observó un incremento de los niveles de la proteína HIF1 α tras 1 h de tratamiento OGD. Dicha proteína permaneció constante hasta el tiempo de 5 h de tratamiento OGD. No se observó dicha proteína en ninguno de los puntos analizados en ROGD, tal y como era esperado. Fueron añadidos 20 μ g de proteína total en cada carril.

Dadas las implicaciones de SUMO en procesos neuronales anteriormente descritas en el apartado de introducción es enormemente interesante el estudio de los niveles de SUMOilación en neuronas diferenciadas por lo que se decidió conveniente la realización de una segunda proteómica con células P19 diferenciadas. Para esta propuesta es posible obtener neuronas diferenciadas a través de un protocolo de neurodiferenciación en las células P19 en la que estas se exponen a ácido retinoico. El protocolo utilizado se encuentra descrito en el apartado de material y métodos. Se comprobó la correcta diferenciación a través de imágenes al microscopio óptico (**Figura 22**). Las imágenes de células diferenciadas muestran la presencia de axones. Así mismo, también se comprobó la existencia de marcadores proteicos para diferenciar entre células P19 no diferenciadas y neurodiferenciadas utilizando las proteínas anteriormente descritas para este proceso: OCT4 para la señalización del estado de células no diferenciadas (Schoorlemmer *et al.*, 1995; Babuška *et al.*, 2010) (Babuška 2010, Schoorlemmer 1995) y β III tubulina neuroespecífica para la señalización del estado de células neurodiferenciadas (Martins *et al.*, 2005; Pachernik *et al.*, 2005; Solari *et al.*, 2009) (**Figura 23**).

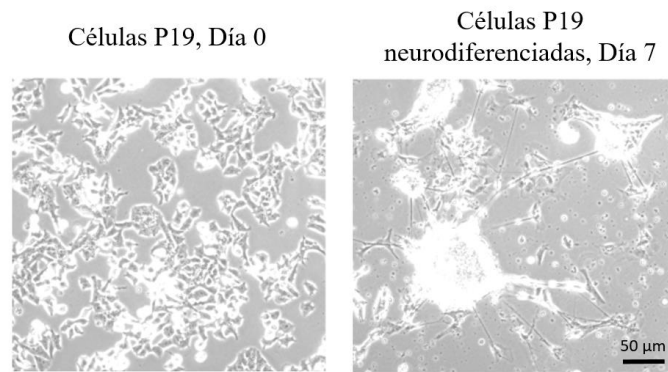


Figura 22. Comprobación de la correcta diferenciación de células P19 en el día 7 del protocolo de neurodiferenciación con tratamiento con ácido retinoico a través de imágenes al microscopio óptico. Las imágenes de células diferenciadas muestran la presencia de axones mientras que las imágenes de células en estado de proliferación muestran la estructura típica de células P19.

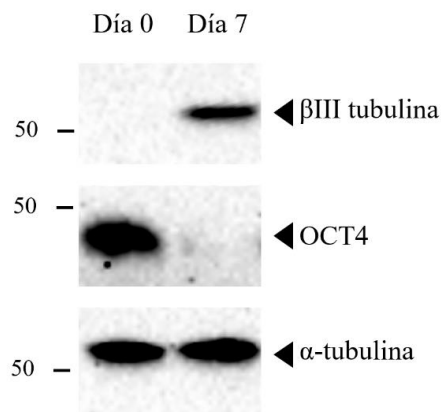


Figura 23. Comprobación de la correcta diferenciación de células P19 en el día 7 del protocolo de diferenciación con tratamiento con ácido retinoico a través de análisis mediante *Western blot* con anticuerpos contra las proteínas β III específica de neuronas y OCT4. Se analizó como control de carga α -tubulina. En el día 7 del tratamiento se observó una disminución drástica de los niveles de OCT4, factor de transcripción característico de células pluripotentes, así como la aparición de la proteína β III tubulina neuroespecífica. Fueron añadidos 10 μ g de proteína total en cada carril.

6.2.3 Selección de los tiempos correctos para la realización de tratamientos OGD y ROGD en células P19

El siguiente paso para llevar a cabo la proteómica mencionada consistió en el análisis de los tiempos de interés de tratamiento OGD y la comprobación de los niveles de SUMOilación de proteínas en la línea celular A5. Para ello se visualizaron mediante *Western*

blot con anticuerpos de detección de SUMO2 a diferentes tiempos durante OGD así como ROGD (**Figura 24**). Se observó un aumento creciente de niveles de proteína SUMOilada conforme se prolongaba el tiempo de estrés en OGD hasta las 2-2,5 h. Los niveles de proteínas SUMOiladas observados tras 5 h de OGD fueron inferiores a los de 2-2,5 h, por lo que para nuestro estudio se determinó como punto interesante el tiempo de 2,5 h de OGD. Consecuentemente, se investigaron, así mismo, los niveles de proteínas SUMOiladas en ROGD una vez las células hubiesen sufrido una OGD de 2,5 h. Interesantemente, los niveles de proteínas SUMOiladas descendieron fuertemente incluso 15 min después de 2,5 h de OGD hasta observarse de forma constante en los tiempos de 2-2,5 h de ROGD. Fue por ello por lo que los puntos de 2,5 h OGD así como 2,5 h ROGD fueron elegidos para la realización de la proteómica propuesta previamente.

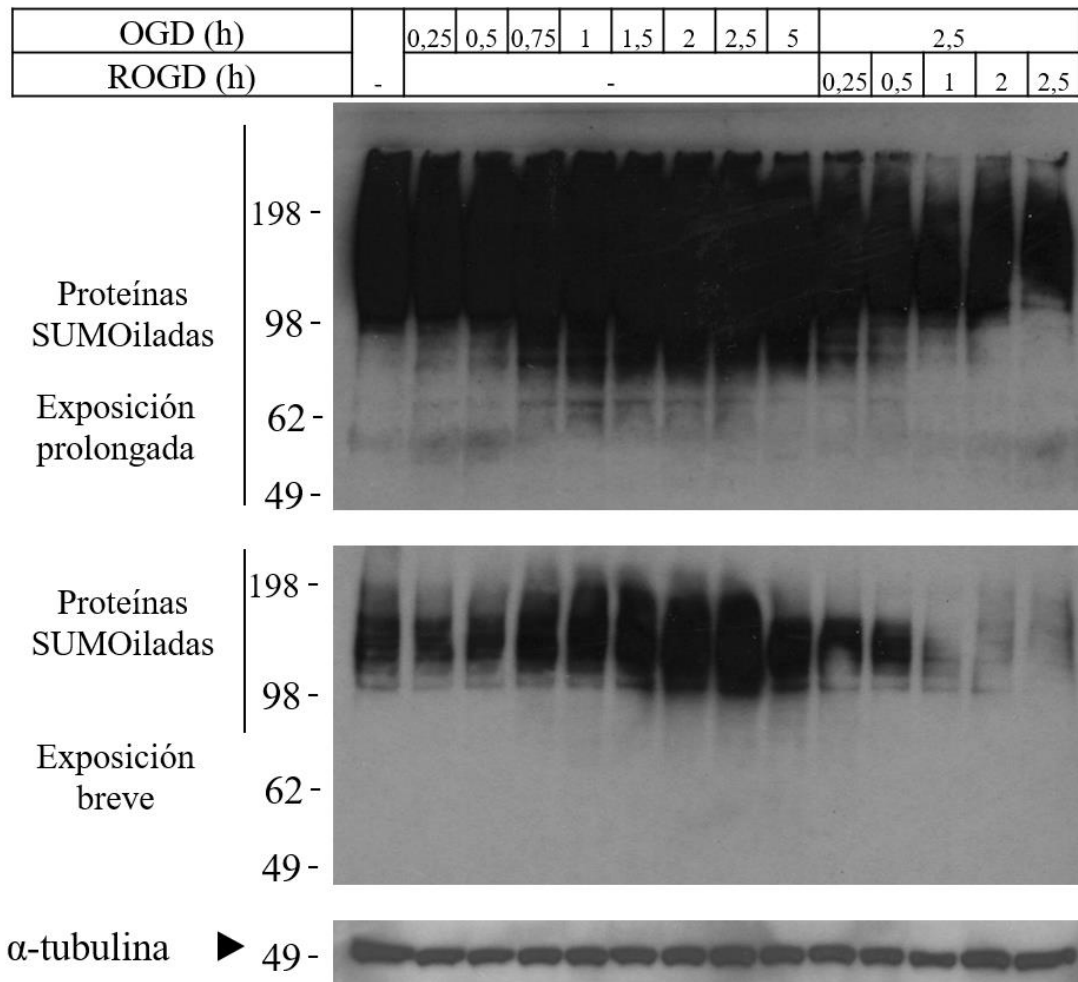


Figura 24. Análisis del patrón de modificación de proteínas por SUMO2 a distintos tiempos de OGD y ROGD. Se muestran los experimentos de *Western blot* realizados con anticuerpos de detección de SUMO2 a diferentes tiempos durante OGD así como ROGD en los que se observó una elevación gradual de los niveles de proteínas SUMOiladas conforme

avanzó el tiempo de estrés OGD hasta las 2-2,5 h, siendo inferiores los niveles de proteínas SUMOiladas a las 5 h de OGD. Posteriormente, en ROGD, se observó una disminución drástica de los niveles de proteínas SUMOiladas tras tan solo 15 min de ROGD, hasta observarse niveles constantes en los tiempos de 2-2,5h de ROGD. Fueron añadidos 20 µg de proteína total en cada carril.

Para la comprobación de que las variaciones en los niveles de proteínas SUMOiladas son similares en la línea parental, en la línea A5, así como en las neuronas diferenciadas a partir de dichas líneas, se comprobaron los niveles de proteínas SUMOiladas a través de *Western blot* utilizando anticuerpo contra SUMO2 (**Figura 25**). El estudio de los niveles de SUMOilación de proteínas demostró que la línea A5 se comportó de manera similar a la línea parental, ya que se observó igualmente un fuerte incremento de los niveles de proteínas SUMOiladas en 2,5 h de OGD y el siguiente descenso hasta condiciones próximas al control tras 2,5 h de ROGD (**Figura 25**). Ocurrió lo mismo en el caso de las neuronas diferenciadas, ya que tanto las neuronas diferenciadas desde la línea parental como las neuronas diferenciadas desde la línea A5 mostraron un elevado incremento de los niveles de SUMOilación en condiciones de OGD y la vuelta a los niveles basales en el punto de 2,5 h ROGD (**Figura 25**). Se realizaron *pull-down* de proteínas a través de matriz de histidina, aislándose las proteínas SUMOiladas por la molécula SUMO2-HIS. Los experimentos de *Western blot* utilizando anticuerpos contra SUMO2 de muestras purificadas mediante *pull-down* con matriz de histidinas mostraron los resultados esperados (**Figura 25**), observándose las mismas variaciones en los niveles de proteínas SUMOiladas anteriormente descritas para el análisis de extractos proteicos sin precipitar. Dichos hallazgos confirmaron la adecuación de la realización de la proteómica en los tiempos de 2,5 h de OGD y 2,5 h de ROGD en ambas líneas tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación.

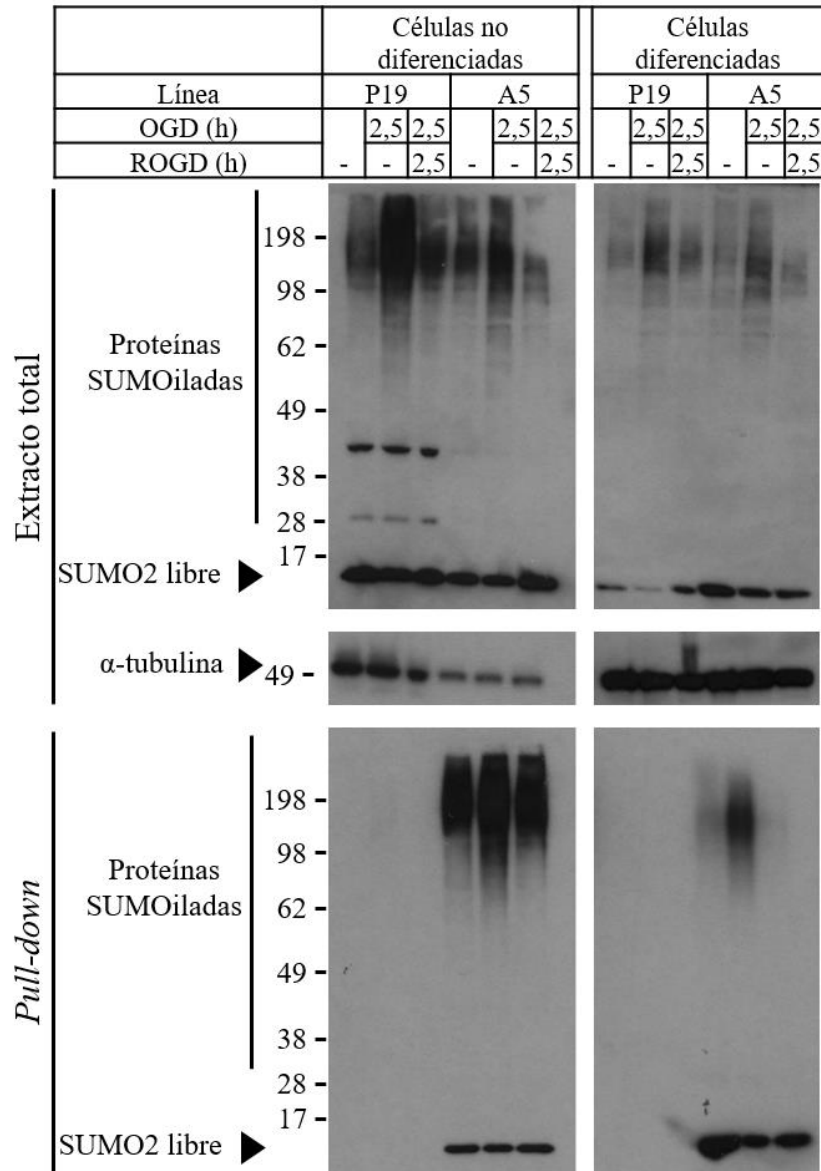


Figura 25. Análisis del patrón de modificación de proteínas por SUMO2 a distintos tiempos de OGD y ROGD en células en estado de proliferación y neurodiferenciadas en las líneas celulares P19 y A5. Se muestran los experimentos de *Western blot* realizados con anticuerpos contra la proteína SUMO2. Tanto la línea celular P19 como la línea A5 se comportan de manera similar, tanto en el estado de proliferación como en el estado de neurodiferenciación, registrándose un elevado incremento de las proteínas SUMOiladas tras 2,5 h de OGD, que revierte a las 2,5 h de ROGD.

6.2.4 Resultados de la identificación del SUMOiloma mediante espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje

En la realización de la proteómica para la identificación del SUMOiloma mediante espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje fueron

analizadas 3 réplicas en las muestras de células no diferenciadas, mientras que de las muestras de células neurodiferenciadas se analizaron 4 réplicas. Las muestras de células de la línea P19 se analizaron, así mismo, para eliminar falsos positivos del análisis obtenido de células A5, ya que por diversos motivos alguna proteína podría ser obtenida en la purificación con bolas de histidina pese a no estar unida a His10-SUMO2. En resumen, las muestras que se analizaron en el espectrómetro provenían de un total de 12 condiciones:

- Línea P19 parental:
 - No diferenciadas
 - Control
 - 2,5 h OGD
 - 2,5 h ROGD
 - Diferenciadas
 - Control
 - 2,5 h OGD
 - 2,5 h ROGD
- Línea A5:
 - a. No diferenciadas
 - i. Control
 - ii. 2,5 h OGD
 - iii. 2,5 h ROGD
 - b. Diferenciadas
 - i. Control
 - ii. 2,5 h OGD
 - iii. 2,5 h ROGD

Los resultados de la secuenciación del espectrómetro de masas se encuentran en tablas adjuntas a este trabajo (Tabla A-1: Lista de proteínas identificadas en células P19 en estado de proliferación. Tabla A-2: Lista de proteínas identificadas en células P19 neurodiferenciadas). En dichas tablas aparecen las siguientes columnas:

- Columnas de color azul: contienen la información de cada proteína identificada.
 - Columna “*Fasta headers*”: encabezamientos del formato FASTA.
 - Columna “*Protein names*”: nombre de la proteína.
 - Columna “*Gene names*”: nombre del gen.
- Columnas de color rosado:

- Columna “*SUMO Target statistics?*”: En esta columna se realizó la comparación estadística necesaria para saber si una proteína es verdaderamente SUMOilada o bien no lo es y está siendo precipitada inespecíficamente. En este caso también aparecería en la proteómica de las células P19 sin His10-SUMO2 y no solo en la proteómica de la línea A5.
- Columna “*SUMO target?*”: Es el resultado de la comparación estadística anteriormente descrita. En caso de especificarse “YES” significa que dicha proteína es verdaderamente una proteína SUMOilada con un error menor al 5 %.
- Columnas de color verde:
 - Columna “OGD vs Control”: Comparación de niveles de proteína SUMOilada en OGD frente al control.
 - Columna “OGD vs *Recovery*”: Comparación de niveles de proteína SUMOilada en OGD frente a ROGD.
 - Columna “Control vs *Recovery*”: Comparación de niveles de proteína SUMOilada en OGD frente a ROGD.
- Columnas de color gris: La columna “*Miscelanea*” contiene información específica de datos acerca de los péptidos identificados, como pesos moleculares, q-valor e intensidades detectados en el espectrómetro de masas.

Para seleccionar las proteínas cuya SUMOilación fluctuó significativamente en OGD y ROGD se consideró que los niveles de SUMOilación de proteínas variaban significativamente si el valor del logaritmo en base 10 era menor de - 1,3. Además, para el análisis solo se consideraron variaciones significativas los cambios en los que los niveles de SUMOilación aumentaron más del doble (es decir, con valores mayores de +1 en la columna “*Difference*”, expresado en logaritmo en base 2) o disminuyeron hasta menos de la mitad (es decir, de un valor menor que -1 en la columna “*Difference*”) respecto al estado de SUMOilación de la condición control.

Los resultados también se pudieron expresar en forma de mapa de calor o “*heatmap*” en el que se representaron agrupadas las muestras según las variaciones en los niveles de proteínas SUMOiladas obtenidos en cada una de ellas (**Figura 26**). Los colores del mapa de calor son negro, verde y rojo en diferentes intensidades, en función de las proteínas obtenidas en las diferentes muestras. La leyenda de colores específica se encuentra en la figura. En el

caso de las muestras de la línea A5 se pudo observar que las muestras del tratamiento OGD se agruparon en un solo subconjunto, al igual que las muestras del tratamiento ROGD (representado como “*recov*”) y las del control. En el caso de las muestras de la línea P19, tal y como se esperaba no se alinearon en ninguna agrupación concreta ya que las proteínas que el espectrómetro de masas analizó en este caso fueron precipitadas de forma inespecífica.

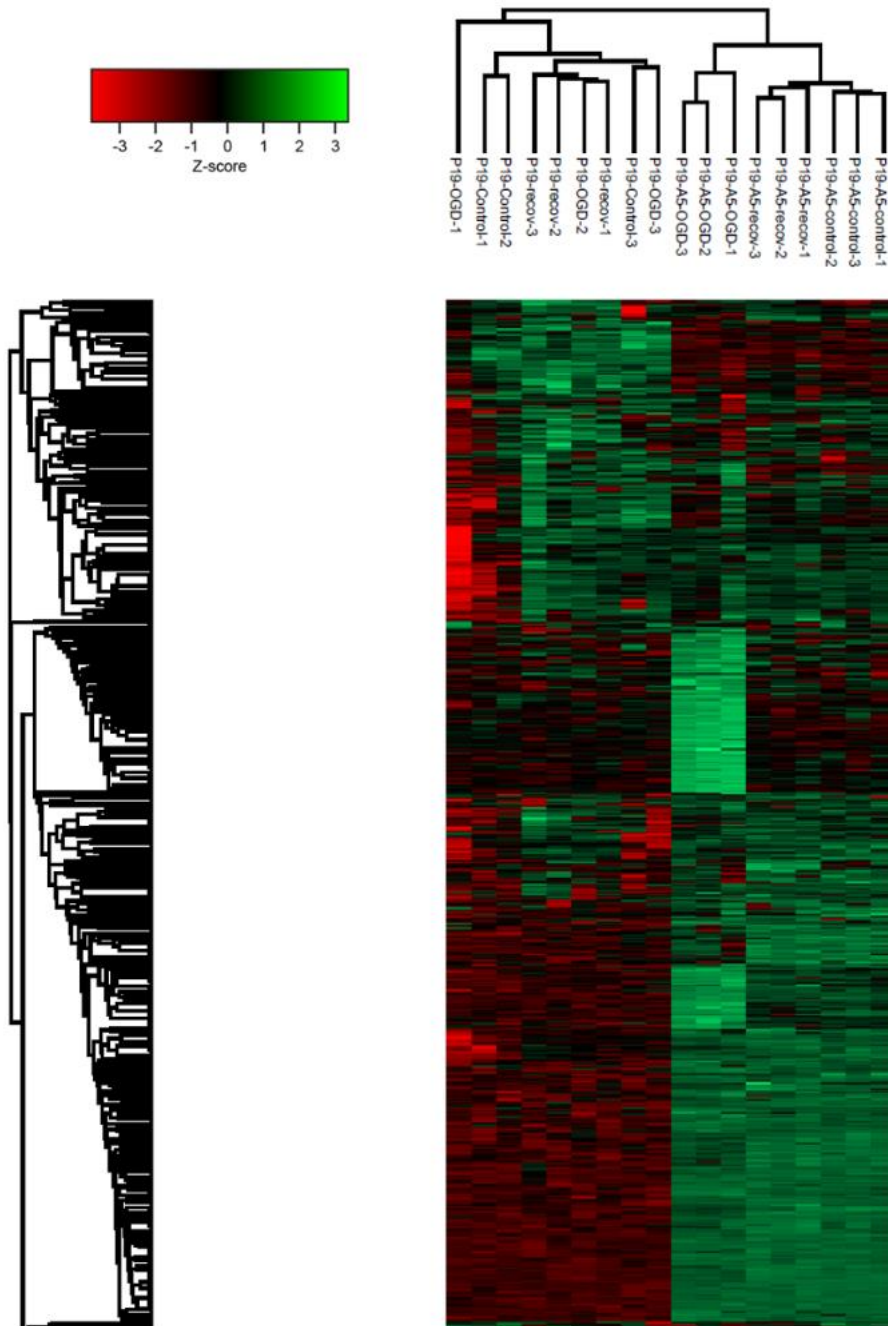


Figura 26. *Heatmap* en el que se representan las muestras de células P19 no diferenciadas según las variaciones en los niveles de proteínas SUMOiladas. Las variaciones en la cuantificación de proteínas en el espectrómetro de masas se representan a través de la gama de

colores negro (valores intermedios), verde (valores elevados) y rojo (valores disminuidos) en diferentes intensidades.

Así mismo, se realizaron diagramas de dispersión para representar el total de proteínas identificadas según el valor de valor p así como la diferencia en los niveles de SUMOilación de dichas proteínas (**Figura 27**).

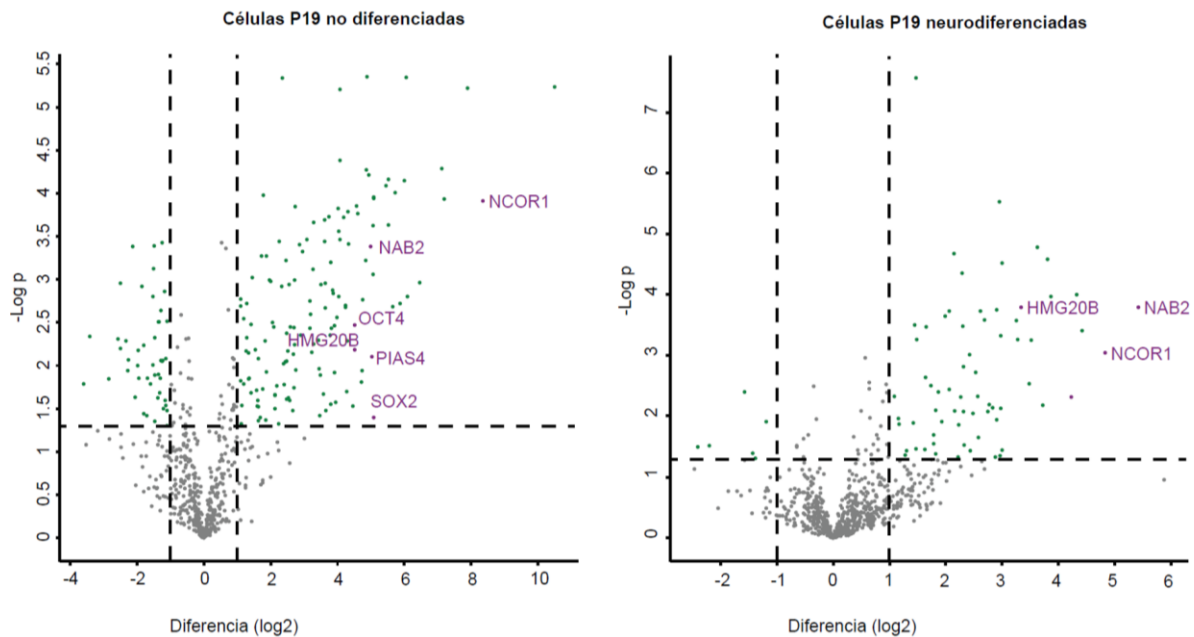


Figura 27. Diagrama de dispersión en el que se representan las proteínas identificadas en la proteómica de células P19 no diferenciadas y neurodiferenciadas en condiciones de OGD. El total de proteínas identificadas se representó según el valor de valor p así como la diferencia en los niveles de SUMOilación con respecto al control. Las líneas discontinuas representan los valores de valor p así como de diferencia en el nivel de SUMOilación a través de los cuales se tomaron como positivos cambios en los niveles de SUMOilación de las diferentes proteínas identificadas en el espectrómetro de masas. En el caso de valor p dicha línea discontinua horizontal se sitúa en el valor de 1,3 para seleccionar las proteínas diana de SUMO en OGD con un error inferior al 5 %. La línea discontinua vertical se sitúa en los valores de +1 y -1 para seleccionar proteínas que presentaran variaciones en los que los niveles de SUMOilación de más del doble (es decir, con valores mayores de +1) o que disminuyeran hasta menos de la mitad (es decir, de un valor menor que -1) del estado de SUMOilación en la condición control. Se señalan proteínas de interés que serán estudiadas a lo largo de este trabajo (HMG20B, NAB2, NCOR1, OCT4, PIAS4 y SOX2).

Los resultados obtenidos en cuanto al número total de proteínas de cada condición se pueden resumir de la siguiente manera (**Figura 28**):

- Número total de proteínas identificadas:
 - Células P19 no diferenciadas: 670 proteínas.

- Células P19 neurodiferenciadas: 765 proteínas.
- Cambios significativos:
 - Células P19 no diferenciadas:
 - 178 modifican su estado de SUMOilación en OGD:
 1. 135 (75.8 %) aumentan su SUMOilación en OGD:
 - a. 119 (88.1 %) recuperan su estado inicial de SUMOilación tras ROGD.
 2. 43 (24,2 %) reducen su SUMOilación en OGD:
 - a. 35 (81.4 %) recuperan su estado inicial de SUMOilación tras ROGD.
 - 37 modifican su estado de SUMOilación en ROGD respecto al control:
 1. 23 (62.2 %) aumentan su SUMOilación en ROGD.
 - a. 6 (26.1 %) se SUMOilaron también en OGD
 - b. 17 (73.9 %) no presentaron cambios significativos en OGD
 2. 14 (37.8 %) reducen su SUMOilación en ROGD.
 - a. 4 (28.6 %) redujeron su SUMOilación en OGD
 - b. 4 (28.6 %) aumentaron su SUMOilación en OGD
 - c. 6 (42.8 %) no presentaron cambios significativos en OGD
 - Células P19 neurodiferenciadas:
 - 57 modifican su estado de SUMOilación en OGD:
 1. 56 (98.2 %) aumentan su SUMOilación en OGD:
 - a. 42 (75.0 %) recuperan su estado de SUMOilación inicial tras ROGD.
 2. 1 (1.8 %) reduce su SUMOilación en OGD:
 - a. 1 (100 %) recupera su estado de SUMOilación inicial tras ROGD.
 - 19 modifican su estado de SUMOilación en ROGD respecto al control:
 1. 19 (100 %) aumentan su SUMOilación en ROGD.
 - a. 8 (42,1 %) aumentaron su SUMOilación en OGD
 - b. 11 (57,9 %) no presentaron cambios significativos en OGD
 2. 0 reducen su SUMOilación en ROGD.

- No diferenciadas vs neurodiferenciadas en OGD:
 - En común: 45 (25,3 % en no diferenciadas y 78,9 % en diferenciadas) modifican su estado de SUMOilación de la misma manera, aumentando en todos los casos en común los niveles de SUMOilación respecto al control.
 1. Proteínas específicas en no diferenciadas: 133 (74,7 %).
 2. Proteínas específicas en neurodiferenciadas: 12 (21,1 %).
- No diferenciadas vs neurodiferenciadas en ROGD:
 - En común: 1 (2.7 % en no diferenciadas y 5.3 % en diferenciadas) modifica su estado de SUMOilación de la misma manera, disminuyendo en este caso en común los niveles de SUMOilación con respecto al control.
 1. Proteínas específicas en no diferenciadas: 36 (97.3 %).
 2. Proteínas específicas en neurodiferenciadas: 18 (94.7 %).

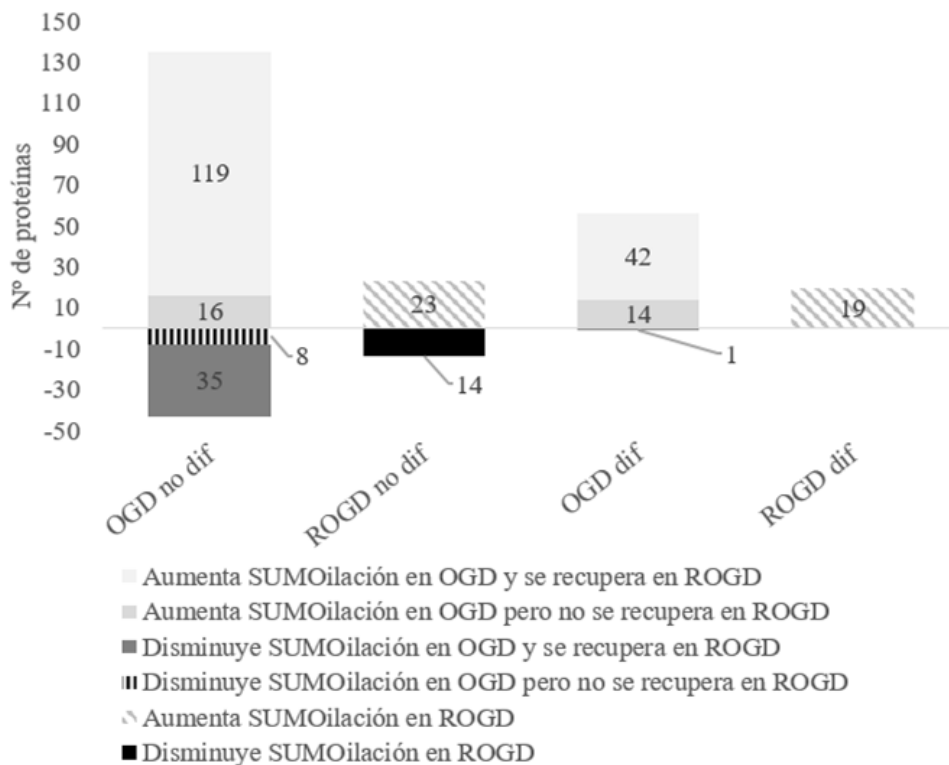


Figura 28. Número total de proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en cada condición, se indican las proteínas cuya SUMOilación

aumenta y disminuye en cada una de las condiciones estudiadas. Se indica como “no dif” las proteínas pertenecientes a células no diferenciadas mientras que como “dif” se indica las proteínas pertenecientes a células neurodiferenciadas.

6.2.5 Validación de los resultados de la proteómica mediante *Western blot*

Para la validación de los resultados obtenidos en el espectrómetro de masas se realizaron análisis mediante *Western blot* para observar un cambio de movilidad electroforética correspondiente a un incremento de 16-20 kDa en el caso de modificación por SUMO2. Las muestras de células de la línea celular A5 corresponden a experimentos de OGD y ROGD a los mismos tiempos que los estudiados en el espectrómetro de masas. Los resultados se muestran en la **Figura 29**. Las muestras pertenecientes a los *Western blot* realizados con anticuerpos contra las proteínas OCT4, NAB2, SOX2 y PIAS4 corresponden a células de la línea celular A5 no diferenciadas, mientras que las muestras de los experimentos de *Western blot* realizados con anticuerpos contra las proteínas NCOR1 y HMG20B corresponden a células P19 neurodiferenciadas. En todos los casos se observó la proteína estudiada en las tres condiciones control, OGD y ROGD en los extractos totales. Sin embargo, tal y como era esperado, en los carriles pertenecientes a la precipitación con matriz de afinidad por la histidina no se observó en ninguno de los casos la banda correspondiente a la proteína estudiada. En el caso de OCT4, interesantemente, se observó cómo el anticuerpo contra dicha proteína detectó en la condición OGD tres bandas correspondientes a modificaciones por SUMO2 de OCT4 tanto en los extractos totales como en los precipitados. Tal y como se indicó en la introducción, todavía no existe ninguna prueba en la bibliografía acerca de la SUMOilación de OCT4 por SUMO2. Es destacable que tan solo en el caso de OCT4 se observaron bandas correspondientes a los pesos moleculares de la proteína modificada por SUMO2 en extractos totales mientras que en los demás casos fue necesario realizar la precipitación descrita para poder observar las bandas correspondientes a las modificaciones por SUMO2. En el caso de NAB2 se observaron dos bandas en la condición OGD correspondientes a la proteína modificada por SUMO2. Dichos resultados fueron los esperados, ya que con anterioridad en nuestro grupo publicamos que NAB2 posee dos lugares de modificación por SUMO2 (García-Gutiérrez *et al.*, 2011). Sin embargo, la SUMOilación de NAB2 no ha sido estudiada hasta la actualidad en condiciones de OGD. En el caso de la proteína NCOR1 también se observó una banda de mayor peso molecular en los precipitados en la condición OGD, lo mismo que ocurrió en el caso de la

proteína SOX2. En el caso de PIAS4, además de observar la banda de SUMOilación en condiciones de OGD se observó también su presencia en condición control, aunque en menor cuantía. Se observó una disminución hasta la desaparición de los niveles de proteína PIAS4 modificada por SUMO2 en condiciones de ROGD. En el caso de la proteína HMG20B se observó la banda correspondiente a la modificación por SUMO2 en las condiciones control, OGD y ROGD. En una exposición breve se apreció que aun existiendo HMG20B SUMOilada en las tres condiciones, los niveles de dicha proteína SUMOilada son mayores en condiciones de OGD. Además, a este resultado hay que sumar la reducción de los niveles de la proteína HMG20B en condiciones de OGD (**Figura 30**). La concurrencia de una disminución de los niveles de proteína HMG20B en OGD junto con el aumento de la SUMOilación de dicha proteína en OGD puede explicar la identificación de esta proteína como positiva en la proteómica realizada a pesar de encontrarse SUMOilada en todas las condiciones. Un hecho a mencionar, así mismo, es que el peso molecular correspondiente a la proteína HMG20B modificada por SUMO2 es de aproximadamente 75 kDa mientras que dicha proteína posee un peso molecular aproximado de 35 kDa, por lo que el peso molecular esperado de la proteína SUMOilada sería aproximadamente 50-55 kDa. Desconocemos la razón por la cual se observó tal aumento (**Figura 29**).

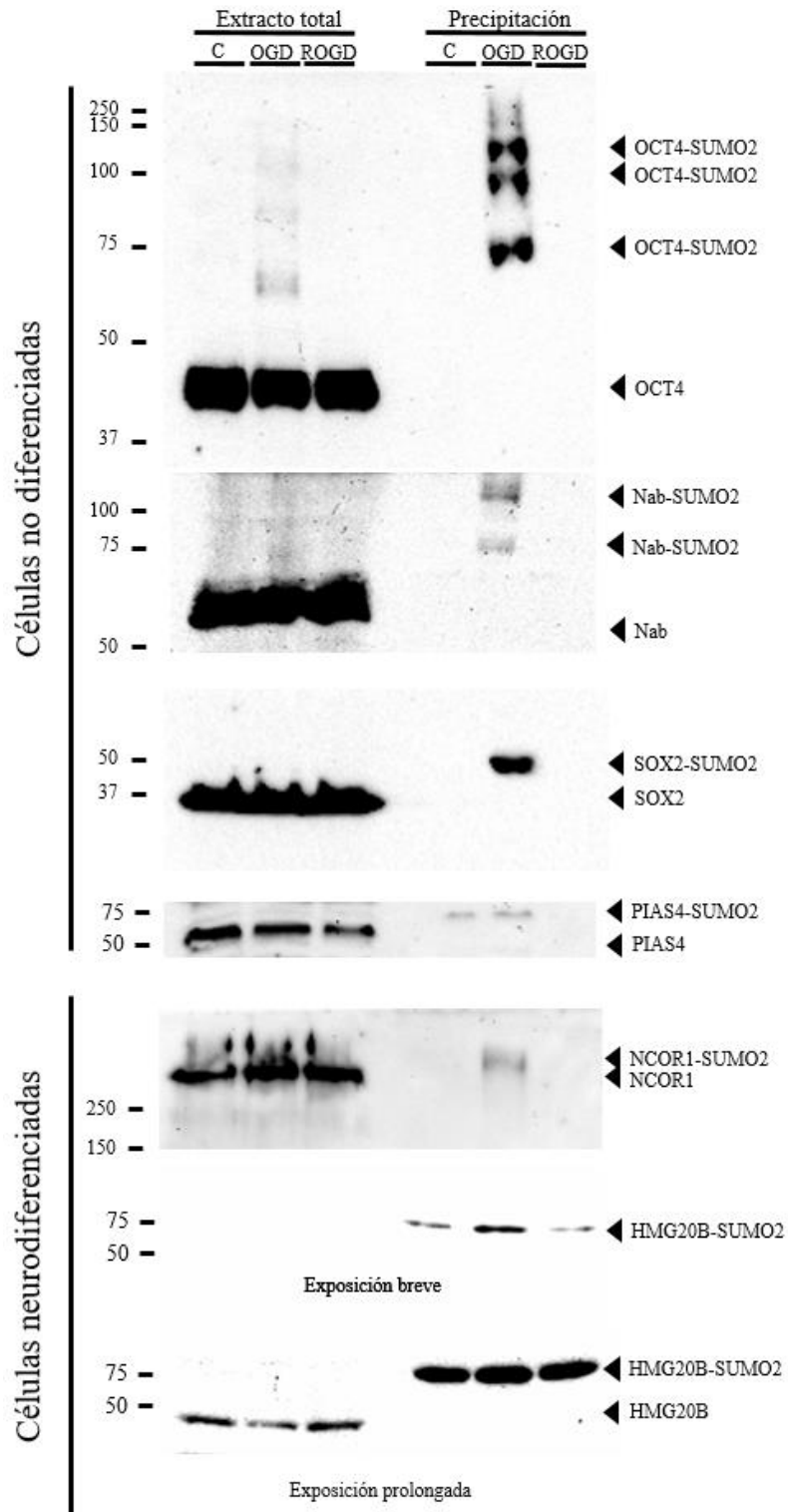


Figura 29. Validación de una selección de proteínas diana de SUMO2 identificadas en el estudio proteómico en condiciones de OGD. Las células, diferenciadas o no diferenciadas, fueron sometidas a 2,5 h OGD y 2,5 h ROGD tras 2,5 h OGD, tal y como se realizaron los experimentos para la identificación del SUMOiloma mediante espectrometría de masas de muestras de proteínas purificadas sin ningún marcaje. Se analizaron mediante *Western blot* las

proteínas indicadas con anticuerpos específicos en extractos totales y tras precipitación con matriz de His. Fueron añadidos 30 μ g de proteína total en cada carril.

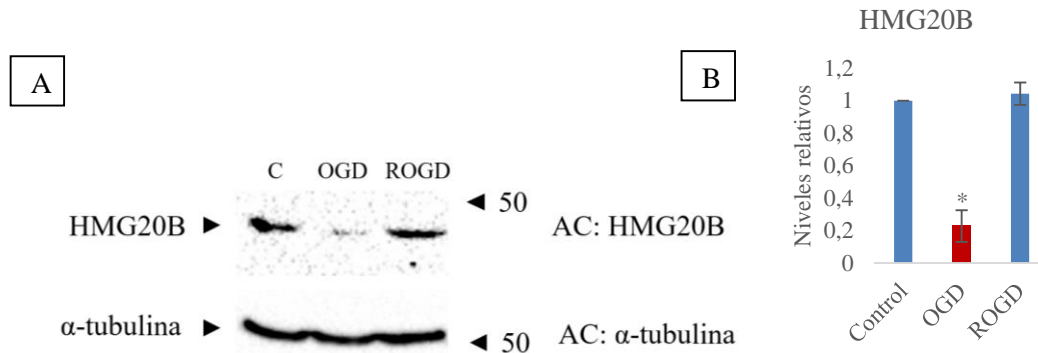


Figura 30. Análisis de los niveles de HMG20B mediante *Western blot* en condiciones de OGD y ROGD. En la figura A se muestra el resultado del tratamiento OGD (2,5 h) y ROGD (2,5 h posterior a 2,5 h OGD) en células P19 sobre los niveles de proteína HMG20B. Se observó una disminución de los niveles de dicha proteína en OGD, mientras que tras 2,5 h ROGD dichos niveles volvieron a los niveles basales de la condición control (C). Se muestra un experimento representativo de *Western blot*. En la figura B se representa la cuantificación del *Western blot* a partir de 3 experimentos de *Western blot* como el mostrado en la figura A. Se observó que la disminución de HMG20B fue significativa en la condición OGD (reducción del 78 % con respecto al control). Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Fueron añadidos 15 μ g de proteína total en cada carril.

Teniendo en consideración todos los datos anteriores, se pudo asumir que la SUMOilación posee un papel altamente relevante en los procesos de OGD y ROGD tanto en estados de proliferación celular como en células neurodiferenciadas debido al alto número de proteínas que se identificaron en ambos estados celulares.

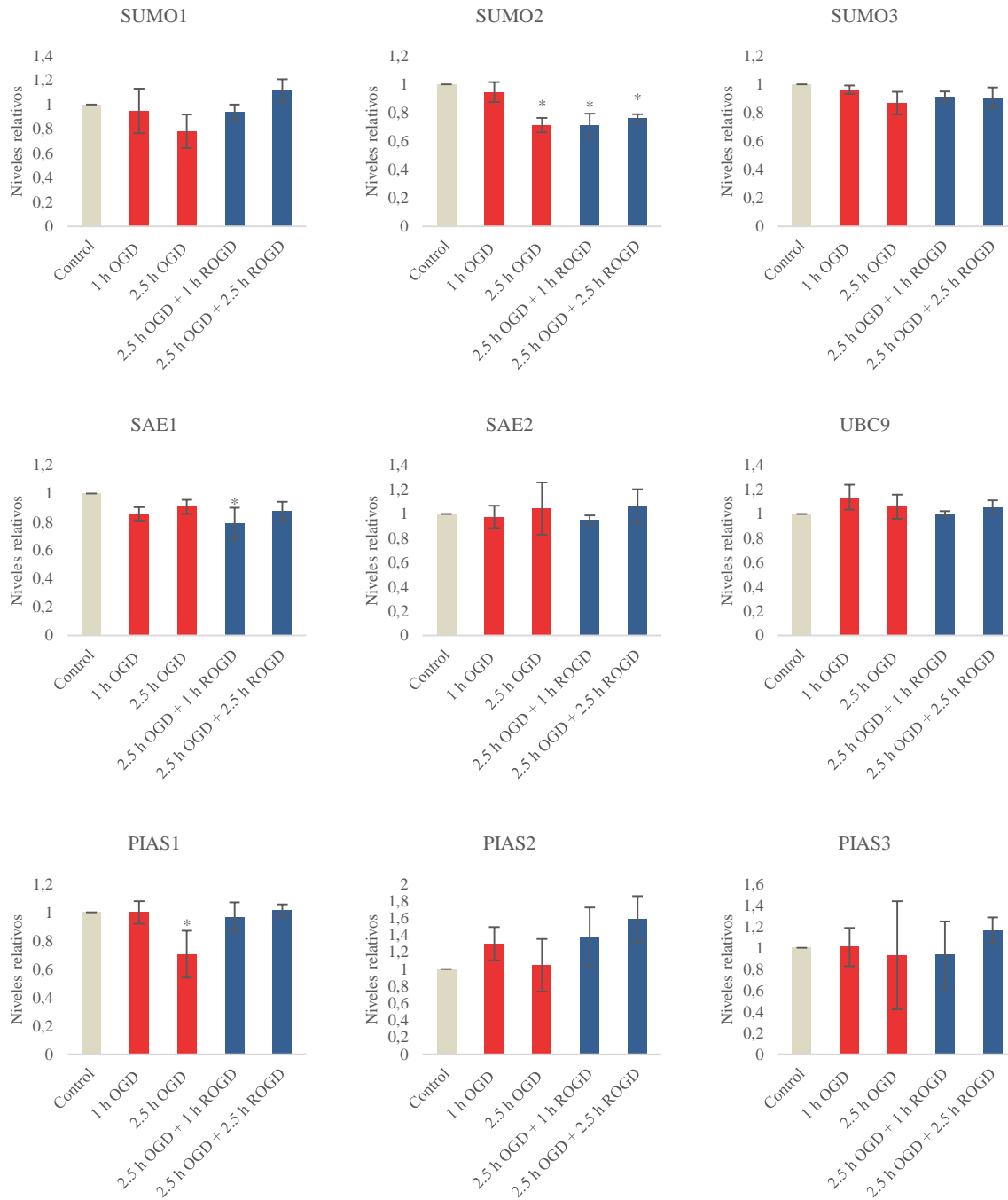
6.3 Análisis de expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en la ruta de SUMOilación en condiciones de OGD y de ROGD

Además del estudio descrito para identificar las proteínas SUMOiladas en condiciones de OGD, nos propusimos realizar un estudio exhaustivo de los niveles de ARNm de los genes de las proteínas que participan en el proceso de SUMOilación a través de qPCR utilizando

muestras obtenidas a diferentes tiempos de tratamiento de OGD y de ROGD. Se obtuvieron datos de los genes que codifican las siguientes proteínas:

- Las 3 moléculas de SUMO mayoritarias en la célula: SUMO1, SUMO2, SUMO3.
- Las proteínas encargadas del proceso de SUMOilación SAE1, SAE2, UBC9, PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4
- Las proteínas encargadas del proceso de deSUMOilación SENP1, SENP2, SENP3, DESI1, SENP5, SENP6 y SENP7.

Se utilizó como control el gen *RpLp0*, fuertemente recomendado por la bibliografía para su utilización en este tipo de experimentos como gen cuya expresión no se modifica en condiciones de hipoxia (Baddela *et al.*, 2014; Bakhashab *et al.*, 2014). Los tiempos estudiados fueron 1 h y 2,5 h durante OGD así como 1h y 2,5 h de ROGD tras 2,5 h de OGD. Los resultados se muestran en la **Figura 31**. Se obtuvo una reducción significativa de los niveles de expresión de los genes de SUMO2 desde 2,5 h de OGD en adelante, así como de los genes de PIAS1 y PIAS4 a las 2,5 h de OGD. El nivel de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP5 descendió a 1 y 2,5 h de OGD, se recuperó a 1 h de ROGD, y ascendió a niveles significativamente superiores a los del control a 2,5 h de ROGD. El caso en el que se detectó el descenso más acusado en el nivel de expresión fue el del gen de la SUMOproteasa SENP7 (**Figura 31**).



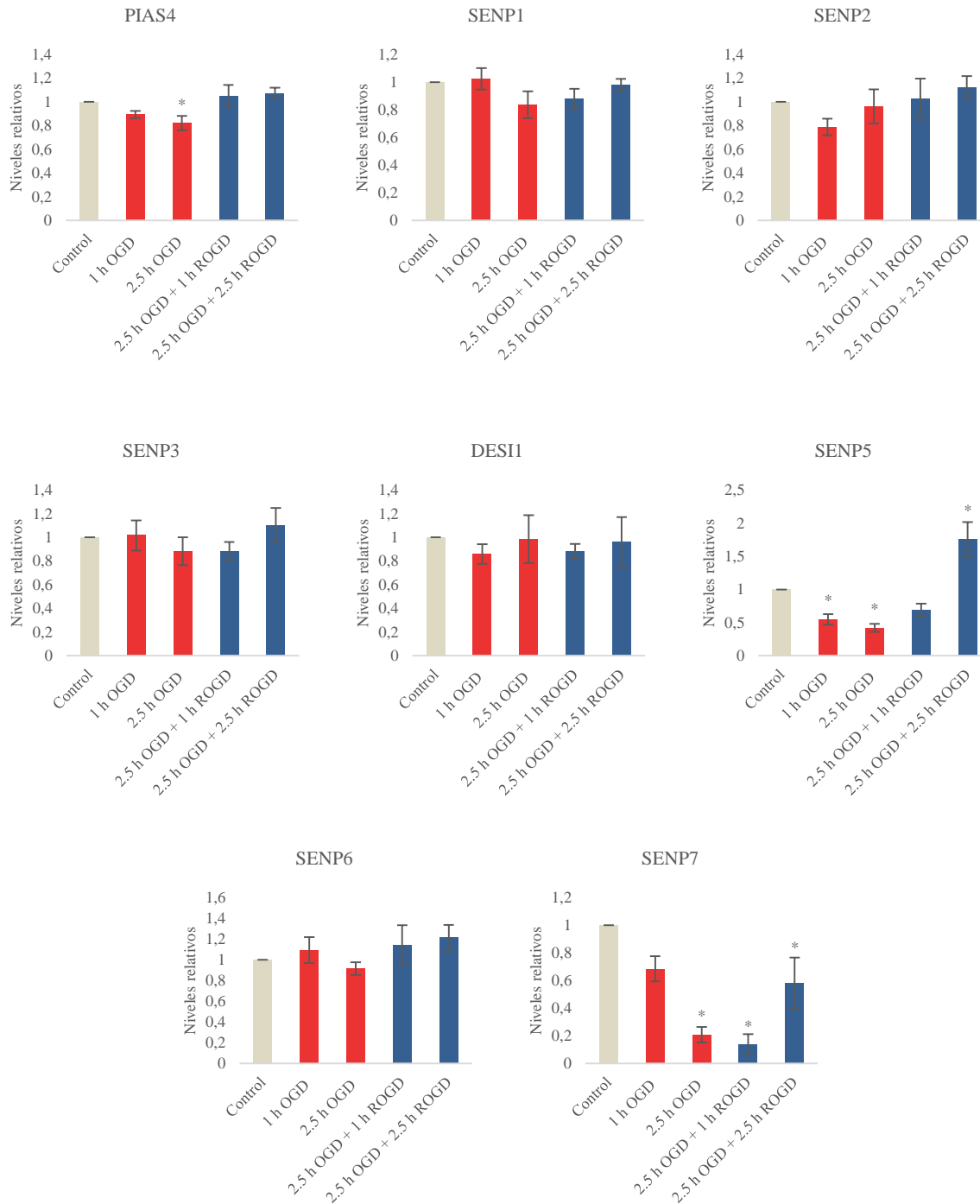


Figura 31. Análisis de expresión de los genes de la ruta de SUMOilación. Se realizó un análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de los genes de los distintos parálogos de SUMO (*Sumo1-3*) así como de los genes de los componentes básicos de la maquinaria de SUMOilación (*Sae1*, *Sae2*, *Ubc9*, *Pias1-4*, *Senp1-3* 5-7 y *Desi1*) en células P19 expuestas a tratamientos de OGD (en color rojo) y ROGD (en color azul) durante los tiempos indicados. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control (en color gris). Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se obtuvo una reducción significativa de los niveles de expresión durante 2,5 h de OGD en los casos de los genes de las proteónas SUMO2, PIAS1, PIAS4, SENP5 y SENP7, recuperándose en todos los casos los niveles de

expresión tras 2,5 h de ROGD excepto en el caso de SUMO2, en el que la reducción observada permaneció durante los tiempos estudiados. Nótese que la escala de cada gráfica es diferente según los valores de expresión máximos y mínimos de cada uno de los genes estudiados.

6.4 Función en viabilidad celular de los componentes de la ruta de SUMOilación y de las dianas de SUMO identificadas en condiciones de OGD

Una vez identificado el SUMOiloma en OGD así como los genes de la ruta de SUMOilación cuyos niveles de expresión varían más significativamente en dichas condiciones de estrés, el siguiente objetivo en el análisis de los efectos de la SUMOilación en OGD fue el estudio de la supervivencia celular alterando tanto los niveles de las proteínas de la ruta de SUMOilación como la SUMOilación de las proteínas diana de SUMO en condiciones de OGD identificadas en la proteómica realizada. Para este propósito se contó con tres métodos diferentes de medida de la supervivencia celular: método con la enzima LDH, método con anexina y método con yoduro de propidio, anteriormente descritos en el apartado de materiales y métodos. La modificación artificial de los niveles de proteínas implicadas en SUMOilación o SUMOiladas durante OGD se llevó a cabo a través de la transfección de plásmidos portadores de dichas proteínas o bien de los mutantes KR (no SUMOilables) correspondientes. Las células fueron sembradas 24 h previo a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina excepto en las transfecciones de los plásmidos portadores de moléculas shARN, las cuales se mantuvieron durante 24 h más en medio DMEM habitual una vez retirada la lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento de OGD durante 24 h.

En primer lugar se analizó la sobreexpresión de SUMO1 y SUMO2. Dados los precedentes sobre la disminución de los niveles de apoptosis celular en condiciones de OGD por aumentos artificiales de los niveles de UBC9 (Lee *et al.*, 2011) se estudiaron también los niveles de citotoxicidad celular tras el aumento de los niveles de dicha proteína. Para comprobar si aumentos de SUMOilación provocados por el aumento de proteínas ligasas PIAS producían un efecto protector frente a OGD se realizaron estudios con las proteínas PIAS1-4. Se estudió también los efectos de la modificación de los niveles de SENP7 dado que la respuesta más drástica en el estudio a través de qPCR de entre los genes estudiados de las proteínas implicadas en el ciclo de SUMOilación fue presentada por el gen de dicha SUMOproteasa. Dada la descripción reciente de dos dominios funcionales claramente

diferenciados en SENP7, uno N-terminal con actividad de fijación de HP1 y otro C-terminal catalítico, se decidió sobreexpresar también el dominio catalítico por separado para discriminar entre ambas actividades. Así mismo, se realizaron estudios modificando los niveles de SENP3 debido a los resultados publicados sobre la actividad proapoptótica de dicha proteína en OGD (Guo *et al.*, 2013). Por la misma razón también se estudió la modificación de los niveles de SENP1 (Cimarosti *et al.*, 2012). Finalmente se procedió al estudio de la viabilidad celular a través de la sobreexpresión de una selección de proteínas identificadas y validadas de la proteómica realizada en OGD. Se realizaron análisis tanto de las proteínas nativas como de los mutantes KR, no SUMOilables, de PIAS4, OCT4, NAB2 y SOX2.

Los resultados obtenidos de las medidas de supervivencia celular a través de los métodos explicados anteriormente se muestran en las **Figuras 32-41**. Los resultados se muestran en tanto por ciento referido a los niveles hallados en las transfecciones control con plásmidos vacíos. En el caso de las transfecciones de los shARN se utilizó el sh control especificado en el apartado de material y métodos. Los niveles para los controles en % de células marcadas con IP, % de células marcadas con anexina y % de citotoxicidad basal con LDH fueron, respectivamente, $47,5 \pm 4,6$, $46,8 \pm 5,3$ y $52,0 \pm 5,0$ para pAdRSV-Sp y $45,0 \pm 4,0$, $45,8 \pm 5,8$ y $45,4 \pm 6,4$ para el sh control. Se obtuvo una disminución significativa de la citotoxicidad celular tras la exposición a OGD en los casos de aumento de los niveles de las proteínas SUMO2, UBC9, PIAS4 y SENP7. Por el contrario, se obtuvo un aumento significativo de la citotoxicidad celular tras la exposición a OGD en los casos de aumento de los niveles de las proteínas SENP3. Así mismo, se observó un efecto sinérgico entre las moléculas shSENP7 y SENP3 debido al aumento de citotoxicidad tras la exposición a OGD con respecto a las muestras transfectadas con el plásmido control así como con las molécula shSENP7 y la proteína SENP3 por separado. En la comparación de las 4 proteínas cuyos mutantes KR fueron también transfectados se obtuvo una mayor citotoxicidad celular tras la exposición a OGD al transfectar el mutante KR en todos los casos excepto en el caso de la proteína OCT4, cuyo mutante KR presentó, interesantemente, el comportamiento contrario (**Figuras 32-41**).

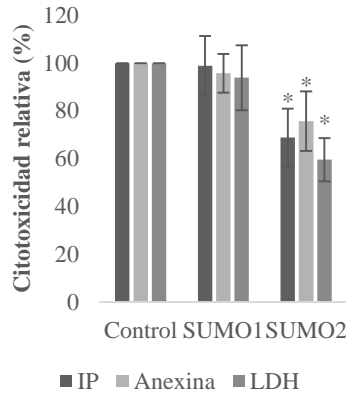


Figura 32. La sobreexpresión de SUMO2 incrementa la viabilidad celular en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección en células P19. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. Las células fueron expuestas a tratamiento de OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad al sobreexpresar SUMO2 según las tres medidas de viabilidad celular. No se aprecian diferencias significativas en el caso de la sobreexpresión de SUMO1.

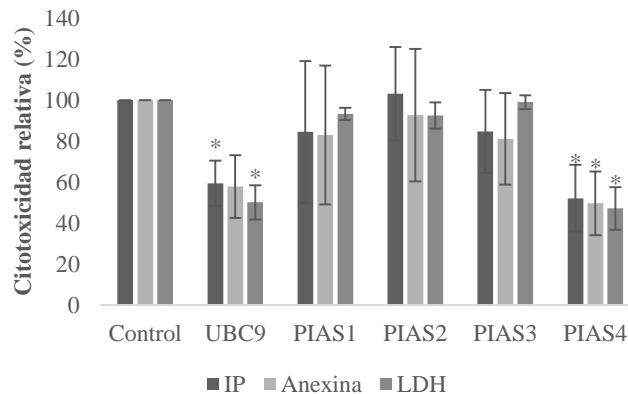


Figura 33. La sobreexpresión de UBC9 y PIAS4 incrementa la viabilidad celular en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección en células P19. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento de OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento de OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad tras la

sobreexpresión de la proteína UBC9 según las medidas de viabilidad celular realizadas con el método IP así como con LDH así como niveles significativos de reducción de citotoxicidad tras la sobreexpresión de la proteína PIAS4 según las tres medidas de viabilidad celular. No se apreciaron diferencias significativas en el caso de la sobreexpresión de PIAS1, PIAS2 ni PIAS3.

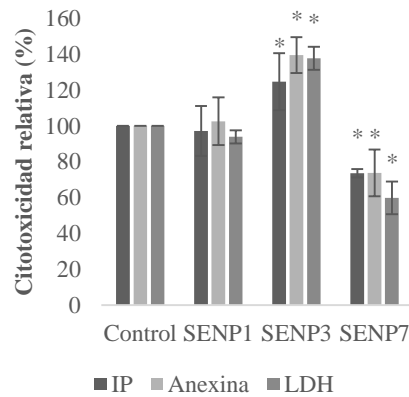


Figura 34. La sobreexpresión de SENP7 incrementa la viabilidad celular mientras que la sobreexpresión de SENP3 muestra el efecto contrario en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. Las células fueron expuestas a tratamiento de OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de aumento de citotoxicidad tras la sobreexpresión de la proteína SENP3 según las tres medidas de viabilidad celular así como niveles significativos de reducción de citotoxicidad tras la sobreexpresión de la proteína SENP7 según las medidas de viabilidad celular realizadas con el método IP así como con LDH. No se apreciaron diferencias significativas en el caso de la sobreexpresión de SENP1.

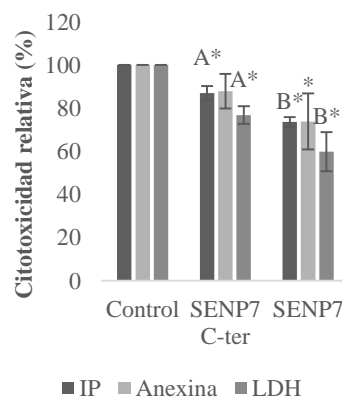


Figura 35. El incremento en la viabilidad celular producido por SENP7 es debido tanto a su dominio catalítico (SENP7 C-ter) como a funciones del resto de su estructura en células

P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. Las células fueron expuestas a tratamiento OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Con A y B se expresan diferencias entre SENP7 C-ter y SENP7. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad tras la sobreexpresión del dominio catalítico de SENP7 y de la proteína SENP7. Mientras que en el caso del dominio catalítico de SENP7 la reducción de citotoxicidad fue significativa en los análisis realizados a través del método con IP y con LDH, en el caso de SENP7 la reducción de citotoxicidad fue significativa en los tres análisis realizados. Además, se apreciaron diferencias significativas en la comparación entre SENP7 C-ter y SENP7 ya que en los análisis realizados a través del método con IP y LDH se obtuvo una reducción significativa de los niveles de citotoxicidad tras la sobreexpresión de SENP7 frente a las de su dominio catalítico.

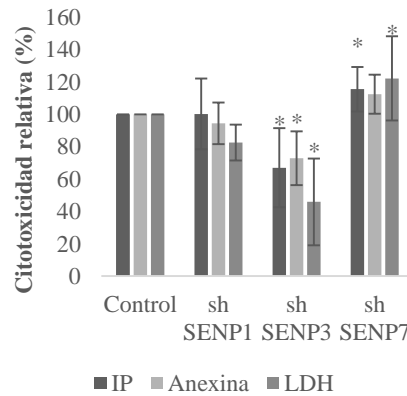


Figura 36. La disminución de los niveles de SENP7 disminuye la viabilidad celular mientras que la disminución de los niveles de SENP3 muestra el efecto contrario en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. Se mantuvieron durante 24 h en medio DMEM habitual una vez retirada la lipofectamina y posteriormente fueron expuestas a tratamiento OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad en las transfecciones de la molécula shSENP3 según las tres medidas de viabilidad celular así como niveles significativos de aumento de citotoxicidad en las transfecciones de la molécula shSENP7 según las medidas de viabilidad celular realizadas con los métodos IP y LDH. No se apreciaron diferencias significativas en el caso de la transfección de shSENP1.

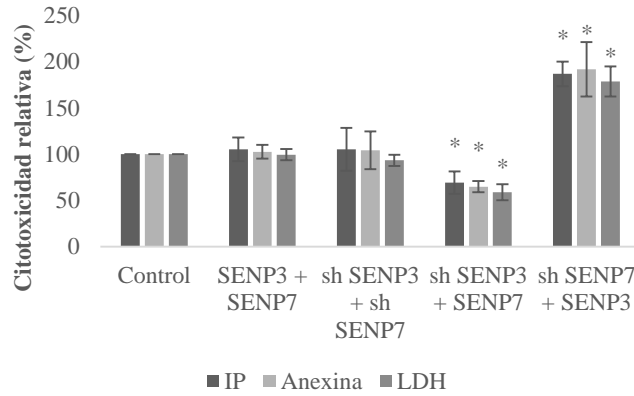


Figura 37. La combinación de niveles opuestos de SENP3 y SENP7 muestra efectos sinérgicos sobre la citotoxicidad por OGD en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento de OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina excepto en las transfecciones en las células transfectadas con moléculas shARN, las cuales se mantuvieron durante 24 h en medio DMEM habitual una vez retirada la lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad en transfecciones de la molécula shSENP3 junto con el vector de expresión de SENP7 según las tres medidas de viabilidad celular así como niveles significativos de aumento de citotoxicidad en transfecciones de la molécula shSENP7 junto con el vector de expresión de SENP3 según las tres medidas de viabilidad celular tanto en comparación con el control como frente a las transfecciones del vector de expresión de SENP3 y de la molécula shSENP7 por separado (ver **Figuras 34 y 36**). No se apreciaron diferencias significativas con respecto al control en el caso de la sobreexpresión de SENP3 y SENP7 ni en el caso de la transfección de shSENP3 con shSENP7.

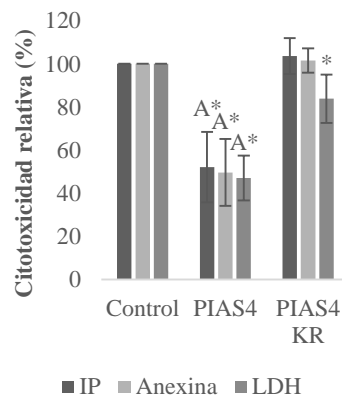


Figura 38. La deSUMOilación de PIAS4 inhibe los efectos citoprotectores de dicha ligasa frente a OGD en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la

transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento de OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento de OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad en las transfecciones de la proteína PIAS4 según las tres medidas de viabilidad celular analizadas. No se apreciaron diferencias significativas en el caso de la sobreexpresión del mutante de SUMOilación de PIAS4 (PIAS4KR) según las medidas de viabilidad celular realizadas con el método IP y anexina, aunque sí se apreció un descenso ligero pero significativo de la citotoxicidad a través del método LDH.

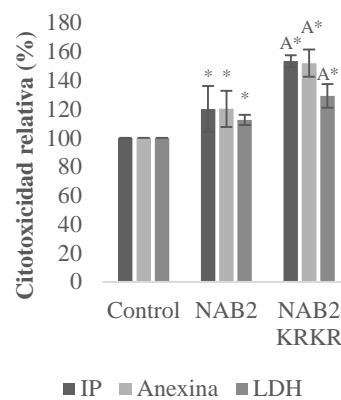


Figura 39. Un mutante de SUMOilación de NAB2 produce un aumento de los niveles de citotoxicidad celular con respecto a la proteína nativa NAB2 en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento de OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento de OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control mientras que con A y se expresan diferencias entre la sobreexpresión de la proteína nativa y el mutante de SUMOilación de esta. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de aumento de citotoxicidad tras la sobreexpresión de NAB2 según las tres medidas de viabilidad celular así como un aumento mayor en la citotoxicidad celular tras la transfección del vector de expresión de NAB2KRKR, tanto con respecto al control como con respecto a la proteína NAB2 según las tres medidas de viabilidad celular.

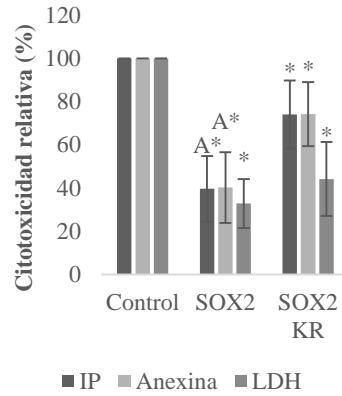


Figura 40. Un mutante de SUMOilación de SOX2 disminuye los efectos citoprotectivos de SOX2 frente a OGD en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control mientras que con A y se expresan diferencias entre la sobreexpresión de la proteína nativa y el mutante de SUMOilación de esta. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de disminución de citotoxicidad tras la sobreexpresión de SOX2 según las tres medidas de viabilidad celular con respecto al control así como según las medidas de viabilidad celular con IP y anexina frente a la sobreexpresión de SOX2KR. Aunque la transfección del vector de expresión de SOX2KR también provocó una disminución en la citotoxicidad por OGD, ésta fue menor que en las transfecciones con el vector de expresión de la proteína SOX2 según las medidas de viabilidad celular realizadas con el método IP y anexina.

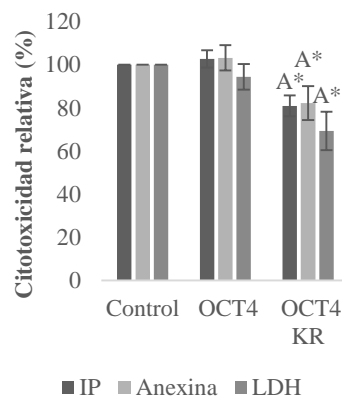


Figura 41. Un mutante KR de OCT4 produce efectos citoprotectivos frente a OGD en células P19. Las células fueron sembradas 24 h previamente a la transfección. Tras las

transfecciones de los diferentes plásmidos permanecieron en el medio con lipofectamina durante 24 h en todos los casos. El tratamiento OGD se realizó una vez finalizaron las 24 h de exposición a lipofectamina. Las células fueron expuestas a tratamiento OGD durante 24 h. Se representa el porcentaje, con respecto al control, de células marcadas con yoduro de propidio (IP) o anexina (Anexina) o bien de actividad LDH (LDH) del medio extracelular. En todos los casos se representa la media \pm desviación estandar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control mientras que con A y se expresan diferencias entre la sobreexpresión de la proteína nativa y el mutante de SUMOilación de esta. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se apreciaron niveles significativos de reducción de citotoxicidad tras la transfección del vector de expresión de OCT4KR según las tres medidas de viabilidad celular. No se aprecian diferencias significativas en el caso de la sobreexpresión de OCT4.

6.5 Análisis de la SUMOproteasa SENP7 en OGD y ROGD

6.5.1 Análisis de los niveles de proteína SENP7 así como de los niveles de expresión de sus diferentes variantes en condiciones de OGD y de ROGD

Ya que *Senp7* es el gen cuya expresión varió más drásticamente entre todos los genes estudiados del ciclo de SUMOilación, se realizó un análisis detallado de la expresión de dicho gen utilizando la misma técnica que en los experimentos del apartado anterior pero prolongando el tiempo de estudio hasta las 6 h (**Figura 42**). Para realizar el estudio de los niveles de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP7 se utilizaron los oligonucleótidos de SENP7 F19 y R22, indicándose con una F oligonucleótido iniciador hacia adelante, en inglés *forward primer* y con una R oligonucleótido iniciador reverso, en inglés *reverse primer*. Dichos oligonucleótidos amplifican ARNm correspondiente a la expresión de todas las variantes de *Senp7* excepto la variante X2 (carente del exón 22, $\Delta 22$) (**Figura 44**). Se observó una disminución significativa de la expresión de *Senp7* desde 1,5 h hasta 6 h tras OGD, observándose una recuperación de los niveles de expresión al aplicar condiciones de ROGD tras 2,5 h de OGD.

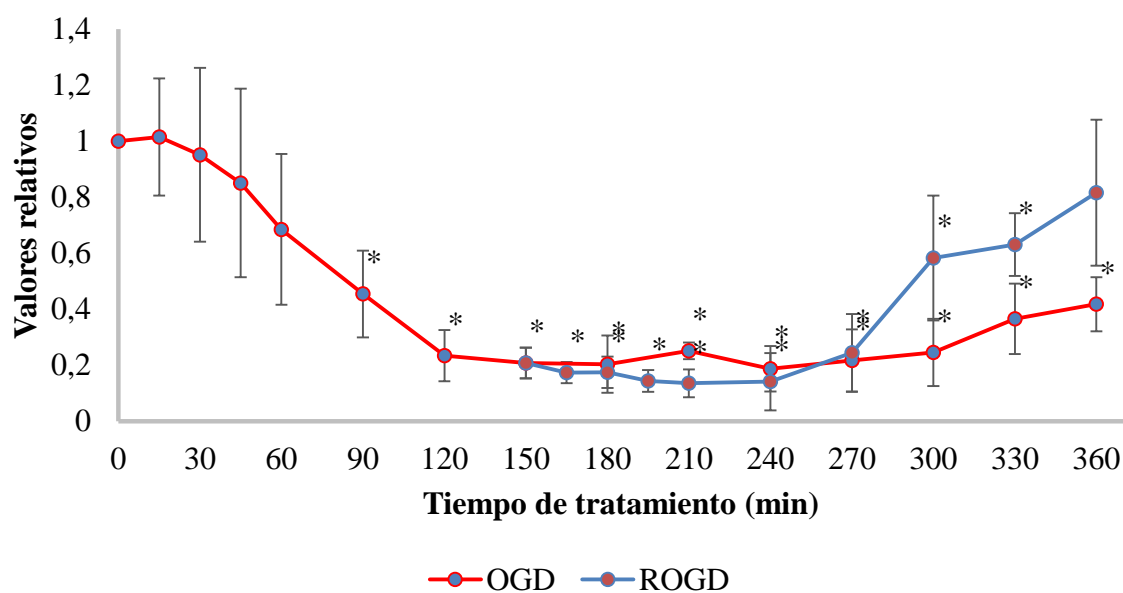


Figura 42. La expresión del gen *Senp7* se regula por OGD y ROGD. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión génica de *Senp7* en células P19 expuestas a tratamientos de OGD (en color rojo) y ROGD (en color azul) según los tiempos indicados. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. Se observó una disminución significativa de la expresión de ARNm de *Senp7* desde 1,5 h (90 min) hasta 6 h (360 min) tras OGD.

Debido a que *Senp7* es el gen cuya expresión varió más drásticamente entre todos los genes del ciclo de SUMOilación estudiados en los experimentos de qPCR mostrados, se realizó un análisis detallado de la expresión de la proteína de dicho gen mediante *Western blot* (**Figura 43**). Desde 0,5 h de OGD hasta 5 h de OGD se observaron bandas reactivas al anticuerpo contra SENP7 de menor tamaño que la observada en condiciones normales de crecimiento. En los periodos de ROGD se observó de nuevo, al igual que en el control, una sola banda, que migró a la misma posición que la banda observada en el control. Se observó, además, un aumento de los niveles de SENP7 tras 2,5 h de ROGD con respecto al punto 1 h de ROGD.

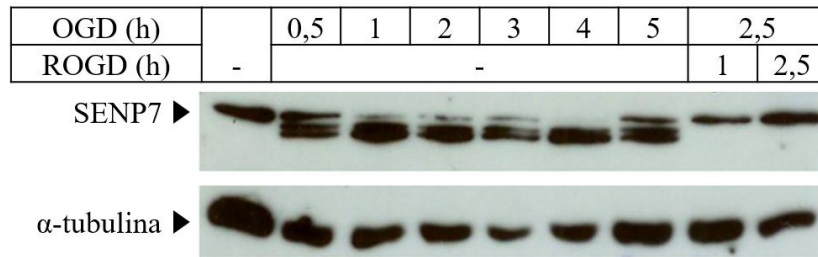


Figura 43. Cambios en el tamaño y nivel de expresión de SENP7 en condiciones de OGD y de ROGD. Se expusieron células P19 a los tiempos indicados de OGD y de ROGD. Los extractos celulares se realizaron mediante experimentos de *Western blot* con anticuerpos contra la proteína SENP7 en condiciones de OGD y de ROGD. En todos los tiempos analizados se observa una banda correspondiente a SENP7, excepto en el periodo de 4 h de OGD, en el que dicha banda del tamaño de SENP7 no se observó. Además, en todos los tiempos analizados durante OGD se observan dos bandas adicionales que migraron con mayor rapidez que la banda superior anteriormente mencionada. Se observó, así mismo, un aumento de los niveles de SENP7 conforme el periodo ROGD se prolongó desde 1 h hasta 2,5 h. Fueron añadidos 20 μ g de proteína total en cada carril.

Resultados previos en publicaciones acerca de SENP7 han demostrado la existencia de respuestas biológicas diferenciales según los niveles de dos isoformas de SENP7 humanas descritas en cáncer de mama. En dicho cáncer se reducen los niveles de SENP7S (isoforma sin exón 6) y aumentan los de SENP7L (isoforma con exón 6) (Bawa-Khalife *et al.*, 2012; Karami *et al.*, 2017). Con el objetivo de evaluar si el resultado observado en el análisis de los niveles de proteína SENP7 por *Western blot* fue debido al cambio en la producción de diferentes isoformas de dicha proteína, se ideó una estrategia a través de PCR para intentar conocer la presencia o ausencia de forma no cuantitativa en OGD y ROGD de la expresión de las diferentes isoformas de la proteína SENP7 que resultan del empalme alternativo de su ARNm existentes según la base de datos de *NCBI Reference Sequence* (**Figura 44**).

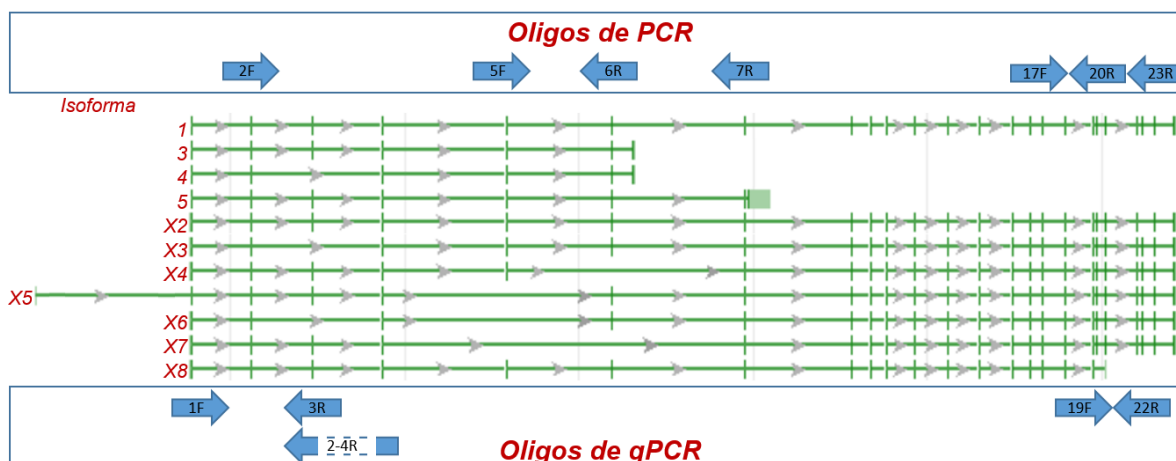


Figura 44. Empalme alternativo del gen *Senp7*. Alineamiento de secuencias de variantes distintas del gen *Senp7* que resultan del empalme alternativo del ARNm según *NCBI Reference Sequences* (RefSeq, última actualización disponible, del 10-Feb-2018). Cada línea verde vertical indica un exón. Se representan los oligonucleótidos utilizados para los experimentos de PCR y qPCR de *Senp7*, indicándose el nombre del oligonucleótido según el número del exón en el que se encuentre y las siglas R o F según es un oligonucleótido *reverse* o *forward*, respectivamente.

Las variaciones observadas mediante *Western blot* podrían ser debidas a variaciones en la expresión de las isoformas cuyos pesos moleculares predichos oscilan entre 93.98 kDa y 116.36 kDa (**Tabla 7**), por lo que las isoformas 3, 4 y 5 no se tuvieron en cuenta como posibles candidatos, al presentar pesos moleculares predichos muy inferiores al resto.

Tabla 7. Isoformas alternativas de SENP7. Número de referencia, número de aminoácidos, peso molecular predicho (kDa) y descripción de secuencias de isoformas distintas de la proteína SENP7, que resultan del empalme alternativo del ARNm del gen *Senp7* según *NCBI Reference Sequences* (RefSeq, última actualización disponible, del 10-Feb-2018).

Isoforma	Referencia	Nº AA	Peso molecular (kDa)	Descripción
1	NP_079759.2	1037	116.36	Completa
3	NP_001003972.1	254	28.15	Final en exón 6
4	NP_001003973.1	227	25.17	Final en exón 6
5	NP_001291432.1	291	31.99	Final en exón 7

X2	XP_006522514.1	1014	113.84	Sin exón 22
X3	XP_017172600.1	1010	113.38	Sin exón 3
X4	XP_006522515.1	973	109.29	Sin exón 6
X5	XP_006522516.1	971	108.86	Sin exón 5
X6	XP_006522517.1	944	105.88	Sin exones 3 y 5
X7	XP_006522518.1	907	101.79	Sin exones 5 y 6
X8	XP_006522519.1	845	93.98	Final en exón 18

Para el estudio de la presencia de ARNm de las distintas variantes de *Senp7* se aisló ARN de células P19 en 3 condiciones diferentes: Control, 2,5 h de OGD y 2,5 h de ROGD tras 2,5 h de OGD. A través de RT-PCR utilizando como molde dicho ARN se produjo el correspondiente ADNc. Este ADNc fue utilizado como molde para diferentes parejas de oligonucleótidos (**Figura 44**), siendo los productos de PCR resultantes diferentes según las diferentes variantes de *Senp7* (**Figura 45**). En todas las PCR se obtuvieron los tamaños esperados para la existencia de las variantes 1 y X3 (**Figura 45** y **Tabla 8**). En la PCR con los oligonucleótidos 17F/20R se obtuvo el tamaño esperado para la variante X2 (coincidente con el de la variante 1). Sin embargo, la PCR realizada con los oligonucleótidos 17F/23R no muestra la existencia del tamaño esperado para la variante X2. En ninguno de los casos se encontró una banda diferencial entre las condiciones control, OGD y ROGD, por lo que fue descartada la hipótesis acerca de la posible existencia de diferentes isoformas de SENP7 en OGD que explicasen los tamaños de bandas de proteína con menor peso molecular observados en relación a la condición control o tras ROGD (**Figura 45**).

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en los análisis de empalme alternativo de *Senp7*. Parejas de oligonucleótidos de PCR y tamaños esperados en pares de bases (pb) para cada una de las variantes. Se muestran subrayados los productos cuyo resultado fue patente en los experimentos mostrados en la **Figura 45**.

Parejas de oligonucleótidos de PCR y tamaños esperados (pb)					
Variante	2F/7R	5F/7R	2F/6R	17F/20R	17F/23R
1	<u>715</u>	<u>442</u>	<u>557</u>	<u>365</u>	<u>591</u>
X2				<u>365</u>	522
X3	<u>634</u>		<u>476</u>		
X4	523	250			
X5	517		359		
X6	436				
X7	325				
X8				240	

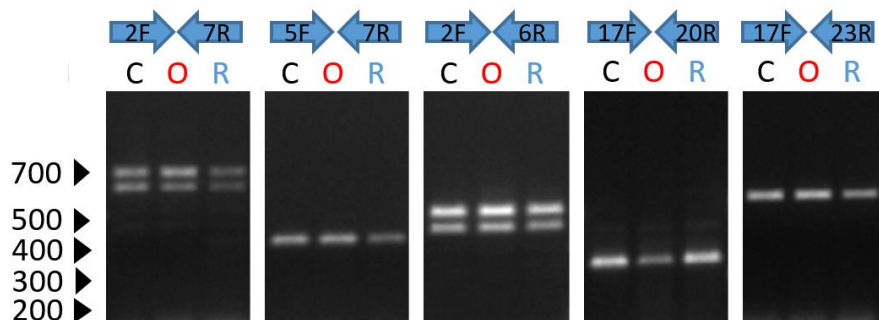


Figura 45. Análisis de empalme alternativo del gen *Senp7* en células P19. Células P19 fueron sometidas a 2,5 h de OGD o 2,5 h de ROGD desde 2,5 h de OGD. Posteriormente se realizó la extracción de ARN de dichas células. A partir de las muestras de ARN se obtuvo el correspondiente ADNc a través de RT-PCR. Dicho ADNc fue utilizado como molde para diferentes parejas de oligos. Se muestran productos de PCR resultantes de las PCR realizadas con los diferentes pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar la presencia de ARNm de las distintas variantes de *Senp7* durante tratamientos OGD y ROGD. Los tamaños del marcador se muestran a la izquierda. Las parejas de oligonucleótidos se indican con las flechas, señalando estas hacia la derecha en el caso de oligonucleótidos *forward* y hacia la izquierda en

el caso de oligonucleótidos *reverse*. Se señala, así mismo, el tratamiento a través de C de color negro (control), O de color rojo (2,5 h OGD) y R de color azul (2,5 h OGD + 2,5 h ROGD).

Las únicas variantes cuya existencia fue demostrada a partir de los experimentos de PCR realizados fueron las variantes 1 y X3. Como los oligonucleótidos utilizados anteriormente para los estudios de expresión de *Senp7* no distinguen entre ambas isoformas, se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada una de ellas. Para la determinación de los niveles de la isoforma 1 se utilizó la pareja de oligonucleótidos de qPCR 1F/3R, mientras que para la determinación de los niveles de la isoforma X3 se utilizó la pareja de oligonucleótidos de qPCR 1F/2-4R, siendo 1F el oligonucleótido *forward* posicionado en el exón 1, 3R el oligonucleótido *reverse* posicionado en el exón 3 y 2-4R el oligonucleótido *reverse* posicionado a caballo entre los exones 2 y 4. De esta manera la pareja 1F/3R no amplificó el ARNm de la isoforma X3 dado que dicha isoforma carece del exón 3, mientras que la pareja de oligonucleótidos 1F/2-4R no amplificó el ARNm de la isoforma 1 dado que la existencia del exón 3 entre los exones 2 y 4 impidió el apareamiento del oligonucleótido 2-4R. Se observó que las isoformas 1 y X3 se comportaron de igual forma tras los tratamientos OGD y ROGD dado que, igualmente a lo descrito en la **Figura 42**, se redujo la expresión génica de ambas isoformas tras OGD y posteriormente se produjo un aumento significativo de la expresión génica de ambas isoformas tras ROGD aunque sin alcanzarse los niveles previos a OGD. Además se estudió la proporción existente de ARNm de ambas isoformas, concluyéndose que la isoforma 1 es la mayoritaria ya que representó casi la totalidad de ARNm existente de la proteína SENP7 (**Figura 46**).

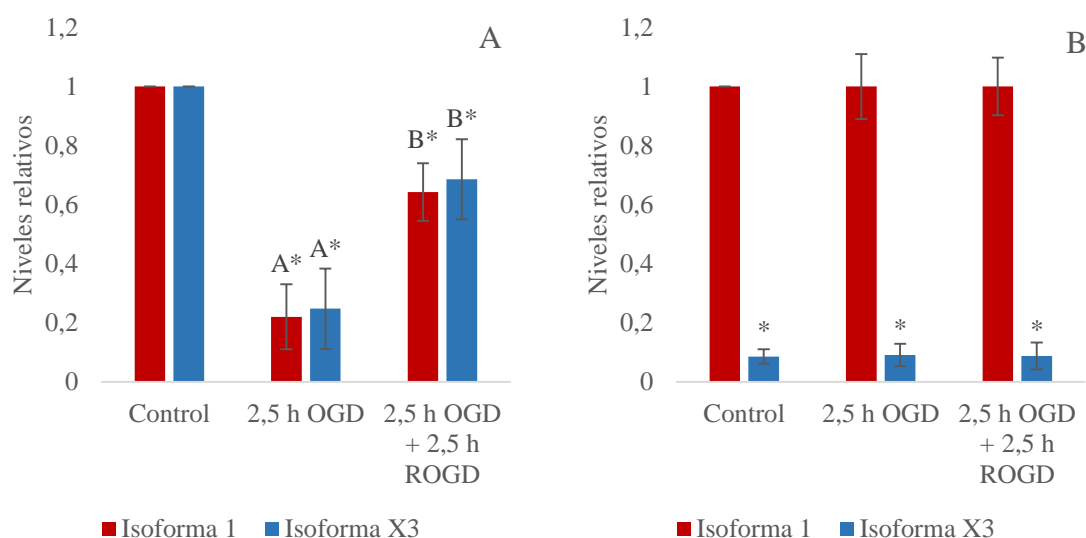


Figura 46. Análisis de los niveles de expresión de las variantes de las isoformas 1 y X3 de SENP7. Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión génica de las variantes 1 (en color rojo) y X3 (en color azul) de *Senp7* en células P19 expuestas a tratamientos de 2,5 h OGD y 2,5 h ROGD posterior a una OGD de 2,5 h. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las letras A y B representan grupos significativamente distintos entre sí. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni. En la figura **A** se aprecia que las variantes 1 y X3 se comportaron de igual forma tras los tratamientos OGD y ROGD, de forma que, igualmente a lo descrito en la **Figura 42**, se redujo la expresión génica de ambas variantes tras OGD. Posteriormente se produjo un aumento significativo de la expresión génica de ambas variantes en ROGD, aunque no se alcanzaron los niveles previos a OGD. En la figura **B** se aprecia la proporción existente de ARNm de ambas variantes. La variante 1 es la mayoritaria, representando casi la totalidad de ARNm existente de la proteína SENP7.

6.5.2 Análisis de degradación de SENP7 por la caspasa 1

Dado que los cambios ocasionados en la proteína SENP7 observados mediante *Western blot* no pudieron ser explicados mediante cambios a nivel de transcritos de las diferentes isoformas de dicha proteína, se realizó un estudio para determinar dianas de proteasas en la proteína SENP7 utilizándose el algoritmo de predicción de sitios de corte de enzimas PeptideCutter del servidor ExPASy (© SIB Swiss Institute of Bioinformatics). Se encontró que la caspasa 1 posee una diana justamente entre los dos dominios de unión a HP1 anteriormente comentados en la introducción, en el aminoácido 102. Para comprobar si la proteasa caspasa 1 realizara el corte predicho en la proteína SENP7 se realizó la transfección con lipofectamina del plásmido de expresión de la proteína SENP7 de ratón en células HEK293T, una de las mejores herramientas para la expresión de proteínas recombinantes (Thomas & Smart, 2005).

Se utilizó como control negativo un vector de expresión de la proteína SENP1 transfectado en las mismas células. Una vez transcurrieron 24 h de exposición a lipofectamina las células fueron recogidas y extraídas tanto en tampón *IP buffer* como en tampón de caspasa 1. Dichos extractos fueron sometidos a tratamiento con la enzima caspasa 1 (C5482 SIGMA) durante 3 h a una concentración de 0,5 U/ μ g de proteínas (**Figura 47**). Se utilizó como control negativo muestras con la proteína SENP1 sobreexpresada. En dichas muestras no se observaron cambios tras el tratamiento con caspasa. En los extractos de células HEK293T con proteína SENP7 sobreexpresada sí se observó una disminución de los niveles de dicha proteína así como la aparición de productos de degradación tanto en experimentos de *Western blot* tanto con anticuerpo contra la proteína SENP7 como contra el epítipo FLAG, situado en el extremo amino de la proteína sobreexpresada (**Figura 47**).

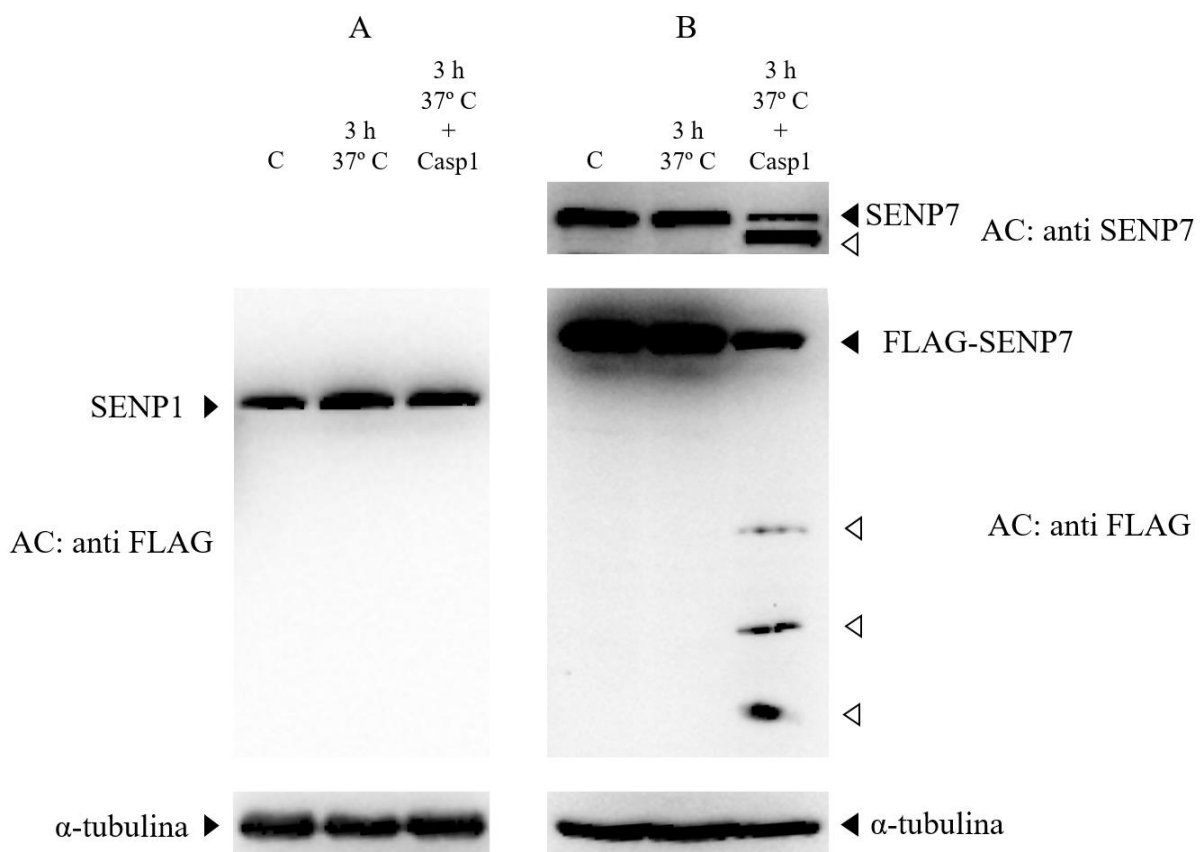


Figura 47. La SUMOproteasa SENP7 es proteolizada por la enzima caspasa 1. Se muestra el resultado del tratamiento con enzima caspasa 1 durante 3 h a 37° C en muestras de células HEK293T que sobreexpresaran SENP1 o SENP7. Así mismo, se realizaron tratamientos a 37° C durante 3 h sin la presencia de la enzima caspasa 1. También se analizaron extractos de células no sometidos a tratamiento. Los extractos celulares fueron llevados a cabo en tampón

de caspasa 1. Las células fueron transfectadas con plásmidos para la expresión de SENP1 o SENP7. Ambas proteínas recombinantes portaban el epítipo FLAG en el extremo N-terminal. Se realizaron experimentos de *Western blot* con anticuerpos contra FLAG, con anticuerpos contra la proteína SENP7 y con anticuerpos contra tubulina como control de carga. En la figura **A** se muestra el resultado de los tratamientos en extractos de células transfectadas con el plásmido para la expresión de SENP1. No se observaron cambios entre control y tratamientos. En la figura **B** se muestra el resultado de los tratamientos en extractos de células transfectadas con el plásmido para la expresión de SENP7. Se observó una disminución de los niveles de la proteína SENP7 a través de la observación con anticuerpos contra la proteína SENP7 así como contra FLAG, la cual se acompañó de la aparición de bandas procedentes de la degradación de la proteína SENP7. Se señalan dichas bandas con puntas de flechas de color blanco. La concentración de caspasa 1 en las muestras que se trataron con dicha enzima fue de 0,5 U/ μ g de proteínas. Fueron añadidos 20 μ g de proteína total en cada carril.

6.6 El factor de transcripción OCT4 es deSUMOilado en OGD por la SUMOproteasa SENP7

Una de las proteínas identificadas en la proteómica previamente descrita fue el factor de transcripción OCT4, previamente descrito en la introducción. Aunque existen evidencias de la SUMOilación de OCT4 por SUMO1, hasta este trabajo no se tenían evidencias de su SUMOilación por SUMO2. En experimentos de *Western blot* con el anticuerpo contra OCT4 tanto en extractos de células de la línea A5 como en los precipitados, mostrándose al menos 3 bandas cuyo peso molecular equivalía a modificaciones por la unión de 1, 2 y 3 moléculas de SUMO2, respectivamente (**Figura 29**). Tal y como se ha descrito en la introducción, SENP7 es, junto a SENP6, la SUMOproteasa que mayor actividad presenta frente a cadenas de poliSUMO, aunque también se ha descrito actividad frente a monómeros de SUMO2 (Nayak & Müller, 2014). Además de ello, existen evidencias de que tanto OCT4 como SENP7 se hallan ubicadas en lugares similares en el interior nuclear, ya que ambas poseen dominios de unión a HP1 (Zaidan *et al.*, 2018), por lo que se comprobó si ambas podrían estar relacionadas realizando transfecciones de los vectores de expresión de la proteína SENP7 en células sujetas a OGD, condición en la que previamente se demostró la SUMOilación por SUMO2 de OCT4 mediante el estudio proteómico. Los resultados se muestran en la **Figura 48**. Mientras que en las condiciones de normoxia no se observó OCT4 SUMOilado, en OGD se observaron 3 bandas correspondientes a SUMO-OCT4 que se reducen completamente en las transfecciones de la proteína SENP7.

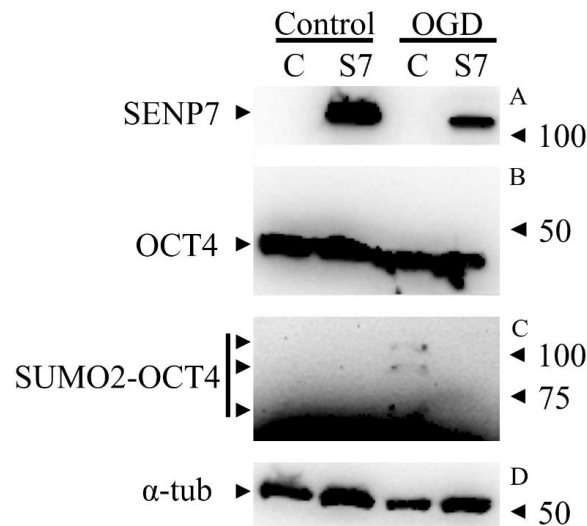


Figura 48. SENP7 actúa como SUMOproteasa de SUMO2-OCT4. Se muestra el resultado de experimentos de *Western blot* de extractos de células P19 tras la transfección con lipofectamina de un plásmido control (C) y un plásmido del vector de expresión de la proteína SENP7 (S7). Las células se mantuvieron 24 h en medio con lipofectamina y posteriormente fueron expuestas a 2,5h de OGD (OGD) o bien se mantuvieron en condiciones de normoxia durante 2,5 h (Control). Los experimentos de *Western blot* se realizaron con anticuerpos frente al epítipo FLAG (A), OCT4 (B, exposición breve, y C, exposición prolongada) y frente a α -tubulina (D). Se observó una reducción completa de las bandas correspondientes a OCT4 modificado por SUMO2 en las células tratadas con OGD en las que se sobreexpresó SENP7. Fueron añadidos 20 μ g de proteína total en cada carril.

Para comprobar con mayor especificidad la actividad de SENP7 sobre OCT4 se realizaron transfecciones de moléculas shARN contra la proteína SENP7 en condiciones de OGD y de ROGD. Los resultados se muestran en la **Figura 49**. Se observó cómo las bandas correspondientes a SUMO2-OCT4 disminuyeron en condición de ROGD debido probablemente a la actuación de la proteína SENP7, ya que en los extractos de células transfectadas con la molécula shARN específica frente a SENP7 se continuó observando la presencia de bandas correspondientes a SUMO2-OCT4 en ROGD.

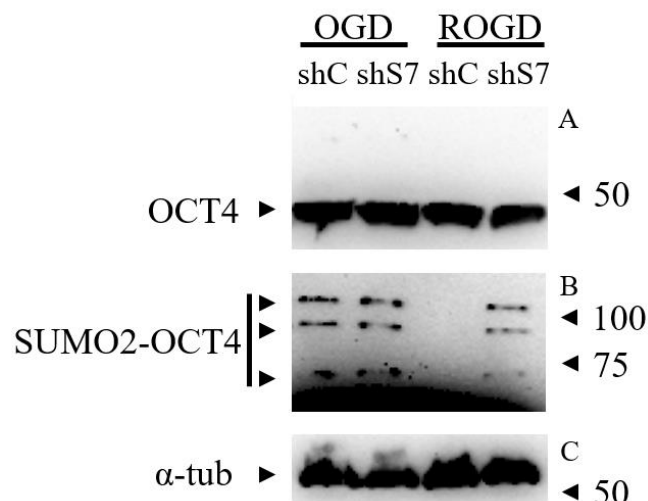


Figura 49. SENP7 actúa como SUMOproteasa de SUMO2-OCT4. Se muestra el resultado de experimentos de *Western blot* con extractos de células P19 tras la transfección con lipofectamina de una molécula shARN control (shC) y de la molécula shARN contra la proteína SENP7 (shS7). Las células se mantuvieron 24 h en medio con lipofectamina y posteriormente se mantuvieron 24 h en reposo. Seguidamente, las células fueron expuestas a 2,5h de OGD (OGD) y a 2,5 h de ROGD tras 2,5 h de OGD (ROGD). Los experimentos de *Western blot* se realizaron con anticuerpos frente a OCT4 (A, exposición breve, y B, exposición prolongada) y frente a α -tubulina (C). Se observó una reducción completa de las bandas correspondientes a OCT4 modificado por SUMO2 en las células tratadas con ROGD, mientras que estas no desaparecieron en las transfecciones de las moléculas shARN contra SENP7. Fueron añadidos 20 μ g de proteína total en cada carril.

6.7 Análisis de viabilidad celular y de expresión de genes del ciclo de SUMOilación en condiciones de estrés diferentes a OGD

Tal y como se comentó en la introducción, los eventos ocurrientes durante la isquemia cerebral se han mimetizado en laboratorio bajo diferentes procesos, como por ejemplo utilizando el compuesto químico CoCl_2 , que ha demostrado mimetizar las condiciones de hipoxia en la célula (Jones & Bergeron, 2001) o con el veneno arsenito, utilizado como agente productor de estrés oxidativo para mimetizar el aumento de estrés oxidativo causado en la isquemia (Castillo & Rodríguez, 2004; Valko *et al.*, 2007; Yang, Sheng, Warner, *et al.*, 2008). Así mismo se ha comentado previamente que altas temperaturas provocan masivos aumentos en los niveles de SUMOilación de proteínas (Saitoh & Hinchey, 2000). Es por todo ello por lo que en este capítulo se propuso estudiar los niveles de SUMOilación de proteínas así como la regulación de los genes de diferentes ligasas y proteasas de SUMO frente a CoCl_2 y otros

tratamientos para mimetizar las condiciones de hipoxia (DMOG y transfecciones de HIF1 α), arsenito y elevadas temperaturas.

6.7.1 Estudios con CoCl₂

6.7.1.1 Estudio del nivel de SUMOilación de proteínas en tratamientos con CoCl₂

Los niveles de proteínas SUMOiladas por SUMO2 se visualizaron por *Western blot* a través del anticuerpo anti-SUMO2. Se observó un incremento desde los 30 min de tratamiento de CoCl₂. Conforme aumentó el tiempo de exposición a CoCl₂ a 2.5 h aparecieron nuevas proteínas SUMOiladas. Una vez pasadas 2.5 h se procedió al lavado con PBS de las células P19 adheridas a la placa de Petri. Una vez lavadas, se procedió a añadir medio α -MEM sin CoCl₂. El resultado fue una disminución del número total de proteínas SUMOiladas así como una disminución de los niveles de SUMOilación de las proteínas aún SUMOiladas (**Figura 50**).

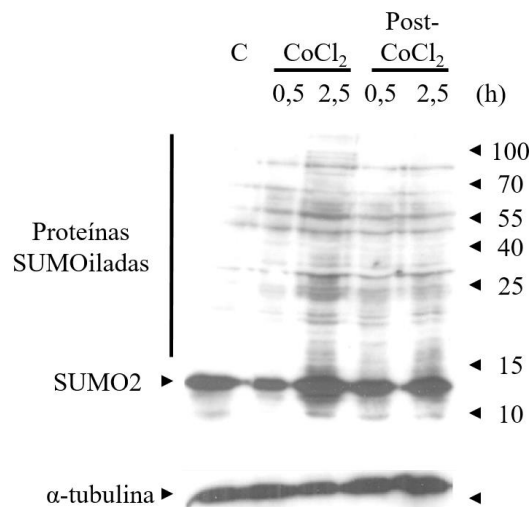


Figura 50. Los niveles de SUMOilación de proteínas aumentan por el tratamiento con CoCl₂ en células P19. Se muestra el resultado de experimentos de *Western blot* con anticuerpos contra SUMO2 en células P19 tratadas con CoCl₂. Se observó un aumento significativo de los niveles de SUMOilación conforme aumentó el tiempo de exposición a CoCl₂ con respecto al control (C). Una vez retirado el CoCl₂ los niveles de SUMOilación se redujeron, aunque no se recuperaron los niveles basales del control. El tratamiento con CoCl₂ se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de 150 μ M. Fueron añadidos 15 μ g de proteína total en cada carril.

6.7.1.2 Caracterización mediante qPCR del patrón de expresión de ligasas de SUMO en respuesta a CoCl₂

Tal y como se comentó en la introducción, las proteínas PIAS constituyen un tipo de ligasas de SUMO. Debido a que la SUMOilación está involucrada en la regulación de diversos procesos biológicos, el aumento masivo de SUMOilación post-isquémica en respuesta a CoCl₂ también puede ser de utilidad en la definición de los efectos en células expuestas a isquemia transitoria. Se ha estudiado que este aumento de SUMOilación es consecuencia en parte de un aumento del nivel de proteínas PIAS en algunos tipos celulares (Cai *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha llevado a cabo este estudio para los 4 tipos de ligasas y para las células P19 y se desconoce cómo se regula el nivel de dichas proteínas a lo largo del tiempo. Es por ello interesante conocer los niveles de expresión de los genes de las diferentes proteínas ligasas a diferentes tiempos en respuesta al tratamiento con CoCl₂ en células P19. En la **Figura 51** se representa cómo los niveles relativos de expresión de los genes *Pias* fluctuaron a lo largo del tiempo debido al tratamiento con CoCl₂ en células P19 determinados mediante qPCR a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total de dichas células. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh*. Se tomaron muestras tras tratamientos prolongados durante 0,5 h, 2,5 h y 8 h. Observando los niveles de ARNm de ligasas PIAS bajo las condiciones mencionadas, se diferenciaron dos tipos de respuesta. En primer lugar, para los genes de las proteínas ligasas PIAS1 y 3 no se observaron diferencias significativas en la cuantificación de ARNm. Sin embargo, para el caso de los genes de las proteínas ligasas PIAS2 y 4 sí se observó un claro aumento de ARNm en el primer punto analizado a las 0,5 h. Este aumento perduró poco en el tiempo en el caso de *Pias2*, volviendo a los niveles de ARNm del control a las 2,5 h. Sin embargo, en el caso de *Pias4*, el aumento de ARNm de dicho gen siguió siendo significativo tras 8 h, aunque disminuyó considerablemente con respecto al punto analizado a las 0,5 h. Se observó, por tanto, una clara respuesta diferencial para el tratamiento de hipoxia con CoCl₂ entre los diferentes genes de las proteínas PIAS, lo cual podría mostrarnos cómo pueden estar especializadas en la respuesta a diferentes tipos de estrés (**Figura 51**).

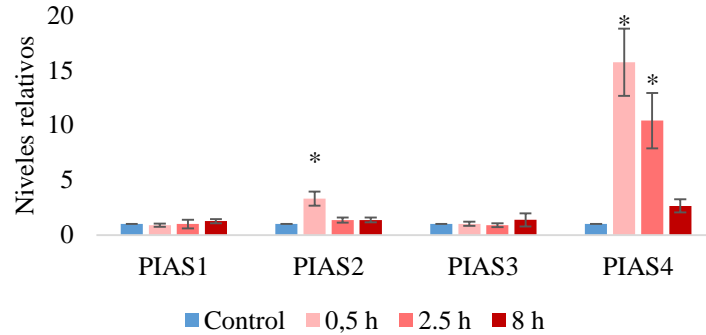


Figura 51. Los niveles de ARNm de los genes de las ligasas de SUMO PIAS2 y PIAS4 aumentan debido al tratamiento con CoCl_2 en células P19. Niveles relativos de expresión de los genes *Pias* determinados mediante PCR en tiempo real a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total de células P19. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh*. Se tomaron muestras tras tratamientos prolongados durante 0,5 h, 2,5 h y 8 h. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. El tratamiento con CoCl_2 se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de 150 μM . Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni.

6.7.2 Estudios con arsenito

6.7.2.1 Estudio de la muerte celular tras la exposición a arsenito a diferentes tiempos

Otro aspecto clave a estudiar en nuestra línea de investigación es el papel que pueden tener los restos citotóxicos celulares que actúan en el infarto neuronal junto con los procesos de hipoxia y falta de glucosa. Dichos restos celulares causan, en parte, estrés oxidativo, el cual ya se ha comprobado que provoca un aumento en los niveles de SUMOilación de proteínas celulares (Yang, Sheng, Warner, *et al.*, 2008). Se estudió a través de citometría de flujo la supervivencia celular en células P19 tras tratamientos con arsenito, un veneno que causa estrés oxidativo. No se produjo una muerte celular significativa hasta las 3 h de exposición a arsenito, en la que la muerte alcanzó cotas de entre el 20-30 %. Tras 6 h de exposición al veneno la muerte celular llegó a niveles de entre el 60 y 70 % (**Figura 52**). Los resultados indicaron una clara disminución de la supervivencia celular, corroborando la hipótesis de partida, por lo que es interesante estudiar la regulación de la SUMOilación en dichas condiciones.

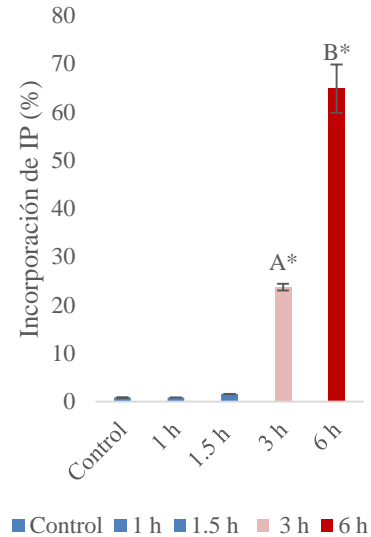


Figura 52. Análisis de apoptosis tardía y necrosis inducida en células P19 por arsenito. Cultivos de células P19 se trataron con arsenito y las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el tanto por ciento de incorporación de IP (consistente en el número total de células apoptóticas tardías y necróticas). El tratamiento con arsenito se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de 100 μ M. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las letras A y B representan grupos significativamente distintos entre sí. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni.

6.7.2.2 Caracterización mediante qPCR del patrón de expresión de ligasas de SUMO en respuesta a arsenito

El aumento masivo de SUMOilación post-isquémica observado en respuesta a arsenito (Yang, Sheng, Homi, *et al.*, 2008) también puede desempeñar un papel crítico en la respuesta final de las neuronas expuestas a isquemia transitoria, ya que durante este proceso se producen a parte de hipoxia y bajada de glucosa, ciertas sustancias citotóxicas, tales como agentes oxidantes, como lo es el arsenito (Valko *et al.*, 2007). Todavía no se ha estudiado cuál es el mecanismo molecular por el cual se da este aumento de los niveles de SUMOilación en respuesta a arsenito. Es por ello interesante conocer los niveles de expresión de los genes de las diferentes proteínas ligasas en la célula a diferentes tiempos en respuesta al tratamiento con arsenito en células P19. En la **Figura 53** se representa cómo fluctuaron a lo largo del tiempo debido al tratamiento del veneno arsenito en células P19 los niveles relativos de expresión de los genes *Pias* determinados mediante PCR en tiempo real a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total de dichas células. Los niveles de expresión se normalizaron

con respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh*. Se tomaron muestras tras tratamientos prolongados durante 0,5 h, 5 h y tras un tratamiento de 0,5 h más una vuelta a condiciones normales de cultivo durante 24 h. Observando los niveles de ARNm de ligasas PIAS bajo las condiciones mencionadas, se pudo diferenciar dos tipos de respuesta, al igual que en el tratamiento con CoCl_2 . En primer lugar, para el gen de la proteína ligasa PIAS1 no se observaron diferencias significativas en la cuantificación de ARNm. Sin embargo, para el caso de los genes de las proteínas ligasas PIAS2 y 4 sí se observó un claro aumento de ARN, en el primer punto analizado, a las 0,5 h. Este aumento disminuyó en el tiempo estudiado, hasta las 5 h de tratamiento. Al igual que en el caso del estudio realizado con el compuesto CoCl_2 , se observó una clara respuesta diferencial entre los genes de las diferentes proteínas PIAS, lo cual podría mostrarnos cómo pueden estar especializadas en la respuesta a diferentes tipos de estrés. En este estudio se analizaron también los niveles de ARNm de los genes de las proteínas ligasas PIAS después de un condicionamiento, tratando las células durante 30 min con arsenito y observando los niveles de expresión 24 h después de haber retirado el veneno. En estas muestras no se observaron diferencias significativas con respecto a la muestra control. Por lo tanto, el aumento de ARNm de proteínas PIAS no se mantuvo después de retirar el veneno tras 0,5 h de tratamiento (**Figura 53**).

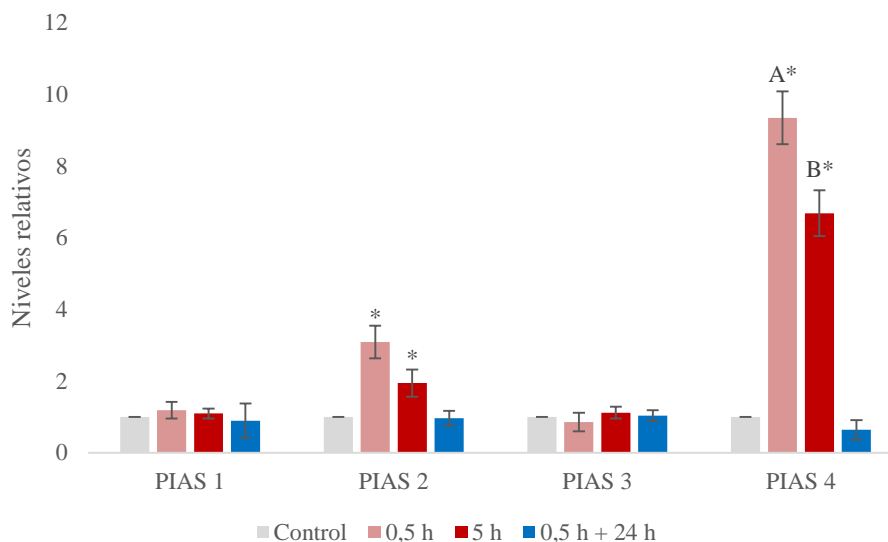


Figura 53. Los niveles de ARNm de las ligasas de SUMO PIAS2 y PIAS4 aumentan al tratar con arsenito células P19. Niveles relativos de expresión de los genes *Pias* determinados mediante PCR en tiempo real a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total de células P19. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión

del gen *Gapdh*. Se tomaron muestras tras tratamientos prolongados durante 30 min, 5 h y tras un tratamiento de 30 min más una vuelta a condiciones normales durante 24 h. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni.

6.7.3 Caracterización mediante qPCR del patrón de expresión del gen de la proteasa de SUMO SENP7 en respuesta a condiciones de estrés diferentes a OGD

Se procedió al estudio de los niveles de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP7 en diferentes condiciones de estrés en los que se ha observado un aumento de los niveles de SUMOilación según la bibliografía. Dichos tratamientos fueron la administración de dimetiloxalilglicina (DMOG), transfección de HIF1 α , tratamiento con el compuesto mimético CoCl₂, OD (del inglés, *Oxygen Deprivation*), GD (del inglés, *Glucose Deprivation*), exposición al veneno arsenito así como a temperaturas elevadas (42° C). El compuesto DMOG es una sustancia utilizada habitualmente en ensayos como mimético químico de la hipoxia al producir la inhibición de las prolihidroxilasas dando lugar, por ello, a la estabilización de HIF1 α en normoxia (Jaakkola *et al.*, 2001). Los resultados se muestran en las **Figuras 54 y 55**. Se observaron descensos en los niveles de expresión en todos los tratamientos realizados.

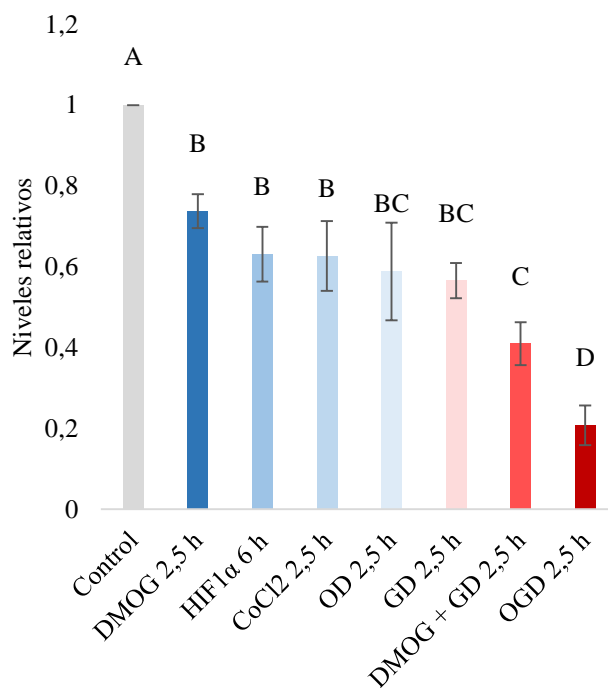


Figura 54. Regulación del gen *Senp7* en respuesta a distintas condiciones de estrés. Niveles de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP7 determinados mediante qPCR bajo diferentes tratamientos en células P19. Los tratamientos administrados fueron exposición a DMOG, sobreexpresión del mutante no degradable de HIF1 α , tratamiento con el compuesto mimético CoCl₂, OD (del inglés, *Oxygen Deprivation*) y GD (del inglés, *Glucose Deprivation*). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión del gen *RpLp0*. Los tratamientos tuvieron una duración de 2,5 h excepto en el caso de la sobreexpresión de HIF1 α , que duró 6 h. Las letras representan grupos de tratamientos diferentes significativamente entre sí, de forma que en los tratamientos realizados mediante la exposición a DMOG, la sobreexpresión de HIF1 α , la exposición a CoCl₂, OD y GD se obtuvo una disminución significativamente similar con respecto al control de los niveles de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP7 (grupo B). Por otra parte, en los tratamientos realizados mediante la exposición a OD, GD y la combinación de DMOG + GD se obtuvo una disminución con respecto al control de los niveles de expresión del gen de SENP7 significativamente similar (grupo C). El tratamiento que alteró los niveles de expresión del gen de SENP7 de forma más drástica fue OGD, siendo los niveles de expresión del gen de SENP7 significativamente menores respecto a todos los tratamientos estudiados (grupo D). El tratamiento con CoCl₂ se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de 150 μ M. El tratamiento con DMOG se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de 100 μ M. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni.

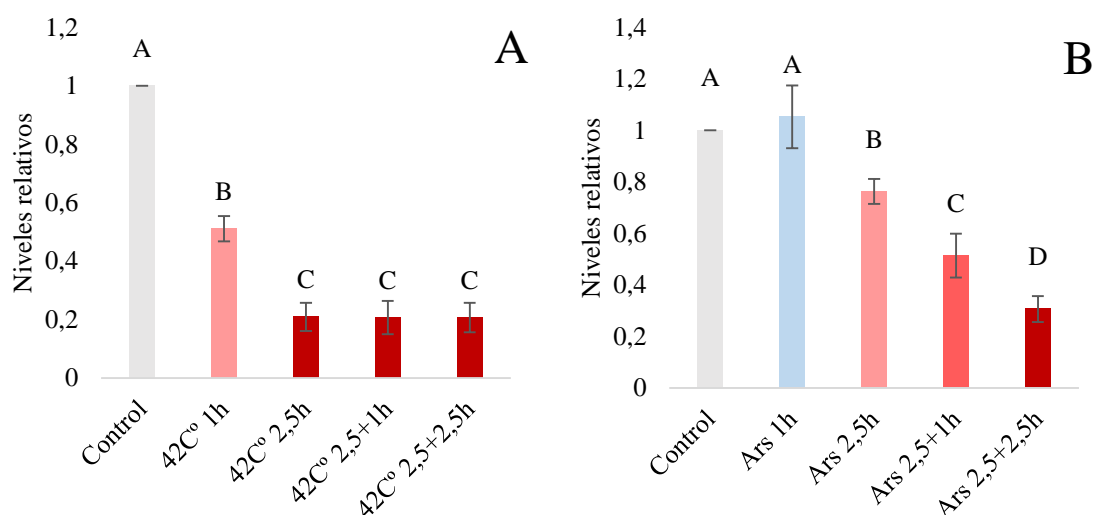


Figura 55. Regulación del gen de la proteasa SENP7 por choque térmico y arsenito. Niveles de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP7 determinados mediante qPCR bajo diferentes tratamientos en células P19. Los tratamientos administrados fueron exposición a 42° C y al veneno arsenito. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al nivel de expresión del gen *RpLp0*. Los tratamientos tuvieron una duración de 1 h y 2,5 h, así como un periodo de recuperación de 1 y 2,5 h. Las letras representan grupos de tratamientos diferentes significativamente entre sí. En la figura **A** se aprecia que la exposición de células a una temperatura de 42° C durante 1 h provocó una disminución significativa de los niveles de expresión de *Senp7* con respecto al control, la cual disminuyó aún más tras la prolongación de dicha exposición a 2,5 h. Dicha disminución permaneció inalterable en el periodo de recuperación estudiado (grupo C). En la figura **B** se aprecia que la exposición de células al compuesto arsenito durante 1 h no alteró los niveles de expresión de *Senp7* significativamente (A). Al aumentar el tiempo de exposición a arsenito a 2,5 h se obtuvieron valores significativamente menores de expresión del gen de SENP7 (B). Interesantemente, en los periodos de recuperación los niveles de expresión no se recuperaron, sino que continuaron descendiendo significativamente (C y D). El tratamiento con arsenito se llevó a cabo añadiendo dicho compuesto al medio de cultivo a una concentración final de 100 μ M. Las diferencias significativas (valor $p < 0,05$) se calcularon mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del post-test Bonferroni.

6.8 Análisis de la expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en cáncer colorrectal

Existen diferentes recursos *online* disponibles para consultar la frecuencia de alteraciones genéticas en muestras de pacientes con cáncer. Estos recursos constituyen una enorme fuente de información tanto en el campo de la medicina como en el de la biología molecular. Algunos de los recursos más notables son cBioportal, el cual integra información procedente de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) así como de otras bases de datos (Cerami *et*

al., 2012; Gao *et al.*, 2013) y Oncomine (Rhodes *et al.*, 2004, 2007). Ambos recogen información de múltiples experimentos de expresión de ARNm mediante *microarrays*.

Las técnicas de cuantificación de ADN a grandes escalas recientemente desarrolladas en los últimos años han permitido hallar la existencia de numerosos polimorfismos tales como inversiones, cambios de un solo nucleótido, variaciones en secuencias repetitivas, deleciones, duplicaciones y reordenamientos complejos al realizar comparaciones con un genoma de referencia, llamados conjuntamente variaciones en el número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés, *Copy Number Variations*) (Shlien & Malkin, 2009). Dichas CNV abarcan específicamente regiones de más de 1 kb en las cuales se han detectado diferencias en el número de copias en la comparación entre dos o más genomas (Feuk, Carson & Scherer, 2006). Las variaciones en el número de copias del ADN constituyen un importante componente de variación genética y su estudio puede aportar datos significativos en el entendimiento de multitud de procesos que ocurren en biología, incluido el comportamiento del cáncer (Shlien & Malkin, 2009). La base de datos cBioportal recoge las variaciones en el número de copias halladas a través de análisis del número de copias con los algoritmos GISTIC o RAE de la siguiente manera: “+2” como un nivel alto de amplificación, “+1” como un nivel de ganancia leve, “0” como un nivel diploide, “-1” como una pérdida poco acentuada, posiblemente debida a una deleción heterocigota, y “-2” como una pérdida pronunciada, posiblemente debida a una deleción homocigota. Se encontró que en dicha base de datos, en el total de 54.483 muestras de tumores recogidas a lo largo de decenas de años procedentes de diferentes pacientes, existen importantes diferencias entre las SUMOproteasas SENP3 y SENP7. En ambos casos, la mayoría de las muestras analizadas no presentan variaciones en el número de copias. Sin embargo, si analizamos la tendencia al alza o a la baja en ambas SUMOproteasas, dichas tendencias son contrarias. Cuando existen variaciones en el número de copias de *Senp7* estas suelen ser de ganancia en dicho número, dado que existen 366 muestras en las que se ha producido una variación de +2 frente a 40 muestras en las que se ha producido una variación de - 2. Es decir, en las muestras en las que existen variaciones de +2 y -2 en el número de copias de *Senp7* existe un 90,1 % de muestras en las que se produce una amplificación de los niveles del gen de dicha proteasa mientras que se produce una disminución de este en tan solo un 9,9 % de las muestras. Así mismo, existen 5.970 muestras en las que se ha producido una variación de +1 frente a 3.113 en las que se produce una variación de -1, por lo que en el total de muestras de cáncer se detecta una variación positiva en el número de copias de *Senp7*. Por el contrario, cuando existen variaciones en el número de copias de *Senp3* estas suelen ser de

disminución en dicho número, dado que existen 306 muestras en las que se ha producido una variación de - 2 frente a 58 muestras en las que se ha producido una variación de + 2. Así mismo existen 10.807 muestras en las que se ha producido una variación de -1 frente a 1.975 en las que se produce una variación de +1. Es decir, en las muestras en las que existen variaciones en el número de copias de *Senp3* existe un 85 % de muestras en las que se produce una disminución de los niveles de dicho gen mientras que se produce una amplificación de este en un 15 % de las muestras (**Figura 56**). Dichos datos apuntan a que SENP7 tendría una participación positiva en los procesos de deriva de las células del organismo hacia cáncer, dado que se encuentra un mayor número de copias del gen de dicha proteasa en las muestras extraídas de múltiples cánceres, mientras que, por el contrario, SENP3 tendría una participación negativa en los procesos de deriva de las células del organismo hacia cáncer dado que la gran mayoría de muestras cancerígenas presentan una disminución en los niveles del gen de esta SUMOproteasa con respecto a tejidos no cancerosos.

Si analizamos las alteraciones que se producen en los genes de ambas proteínas en los diferentes tipos de cáncer de la base de datos cBioportal, encontramos, en correlación con los datos anteriormente expuestos, resultados opuestos entre las SUMOproteasas SENP3 y SENP7. Mientras que en el caso de *Senp3* observamos una mayor frecuencia de deleciones frente a amplificaciones, en el caso de *Senp7* observamos una mayor frecuencia de amplificaciones frente a deleciones (**Figuras 57 y 58**).

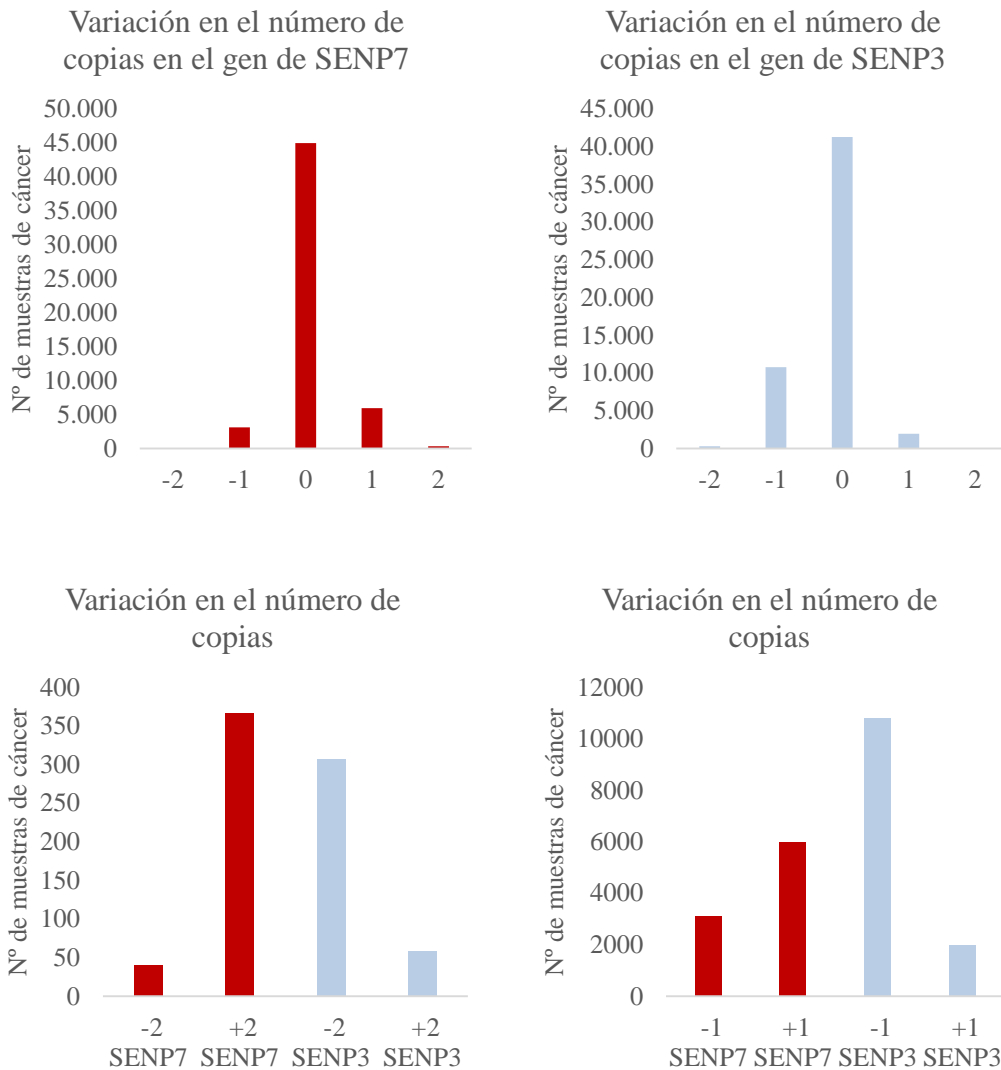


Figura 56. Análisis de la variación en el número de copias de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en un total de 54.483 muestras existentes en la base de datos cBioportal. Se señalan las variaciones en el número de copias según la numeración “+2” como un nivel alto de amplificación, “+1” como un nivel de ganancia leve, “0” como un nivel diploide, “-1” como una pérdida poco acentuada, posiblemente debida a una delección heterocigota, y “-2” como una pérdida pronunciada, posiblemente debida a una delección homocigota. Se observó un mayor número de pacientes en los que existía una variación positiva para el caso de SENP7 y una variación negativa para el caso de SENP3.

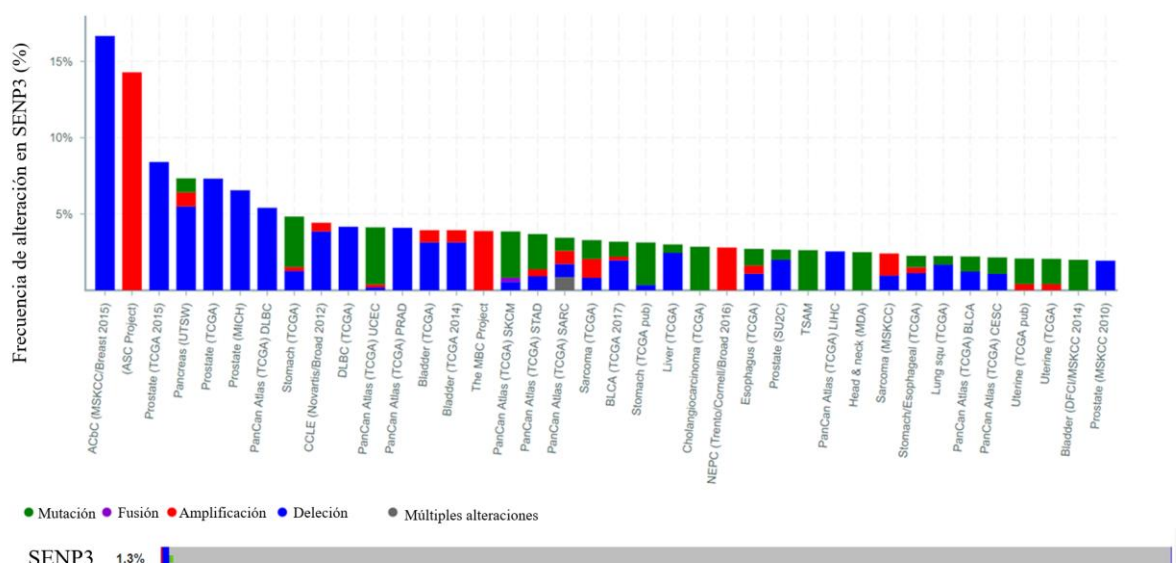


Figura 57. Frecuencia de alteraciones del gen de la SUMOproteasa SENP3 en los diferentes tipos de cáncer de la base de datos cBioportal. Se muestran solo los cánceres en los que la frecuencia de alteración en el gen de SENP3 es mayor. Se observa que la mayoría de cánceres poseen, sobre todo, variaciones de deleciones y mutaciones puntuales. En la barra inferior se muestra el total de muestras en las que se detectó alguna mutación en el gen de SENP3. En dicha barra se observa que en la gran mayoría de casos la mutación detectada es deleción.

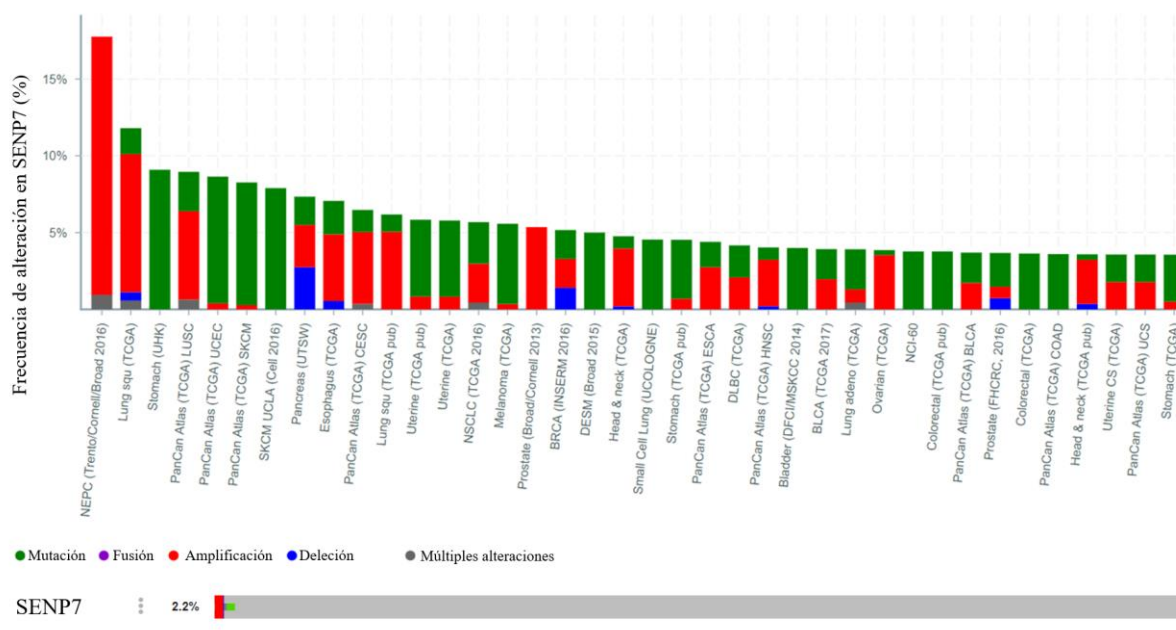
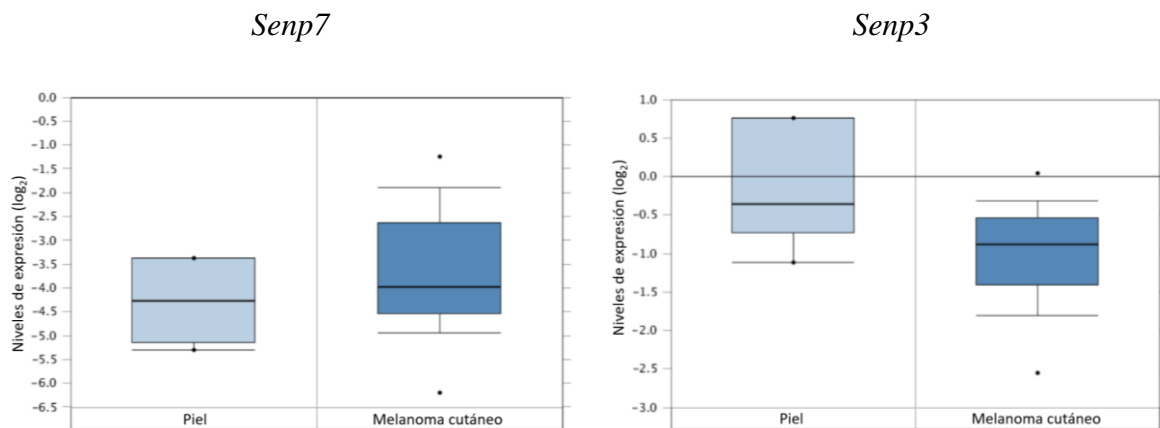


Figura 58. Frecuencia de alteraciones del gen de la SUMOproteasa SENP7 en los diferentes tipos de cáncer de la base de datos cBioportal. Se muestran solo los cánceres en los que la frecuencia de alteración en el gen de SENP7 es mayor. Se observa que la mayoría de cánceres poseen, sobre todo, variaciones de deleciones y mutaciones puntuales. En la barra inferior se muestra el total de muestras en las que se detectó alguna mutación en el gen de SENP7. En dicha barra se observa que en la gran mayoría de casos la mutación detectada es deleción.

los que la frecuencia de alteración en el gen de SENP7 es mayor. Se observa que la mayoría de cánceres poseen, sobre todo, variaciones de amplificaciones y mutaciones puntuales. En la barra inferior se muestra el total de muestras en las que se detectó alguna mutación en el gen de SENP7. En dicha barra se observa que en una gran proporción de casos la mutación detectada es de amplificación.

Para estudiar la hipótesis de si el aumento de la proteína SENP7 pudiera promover la tumorigénesis y, al contrario, el aumento de la proteína SENP3 pudiera inhibirla, se realizó un análisis con la información de la base de datos Oncomine para estudiar los niveles de ARNm de varios tumores frente a los niveles de muestras no tumorales. Se observaron 5 tumores en los que se produjo un aumento de los niveles de expresión de *Senp7* y un descenso de los niveles de expresión de *Senp3* de al menos 1,5 veces y con un valor p menor de 0,05. Los resultados se encuentran en la **Figura 59** y en la **Tabla 9**. Se encontró un nivel de expresión de *Senp7* mayor y de *Senp3* menor en comparación con los niveles de expresión de muestras de pacientes sanos en los siguientes tumores: melanoma cutáneo, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma, leucemia linfoblástica aguda de células T y carcinoma de mama invasivo.



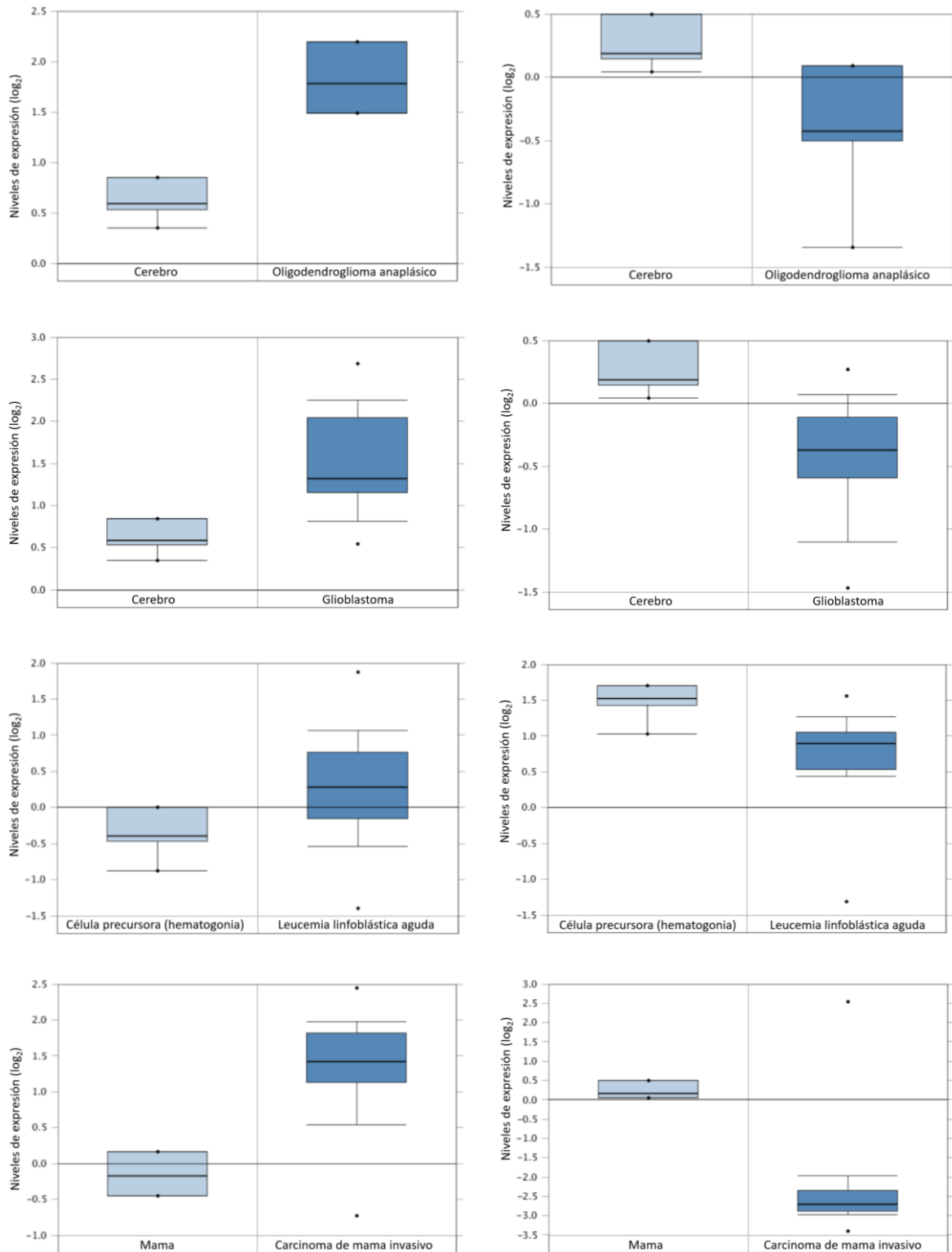


Figura 59. Cambios en los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas *SENP3* y *SENP7* en muestras de distintos cánceres humanos con respecto a los niveles de expresión de dichos genes en tejidos de pacientes sanos. Se observó un aumento de los niveles de expresión de *Senp7* en los tumores melanoma cutáneo, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma, leucemia linfoblástica aguda de células T y carcinoma de mama invasivo. En todos los casos se observaron niveles inferiores de expresión de *Senp3* a los de las

muestras de tejidos sanos. Los datos relativos al valor p además de información adicional se encuentran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Cambios en los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en muestras de distintos cánceres humanos con respecto a los niveles de expresión de dichos genes en tejidos de pacientes sanos. Se detalla el nivel de cambio, valor p, t-Test, N° de muestras así como la fuente de los datos analizados.

Tumor	Melanoma cutáneo		Oligodendroglioma anaplásico		Glioblastoma		Leucemia linfoblástica aguda de células T		Carcinoma de mama invasivo	
<i>Senp</i>	<i>Senp3</i>	<i>Senp7</i>	<i>Senp3</i>	<i>Senp7</i>	<i>Senp3</i>	<i>Senp7</i>	<i>Senp3</i>	<i>Senp7</i>	<i>Senp3</i>	<i>Senp7</i>
Cambio	-1.635	1.542	-1.635	2.338	-1.539	1.870	-1.571	1.590	-6.733	2.857
valor p	0.01	0.038	0.007	0.006	6.33E-4	3.79E-5	0.006	2.94E-29	7.72E-20	1.11E-7
t-Test	-2.877	1.944	-3.274	5.321	-5.021	6.078	-3.936	12.951	-19.956	10.362
N° de muestras	70		54		54		2.096		59	
Artículo	(Talantov <i>et al.</i> , 2005)		(Bredel <i>et al.</i> , 2005)		(Bredel <i>et al.</i> , 2005)		(Haferlach <i>et al.</i> , 2010)		(Finak <i>et al.</i> , 2008)	

Así mismo, se realizó un análisis para comparar la supervivencia media de pacientes con adenocarcinoma colorrectal registrados en la base de datos cBioportal. Dicho análisis se realizó teniendo en cuenta un total de 372 muestras de diferentes pacientes ya que estos fueron todos los pacientes de los cuales se disponía de datos de supervivencia y, a su vez, de análisis de ARNm. Para el análisis de supervivencia se utilizaron curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier comparadas mediante el test del Log-Rango (Mantel-Cox). Cabe señalar que durante el periodo de tiempo de los diferentes estudios de cáncer colorrectal de la base de datos cBioportal, el seguimiento de los pacientes es individual, pudiendo ocurrir que éste fallezca, continúe con vida en la fecha de finalización del estudio o se pierda el contacto con él en un instante determinado. Las dos últimas situaciones se representan en los gráficos de Kaplan-Meier como datos censurados. Los resultados se muestran en las **Figuras 60-63**. En primer lugar, cabe destacar la diferencia en la supervivencia de los pacientes que poseen los niveles de expresión más elevados del gen de la SUMOproteasa SENP7 (cuartil 4) con respecto

a los pacientes que poseen los niveles de expresión más disminuidos de dicha proteasa (cuartil 1) (**Figura 60**). En aquellos que poseen un mayor nivel de expresión de *Senp7* (cuartil 4) la supervivencia fue menor que en el resto de los pacientes (**Figura 61**). Ocurrió lo contrario en el análisis de supervivencia según los niveles de expresión de *Senp3*, en los que el nivel de supervivencia fue mayor en aquellos pacientes que presentaron una mayor expresión de *Senp3* (Percentil P79) (**Figura 62**). Si analizamos los datos de *Senp3* y *Senp7* conjuntamente observamos que se produjo un efecto todavía más acentuado entre los pacientes. Se diferenciaron los grupos con niveles de expresión superior o inferior según dichos pacientes presentaban niveles de expresión de las SUMOproteasas mayores al Percentil 65 o menores del Percentil 35 respectivamente. En el grupo de pacientes que poseían una expresión de *Senp3* superior y una expresión de *Senp7* inferior los niveles de supervivencia fueron significativamente mayores a los que presentaron niveles de expresión inversa (**Figura 63**). Interesantemente, la supervivencia de los pacientes que presentaron niveles superiores de *Senp3* e inferiores de *Senp7* es de alrededor del 80 %, mientras que la supervivencia es de aproximadamente un 20 % en aquellos pacientes con niveles superiores de *Senp7* e inferiores de *Senp3*.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8,074	3	,044

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de SENP7.

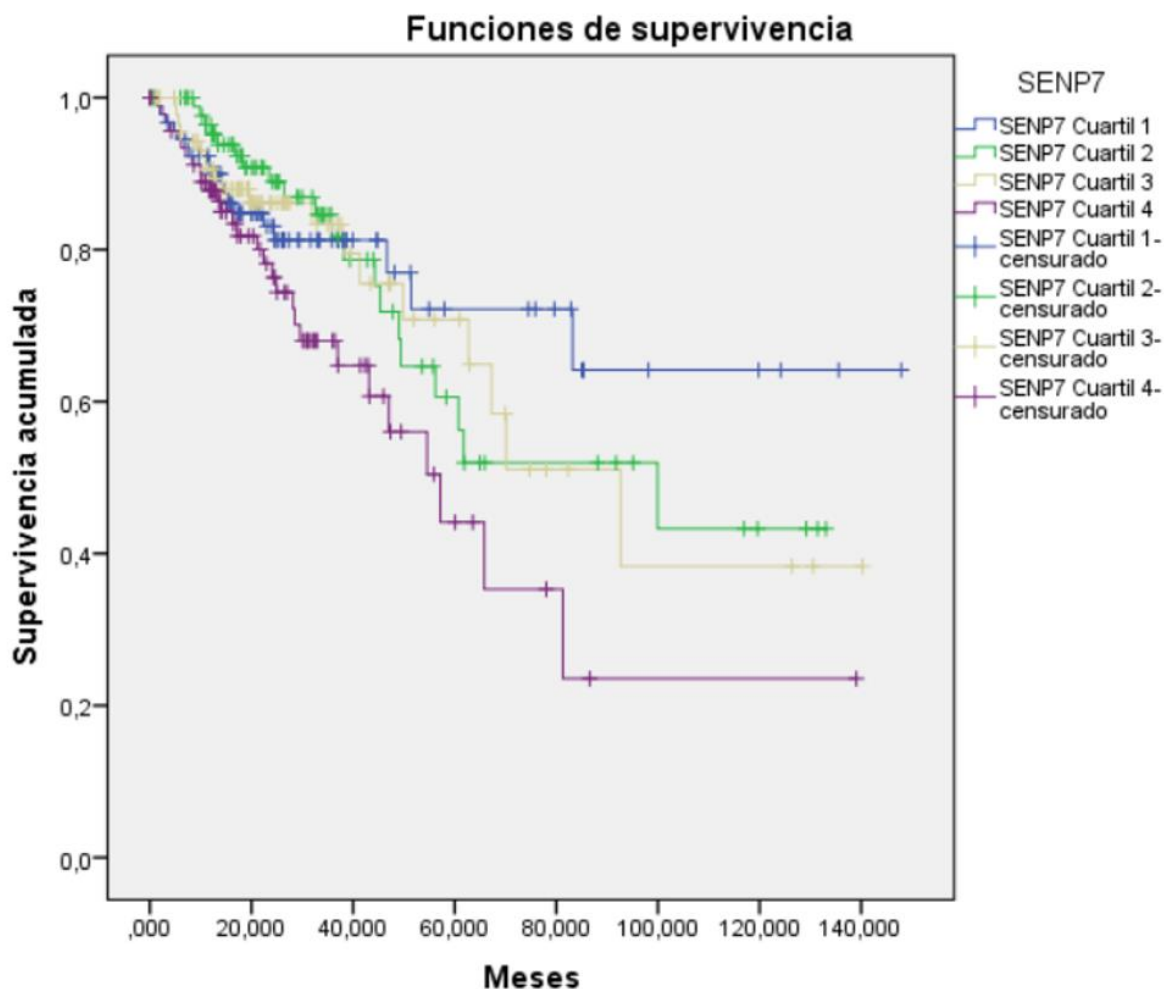


Figura 60. El aumento en los niveles de expresión de *Senp7* se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal. Representación gráfica de Kaplan-Meier para el análisis de las diferencias en supervivencia de pacientes con distintos niveles de expresión del gen de la proteína SENP7. Se diferenciaron 4 tipos de paciente según el cuartil al que pertenecían de forma que en el cuartil 1 se agruparon los pacientes cuyas muestras presentaron niveles de expresión de *Senp7* dentro del cuartil 1 del total de datos de niveles de expresión de *Senp7*, y así para el resto de los cuartiles.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,855	1	,005

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de SENP7.

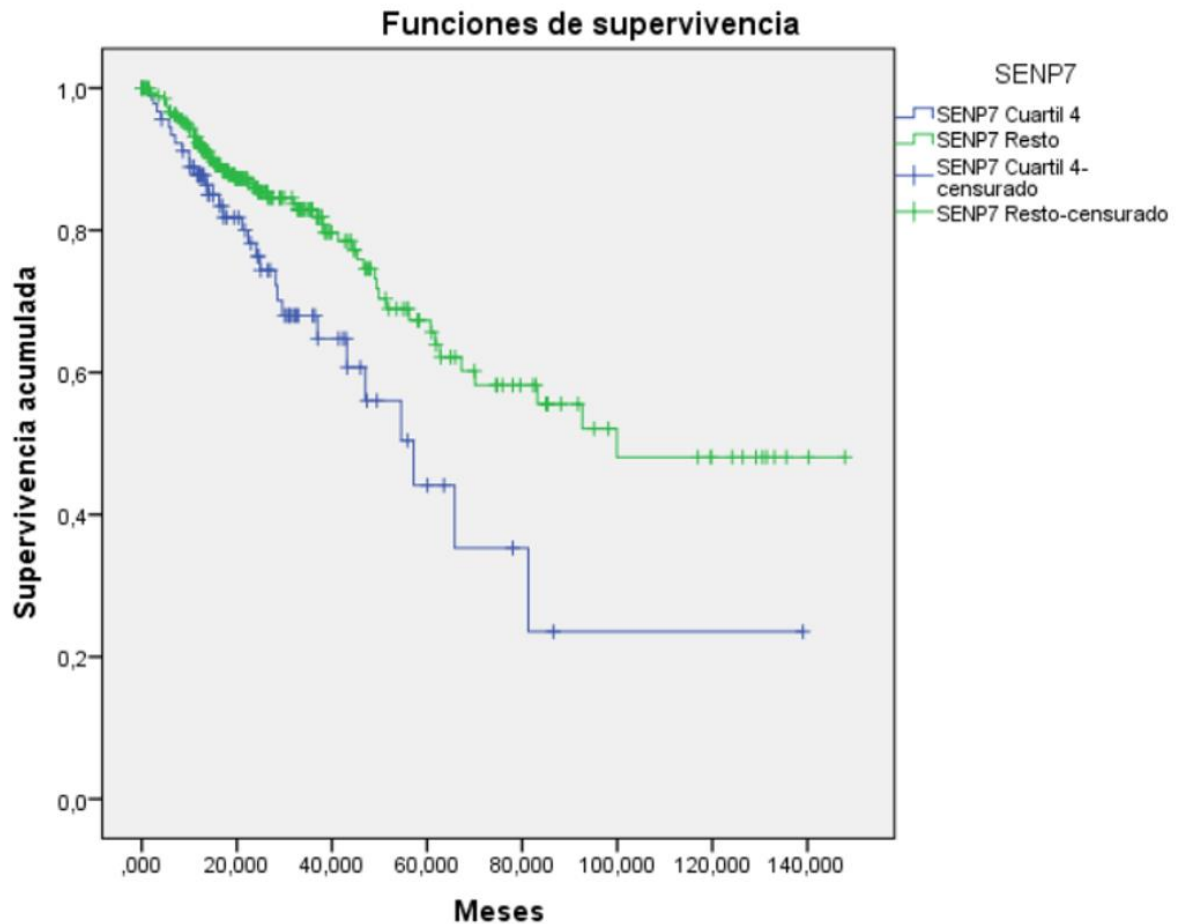


Figura 61. El aumento en los niveles de expresión de *Senp7* se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal. Representación gráfica de Kaplan-Meier para el análisis de las diferencias en supervivencia de pacientes con distintos niveles de expresión del gen de la proteína SENP7. Se diferenciaron dos grupos de pacientes según los niveles de expresión de *Senp7*. En el cuartil 4 se agruparon los pacientes cuyas muestras presentaron niveles de expresión de *Senp7* dentro del cuartil 4 del total de datos de niveles de expresión de *Senp7*. En el grupo “Resto” se agrupó al resto de pacientes. Se observaron niveles significativos de descenso de la supervivencia en aquellos pacientes que presentaron un nivel superior de expresión de *Senp7*.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,696	1	,101

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de SENP3.

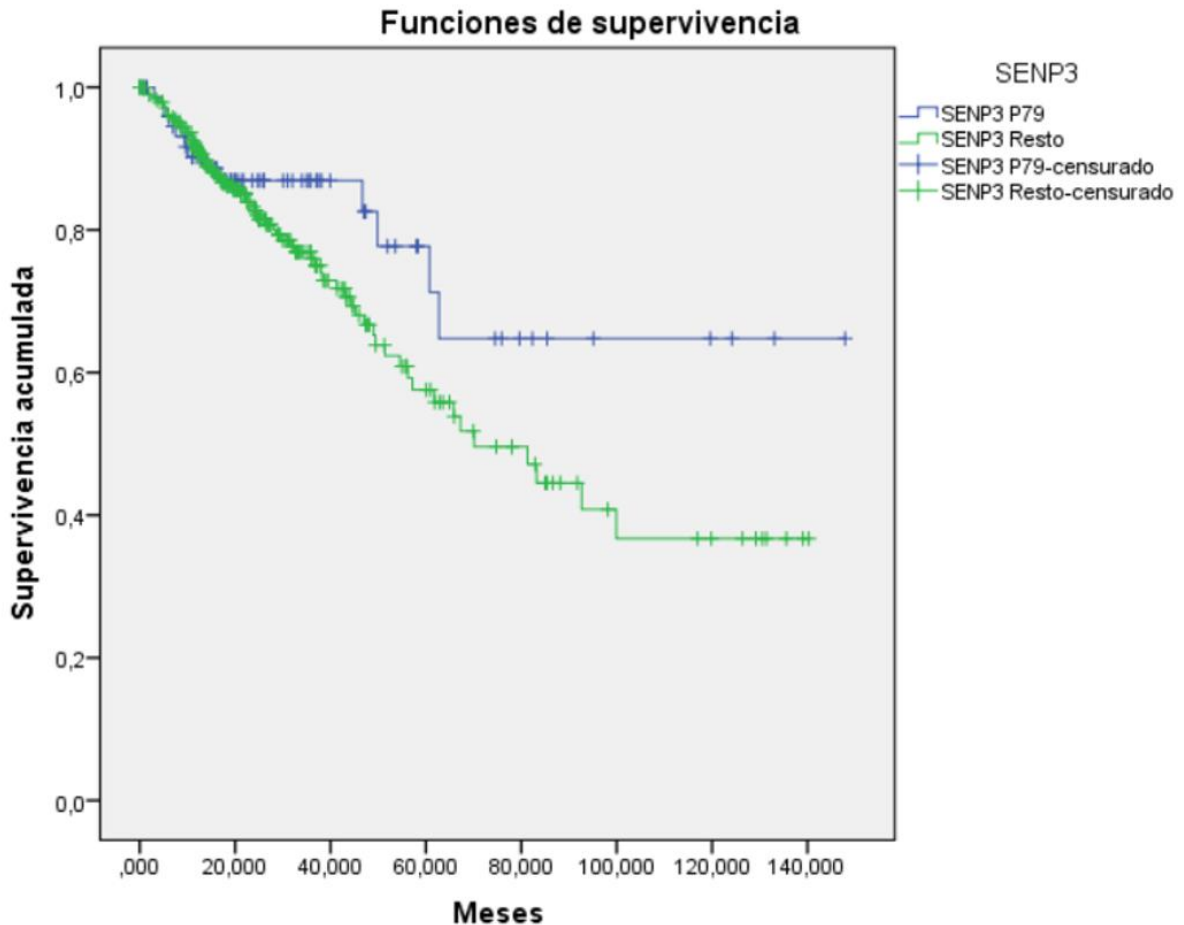


Figura 62. La disminución de los niveles de expresión de *Senp3* se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal. Representación gráfica de Kaplan-Meier para el análisis de las diferencias en supervivencia de pacientes con distintos niveles de expresión del gen de la proteína SENP3. Se diferenciaron dos grupos de pacientes según los niveles de expresión de *Senp3*. En el grupo P79 se agruparon los pacientes cuyas muestras presentaron niveles de expresión de *Senp3* entre los percentiles 79 a 100 del total de datos de niveles de expresión de SENP3. En el grupo “Resto” se agrupó al resto de pacientes. Se observó un descenso de la supervivencia en aquellos pacientes que presentaron un nivel inferior de expresión de *Senp3*.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,723	1	,010

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de SENP3 y SENP7.

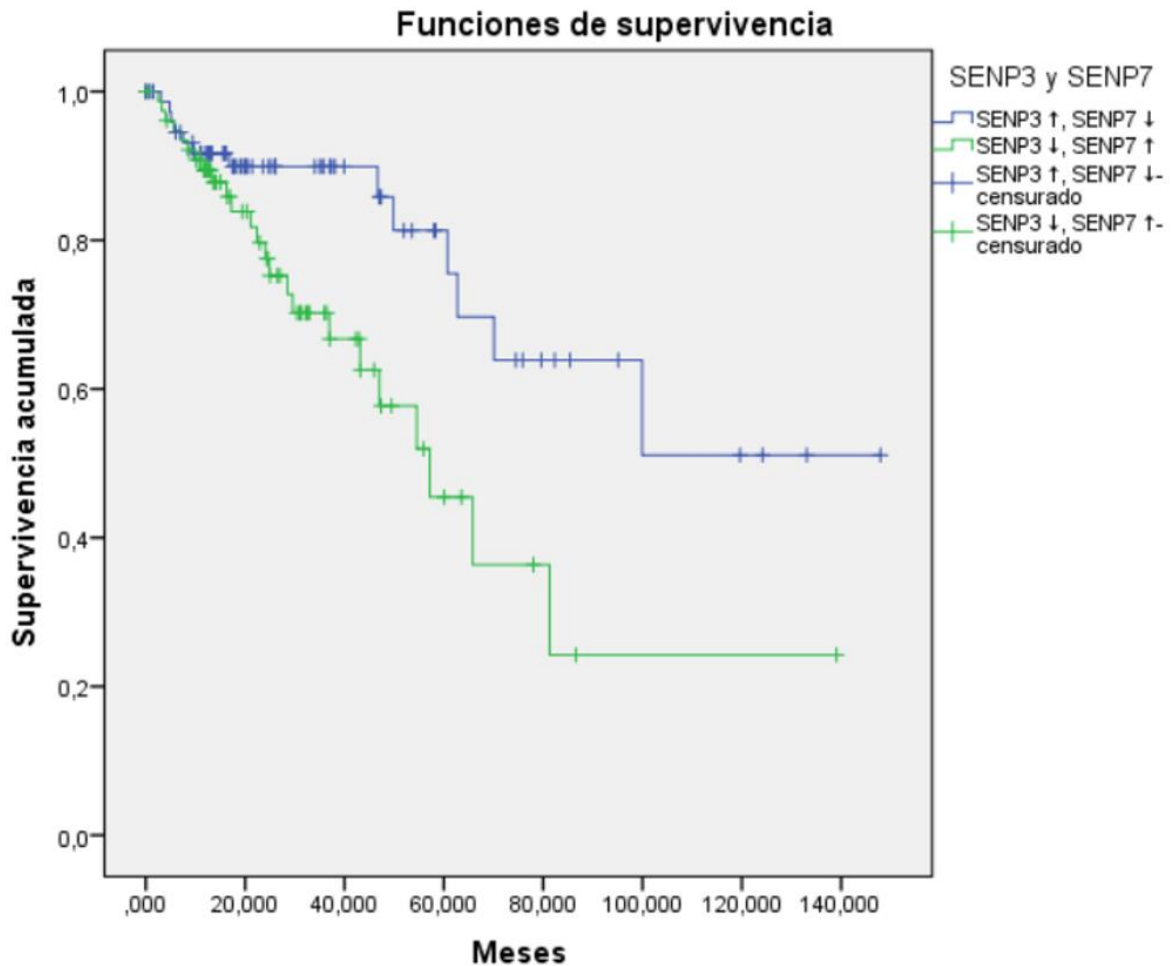


Figura 63. Los pacientes de cáncer colorrectal con niveles de expresión elevados de *Senp7* y disminuidos de *Senp3* presentan una menor supervivencia. Representación gráfica de Kaplan-Meier para el análisis de las diferencias en supervivencia de pacientes con distintos niveles de expresión de los genes de las proteínas SENP3 y SENP7. Se diferenciaron 2 tipos de paciente según presentaran niveles superiores (↑) o inferiores (↓) de las diferentes SUMOproteasas. Se consideraron niveles superiores aquellos pertenecientes a los percentiles 65 a 100 y niveles inferiores aquellos pertenecientes a los percentiles 0 a 35. Se observó un descenso significativo de los niveles de supervivencia en aquellos pacientes que presentaron unos niveles de expresión menores de *Senp3* y mayores de *Senp7*.

Así mismo, se investigó si existían diferencias en los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en los diferentes estadios de extensión del cáncer colorrectal diferenciados según la American Joint Committee on Cancer (AJCC 2017). Los diferentes estadios son T1 (extensión hasta la submucosa), T2 (extensión hasta la muscular propia), T3 (extensión hasta las capas más externas del colon o del recto pero sin atravesarlas), T4a (tumor que penetra la superficie del peritoneo visceral) y T4b (tumor que invade directamente o está adherido a otros órganos o estructuras). Los datos se muestran en la **Figura 64** y son los correspondientes a los 363 casos de cancer colorrectal para los que existe en la actualidad información en la base de datos cBioportal acerca de los niveles de extensión de cáncer y de niveles de expresión de proteínas. Se observó un aumento progresivo en el número de pacientes con niveles inferiores de expresión del gen de SENP3 y elevados del gen de SENP7 según avanzaban los estadios de extensión de cancer colorrectal diferenciados según la American Joint Committee on Cancer (AJCC 2017) T1 (37,5 %), T2 (44,4 %), T3 (48,9 %), T4a (68,8 %) y T4b (71,4 %).

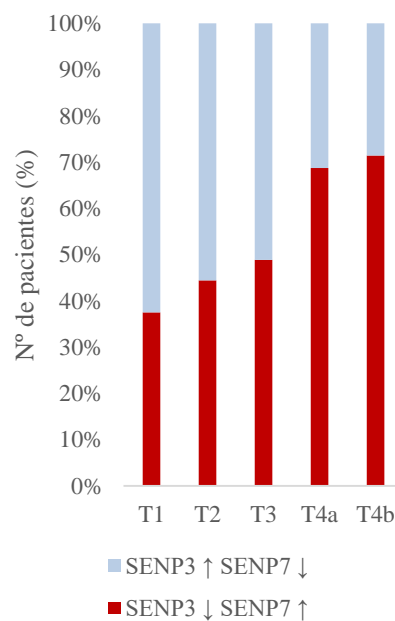


Figura 64. Relación entre los niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 y los estadios de extensión de cáncer colorrectal diferenciados según la American Joint Committee on Cancer (AJCC 2017). Representación gráfica del tanto por ciento de pacientes con distintos niveles de expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP3 y SENP7 en distintos estadios de progresión del cáncer colorrectal. Se diferenciaron 2 tipos de paciente según presentaran niveles superiores (↑) o inferiores (↓) de las diferentes SUMOproteasas. Se consideraron niveles superiores aquellos pertenecientes a los percentiles 50 a 100 y niveles inferiores aquellos pertenecientes a los percentiles 0 a 50. Se observó un aumento en el número de pacientes con niveles inferiores de expresión del gen de SENP3 y

elevados del gen de SENP7 según progresaban los estadios de extensión de cancer colorrectal diferenciados según la American Joint Committee on Cancer (AJCC 2017).

7 Discusión

La isquemia cerebral aguda tiene lugar cuando se produce el descenso de oxígeno y glucosa en las células del parénquima cerebral por el freno en el torrente sanguíneo en una determinada área del cerebro. El daño producido en la zona infartada puede provocar, según la funcionalidad de esa área cerebral, sintomatologías tan variadas como hemiplejía, afasia o parálisis facial (Luengo-Fernandez *et al.*, 2013). De hecho, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el infarto cerebral es una de las principales causas de discapacidad, demencia y muerte. La clínica neurológica de dicha enfermedad es muy florida, pudiendo causar episodios de epilepsia, depresión, etc. (Roger *et al.*, 2011; Thrift *et al.*, 2017). En cuanto a su tratamiento, se han estudiado múltiples agentes farmacológicos denominados neuroprotectores en más de 1.000 estudios experimentales, muchos de los cuales han resultado positivos, pese a que prácticamente ninguno se ha confirmado en los más de 400 estudios clínicos llevados a cabo (Fisher *et al.*, 2009; Alonso de Leciñana *et al.*, 2014). Consecuentemente, las guías de práctica clínica utilizadas hoy en día tan solo consideran como tratamiento farmacológico específico la administración intravenosa del activador tisular del plasminógeno (r-TPA). Además, dicho tratamiento posee una corta ventana terapéutica ya que su administración se debe realizar durante las 4,5 horas siguientes al evento (Hernández & Herrera, 2015). El tratamiento quirúrgico, en el que se realiza trombectomía mecánica e implantación de un stent, todavía no está indicado para la mayor parte de los pacientes y tan solo es beneficioso en una minoría de casos. Los demás tratamientos consisten en cuidados generales o cerebroprotección no farmacológica (control de presión arterial, glucemia, gasometría, temperatura, así como prevención y detección precoz de las complicaciones) (Alonso de Leciñana *et al.*, 2014). Es por todo ello, que desarrollar terapias y fármacos neuroprotectores son aspectos de enorme interés actual.

En la cascada de daño en el parénquima cerebral tras un evento isquémico, el primer componente en actuar es la falta de oxígeno y glucosa, más aún en el tejido cerebral, ya que en este se produce uno de los consumos de oxígeno y glucosa mayores de entre todos los sistemas del organismo y depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa, a través del uso de glucosa, para la producción de energía. La falta de oxígeno y glucosa provoca un fallo bioenergético grave, por lo que se reducen los niveles de ATP disponibles y con ello, de forma rápida, los canales dependientes de energía que mantienen la despolarización de las células fracasan. Esto provoca despolarización en la membrana plasmática y, con ello, un gran

incremento de calcio, glutamato y sustancias tóxicas como especies reactivas de oxígeno, causando un aumento del daño del tejido neuronal (Brouns & De Deyn, 2009; Bonaventura *et al.*, 2016). A las pocas horas de dicho evento se produce un incremento en la expresión de genes proinflamatorios como Nf-k β e interferón β -1b, produciéndose de este modo la inflamación (Dirnagl, Iadecola & Moskowitz, 1999; Alzheimer, 2012). Posteriormente, se produce edema debido a la acumulación de iones y la despolarización de células periféricas a la zona del infarto, cuyos niveles máximos suelen rondar entre 1 y 2 días después de dicho daño cerebral (Rosenberg *et al.*, 1996; Doshi, Bou-haidar & Delman, 2017). Todos estos eventos influyen sinérgicamente sobre la aparición de procesos apoptóticos, los cuales comienzan desde las primeras horas después del daño inducido por la isquemia cerebral (Barone & Feuerstein, 1999; Dirnagl, Simon & Hallenbeck, 2003; Junior *et al.*, 2014) (**Figura 65**).

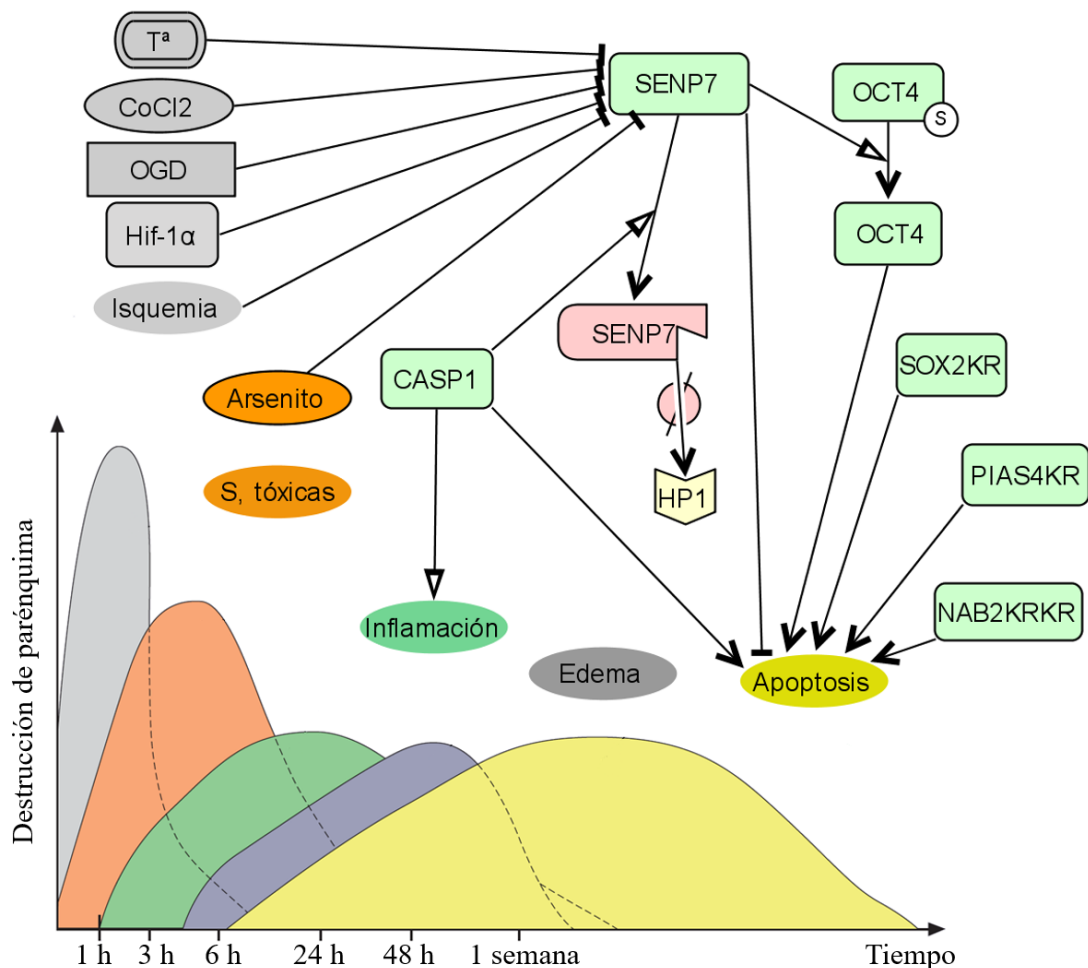


Figura 65. Cascada de eventos dañinos durante la isquemia focal cerebral. La destrucción del parénquima del área cerebral en la que tiene lugar un evento isquémico es provocada, en primer lugar, por la falta de oxígeno y glucosa. Dicho estrés puede ser simulado en condiciones

de laboratorio a través del uso de condiciones de OGD, tratamiento con CoCl_2 o sobreexpresión de HIF1 α . Así mismo, desde el comienzo de dicho evento tiene lugar la producción de sustancias tóxicas (representado como s. tóxicas). Dicho estrés puede ser simulado en condiciones de laboratorio a través del uso de compuestos como el arsenito. Durante las siguientes horas al evento isquémico se producen los procesos de inflamación y edema. El papel de la caspasa 1 en la producción de la inflamación y apoptosis celular ha sido ampliamente estudiado y es fundamental. En este trabajo se ha comprobado que el nivel de expresión del gen de la SUMOproteasa SENP7 se reduce en condiciones de OGD, tratamiento con CoCl_2 , sobreexpresión de Hif1 α así como tratamiento con arsenito. Además, el nivel de expresión de dicho gen se reduce en condiciones de hipertermia (42° C). Así mismo, se ha comprobado que el tratamiento con la enzima caspasa 1 en extractos celulares provoca la proteólisis de SENP7 reduciendo, probablemente, la actividad de dicha SUMOproteasa sobre la proteína HP1. Además, en este trabajo se ha comprobado que la SUMOproteasa SENP7 posee actividad antiapoptótica, al contrario de los mutantes de SUMOilación SOX2KR, PIAS4KR, NAB2KR. Igualmente, se comprobó que el factor de transcripción OCT4 es deSUMOilado por la proteasa SENP7 y que, al contrario que el mutante de SUMOilación OCT4KR y que el resto de mutantes de SUMOilación estudiados, OCT4 posee actividad proapoptótica. Además, en el esquema se hace constar que la proteína SENP7 proteolizada por la acción de la caspasa 1 podría no actuar a modo de candado sobre la proteína HP1. Adaptada de Barone & Feuerstein, 1999; Dirnagl, Iadecola & Moskowitz, 1999; Heiss *et al.*, 1999; Brouns & De Deyn, 2009; Junior *et al.*, 2014; Rubió, 2014.

En la realización de este trabajo hemos utilizado diferentes tratamientos en los que hemos intentado reproducir condiciones similares a las que las células estarían sufriendo en el transcurso de un proceso de isquemia, como hipoxia (a través de los tratamientos OGD, OD, CoCl_2 , DMOG o sobreexpresión de HIF1 α), falta de nutrientes (a través de los tratamientos OGD y GD) o aumento de sustancias tóxicas (a través de tratamientos con arsenito). Con anterioridad a este trabajo se ha descrito que todos ellos provocan un aumento en los niveles de SUMOilación de proteínas. Sin embargo, aún se conoce muy poco acerca de cuáles son los mecanismos moleculares a través de los cuales se producen dichos aumentos, y esto es esencial si se quiere alterar el proceso con fines terapéuticos. Es por ello que en este trabajo hemos analizado el nivel de expresión de los genes más relevantes del ciclo de SUMOilación, hallando que, interesantemente, todos los tratamientos realizados provocan una bajada de los niveles de expresión del gen de la proteína SENP7. En la actualidad existen pocas publicaciones sobre esta proteína. Al comienzo de este trabajo esperábamos que, al menos a nivel transcripcional, las proteínas del ciclo de SUMO se alterasen de forma significativa en tratamientos de estrés que producen incrementos masivos de SUMOilación. Sin embargo, apenas existen cambios a nivel de expresión génica de los componentes de dicho ciclo durante OGD, variando sustancialmente tan solo la expresión de los genes de las SUMOproteasas SENP5 y SENP7. Al contrario de lo que esperábamos, el aumento de los niveles de SUMOilación en OGD no se

está produciendo, al menos a nivel transcripcional, por un aumento de la expresión de los genes de las proteínas ligasas de la familia PIAS, sino por un descenso de la expresión de los genes de proteasas de SUMO. De todos modos no descartamos el papel de otras ligasas que no hemos analizado.

Además de por el descenso tanto transcripcional como a nivel de proteína de SENP7 observado en OGD, dicha proteína aumenta aún más su interés si analizamos los experimentos de citotoxicidad. El papel de SENP7 es claro, ya que mientras que el aumento artificial de los niveles de dicha proteasa posee un efecto beneficioso para la supervivencia celular durante OGD, al utilizar una molécula shARN para disminuir los niveles de SENP7, se produce un aumento en la muerte celular. Además, SENP7 parece tener un papel totalmente antagonista con la SUMOproteasa SENP3. Cuando comenzamos nuestra investigación, esperábamos que las modificaciones de los niveles de SENP7 y SENP3 poseyeran un efecto similar debido a que ambas actúan como SUMOproteasas y a que se ha descrito ampliamente que SUMO presenta, indiscutiblemente, un papel neuroprotector. Sin embargo, nuestros hallazgos parecen complicar esta visión, quizás demasiado simplista. Nuestros resultados abogan por un papel señalizador de SUMO más que un papel protector. Pese a que globalmente un aumento de SUMOilación pueda producir efectos beneficiosos, en este trabajo hemos observado, por el contrario, que una proteína deSUMOilada específicamente por SENP7, como es OCT4, tendría un papel proapoptótico en el estado de SUMOilación. Otro de los ejemplos de la literatura en los que la SUMOilación tendría efectos proapoptóticos sería el hecho de que la SUMOilación de HIF1 α produce la degradación de dicho factor y con ello la inhibición de los efectos protectores frente a isquemia mediados por HIF1 α . Esta deSUMOilación es mediada por SENP1 y se ha descrito en relación a efectos dañinos por isquemia en el miocardio (Gu *et al.*, 2014). Sin duda alguna el conocimiento actual acerca de dianas específicas de SUMO envueltas en isquemia es altamente limitado y los efectos potenciales individuales que tenga cada una de las proteínas SUMOiladas dentro del complejo de patologías, como por ejemplo la isquemia cerebral, son actualmente muy especulativos (Peters, Wielsch & Boltze, 2017).

Por lo tanto, SUMO se presenta como una molécula clave para los mecanismos a través de los cuales la célula debe valorar entre entrar en el proceso de apoptosis o permanecer viva a pesar de haber sufrido un daño. Aparte de los numerosos estudios que han demostrado el papel neuroprotector de SUMO en OGD, existen también multitud de trabajos que indican que la SUMOilación de proteínas se induce masivamente por otros tipos de daño celular, como por

ejemplo someter a las células a altas temperaturas (Saitoh & Hinchey, 2000). Los miembros de la familia de proteasas de cisteína no suelen verse afectados por estrés por calor. Sin embargo, en células HeLa se ha demostrado que las SUMOproteasas SENP1, 2, 3 y 7 (pero no SENP6) son particularmente sensibles al estrés térmico, una propiedad que radica mayormente en su dominio catalítico, por lo que SUMO podría tener un papel fundamental en la adaptación de las células a dicho estrés (Pinto *et al.*, 2012). Otros estreses que se han relacionado con SUMO son el estrés osmótico, el estrés genotóxico, las roturas de cadena doble del ADN o la falta de nutrientes (Bekker-Jensen & Mailand, 2011; Eckermann, 2013).

La forma en la que podríamos conocer el papel de SUMO ante cada uno de los estreses en los que se ha visto su importancia es la realización de proteómicas en cada una de estas condiciones. En este sentido, la proteómica presentada en este trabajo supone un importante avance en uno de los estreses en los que se ha estudiado más la función de SUMO, la carencia de oxígeno y glucosa, OGD. También existen otras proteómicas realizadas hasta la fecha para el estudio de las proteínas SUMOiladas ante otros estreses. Cuando un paciente permanece durante un estado prolongado conectado a equipos de ventilación mecánica sufre el proceso iatrogénico denominado como disfunción diafragmática inducida por la ventilación (DDIV) (Dot *et al.*, 2017). Dicho proceso es la causa más importante de fallo en la retirada de la ventilación de soporte. Interesantemente, una de las proteómicas realizadas para el estudio de la SUMOilación ha sido realizada en modelos de ratas en las que se realizó una ventilación mecánica prolongada y un posterior estudio de las proteínas SUMOiladas por espectrometría de masas, identificándose así un número de proteínas cuya SUMOilación es clave para el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a la DDIV. Este es tan solo un ejemplo de los estudios a través de la realización de proteómicas de SUMO que pueden realizarse. Un aspecto clave para el análisis de las proteínas SUMOiladas por espectrometría de masas es la puesta a punto de sistemas eficientes de purificación de estas. En este sentido, este trabajo presenta un método novedoso para la purificación del SUMOiloma utilizando la proteasa SENP1 en el proceso de elución. Hemos verificado la eficacia de este método en la purificación de proteínas modificadas por SUMO1 utilizando una línea estable de células P19 que expresa una versión etiquetada de SUMO1 para facilitar su purificación. SUMO1 orquesta funciones muy variadas e interesantes en el interior celular, estando implicado en desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 2008), memoria (Matsuzaki *et al.*, 2015), angiogénesis (Yang *et al.*, 2013) y un largo etcétera. Muchos de estos procesos no han sido aún estudiados desde un punto de vista proteómico, y un método novedoso de identificación de proteínas SUMOiladas podría

contribuir a ensanchar el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares implicados. Dicho método podría haberse puesto a punto igualmente para la identificación de proteínas modificadas por SUMO2, pero debido a razones inherentes y dictadas por el establecimiento de una colaboración con el grupo del Dr. Vertegaal, se decidió finalmente aplicar otro método de purificación más conveniente para el estudio proteómico realizado.

A pesar de los numerosos precedentes mencionados en la introducción sugiriendo fuertemente un papel neuroprotector de la SUMOilación de proteínas no se ha investigado en detalle la función del incremento generalizado de proteínas SUMOiladas (“SUMOiloma”) en la célula. Además, el conocimiento acerca de la identidad de las proteínas que se SUMOilan frente a condiciones de isquemia es actualmente escaso. En el año 2012 se llevó a cabo un estudio proteómico utilizando la técnica de SILAC y células que sobreexpresaban de forma estable una versión etiquetada de SUMO3 que identificó incrementos de SUMOilación en condiciones de ROGD, y no de OGD, en un total de 22 proteínas (Yang *et al.*, 2012). Debido a la existencia de esta proteómica, se considera interesante realizar una comparación de los resultados obtenidos en esta con los obtenidos en este trabajo. Dicha proteómica presenta numerosas diferencias con la proteómica realizada en nuestro laboratorio. Las principales diferencias son las siguientes:

- El tipo de tratamiento:
 - Yang *et al.*: Se someten las células a una OGD de 6 h y posterior re-oxigenación de 30 min, por lo que no se estudian las proteínas SUMOiladas en OGD sino en ROGD.
 - Este trabajo: Estudio del SUMOiloma tras 2.5 h de OGD y 2.5 h de ROGD.
- El medio de tratamiento:
 - Yang *et al.*: Se realiza el tratamiento de OGD utilizando una solución salina sin glucosa con 116 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5.4 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 14.7 mM, NaHCO₃ y 10 mM HEPES, pH7.4 equilibrada incubando el medio durante la noche anterior en una cámara anóxica con una mezcla de gas anóxica (85 % N₂, 10 % H₂, 5 % CO₂ con paladio catalítico) y una ROGD en medio completo.
 - Este trabajo: Se realizó el tratamiento de OGD con medio cuya única diferencia con el medio control es la ausencia de glucosa y niveles de oxígeno de un 1 %.
- El tipo de células:

- Yang *et al.*: Células de neuroblastoma B35, del sistema nervioso central de *Rattus norvegicus* (rata parda).
- Este trabajo: Células P19 derivadas de un teratocarcinoma embrionario de *Mus musculus* (ratón casero) en condiciones de proliferación y neurodiferenciación.
- El tipo de estudio proteómico:
 - Yang *et al.*: Marcaje metabólico mediante isótopos estables – SILAC: en esta aproximación se utilizan aminoácidos marcados con isótopos estables que son incorporados metabólicamente en las proteínas sintetizadas por las células de forma que el proteoma se marca isotópicamente (Ong *et al.*, 2002). Los cultivos control son marcados con aminoácidos ligeros mientras que los cultivos sometidos a la condición “OGD” son incubados con aminoácidos pesados, lo que permite analizar ambas muestras conjuntamente.
 - Este trabajo: No se realizó marcaje de proteínas, las muestras fueron analizadas por separado.
- Método de aislamiento del SUMOiloma:
 - Yang *et al.*: Se realiza con una línea celular con SUMO etiquetado con HA para poder llevar a cabo el aislamiento del SUMOiloma a través de inmunoprecipitación utilizando agarosa con anticuerpos monoclonales anti-HA.
 - Este trabajo: Se realizó con una línea celular con SUMO etiquetado con histidina para poder realizar el aislamiento del SUMOiloma a través de precipitación utilizando una matriz para aislamiento de histidinas.
- Molécula de SUMO estudiada:
 - Yang *et al.*: Se utiliza HA-SUMO3.
 - Este trabajo: Se utilizó His-SUMO2.

Los resultados de la comparación del SUMOiloma aislado en ambas proteómicas se muestran en la **Tabla 10** así como en la **Figura 66**. En resumen, los resultados de dicha comparación fueron los siguientes:

- Comparación entre proteómica de Yang *et al.* y células P19 no diferenciadas en OGD:
 - 11 proteínas (50 % de las 22 proteínas identificadas en la proteómica de Yang *et al.*) no presentaron cambios significativos similares con nuestra proteómica en condiciones de OGD.

- 11 proteínas (50 %) varían significativamente de igual forma:
 - 10 proteínas (90.9 %) aumentaron sus niveles de SUMOilación en ambos casos.
 - 1 proteína (9.1 %) disminuyó sus niveles de SUMOilación en ambos casos.
- Comparación entre proteómica de Yang *et al.* y células P19 no diferenciadas en ROGD:
 - No existió ningún cambio significativo similar entre ambas proteómicas.
- Comparación entre proteómica de Yang *et al.* y células P19 diferenciadas en OGD:
 - 18 proteínas (81.8 %) no presentaron cambios significativos similares con nuestra proteómica en condiciones de OGD.
 - 4 proteínas (18.2 %) variaron significativamente de igual forma:
 - 4 proteínas (100 %) aumentaron sus niveles de SUMOilación en ambos casos.
- Comparación entre proteómica de Yang *et al.* y células P19 diferenciadas en ROGD:
 - 19 proteínas (86.4 %) no presentaron cambios significativos similares con nuestra proteómica en condiciones de OGD.
 - 3 proteínas (13.6 %) variaron de forma igual significativamente:
 - 3 proteínas (100 %) aumentaron sus niveles de SUMOilación en ambos casos.

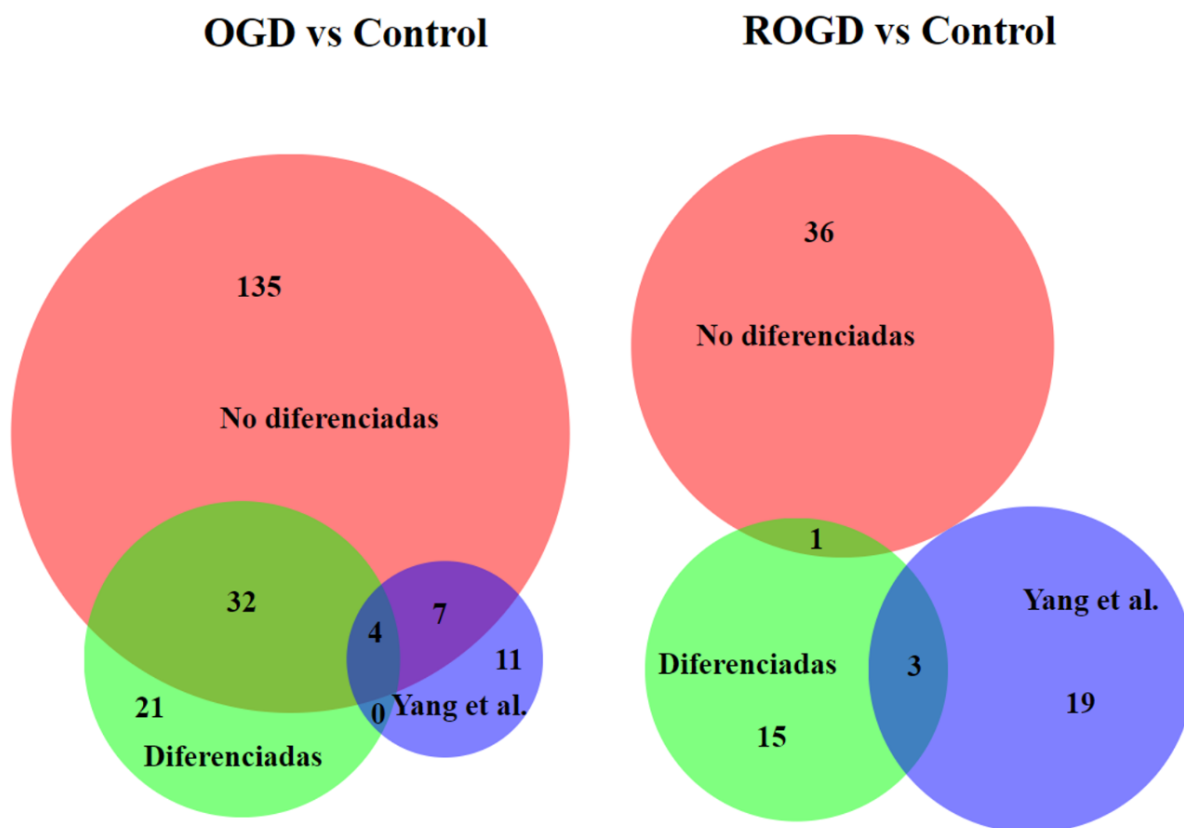


Figura 66. Coincidencias entre nuestro análisis proteómico y el descrito por Yang *et al.*, 2012. Diagrama de Venn resultante de la comparación de los resultados obtenidos en la identificación del SUMOiloma en OGD y ROGD en células P19 con los resultados en la identificación del SUMOiloma en ROGD de Yang *et al.*, 2012. Los números representan cada una de las proteínas identificadas en ambas proteómicas.

Se observó que a pesar de que en la proteómica de Yang *et al.* se realiza un análisis en condiciones de ROGD, curiosamente se encontraron muchas más proteínas en común entre las proteómicas comparándolas con las condiciones de OGD que con las condiciones de ROGD de nuestra proteómica. Cabe resaltar que en la comparación entre la proteómica de Yang *et al.* y células P19 diferenciadas en ROGD, las 3 proteínas que aumentaron sus niveles de SUMOilación en ambos casos con respecto al control mostraron mayores incrementos de SUMOilación en el tratamiento OGD. Es por ello por lo que es probable que la coincidencia no se deba a un aumento de niveles de SUMOilación en condiciones de ROGD sino a que en el punto de 2,5 h tras ROGD los niveles de SUMOilación no hayan descendido hasta los encontrados en la condición control. Por tanto, es posible que dichas proteínas no aumenten sus niveles de SUMOilación específicamente tras ROGD, como se ha publicado.

Tabla 10. Listado comparativo de las proteínas identificadas en el estudio proteómico de Yang *et al.*, 2012 y las proteínas identificadas en este trabajo. Lista de proteínas resultante de la comparación de los resultados obtenidos en la identificación del SUMOiloma en condiciones de OGD y ROGD en células P19 con los resultados de la identificación del SUMOiloma en condiciones de ROGD de Yang *et al.*, 2012. Las flechas hacia arriba indican detección de ascenso en los niveles de SUMOilación de las proteínas, mientras que las flechas hacia abajo indican lo contrario.

Número GI	Yang <i>et al.</i>		Ortólogo de ratón		OGD vs Control		ROGD vs Control	
	Proteína		Proteína	UniProtKB/TrE MBL/Swiss-Prot	No dif.	Dif.	No dif.	Dif.
8392900	ref NP_059021.1 runt-related transcription factor 1 [Rattus norvegicus]	↑	Runx1 runt related transcription factor 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q3UM65, AL672278, BQ033862, CT025774, G3UWD2, G3X9W7, Q8BQ09				
13540673	ref NP_001019439.1 DNA ligase 1 isoform 1 [Rattus norvegicus]	↑	Lig1 ligase I, DNA, ATP-dependent [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q3U4X8				
158186698	ref NP_001103381.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M isoform a [Rattus norvegicus]	↑	Hnrnpm heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q9D0E1, Q3THB3, Q570Z0	↑	↑		↑
197387226	ref NP_001127992.1 helicase ARIP4 [Rattus norvegicus]	↑	Rad54l2 RAD54 like 2 (S. <i>cerevisiae</i>) [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q99NG0, E9QKL0	↑			
158533978	ref NP_001013223.2 myelin expression factor 2 [Rattus norvegicus]	↑	Myef2 myelin basic protein expression factor 2, repressor [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q8C854, A7UQY4, A2ATP5, A7UQY4, A7UQY4	↑	↑		↑
199560324	ref NP_001128346.1 Ngfi-A binding protein 2 [Rattus norvegicus]	↑	Nab2 Ngfi-A binding protein 2 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q61127, Q3TYF1, Q61127	↑	↑		↑
198278571	ref NP_001094227.1 E3 SUMO-protein ligase PIAS4 [Rattus norvegicus]	↑	Pias4 protein inhibitor of activated STAT 4 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q9JM05, Q3ULQ6	↑			
157819153	ref NP_001100953.1 interferon regulatory factor 2-binding protein 1 [Rattus norvegicus]	↑	Irf2bp1 interferon regulatory factor 2 binding protein 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q8R3Y8				
293354431	ref XP_001061632.2 PREDICTED: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 [Rattus norvegicus]	↑	Hnrnpa0 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q9CX86	↑			
16758050	ref NP_445789.1 E3 SUMO-protein ligase PIAS2 [Rattus norvegicus]	↑	Pias2 protein inhibitor of activated STAT 2 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q8C5D8, Q3V3U5, G3UWE3, F8WHS8	↑			
109459149	ref XP_001068093.1 PREDICTED: nuclear mitotic apparatus protein 1 isoform 2 [Rattus norvegicus]	↑	Numa1 nuclear mitotic apparatus protein 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	E9Q7G0	↑			
62078769	ref NP_001014041.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 [Rattus norvegicus]	↑	Hnrnp2 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	P70333				
19705547	ref NP_599240.1 nucleus accumbens-associated protein 1 [Rattus norvegicus]	↑	Nacc1 nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q7TSZ8	↑			
67078510	ref NP_001019922.1 transcription factor SOX-6 [Rattus norvegicus]	↑	Sox6 SRY (sex determining region Y)-box 6 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	E9PUW0, Q8BSS6, P40645, Q3V1J7,				

57528279	ref NP_001009672.1 small ubiquitin-related modifier 1 precursor [Rattus norvegicus]	↑	Sumo1 small ubiquitin-like modifier 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	A0A0U1RNW8, A0A0U1RPC1, P63166		
61889073	ref NP_062022.2 matrin-3 [Rattus norvegicus]	↑	Matr3 matrin 3 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q8K310, Q5BL18		
58865526	ref NP_001011979.1 TAR DNA binding protein [Rattus norvegicus]	↑	Tardbp TAR DNA binding protein [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q8BLD4, Q8BUM1, Q921F2, Q8ROB4, Q544R5, Q6VYI4, Q6VYI5	↑	↑
109483564	ref XP_001074703.2 PREDICTED: promyelocytic leukemia-like [Rattus norvegicus]	↑	No existe dicho número de acceso			
209870077	ref NP_446368.1 transcription intermediary factor 1-beta [Rattus norvegicus]	↓	Trim28 tripartite motif-containing 28 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q62318, Q5EBP9		
293356056	ref XP_218939.3 PREDICTED: remodeling and spacing factor 1 [Rattus norvegicus]; Duplicate proteins: gi 293344232	↓	Rsf1 remodeling and spacing factor 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	E9PWW9		↓
56606080	ref NP_001008509.1 bromodomain-containing protein 8 [Rattus norvegicus]	↓	Brd8 bromodomain containing 8 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Q8R3B7, D3YZC7, D3YZC8		
293342765	ref XP_001061350.2 PREDICTED: histone cluster 1, H2ae-like [Rattus norvegicus]	↓	Hist1h2an histone cluster 1, H2an [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	C0HKE1-9, B2RVF0		

La proteómica realizada en este trabajo supone un avance, sin lugar a dudas, en la comprensión del SUMOiloma en condiciones de OGD dado que presenta múltiples diferencias con la proteómica anteriormente mencionada. En primer lugar, el método es completamente diferente ya que mientras la proteómica realizada en el año 2012 utiliza el método SILAC, nuestra proteómica utiliza un sistema de purificación *Label-free*. Dicho método posee una popularidad mayor debido a que no utiliza químicos adicionales en el medio celular (Asara *et al.*, 2008). A parte de esta ventaja, el estrés utilizado es radicalmente diferente, dado que mientras que en la proteómica de 2012 se utiliza una solución salina para provocar OGD, en el presente trabajo se expusieron las células a condiciones de OGD estrictamente. Se decidió utilizar estas condiciones para simular de la forma más simple posible las condiciones de una isquemia, en la que el estrés viene dado por la falta de oxígeno y glucosa en primer lugar (Brouns & De Deyn, 2009; Bonaventura *et al.*, 2016). De hecho, el cerebro es el tejido que consume un mayor nivel de glucosa, dado que presenta uno de los tipos de células más hiperespecializadas que existen, las neuronas. Mientras que la tasa de consumo de glucosa en estado basal es de 20 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en riñones y corazón, 60 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en los intestinos, 110 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en el hígado y 245 $\mu\text{mol}/\text{min}$ en el músculo, en el cerebro es, con gran diferencia, la mayor, con 385 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Defronzo RA, 2001). Además de esto, en la proteómica realizada

en 2012 dentro de los estreses a los que se sometió la célula también se encontró el de la eliminación del suero. En nuestro laboratorio hemos comprobado cómo diferentes concentraciones de suero pueden interferir sobre el nivel de SUMOilación de algunas proteínas (García-Gutiérrez *et al.*, 2011). Ya que en este caso se mezcla un tratamiento de isquemia con respuesta a suero, debido a que nuestro interés es estudiar finamente la regulación de ligasas y proteasas y de sus factores de regulación en respuesta a los estreses producidos durante la isquemia, necesitamos determinar dianas inequívocas de SUMO en respuesta a este proceso por lo que la proteómica se realizó en condiciones de OGD y ROGD. Otra de las características interesantes con respecto a las diferencias entre la proteómica presentada en este trabajo y la realizada en 2012 es la utilización de la molécula de SUMO2 en vez de la de SUMO3. Aunque ambos presentan una elevada homología, no debemos olvidar que las diferencias en los resultados obtenidos entre ambas quizás se deban a las sutiles diferencias entre uno y otro SUMO.

Otro factor a tener en cuenta es que en la proteómica de este trabajo se han analizado dos situaciones diferentes, OGD y ROGD, lo que ha permitido diferenciar si las proteínas cuya SUMOilación incrementa en el estado de ROGD con respecto al control se SUMOilaron durante OGD o bien se SUMOilaron debido al proceso de ROGD. En este sentido es muy interesante señalar que entre las 23 proteínas cuyo estado de SUMOilación fue significativamente elevado en ROGD con respecto al control en células no diferenciadas, el 26.1 % de ellas se SUMOilaron también en el estado de OGD. Es decir, una parte importante de las proteínas cuya SUMOilación es observada en ROGD también son SUMOiladas en OGD. Para dilucidar si estas proteínas se SUMOilaron en OGD y se identificaron en ROGD como positivas debido a que no había dado lugar a su deSUMOilación, o bien si estas proteínas se SUMOilaron en OGD y se volvieron a SUMOilar en ROGD serían necesarios experimentos de comprobación para cada una de ellas mediante análisis de sus niveles por *Western blot*. Igualmente es destacable que entre las 14 proteínas cuyo estado de SUMOilación fue significativamente menor en ROGD con respecto al control en células no diferenciadas, el 28.6 % de ellas presentaron niveles de SUMOilación significativamente menores también en el estado de OGD. Más interesante aún es la observación de que un 28.6 % de esas 14 proteínas presentaron niveles de SUMOilación superiores en OGD. Este 28.6 % de proteínas está compuesto por 4 proteínas: el factor de transcripción E3 (Tfe3), el miembro de la familia de proteínas kinesina-like Kif23, el factor de transcripción Hif1 α y la ligasa de SUMO PIAS1. En el caso de Hif1 α el resultado es el esperado, debido a que, tal y como se ha demostrado en el

apartado de resultados debido a las condiciones de ROGD dicho factor se reducía drásticamente. Sin embargo, el dato de la SUMOilación de PIAS1 es enormemente interesante, ya que podría estar explicando su papel en OGD. La SUMOilación de las proteínas PIAS2 y PIAS4 también es detectada en la proteómica realizada en OGD, aunque en el caso de estas dos ligasas no existen diferencias entre el control y ROGD. Hemos observado el mismo resultado para PIAS4 mediante *Western blot*, en los que se observa PIAS4 SUMOilado en condiciones control, un mayor nivel en OGD y la posterior desaparición de dicha proteína SUMOilada tras ROGD. Es conocida la importancia de la autoSUMOilación de PIAS1 y PIAS4 para la realización de su función sobre determinados sustratos (Kotaja *et al.*, 2002; Gocke, Yu & Kang, 2005; Ihara, Yamamoto & Kikuchi, 2005).

Sin embargo, si observamos los cambios a nivel de expresión génica durante OGD podemos apreciar que, sorprendentemente, los genes de las proteínas PIAS1 y 4, y no los de las proteínas PIAS2 y 3, presentan una reducción de los niveles de su transcrito tras 2,5 h de OGD. Los resultados contrastan con los obtenidos a través del análisis de expresión de los genes de dichas proteínas durante los tratamientos con CoCl₂ y el veneno arsenito, en los que se observa una clara respuesta diferencial dados los aumentos en los niveles de expresión de los genes de las proteínas PIAS2 y 4. Las subidas transitorias observadas en la expresión de los genes de las ligasas PIAS2 y 4 pueden ser lógicas ya que la SUMOilación de las proteínas diana puede llevarse a cabo durante el periodo inicial de tratamiento, no siendo necesaria la presencia de altos niveles de dichas ligasas a posteriori, habiendo ya SUMOilado las proteínas dianas correspondientes. En este estudio hemos analizado también los niveles de ARNm de los genes de las proteínas ligasas PIAS después de un condicionamiento, tratando las células durante 30 min con arsenito y observado los niveles de expresión 24 h después de haber retirado el veneno. Según todos los análisis realizados el gen *Pias* que parece no estar implicado en ninguno de los procesos de estrés utilizados es el de la proteína PIAS3, dado que no se han observado variaciones significativas en los niveles de expresión tras tratamientos con OGD, CoCl₂ ni arsenito. Además, tampoco se han observado cambios en los niveles de SUMOilación de dicha proteína en la proteómica realizada en condiciones de OGD. Por todo ello, la regulación de la expresión y actividad de las proteínas PIAS se presenta bastante compleja. Análisis de *Western blot* en experimentos futuros bajo los diferentes tipos de estrés analizados podrían confirmar las observaciones realizadas en este trabajo a través de qPCR y del escrutinio proteómico en OGD.

Quizá el aspecto más importante y que podría aportar más novedades acerca del papel de SUMO en isquemia cerebral es el hecho de haber realizado la proteómica en condiciones de OGD y ROGD en células neurodiferenciadas, ya que se trata de un modelo que reproduce con mayor cercanía las condiciones de una isquemia cerebral. De hecho, existen 12 proteínas cuya SUMOilación diferencial ha sido identificada en la proteómica de células neurodiferenciadas y no en células no diferenciadas. Quizás estas proteínas sean claves en los procesos biológicos propios de neuronas. En la actualidad en nuestro grupo trabajamos para estudiar esta hipótesis. Aún existen más diferencias en la comparación entre células en el estado de proliferación y células neurodiferenciadas ya que tan solo presentan coincidencia en 1 de las 37 proteínas cuyo estado de SUMOilación es diferente en ROGD frente al control, lo que podría indicar que el papel de la modificación por SUMO2/3 en neuronas podría ser bastante diferente al del ejercido en células en estado de proliferación. Sin duda alguna, los resultados de esta proteómica son intrigantes, y esperamos poder dilucidar muchas de estas preguntas en un futuro próximo.

Las ontologías constituyen representaciones formalizadas del conocimiento de gran interés en las ciencias de la computación y biología molecular debido a que incluyen el significado de múltiples términos así como las relaciones que los interconectan entre sí. Una de las ontologías más utilizadas en estos momentos es la ontología de genes (Viera, Castellanos & Zardón, 2010). A la hora de desarrollar una ontología de genes existen diversos métodos y modelos para realizar análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA, por sus siglas en inglés *Gene Set Enrichment Analysis*) para estudiar dentro de una amplia lista de genes conceptos claves en biología molecular como, por ejemplo, la función molecular de los productos génicos, su papel en los procesos biológicos así como su localización dentro de los diferentes componentes celulares. En este tipo de análisis, por tanto, se realiza una búsqueda para obtener información acerca de si existe un proceso biológico, como por ejemplo una vía metabólica, de manera más frecuente en una lista de genes obtenida en condiciones diferentes a la lista de genes obtenida en una condición control (Tipney & Hunter, 2010). Actualmente existen diversas herramientas *online* que permiten realizar este tipo de análisis. Una de las más populares es DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (DAVID, 2016). Es por ello por lo que se realizaron análisis de ontología de genes con dicho programa para realizar un análisis de los genes pertenecientes a las proteínas cuyo estado de SUMOilación varió a través del tratamiento OGD tanto en células P19 no diferenciadas como en células neurodiferenciadas en la proteómica previamente descrita (**Figuras 67 y 68**). En dicho análisis se observó que cerca de la totalidad de las proteínas realizan funciones en el

núcleo celular (90 %), lo cual es consistente con las observaciones previas que indican que la SUMOilación es un evento predominantemente nuclear (Vertegaal *et al.*, 2004; Bruderer *et al.*, 2011). A parte de las observaciones anteriores, en cuanto al análisis funcional se encontró que existe un elevado número de genes relacionados con regulación transcripcional (53 %) así como un alto número de genes implicados en procesos generales de la transcripción (51 %). Si observamos los grupos relacionados con sentido positivo (17 %) o negativo (16 %) en la regulación de la transcripción no existe un predominio hacia ninguno de ambos sentidos.

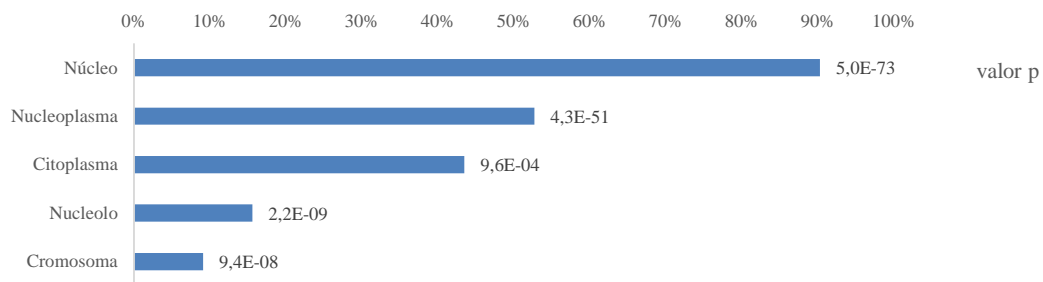


Figura 67. La mayoría de proteínas que modifican su estado de SUMOilación en OGD se localizan en el núcleo. Análisis de ontología de genes sobre la localización de dianas de SUMO2 en OGD. El número de proteínas incluidas en cada localización está representado por porcentajes. Se analizó el total de las 190 proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en condiciones de OGD en células en estado de proliferación y neurodiferenciadas según los datos de la proteómica realizada. También se indican los valores de valor p para cada uno de los términos.

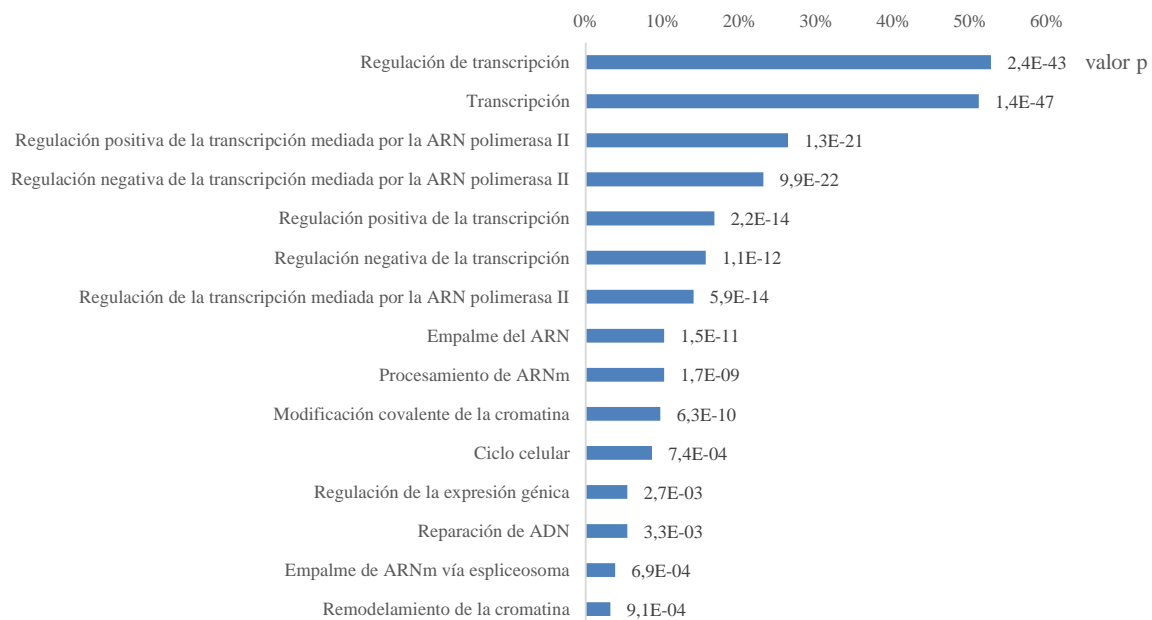


Figura 68. La mayoría de proteínas que modifican su estado de SUMOilación en condiciones de OGD están relacionadas con transcripción. Análisis de ontología de genes

sobre la función de proteínas dianas de SUMO2 cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en OGD. El número de proteínas incluidas en cada función está representado por porcentajes. También se indican los valores de valor p para cada uno de los términos. Se analizó el total de las 190 proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en condiciones de OGD en células en estado de proliferación y neurodiferenciadas según los datos de la proteómica realizada.

La biosíntesis de ARNm es un proceso llevado a cabo por la ARN polimerasa II (ARNP II). Dicho proceso se encuentra altamente regulado de modo que permite una elevada adaptación de la síntesis de proteínas y el metabolismo celular al ambiente y los cambios fisiológicos. La transcripción realizada por la ARNP II se encuentra acoplada al metabolismo de la molécula resultante, el ARN mensajero (ARNm). Dicho metabolismo incluye el ensamblaje cotranscripcional desde su nacimiento de diferentes proteínas que le confieren estabilidad e intervienen en el proceso de forma que se produce una ribonuceoproteína mensajera (RNPM) la cual se transporta al citoplasma (Aguilera, 2005; Keene, 2007). La formación adecuada y eficiente de las RNPM se produce a través de la coordinación de diferentes eventos bioquímicos en el núcleo (**Figura 69**). La unión al ADN de activadores transcripcionales junto con coactivadores dirige la formación de complejos preiniciación con la ARNP II en los promotores de genes. Los pre-ARNms sintetizados por la ARNP II interactúan con varios complejos de unión a ARN de una manera dinámica: la maquinaria de procesamiento de ARNm cataliza la formación de la caperuza 5', se produce el empalme de los intrones a través del espliceosoma, y el procesamiento del extremo 3' (por ejemplo, por poliadenilación), mientras que otras proteínas asociadas al ARNm sirven como adaptadores para la maquinaria de exportación del ARN. Estos múltiples eventos están asociados con los mecanismos de control de calidad de forma que tan solo las moléculas maduras son exportadas por los complejos de poros del núcleo (CPN) (Oeffinger & Zenklusen, 2012; Rouvière, Geoffroy & Palancade, 2013). Se ha demostrado ampliamente la participación del polipéptido SUMO en la biosíntesis de ARNm ya que ha sido descubierta la SUMOilación de múltiples factores envueltos en dicho proceso en levaduras (Wohlschlegel *et al.*, 2004; Zhou, Ryan & Zhou, 2004), células de mamíferos (Gocke, Yu & Kang, 2005; Rosas-Acosta *et al.*, 2005) y plantas (Budhiraja *et al.*, 2009; Elrouby & Coupland, 2010). Así mismo, se ha descubierto la participación en procesos de regulación transcripcional de las proteínas del ciclo de SUMO PC2 (Lin *et al.*, 2003; Long, Zuo & Park, 2005), Krox-20 (García-Gutiérrez *et al.*, 2011), SENP3 (Fanis *et al.*, 2012), Ulp1 (Kashyap *et al.*, 2005), SENP2 (Vethantham, Rao & Manley,

2007), Slx5/8 (Nagai *et al.*, 2008), RanBP2 (Palancade & Doye, 2008), UBC9 (Shiio & Eisenman, 2003) y PIAS1 (Rappilber *et al.*, 2003) (**Figura 69**).

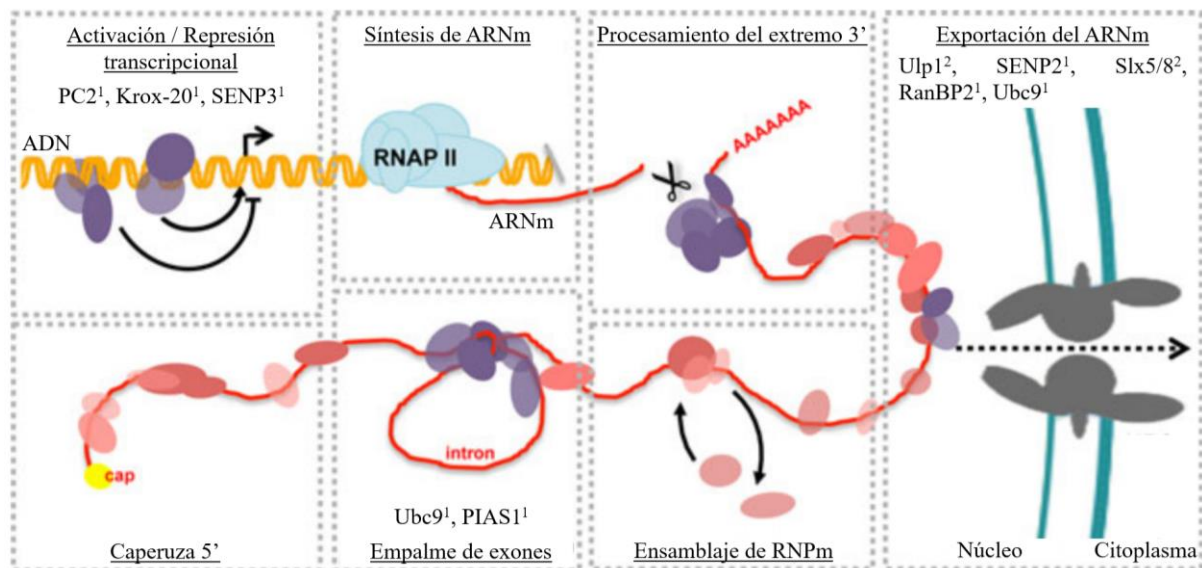


Figura 69. Ruta de biosíntesis del ARNm. Se representan los diferentes procesos contribuyentes a la biosíntesis del ARNm: activación o represión transcripcional, síntesis de ARNm, caperuza 5', empalme de exones, procesamiento del extremo 3', ensamblaje de ribonucleoproteínas y exportación de ARNm. Las enzimas del ciclo de SUMO asociadas con la maquinaria del proceso de biosíntesis del ARNm están indicadas con el número 1 en caso de que se haya descubierto dicha asociación en células de mamíferos y con el número 2 en caso de que dicha asociación haya sido descrita en levaduras. Se representa como RNAP II la ARN polimerasa II y como CPN los complejos de poros nucleares. Adaptada de Rouvière, Geoffroy & Palancade, 2013.

En la proteómica presentada en este trabajo, al tener en cuenta las proteínas cuyos niveles de SUMOilación variaron significativamente en condiciones de OGD tanto en células no diferenciadas como en neurodiferenciadas, se encontró que existe un total de 98 proteínas cuyos genes se encuentran clasificados dentro del grupo de regulación de transcripción, 95 dentro del grupo de transcripción, 49 dentro del grupo de regulación positiva de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II, 43 dentro del grupo de regulación negativa de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II, 31 dentro del grupo de regulación positiva de la transcripción, 29 dentro del grupo de regulación negativa de la transcripción, 26 dentro del grupo de regulación de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II, 19 dentro del grupo de empalme del ARN, 19 dentro del grupo de procesamiento de ARNm, 10 dentro del grupo de regulación de la expresión génica y 7 dentro del grupo de empalme de ARNm vía espliceosoma (**Tabla 11**). Si contamos el número de genes totales implicados en los procesos de biosíntesis del ARNm identificamos un total de 125 genes cuyos productos proteicos fueron

identificados en la proteómica realizada en condiciones de OGD. Si tenemos en cuenta que en dicha proteómica se identificó un total de 190 proteínas cuyos niveles de SUMOilación variaron significativamente, este hecho supone que el 66 % de dichas proteínas están implicadas en la regulación de la biosíntesis del ARNm.

Tabla 11. Distribución por categorías de las proteínas implicadas en transcripción que presentan diferencias en los niveles de SUMOilación en OGD. Lista de los 125 genes participantes en procesos de transcripción cuyos productos proteicos presentan cambios significativos en los niveles de SUMOilación en condiciones de OGD tanto en células no diferenciadas como en neurodiferenciadas.

Genes	Regulación de transcripción	Transcripción	Regulación positiva de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II	Regulación negativa de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II	Regulación positiva de la transcripción	Regulación negativa de la transcripción	Regulación de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II	Empalme del ARN	Procesamiento de ARNm	Regulación de la expresión génica	Empalme de ARNm via espicosoma
<i>Arid3a</i>	x	x	x								
<i>Asxl2</i>	x	x	x	x							
<i>Aif1</i>	x	x	x				x				
<i>Aif4</i>	x	x	x		x		x				
<i>Atrx</i>	x	x	x								
<i>Bbx</i>	x	x									
<i>Bcor</i>	x	x		x		x					
<i>Brd7</i>	x	x			x	x	x				
<i>Chx1</i>						x					
<i>Chx2</i>	x	x		x							
<i>Chx5</i>						x					
<i>Cux1</i>	x	x		x							
<i>Dach1</i>	x	x		x		x					
<i>Daxx</i>	x	x	x	x		x					
<i>Ddx5</i>	x	x	x	x	x		x	x	x		
<i>Dgcr14</i>								x	x		
<i>Dnttip2</i>	x	x									
<i>Dpf2</i>	x	x									
<i>Ehmt2</i>				x				x			
<i>Elf2</i>	x	x			x			x			
<i>Elmsan1</i>								x			
<i>Emsy</i>	x	x									
<i>Erf</i>	x	x		x			x				
<i>Esf1</i>	x	x									
<i>Etv3</i>	x	x		x							
<i>Etv4</i>	x	x	x		x						
<i>Fos</i>	x	x	x		x		x				
<i>Foxk2</i>	x	x	x								
<i>Foxm1</i>	x	x	x	x	x	x					
<i>Foxp1</i>	x	x	x	x	x	x					
<i>Foxp4</i>	x	x	x	x							
<i>Gabpa</i>	x	x	x	x				x			
<i>Gmeb1</i>	x	x	x								
<i>Gtf2i</i>	x	x									
<i>Hif1a</i>	x	x	x	x	x					x	
<i>Hmg20b</i>	x	x									
<i>Hnrnpc</i>								x	x		x
<i>Hnrnpf</i>								x	x		
<i>Hnrnp1</i>								x	x		
<i>Hnrnp1</i>								x	x		
<i>Hnrnp1</i>								x	x		x
<i>Irf2bpl</i>			x	x							
<i>Lin54</i>	x	x									
<i>Mam11</i>	x	x	x								
<i>Mitf</i>	x	x	x	x	x		x			x	
<i>Mkl1</i>	x	x	x		x		x				
<i>Mkl2</i>	x	x	x		x					x	
<i>Mtf1</i>	x	x	x		x						
<i>Myb12</i>	x	x	x					x			
<i>Myef2</i>		x		x							
<i>Nab2</i>	x	x				x					
<i>Nacc1</i>	x	x				x					
<i>Ncoa2</i>	x	x	x	x		x					
<i>Ncoa3</i>	x	x	x								
<i>Neor1</i>	x	x		x		x	x				
<i>Neor1 i. 2</i>	x	x		x		x	x				
<i>Neor1 i. C</i>	x	x		x		x	x				
<i>Nrf1</i>	x	x	x					x			
<i>Nrip1</i>	x	x	x	x				x			
<i>Oct4</i>	x	x	x	x		x				x	
<i>Otx2</i>	x		x		x		x				
<i>Patz1</i>	x		x			x				x	
<i>Pbrm1</i>	x	x			x						
<i>Phf10</i>	x	x									
<i>Phf12</i>	x	x		x		x					
<i>Phf21a</i>	x	x		x							
<i>Pias1</i>	x	x		x	x						
<i>Pias2</i>	x	x	x		x		x				

<i>Pias4</i>	x	x		x			x		
<i>Pml</i>	x	x	x				x		
<i>Prpf40a</i>									
<i>Ptbp1</i>			x				x	x	x
<i>Rad54l2</i>			x						
<i>Rbbp6</i>								x	
<i>Rbm10</i>				x			x		
<i>Rbm14</i>	x	x	x						
<i>Rbm22</i>							x	x	
<i>Rbm5</i>							x	x	
<i>Rfc1</i>	x	x		x	x	x			
<i>Rnf2</i>	x	x		x					
<i>Rsf1</i>					x	x			
<i>Safb</i>	x	x	x				x		
<i>Sall2</i>	x	x		x		x			
<i>Sap130</i>	x	x		x					x
<i>Sarnp</i>		x		x					
<i>Setd2</i>	x	x							x
<i>Sfr1</i>	x	x			x				
<i>Six4</i>	x	x	x		x	x			x
<i>Slu7</i>							x	x	
<i>Smarca1</i>	x	x	x		x				
<i>Snw1</i>	x	x	x	x		x	x	x	x
<i>Son</i>	x	x					x	x	
<i>Sox2</i>	x	x	x	x	x		x		x
<i>Sp1</i>	x	x	x		x		x		
<i>Spen</i>	x	x		x	x	x			x
<i>Srsf10</i>	x						x	x	x
<i>Suz12</i>	x	x		x					
<i>Tardbp</i>	x	x					x	x	
<i>Tcerg1</i>	x	x		x					
<i>Tef7</i>	x	x		x				x	
<i>Tef7l1</i>	x	x				x	x		
<i>Terf2ip</i>	x	x							
<i>Tet1</i>	x	x	x						
<i>Tet3</i>			x						
<i>Tfe3</i>	x	x	x		x				
<i>Tfeb</i>	x	x	x		x				
<i>Tra2a</i>							x	x	x
<i>Trerf1</i>	x	x			x		x		
<i>Trim24</i>	x	x			x	x			
<i>Ubp1</i>	x	x					x		
<i>Ubf1</i>	x	x							
<i>Ujf1</i>	x	x	x						
<i>Yeats2</i>	x			x		x			
<i>Ylpm1</i>	x	x		x					
<i>Zbtb3</i>	x	x							
<i>Zbtb33</i>	x	x				x			
<i>Zeb2</i>	x	x	x	x					
<i>Zfx4</i>	x	x							
<i>Zfp1</i>	x	x							
<i>Zfp395</i>							x		
<i>Zfp397</i>		x							
<i>Zhx1</i>	x	x		x		x			
<i>Zmiz1</i>	x	x	x						
<i>Zmym5</i>	x	x							
<i>Zmynd8</i>	x								

El programa DAVID también arrojó datos interesantes cuando se realizó el análisis de componentes de determinadas rutas biológicas utilizando la información contenida en La Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG), la cual es una base de datos que almacena información para la comprensión general de redes de interacción molecular (Tanabe & Kanehisa, 2012; DAVID, 2016). Se identificaron dos rutas cuyos componentes se encontraron alterados significativamente (**Figura 70**). Interesantemente, en la ruta de los componentes del espliceosoma se encontraron 13 proteínas (**Figura 71**). El espliceosoma es un complejo formado por ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, del inglés *small nuclear RiboNucleoProteins*) cuya función es eliminar los intrones de los precursores del ARNm, proceso denominado empalme del ARN, tal y como se comentó anteriormente (Matera & Wang, 2014).

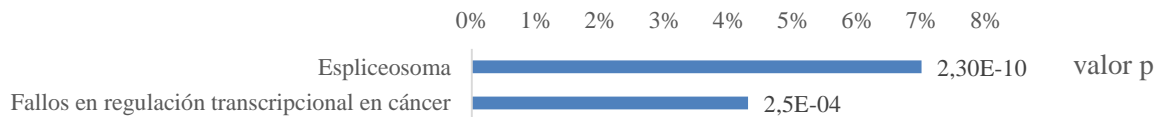


Figura 70. Rutas en las que están implicadas las proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían tras OGD. El número de proteínas incluidas en cada ruta según la información de rutas en KEGG está representado por porcentajes. También se indican los valores de valor p para cada uno de los términos. Se analizó el total de las 190 proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en condiciones de OGD en células en estado de proliferación y neurodiferenciadas según los datos de la proteómica realizada.

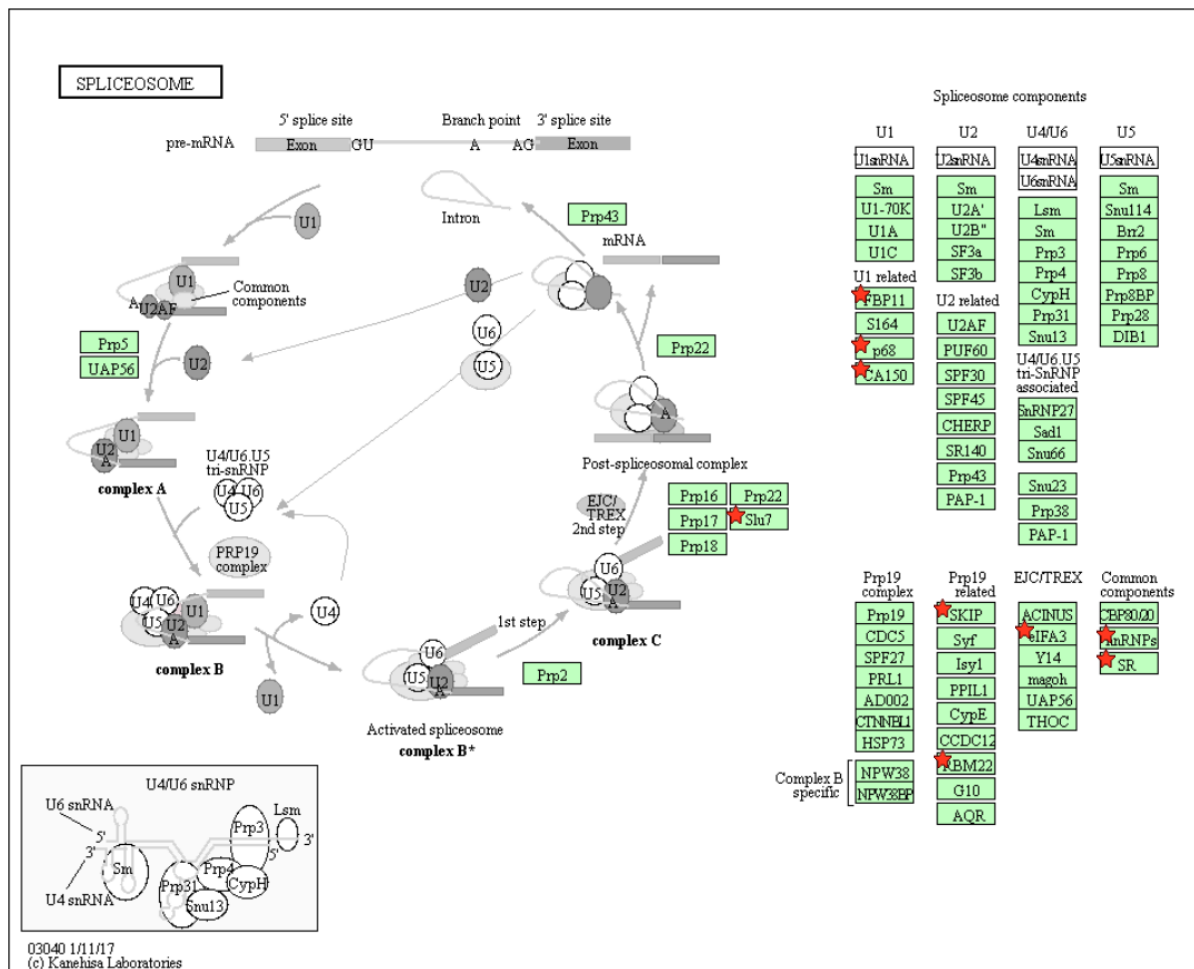


Figura 71. Ruta del espliceosoma y proteínas cuyo nivel de SUMOilación varía significativamente en condiciones de OGD. Esquema de la ruta del espliceosoma en el que se marcan las proteínas cuya SUMOilación fue detectada en OGD en células no diferenciadas así como en células neurodiferenciadas. El espliceosoma está compuesto por 5 RNPm (U1, U2, U4, U5 y U6) y varias proteínas asociadas al espliceosoma (*Spliceosome-Associated Proteins*, SAPs). Los espliceosomas no son simples complejos estables sino una familia dinámica de partículas que se ensamblan en el precursor del ARNm y ayudan a plegarlo en la conformación precisa. Se marcan con una estrella de color rojo las proteínas implicadas en los procesos de

empalme del ARN identificadas en la proteómica en células P19 en condiciones de OGD: FBP11, p68, CA150, Slu7, SKIP, RBM22, eIFA3, hnRNPs y SR. Adaptada de KEGG.

Si observamos el conjunto de los datos aportados por el análisis de ontología de genes, en el que se han identificado un 66 % de proteínas implicadas en los procesos de transcripción, así como las rutas halladas podemos observar que la modificación por SUMO se centra bastante en la modificación de la maquinaria de biosíntesis del ARN. El elevado número de proteínas implicadas en esta función puede orientarnos para conocer cuál es el papel de los incrementos de proteínas SUMOiladas por SUMO2/3 observados a lo largo de múltiples publicaciones en condiciones de OGD anteriormente mencionados. Se conoce que el proceso de biosíntesis del ARN se encuentra altamente regulado de modo que permite una elevada adaptación de la síntesis de proteínas y el metabolismo celular al ambiente y los cambios fisiológicos. (Rouvière, Geoffroy & Palancade, 2013). De esta forma, SUMO podría destacar como un elemento clave para regular la producción de ARNm en la célula ante un estrés como OGD. En definitiva, a través de la rápida modificación de múltiples proteínas de la maquinaria de biosíntesis del ARNm gracias a SUMO, la célula sería capaz de reorientar la producción de ARNm, y con ella de proteínas, para hacer frente a las nuevas condiciones estresantes de una forma eficiente. Es conocido que la conjugación de SUMO a las proteínas del espliceosoma es requerida para producir un empalme eficiente del ARNm (Pozzi *et al.*, 2017). Aunque todavía queda por aclarar el papel de cada una de las proteínas implicados en la transcripción modificadas por SUMO en OGD. En este sentido, en el trabajo presentado se han obtenido datos acerca de algunos genes del total de los 125 que participan en procesos de transcripción como la verificación de los cambios por SUMO mediante *Western blot* de HMG20B, NAB2, NCOR1, OCT4, PIAS4, SOX2 así como la obtención de datos de viabilidad a través de la modificación de los niveles de PIAS4, NAB2, OCT4 y SOX2 y de sus mutantes de SUMOilación.

En cuanto a los análisis de las proteínas cuyos niveles de SUMOilación varían significativamente en OGD y que según la información de KEGG participan en rutas implicadas en la tumorigénesis, se encontraron proteínas relacionadas con multitud de cánceres, como por ejemplo PML y NCOR1, en el caso de la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica de células B (Gelmetti *et al.*, 1998; de Thé, Pandolfi & Chen, 2017), SIX4 en el caso de la leucemia linfoblástica de células T (Wang *et al.*, 2011), TFE3 en el caso del carcinoma renal (Alshenawy, 2015), DDX5 y ETV4 en el caso del cáncer de próstata

(Barros-Silva *et al.*, 2013; Taniguchi *et al.*, 2016), SP-1 en el caso del neuroblastoma (Tuthill *et al.*, 2003), ETV4 en el caso del sarcoma de Swing (Ishida *et al.*, 1998), ATF1 en el caso del sarcoma de partes blandas (W. L. Wang *et al.*, 2009). Cabe mencionar el caso del cáncer colorrectal, ya que si observamos la ruta KEGG descrita para este cáncer colorrectal encontramos las proteínas TCF7, TCF7L1 y c-Fos (L. Wang *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2016). Además, otras proteínas implicadas en la ruta KEGG del cáncer colorrectal, como por ejemplo c-Myc, C-Jun, TCF/LEF también se han relacionado con SUMO (Bossis *et al.*, 2005; González-Prieto *et al.*, 2015).

Los resultados de la proteómica han sido ampliamente validados mediante *Western blot* ya que se ha comprobado un total de 6 proteínas diferentes. Si observamos el número total de proteínas identificadas en la proteómica en OGD y ROGD, tanto en células en el estado proliferativo como en células neurodiferenciadas existe un predominio sustancial en el número de proteínas que sufren un aumento de SUMOilación, siendo el número de proteínas que sufren un descenso de SUMOilación bastante inferior. Dichos resultados eran los esperados, acordes con los niveles de SUMOilación de proteínas observados en el apartado de resultados así como con la bibliografía existente en condiciones de OGD. Sin embargo, no por ello los resultados acerca de la deSUMOilación de proteínas son menos interesantes, ya que podrían estar mostrándonos grupos específicos de proteínas con funciones similares o bien grupos de proteínas cuya SUMOilación y deSUMOilación pudiera estar regulada por ligasas y proteasas concretas, respectivamente, y que por ello variaran de una manera diferente a la tónica general.

Los mecanismos a través de los cuales una única célula debe valorar entre sufrir un proceso de apoptosis o resistir viva son claves en organismos pluricelulares, en los que la apoptosis juega un papel fundamental, ya que esta es necesaria para procesos como el desarrollo embrionario o mecanismos de defensa contra el cáncer. De hecho, a lo largo de la vida de un organismo como el ser humano, se producen mutaciones oncogénicas en millones de células y, sin embargo, gracias a los procesos de apoptosis selectiva, el sacrificio de algunas células del organismo produce un beneficio común final: la supervivencia del organismo y su reproducción y, con ello, el trasvase de la información genética codificada en el ADN del organismo. Uno de los conceptos que describe lo que acabamos de explicar es el de senescencia celular, la cual se define como el proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula y que constituye una ruta hacia la muerte celular programada, siendo de vital importancia para la supresión de la formación de células cancerosas. Si consultamos la

bibliografía existente en la actualidad sobre SENP7, a pesar de la escasez de información ya comentada sobre dicha proteína, sorprendentemente existen evidencias acerca del papel de dicha SUMOproteasa en los procesos de senescencia a través de su relación con la proteína SPOP o proteína POZ-tipo moteado (del inglés, *Speckle-type POZ Protein*). Dicha proteína funciona como un adaptador para la ligasa de ubiquitina E3 cullin 3. Interesantemente, estudios de secuenciación masiva de genomas de nueva generación han revelado recientemente que SPOP está mutada con alta frecuencia en numerosos tipos de cáncer como por ejemplo el de próstata o el de endometrio (Berger *et al.*, 2011; Barbieri *et al.*, 2012; Le Gallo *et al.*, 2012). El silenciamiento epigenético de SPOP a través de hipermetilación de su promotor inhibe la apoptosis celular en el cáncer colorrectal (Zhi *et al.*, 2016). Todos estos hallazgos indican que SPOP es un gen supresor de tumores. Mientras que la proteína SPOP promueve la senescencia, los mutantes de dicha proteína encontrados en muestras de cáncer no la promueven. Los mecanismos inductores de senescencia promueven la acción de SPOP, el cual produce la ubiquitinación de SENP7 y, con ello, la degradación de dicha SUMOproteasa. Dicho evento produce un incremento de la SUMOilación de la proteína anteriormente descrita HP1 α así como su movilización, ya que se encontraba bloqueada por SENP7, y con ello, un silenciamiento epigenético de algunos genes que conlleva la activación del mecanismo de senescencia celular. En definitiva, SPOP actúa como gen supresor de tumores al producir la degradación de SENP7 y, con ello, la activación de la senescencia celular (Zhu *et al.*, 2015).

En relación a la deSUMOilación de OCT4 por SENP7, el hecho de que SENP7 promueva la polideSUMOilación de una proteína concuerda con lo descrito en la bibliografía existente, la cual apoya que la actividad de SENP7 es mayoritariamente frente a cadenas de poliSUMOs (Nayak & Müller, 2014). Aun así, además de producir la polideSUMOilación de OCT4, SENP7 también produce la deSUMOilación del monómero de SUMO2 dado que tras la transfección de SENP7 tampoco se observa la banda correspondiente a OCT4 monoSUMOilado. Resultados anteriores de nuestro grupo indican que SENP7 es necesaria para el correcto desarrollo del proceso de neurodiferenciación (Juarez-Vicente, Luna-Pelaez & Garcia-Dominguez, 2016) aunque los mecanismos moleculares por los cuales se produce dicho efecto todavía están por dilucidar. Como se indicó en la introducción, OCT4 es una proteína característica de estados de proliferación y, como hemos comprobado, sus niveles descienden en condiciones de neurodiferenciación. Una posible explicación al hecho de que la proteasa SENP7 sea necesaria para la correcta neurodiferenciación podría residir en el hecho de que al realizar la deSUMOilación de OCT4, promoviera, con ello, la degradación de dicho

factor de transcripción. De hecho, no sería la primera proteína en la que se describe que la SUMOilación es protectora frente a la degradación, ya que en muchos casos los procesos de modificación postraduccional ubiquitinación y SUMOilación compiten entre sí, de forma que la deSUMOilación crea una conformación idónea para la ubiquitinación y con ello la posterior degradación. Uno de los ejemplos de dicho juego entre modificaciones es el caso de Ikb α comentado anteriormente, ya que la SUMOilación inhibe la ubiquitinación y con ello la degradación de dicha proteína (Desterro, Rodriguez & Hay, 1998). Otro de otros muchos ejemplos es el caso de la proteína serina hidroximetiltransferasa 1 (SHMT1), para la que se ha demostrado que SUMOilación y ubiquitinación ocurren en la misma lisina (Anderson, Eoms & Stovers, 2012). Otra explicación acerca de por qué la proteasa SENP7 es necesaria para la correcta neurodiferenciación podría ser que, al descender los niveles de OCT4 SUMOilado, este se una con menor afinidad al ADN y con ello se reduzcan los niveles de proteínas activadas transcripcionalmente por OCT4, dado que ha sido publicado con anterioridad que la SUMOilación de OCT4 produce un aumento en su estabilidad, en su unión al ADN así como en su función de transactivación (Wei, Schöler & Atchison, 2007).

El hallazgo de una nueva diana de la SUMOproteasa SENP7 supone, sin duda alguna, un paso adelante en el conocimiento sobre las funciones de dicha SUMOproteasa ya que tan solo se conocen unos pocos sustratos específicos de esta proteína. Sin duda, el ejemplo más estudiado es el de HP1 α , ya comentado anteriormente (Maison *et al.*, 2012). Otro de los ejemplos existentes es la deSUMOilación de la proteína KAP1 (proteína 1 asociada a KRAB). SENP7 produce la deSUMOilación de SUMO2/3 de KAP1 y regula la interacción del remodelador de cromatina CHD3 con la cromatina. Consecuentemente, en presencia de CHD3, SENP7 es requerida para la relajación de la cromatina en respuesta al daño en el ADN, para la reparación por recombinación homóloga y para la resistencia celular a agentes dañinos del ADN. En resumen, la deSUMOilación por SENP7 es requerida para promover un estado de cromatina permisivo para reparar el ADN (Garvin *et al.*, 2013). Estos datos sugieren otra posible causa del efecto antiapoptótico de SENP7 observado en este trabajo. Esto indicaría que otras proteínas que sufriesen una poliSUMOilación y que en ese estado promoviesen muerte celular constituirían candidatos adecuados para el estudio de su deSUMOilación por SENP7.

Los análisis de viabilidad celular tras la de transfección de diferentes construcciones en células P19 suponen un acercamiento a la comprensión de las funciones del SUMOiloma identificado en condiciones de OGD. Los resultados obtenidos son, en general, muy similares

para los tres métodos de medida de la viabilidad celular utilizados, lo cual sostiene con mayor peso dichos resultados. En cuanto a la sobreexpresión de la proteína SUMO2, tal y como esperábamos según lo descrito en la bibliografía hemos observado una reducción de citotoxicidad, mientras que no fue así para el caso de SUMO1. Estos resultados confirman los hallazgos anteriormente mencionados acerca de la protección de SUMO frente a OGD en otros modelos celulares en nuestro modelo, células P19, lo cual no había sido confirmado hasta ahora. Así mismo podemos entender que es SUMO2/3 y no SUMO1 la molécula cuya actuación es más importante ante una situación de OGD. En relación a la sobreexpresión de diversas SUMOproteasas no se observan cambios significativos en la viabilidad celular para el caso de SENP1. Como ya hemos comentado antes, para el caso de SENP3 y SENP7 se observan resultados totalmente contrapuestos, teniendo SENP7 un papel antiapoptótico y SENP3 proapoptótico. Dichos resultados concuerdan con el hecho de que una proteína proapoptótica como SPOP induzca la degradación de la SUMOproteasa SENP7 (Zhu *et al.*, 2015) así como que SENP7 sea requerida para la relajación de la cromatina en respuesta al daño en el ADN, para la reparación por recombinación homóloga y para la resistencia celular a agentes dañinos del ADN (Garvin *et al.*, 2013). Los experimentos de sobreexpresión del dominio catalítico C-terminal de la proteína SENP7 muestran resultados en el mismo sentido que los de la proteína completa. Aunque cabe resaltar que la proteína completa muestra beneficios significativamente mayores que el dominio catalítico. Esto deja entrever que el hecho por el cual la proteína SENP7 posee efectos antiapoptóticos no solo se debe a su influencia como SUMOproteasa sino que también podría ser debido a efectos diferentes. Entre ellos podrían encontrarse los provocados por su actuación como candado de la proteína HP1 anteriormente descrita. Con respecto a la comparación de SENP3 y SENP7, es aún más interesante cuando se analizan los resultados de experimentos de contranfección. Cuando ambas proteasas se coexpresan o se reducen sus niveles los resultados de viabilidad son similares al control, por lo que se observa que las actividades anti y proapoptóticas de una y otra son equiparables, de modo que ambas actuaciones se contrarrestan. Sin embargo, cuando se combina una bajada de expresión de SENP3 con una subida de SENP7 el estado protector es máximo, mientras que una bajada de SENP7 junto con una subida de SENP3 provoca efectos muy perniciosos para la célula.

Al comparar los procesos de ubiquitinación y SUMOilación entre sí, la SUMOilación parece ser mucho más simple debido a que existen descritas solo unas pocas proteasas y ligasas de SUMO, frente a las más de 100 proteasas y ligasas que existen específicas de ubiquitina (Nayak & Müller, 2014). Ya que existen cientos de proteínas en nuestro organismo que son

SUMOiladas, el hecho de que solo haya unas pocas enzimas encargadas del control de la SUMOilación es difícil de explicar, ya que múltiples proteínas serían SUMOiladas bajo las mismas circunstancias, suponiéndose así que la SUMOilación es un proceso inespecífico. Una solución a este problema podría ser que las diferentes proteasas y ligasas de SUMO sufrieran un empalme alternativo de forma que diferentes variantes de una misma SENP o PIAS podrían interactuar con sustratos específicos. De hecho existen algunos ejemplos en la bibliografía que apuntan a ello. Uno de ellos es el reciente descubrimiento de la proteasa SENP7S humana, la cual regula la señalización y transformación epitelial mamaria (Karami *et al.*, 2017). Sin embargo, sería difícil explicar la SUMOilación específica de cada una de las cientos de proteínas que se SUMOilan a través de variantes de las proteasas y ligasas descritas hasta la fecha. Si observamos el sistema desde otro punto de vista, el hecho de que múltiples proteínas se SUMOilaran y deSUMOilaran en las mismas condiciones podría significar que el sistema de modificación por SUMO regulase de forma coordinada grupos de proteínas que están relacionadas funcional y físicamente, de forma que cada una de las SENP y PIAS estuviera encargada de actuar sobre un gran grupo de proteínas con funciones similares. El concepto de modificación de grupos establecería un nivel superior de complicación en el papel que SUMO desempeña. En este sentido, nuestros datos apuntan a que SENP3 y SENP7 podrían tener papeles totalmente opuestos, de forma que se encargaran de la deSUMOilación de proteínas con funciones contrapuestas en los procesos de apoptosis.

Debido a que el corte predicho de la caspasa 1 se sitúa justamente entre los dos dominios de unión a HP1 anteriormente comentados en la introducción, las repercusiones que la cisura de dicha proteasa pudiera tener al inactivar la función de SENP7 sobre HP1 serían importantes. Dado que las regiones aminoacídicas participantes en una función importante en el desempeño de la actividad de una proteína suelen estar conservadas entre especies, se realizó un alineamiento entre varias especies lejanas filogenéticamente entre sí para conocer si el dominio de corte de la caspasa 1 pudiese estar conservado. Los resultados se muestran en la **Figura 72**. Interesantemente, la secuencia de corte por la caspasa 1 está conservada en especies tan lejanas como las del grupo de peces cartilagosos (*Callorhinchus mili*) así como las de los peces óseos (*Oryzias latipes*). Así mismo, también está conservada en especies de los grupos de reptiles (*Anolis carolinensis*) y mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*). Por el contrario, especies de aves (*Gallus gallus*, *Aquila chrysaetos canadensis*) y anfibios (*Xenopus laevis*) no presentan una secuencia de corte clara para la caspasa 1. Por otra parte, los dos dominios de anclaje de HP1 están mejor conservados en vertebrados amniotas (mamíferos, aves y reptiles) y menos

en los anamniotas (anfibios y peces), pudiendo estar relacionada la presencia de dos dominios de anclaje de HP1 con alguna ventaja evolutiva en vertebrados superiores (**Figura 72**).

A

		HP1	Caspasa 1		HP1																																																																										
hSENP7	94	ERQ	LK	V	M	L	T	N	V	L	W	T	D	L	G	R	K	F	R	K	T	L	P	R	N	D	A	N	L	C	D	A	N	K	V	Q	S	D	S	L	P	S	T	S	V	D	S	L	E	T	C	Q	K	L	E	P	L	R	Q	S	L	N	L	S	E	R	I	P	R	V	I	L	T	N	V	170			
mSENP7	88	KR	H	L	R	V	M	L	T	N	V	L	W	T	D	L	G	R	E	F	R	K	T	L	P	R	K	D	A	N	L	C	A	P	S	K	V	Q	S	D	S	L	P	S	T	S	V	D	S	I	E	T	C	Q	R	L	D	P	L	H	Q	S	L	N	L	S	E	R	I	P	R	V	I	L	T	D	I	164	
cSENP7	79	I	G	C	P	K	V	I	L	T	N	V	L	R	T	K	I	G	R	K	Y	T	Q	A	Q	P	K	T	D	A	N	F	S	D	A	G	K	L	Q	S	N	Q	P	P	S	S	V	A	S	L	K	I	W	Q	I	L	N	P	A	L	H	S	P	F	L	S	K	R	C	P	O	V	I	L	T	N	V	155	
qSENP7	79	I	G	C	P	K	V	I	L	T	N	V	L	R	T	K	I	G	R	K	Y	T	Q	A	Q	P	K	T	G	A	N	F	S	D	A	G	K	L	Q	S	D	Q	P	P	S	S	A	A	S	L	K	I	W	Q	I	L	N	P	T	L	Q	S	L	F	L	S	K	R	C	P	K	V	I	L	T	N	V	155	
aSENP7	81	Y	G	C	P	K	V	I	L	T	N	V	L	K	T	V	G	R	K	Y	T	Q	T	Q	L	I	T	D	A	N	L	S	H	G	V	K	L	Q	S	D	Q	T	P	S	S	V	D	T	V	E	I	W	Q	I	F	S	P	L	H	E	S	L	F	I	S	K	R	C	P	K	V	M	L	T	N	V	157		
xSENP7	47	P	S	Y	K	N	V	T	V	R	K	R	P	W	D	S	S	Y	D	S	F	N	K	T	R	-	N	K	D	S	N	A	Y	Q	S	K	F	P	F	R	S	S	R	S	R	S	E	L	R	G	V	H	N	E	A	K	S	P	S	E	E	V	P	Y	D	F	K	A	K	R	C	S	V	E	L	I	R	I	122
oSENP7	79	R	R	K	F	L	L	I	L	T	D	V	L	K	T	D	M	G	K	A	H	M	E	R	I	K	S	L	R	K	Q	L	S	G	P	Q	K	A	S	R	P	N	R	E	Q	P	A	T	C	R	E	K	S	S	Q	R	E	T	R	N	G	S	S	L	K	S	N	Q	K	T	T	P	S	S	155				
sSENP7	100	L	K	E	A	R	I	V	L	K	D	V	L	M	T	D	S	G	R	R	H	L	Q	L	K	N	R	G	C	S	N	V	-	-	T	D	T	S	H	P	K	H	T	P	T	S	E	L	T	D	N	C	H	V	E	T	K	T	S	H	Q	A	S	Q	S	N	I	L	F	S	S	G	V	174					

B

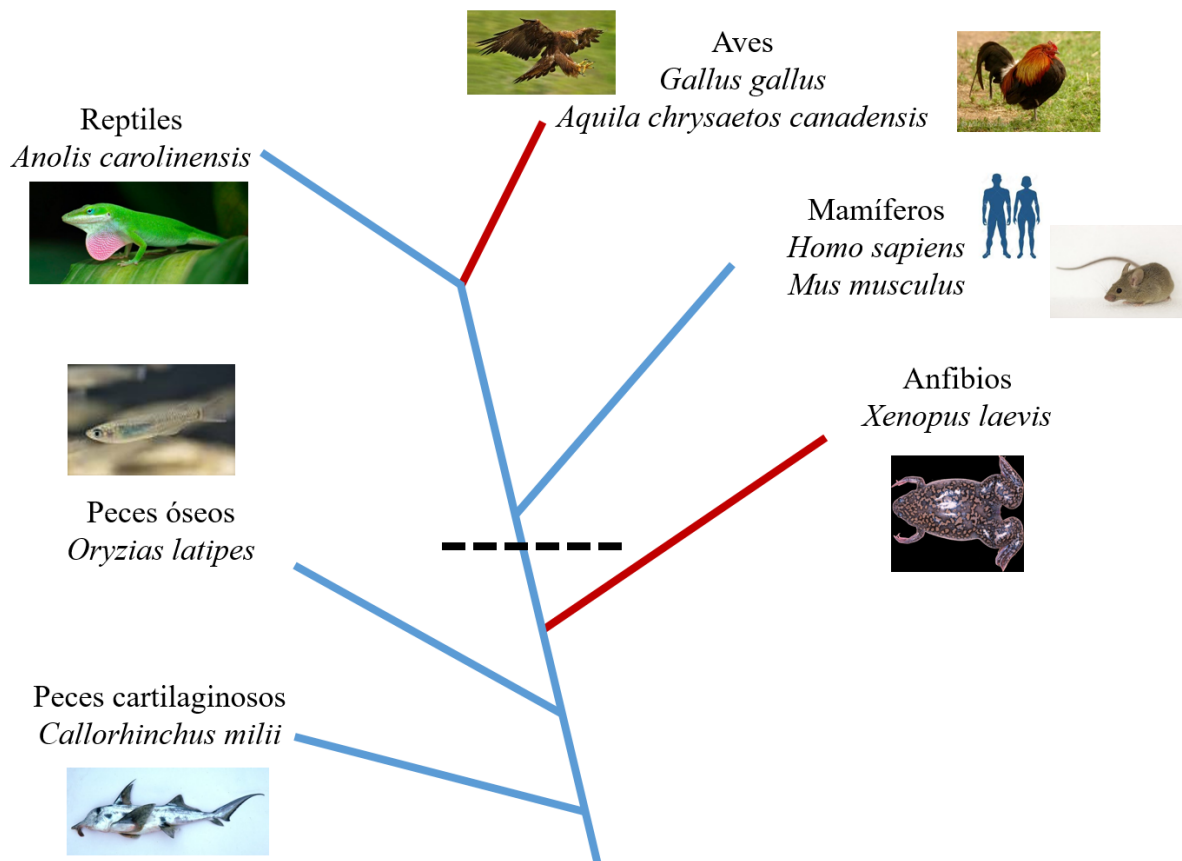


Figura 72. Estudio de variabilidad de conservación de las secuencias de SENP7 en diferentes especies. Figura A: Se muestra un fragmento correspondiente a la región N-terminal de las secuencias de SENP7 de diferentes especies. Se han coloreado los aminoácidos relevantes de las secuencias consenso para la unión con HP1 y para el corte de caspasa 1. Figura B: Se muestra un cladograma para la visualización de la relación entre especies estudiadas. Los clados en azul muestran las especies con el dominio de corte de caspasa 1 conservado, mientras que en rojo se representan las especies que no poseen dicha conservación. La línea de puntos

separa vertebrados superiores (mamíferos, aves y reptiles) de inferiores (anfibios y peces). En estos últimos no aparecen tan claramente conservados los dos dominios de anclaje de HP1 como en los vertebrados superiores. Leyenda: h, *Homo sapiens*; m, *Mus musculus*; c, *Gallus gallus*; q, *Aquila chrysaetos canadensis*; a, *Anolis carolinensis*; x, *Xenopus laevis*; o, *Oryzias latipes*; s, *Callorhinchus milii*.

Los resultados preliminares aportados en este trabajo acerca de la degradación de la proteína SENP7 en presencia de la enzima caspasa 1 indican que probablemente dicha proteasa tenga un papel clave en la regulación de la proteína SENP7. Sería interesante comprobar si el descenso artificial de los niveles de caspasa 1 utilizando moléculas de shARN dirigidas contra esta produjese un aumento de los niveles de SENP7 y con ello una disminución de los niveles de proteínas SUMOiladas en OGD. Como se comentó en la introducción, las caspasas poseen un papel esencial tanto en procesos de inflamación como en apoptosis y ha sido estudiado que las drogas inhibidoras de caspasas producen efectos neuroprotectores en isquemia cerebral (Loddick, MacKenzie & Rothwell, 1996; H Hara *et al.*, 1997; H. Hara *et al.*, 1997; Bose *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1998; Ma, Endres & Moskowitz, 1998; Han *et al.*, 2002). Así mismo también se ha comentado anteriormente que existen numerosos trabajos que indican papeles proapoptóticos importantes de las diferentes caspasas en OGD (Le *et al.*, 2002; Malagelada *et al.*, 2005; Serra-Pérez *et al.*, 2008; Fradejas *et al.*, 2010). Todo ello hace que el corte de la caspasa 1 sobre una proteína que ha mostrado efectos antiapoptóticos, SENP7, cuadre perfectamente. El corte de la caspasa 1 sobre SENP7 podría explicar otro de los motivos por los que dicha caspasa promoviera la apoptosis en OGD. Los análisis de comparación de secuencias con especies tan lejanas filogenéticamente como las del grupo de peces cartilagosos (*Callorhinchus mili*) así como las de los peces óseos (*Oryzias latipes*), especies de los grupos de reptiles (*Anolis carolinensis*) y mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*) indican que la secuencia de corte de la caspasa 1 se mantiene intacta en todas ellas. A pesar de que todavía quedan análisis que realizar para comprobar el proceso del corte de la caspasa 1 sobre SENP7. Dado que las regiones aminoacídicas participantes en una función importante en el desempeño de la actividad de una proteína suelen estar conservadas entre especies, dichos resultados apuntan a que el corte por la caspasa 1 en SENP7 podría tener una función clave.

En relación a la sobreexpresión de Ubc9 y ligasas PIAS, los resultados de viabilidad celular son los esperados, debido a que ambas moléculas producen un aumento de los niveles de SUMOilación de proteínas. Al menor de Ubc9 existían evidencias específicas previas acerca

de los beneficios del aumento de su expresión en OGD (Lee *et al.*, 2011). Interesantemente, la sobreexpresión del mutante KR de la proteína PIAS4 presenta un aumento significativamente considerable de los niveles de células apoptóticas en OGD con respecto a la sobreexpresión de la proteína PIAS4 silvestre. La confirmación a través de *Western blot* de la SUMOilación de la proteína PIAS4 en OGD y su posterior deSUMOilación en ROGD concuerda con los resultados obtenidos. Todo ello indica que la SUMOilación de PIAS4 es clave en los procesos de regulación por SUMO que ocurren frente a OGD. En relación a los efectos observados tras la sobreexpresión de OCT4 y el correspondiente mutante deficiente en SUMOilación, se han obtenido resultados no esperados, dado que se partía de la hipótesis de que las células que expresan el mutante KR deberían mostrar unos niveles mayores de apoptosis debido a los efectos beneficiosos de SUMO. El hecho de que OCT4 KR produzca beneficios para la célula, así como el hecho de que esta proteína sea deSUMOilada concretamente por SENP7 y que dicha SUMOproteasa tenga efectos antiapoptóticos son aspectos que concuerdan entre sí. Así mismo, es interesante el hecho de que haya sido demostrado que las proteínas PIAS1, 3 y 4 actúan como represores de la función de OCT4 (Tolkunova *et al.*, 2007) independientemente de su capacidad de SUMOilación sobre OCT4. Con respecto a los demás mutantes KR, los resultados fueron los esperados debido a que tanto para el caso de NAB2 como para el caso de SOX2, los mutantes KR producen aumentos de los niveles de células en apoptosis significativamente mayores a los obtenidos tras sobreexpresar las versiones silvestres SUMOilables. Sin embargo, cabe destacar que mientras que la sobreexpresión de NAB2 produce un aumento de los niveles de células apoptóticas, la sobreexpresión de SOX2 muestra un comportamiento contrario. Dichos resultados concuerdan con resultados descritos en la bibliografía para otros tipos celulares, ya que en el caso de NAB2 se ha comprobado, como ya se ha indicado, que activa la expresión de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Balzarolo *et al.*, 2012, 2013) y en el caso de SOX2 se ha demostrado que su silenciamiento causa parada de la proliferación y pérdida de la tumorigenicidad (Ben-Porath *et al.*, 2008; Bass *et al.*, 2009). Igualmente, ha sido comprobado que SOX2 promueve la tumorigenicidad, la supervivencia celular y la resistencia a drogas de quimioterapia (Tian, 2012; Chou *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017). Los hallazgos realizados en este trabajo indican que la SUMOilación de ambas proteínas tendría un efecto contrario ya que, mientras que el mutante KR de NAB2 presenta un aumento de la función proapoptótica de dicha proteína, en el caso del mutante de SOX2 posee un descenso en la función de inhibición de apoptosis que posee dicha proteína. Sin embargo, el resultado final en ambos casos es el mismo, dado que la proteína silvestre posee efectos beneficiosos con respecto a la proteína mutante.

Esto concuerda con los efectos beneficiosos que se presuponen para SUMO en el estrés por OGD.

Los resultados obtenidos a través de la identificación del SUMOiloma en condiciones de OGD y el análisis de viabilidad de los mutantes de SUMOilación de las proteínas identificadas suponen un paso más hacia la comprensión de la enormemente compleja labor de SUMO. Cabe mencionar que aparte de las funciones que se han descrito sobre regulación ante diferentes tipos de estrés, SUMO posee otras muchas funciones. Debido al hecho de que SUMO posee un papel fundamental en las células y a que la ruta de modificación por SUMO comprende una sola enzima E1 y E2, cualquier interferencia con dichas enzimas tendría efectos remarcables, y de hecho, existen ejemplos de patógenos que han aprovechado estos hechos de forma que varios virus y bacterias realizan su infección promoviendo la degradación mediada por el proteosoma de las enzimas E1 y E2 del ciclo de SUMOilación (Flotho & Melchior, 2013).

En este trabajo hemos demostrado que los niveles de SUMOilación de proteínas aumentan con el tratamiento de hipoxia mediante CoCl_2 en células P19 y descienden durante la normoxia posterior. A pesar de que ya ha sido descrito un aumento del nivel de SUMOilación en otras líneas celulares diferentes a P19 (Cai *et al.*, 2010) no se había descrito que tras la eliminación de dicho compuesto disminuyese de nuevo el nivel de proteínas SUMOiladas por SUMO2. Así mismo, es interesante la observación de los niveles de SUMO2 libre. Como cabría esperar, tras 30 min de tratamiento en condiciones simuladas de hipoxia los niveles de SUMO2 libre disminuyen ya que este pasa a estar conjugado. Sin embargo, observamos que el nivel de SUMO2 libre aumenta una vez pasadas 2,5 h en condiciones simuladas de hipoxia a pesar de que el nivel de conjugación de SUMO2 es también mayor. Presuponemos, por tanto, que las células P19 están elevando la expresión de SUMO2 en respuesta a este estrés, ya que los niveles del control α -tubulina permanecen constantes.

Además de todo ello, cabe comentar los interesantes resultados obtenidos tras el análisis en bases de datos de las proteínas SENP3 y SENP7 en distintos tipos de cáncer. Dichos análisis se realizaron motivados por los efectos observados para ambas proteínas según las medidas de supervivencia celular realizadas. Dado que la SUMOproteasa SENP3 mostró un efecto proapoptótico y SENP7 mostró un efecto beneficioso en OGD, nos preguntamos si dichos efectos podrían reflejarse también en el caso de muestras de tejidos tumorales de pacientes. Dada la cantidad de procesos en los que está envuelto SUMO, tales como replicación y

reparación de ADN, transcripción, transporte entre núcleo y citoplasma, carcinogénesis, diferenciación celular, angiogénesis, metástasis, proliferación celular, senescencia celular, apoptosis, transición epitelio-mesénquima y demás, existen diversos estudios que muestran importantes relaciones entre los niveles de SUMOilación de proteínas y algunos tipos de cáncer (Han *et al.*, 2018). Es por ello que algunos trabajos han indagado acerca del papel de diferentes SUMOproteasas en el desarrollo de enfermedades humanas, entre las que se incluye el cáncer, sugiriendo que estas podrían ser atractivas dianas para nuevas drogas quimioterápicas (Bialik & Woźniak, 2017). Existe un estudio en el que se ha sugerido que la variabilidad en los genes de las SUMOproteasas SENP1 y SENP2 podría tener un papel en el desarrollo de cáncer de mama (Mirecka, Morawiec & Wozniak, 2016). Así mismo, se ha demostrado que SENP1, al producir la deSUMOilación del receptor de andrógenos modula la respuesta genética en el cáncer de próstata (Kaikkonen *et al.*, 2009). A través de diferentes estudios se ha constatado que existe un aumento de la deSUMOilación en el cáncer de próstata a través del aumento de los niveles de SENP1 y SENP3, mientras que en el cáncer de mama ocurre lo contrario, a través de una disminución de los niveles de SENP6 y un aumento de los niveles de las enzimas E2 y E3 del ciclo de SUMOilación (Bawa-Khalfe & Yeh, 2010). De esta forma, sería el desbalance en los niveles de SUMOilación de proteínas lo que precipitaría la formación de células cancerosas. Ya comentamos anteriormente que resultados previos en publicaciones acerca de SENP7 han demostrado la existencia de respuestas biológicas diferenciales según los niveles de dos isoformas de SENP7 humanas descritas en cáncer de mama. En dicho cáncer se reducen los niveles de SENP7S (variante sin exón 6) y aumentan los de SENP7L (variante con exón 6). Dicho cambio se correlaciona con los niveles de enfermedad metastásica (Bawa-Khalfe *et al.*, 2012; Karami *et al.*, 2017). Existen algunos trabajos más que relacionan las SUMOproteasas SENP con el cáncer y otras enfermedades, aunque todavía queda un amplio camino por recorrer acerca del papel de dichas enzimas en cáncer. El diagnóstico, la terapia o la prevención a través del control de la actividad de genes o productos génicos que controlan la progresión del ciclo celular, diferenciación o apoptosis constituyen una estrategia prometedora contra el cáncer (Cho, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Es por ello por lo que en nuestro grupo estamos trazando en la actualidad diferentes diseños experimentales para indagar aún más acerca de la importancia que puedan tener SENP3 y SENP7 en el cáncer colorrectal gracias a los datos aportados en este trabajo, los cuales muestran una correlación importante entre los niveles de expresión de los genes de SENP3 y SENP7 y los niveles de supervivencia del paciente así como la extensión del cáncer colorrectal. Según los resultados presentados, la disminución de la supervivencia de los pacientes así como el incremento de la extensión del tumor con mayores

niveles de expresión del gen de SENP7 podrían estar producidos por el papel antiapoptótico que dicha proteína parece tener, al menos en células P19, de forma que produciría una viralización del tumor y ello explicaría la menor supervivencia de dichos pacientes. Lo contrario ocurriría para el caso de SENP3, que muestra resultados opuestos a SENP7. Si se confirmasen los resultados hallados en células P19 en líneas de cáncer colorrectal de modo que las modificaciones de los niveles de SENP3 y SENP7 produjesen los mismos efectos en dichas líneas, sería un hallazgo importante a tener en cuenta en la selección de tratamientos contra dicho cáncer. De hecho, revisando los estudios de quimioterapia del cáncer colorrectal hemos detectado que existen dos agentes quimioterápicos, la brefeldina A (BFA) y la tunicamicina (Tm), que producen un aumento en los niveles de expresión de *Senp7* en células de la línea HCT116 de cáncer de colon (Deegan *et al.*, 2015). Dado que, tal y como se ha mostrado en el apartado de resultados, los niveles elevados de expresión del gen de SENP7 se correlacionan con una menor supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal, sería necesario investigar con profundidad el efecto de ambos agentes quimioterápicos, ya que aunque su efecto global en la mayoría de cánceres pueda ser beneficioso, en el cáncer colorrectal quizás esté produciendo los efectos contrarios.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo principal de este proyecto consistía en identificar dianas terapéuticas relacionadas con la SUMOilación de proteínas para tratamientos de neuroprotección frente a isquemia. Las ligasas y proteasas de SUMO, como enzimas directamente implicadas en la regulación del proceso son candidatos obvios. Se desconoce la manera de estimular la acción de las ligasas. Sin embargo, sí se conocen algunas drogas como la N-etilmaleimida (NEM), aza-epóxido y la quetona aculoximetil (AOMK), capaces de inhibir la acción de las proteasas de SUMO (Albrow *et al.*, 2011). Aunque estas no actúan específicamente frente a ninguna SENP, recientemente se están diseñando moléculas variantes capaces de inhibir de forma más específica la de-SUMOilación de proteínas (Kumar & Zhang, 2013; Madu *et al.*, 2013). De hecho, hace tan solo unos meses ha sido publicado un nuevo trabajo en este campo, en el que a través de un cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés, *High-Throughput Screening*) se han encontrado varias moléculas citoprotectivas frente a OGD debido a que promueven la conjugación de SUMO a través de la inhibición específica de SENP2. Por lo tanto, las proteasas de SUMO se prefiguran como el objetivo fundamental para la intervención terapéutica. Es por ello que en este proyecto nos propusimos determinar si la inhibición específica de algunas proteasas de SUMO podría producir mayores niveles de SUMOilación en condiciones normales de crecimiento y si esto

podría tener un efecto protector frente a condiciones de OGD, avanzando así en el conocimiento de cuáles son las enzimas clave del proceso y los mecanismos de regulación. A la luz de los resultados relativos a la SUMOproteasa SENP7, quizás sería interesante la realización de estudios con inhibidores de esta proteína como tratamiento contra células cancerosas así como con inhibidores de otras SENPs distintas a SENP7 como terapia para prevenir los efectos de la isquemia.

En resumen, en este trabajo hemos descrito un método para la purificación selectiva del SUMOiloma, hemos identificado proteínas diana de SUMO en condiciones de simulación de isquemia, hemos clarificado la regulación de determinadas ligasas y proteasas de SUMO en diferentes tipos de estrés que las células neuronales sufren durante el proceso de infarto cerebral y hemos revelado que algunas de ellas pueden ser enzimas claves en algunos tipos de cáncer. Los resultados descritos suponen un avance acerca del conocimiento de las implicaciones que la adición de un péptido de 100 aminoácidos puede suponer para las muchas proteínas dianas de SUMO. Es por todo ello por lo que sientan las bases para identificar dianas terapéuticas relacionadas con la ruta de SUMOilación de proteínas para tratamientos de neuroprotección frente a isquemia o incluso en enfermedades como el cáncer colorrectal.

8 Conclusiones

1. En células P19 que expresan de forma estable una construcción de SUMO1 etiquetada con una cola de histidinas, se purifica eficientemente el SUMOiloma mediante el uso de matriz de histidinas y elución con el dominio catalítico de la SUMOproteasa SENP1.
2. Los niveles de proteínas SUMOiladas aumentan al tratar células P19 en estados de proliferación con CoCl₂. Dichos niveles aumentan igualmente en condiciones de OGD (*Oxygen and Glucose Deprivation*) y se recuperan tras condiciones de ROGD (*Recover from OGD*) tanto en células proliferativas como en neurodiferenciadas.
3. La exposición a condiciones de OGD produce aumentos significativos en los niveles de SUMOilación en células P19 de las proteínas NAB2, OCT4, PIAS4 y SOX2 en estado de proliferación así como de las proteínas HMG20B y NCOR1 en células neurodiferenciadas.
4. Un número significativo de proteínas SUMOiladas en condiciones de OGD en células P19 presentan diversas funciones, entre las que predomina la participación en diferentes procesos relacionados con la transcripción.
5. Los niveles de expresión de los genes de las proteínas SUMO2, PIAS1, PIAS4, SENP5 y SENP7 se reducen en condiciones de OGD y se recuperan tras condiciones de ROGD en células P19. Los niveles de expresión de los genes de las proteínas PIAS2 y PIAS4 aumentan tras tratamiento con CoCl₂ y con el veneno arsenito. Los niveles de expresión del gen *Senp7* se reducen, así mismo, tras tratamiento con DMOG, CoCl₂, OD (*Oxygen Deprivation*), GD (*Glucose Deprivation*), hipertermia, arsenito y sobreexpresión de la proteína HIF1 α .
6. Se produce una disminución en los niveles de apoptosis celular en condiciones de OGD en células P19 tras sobreexpresar las proteínas SUMO2, UBC9, PIAS4, SENP7 o el dominio catalítico de SENP7, mientras que se produce un aumento de los niveles de apoptosis celular al sobreexpresar la proteína SENP3.
7. Se produce un aumento en los niveles de apoptosis celular en condiciones de OGD en células P19 al sobreexpresar mutantes no SUMOilables de las proteínas NAB2, PIAS4 y SOX2 con respecto a la sobreexpresión de sus formas silvestres, mientras que en el caso de la proteína OCT4 se observa el efecto contrario.
8. En condiciones de OGD se produce una degradación de la SUMOproteasa SENP7, cuyos niveles se recuperan tras condiciones de ROGD en células P19. El tratamiento

con enzima caspasa 1 en extractos celulares que expresan SENP7 etiquetada produce una degradación de esta, cuyos tamaños coinciden con los observados en condiciones de OGD.

9. El factor de transcripción OCT4 es deSUMOilado en condiciones de ROGD por la SUMOproteasa SENP7.
10. En el conjunto de los diferentes tipos de cáncer recogidos en la base de datos cBioportal se observa un aumento del número de copias del gen *Senp7* en correlación con una disminución del número de copias del gen *Senp3*. Según los datos recogidos en la base de datos de cáncer Oncomine, los niveles de expresión del gen *Senp7* ascienden en el caso de los tumores melanoma cutáneo, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma, leucemia linfoblástica aguda de células T y carcinoma de mama invasivo, mientras que descienden en el caso del gen *Senp3*. Según los datos recogidos en cBioportal, la supervivencia de pacientes de cáncer colorrectal con niveles elevados de expresión del gen *Senp7* disminuye conforme aumentan los niveles de expresión de dicho gen mientras que para el gen *Senp3* ocurre el efecto contrario.

9 Abreviaturas

Abreviaturas generales

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
(p/v)	Peso por volumen
(v/v)	Volumen por volumen
3D	Tridimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
B	Bases nitrogenadas
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CMV	Citomegalovirus
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagles médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ECL	Luminiscencia química mejorada (<i>Enhanced Chemical Luminescence</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal bovino
GFP	Proteína fluorescente verde
GST	Proteína Glutación S Transferasa
H Cl	Ácido clorhídrico
H2O milli Q	Agua destilada ultrapura
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HRP	Peroxidasa del rábano (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

LB	Luria-Bertani
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NLS	Secuencia de localización Nuclear
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases nitrogenadas
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>)
PPi	Anión pirofosfato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RSV	Virus sincicial respiratorio (<i>Human Respiratory Syncytial Virus</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
shARN	ARN pequeño de horquilla (<i>Small hairpin RNA</i>)
Sig	Significancia
TEMED	Tetrametiletildiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Triton-X100	Éter de glicol de polietileno actilfenilo
U	Unidades de enzima

Unidades:

A	Amperios
°C	Grados centígrados
d	Días
F	Faradio
g	Gramos
x g	Aceleración gravitacional de la Tierra
h	Horas
l	Litros
M	Molaridad (mol/L)
Min	Minutos
OD	Densidad Óptica

pH	Potencial hidrógeno
s	Segundos
V	Voltios

Prefijos

k	Kilo- 10^3
c	Centi- 10^{-2}
m	Mili- 10^{-3}
μ	Micro- 10^{-6}
n	Nano- 10^{-9}

Código de ácidos nucleicos

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo

Código de aminoácidos

A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina

L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

10 Apéndice

El CD que se encuentra adjunto contiene los datos obtenidos del análisis realizado en el espectrómetro de masas realizado para la identificación de las proteínas que presentan cambios en los niveles de SUMOilación en OGD y ROGD en las células P19 cultivadas en estado de proliferación así como neurodiferenciadas, desglosados en las siguientes tablas:

- Tabla A1. Lista de proteínas identificadas en células P19 en estado de proliferación.
- Tabla A2. Lista de proteínas identificadas en células P19 neurodiferenciadas.

11 Bibliografía

- 1 Aguilera, A. (2005) ‘Cotranscriptional mRNP assembly: From the DNA to the nuclear pore’, *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 242–250. doi: 10.1016/j.ceb.2005.03.001.
- 2 Albrow, V. E. *et al.* (2011) ‘Development of small molecule inhibitors and probes of human SUMO deconjugating proteases’, *Chemistry and Biology*, 18(6), pp. 722–732. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.05.008.
- 3 Alegre, K. O. and Reverter, D. (2011) ‘Swapping small ubiquitin-like modifier (SUMO) isoform specificity of SUMO proteases SENP6 and SENP7’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), pp. 36142–36151. doi: 10.1074/jbc.M111.268847.
- 4 Allshire, R. C. and Karpen, G. H. (2008) ‘Epigenetic regulation of centromeric chromatin: Old dogs, new tricks?’, *Nature Reviews Genetics*, pp. 923–937. doi: 10.1038/nrg2466.
- 5 Alonso de Leciñana, M. *et al.* (2014) ‘Guía para el tratamiento del infarto cerebral agudo’, *Neurología*, pp. 102–122. doi: 10.1016/j.nrl.2011.09.012.
- 6 Alshenawy, H. A. S. (2015) ‘Immunohistochemical Panel for Differentiating Renal Cell Carcinoma with Clear and Papillary Features’, *Pathology and Oncology Research*, 21(4), pp. 893–899. doi: 10.1007/s12253-015-9898-7.
- 7 Alzheimer, C. (2012) ‘Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS’. Available at: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=a_DIBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Molecular+and+Cellular+Biology+of+Neuroprotection+in+the+CNS&ots=4g4u9NLMxc&sig=DbdG1GS6V4YSxKRJIUW1YMkQGbQ (Accessed: 29 April 2018).
- 8 Anderson, D. D., Eoms, J. Y. and Stovers, P. J. (2012) ‘Competition between sumoylation and ubiquitination of serine hydroxymethyltransferase 1 determines its nuclear localization and its accumulation in the nucleus’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), pp. 4790–4799. doi: 10.1074/jbc.M111.302174.
- 9 Andrews, E. A. *et al.* (2005) ‘Nse2, a Component of the Smc5-6 Complex, Is a SUMO Ligase Required for the Response to DNA Damage’, *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), pp. 185–196. doi: 10.1128/MCB.25.1.185-196.2005.
- 10 Asara, J. M. *et al.* (2008) ‘A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen’, *Proteomics*, 8(5), pp. 994–999. doi: 10.1002/pmic.200700426.
- 11 Audebert, H. J. *et al.* (2004) ‘Systemic inflammatory response depends on initial stroke severity but is attenuated by successful thrombolysis’, *Stroke*, 35(9), pp. 2128–2133. doi: 10.1161/01.STR.0000137607.61697.77.
- 12 Azuma, Y. *et al.* (2001) ‘Expression and regulation of the mammalian SUMO-1 E1 enzyme’, *Faseb Journal*, 15(8), p. 1825–+. doi: 10.1096/fj.00.
- 13 Azuma, Y. *et al.* (2005) ‘PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes’, *EMBO Journal*, 24(12), pp. 2172–2182. doi: 10.1038/sj.emboj.7600700.
- 14 Azuma, Y., Arnautov, A. and Dasso, M. (2003) ‘SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis’, *Journal of Cell Biology*, 163(3), pp. 477–487. doi: 10.1083/jcb.200304088.
- 15 Babuška, V. *et al.* (2010) ‘Characterization of P19 cells during retinoic acid induced differentiation.’, *Prague medical report*, 111(4), pp. 289–299.

- 16 Baddela, V. S. *et al.* (2014) ‘Suitable housekeeping genes for normalization of transcript abundance analysis by real-time RT-PCR in cultured bovine granulosa cells during hypoxia and differential cell plating density’, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1). doi: 10.1186/1477-7827-12-118.
- 17 Bae, S.-H. *et al.* (2004) ‘Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), pp. 394–400. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.068.
- 18 Bakhshab, S. *et al.* (2014) ‘Reference genes for expression studies in hypoxia and hyperglycemia models in human umbilical vein endothelial cells.’, *G3 (Bethesda, Md.)*, 4(11), pp. 2159–65. doi: 10.1534/g3.114.013102.
- 19 Balzarolo, M. *et al.* (2012) ‘The transcriptional regulator NAB2 reveals a two-step induction of TRAIL in activated plasmacytoid DCs’, *European Journal of Immunology*, 42(11), pp. 3019–3027. doi: 10.1002/eji.201242385.
- 20 Balzarolo, M. *et al.* (2013) ‘NAB2 and EGR-1 exert opposite roles in regulating TRAIL expression in human Natural Killer cells’, *Immunology Letters*, 151(1–2), pp. 61–67. doi: 10.1016/j.imlet.2013.02.001.
- 21 Bannister, A. J. *et al.* (2001) ‘Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain’, *Nature*, 410(6824), pp. 120–124. doi: 10.1038/35065138.
- 22 Barbieri, C. E. *et al.* (2012) ‘Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer’, *Nature Genetics*, 44(6), pp. 685–689. doi: 10.1038/ng.2279.
- 23 Barone, F. C. and Feuerstein, G. Z. (1999) ‘Inflammatory Mediators and Stroke: New Opportunities for Novel Therapeutics’, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(8), pp. 819–834. doi: 10.1097/00004647-199908000-00001.
- 24 Barros-Silva, J. D. *et al.* (2013) ‘Novel 5' Fusion Partners of ETV1 and ETV4 in Prostate Cancer’, *Neoplasia*, 15(7), pp. 720–IN6. doi: 10.1593/neo.13232.
- 25 Bass, A. J. *et al.* (2009) ‘SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas’, *Nature Genetics*, 41(11), pp. 1238–1242. doi: 10.1038/ng.465.
- 26 Bawa-Khalfe, T. *et al.* (2012) ‘Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43), pp. 17466–71. doi: 10.1073/pnas.1209378109.
- 27 Bawa-Khalfe, T. and Yeh, E. T. H. (2010) ‘SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and progression’, *Genes and Cancer*, 1(7), pp. 748–752. doi: 10.1177/1947601910382555.
- 28 Bayer, P. *et al.* (1998) ‘Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1’, *Journal of Molecular Biology*, 280(2), pp. 275–286. doi: 10.1006/jmbi.1998.1839.
- 29 Becker, K. J. (1998) ‘Inflammation and acute stroke.’, *Current opinion in neurology*, 11(1), pp. 45–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9484616>.
- 30 Békés, M. *et al.* (2011) ‘The dynamics and mechanism of SUMO chain deconjugation by SUMO-specific proteases’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), pp. 10238–10247. doi: 10.1074/jbc.M110.205153.
- 31 Bekker-Jensen, S. and Mailand, N. (2011) ‘The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaks’, *FEBS Letters*, pp. 2914–2919. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.056.

- 32 Ben-Porath, I. *et al.* (2008) ‘An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors’, *Nature Genetics*, 40(5), pp. 499–507. doi: 10.1038/ng.127.
- 33 Berger, M. F. *et al.* (2011) ‘The genomic complexity of primary human prostate cancer’, *Nature*, 470(7333), pp. 214–220. doi: 10.1038/nature09744.
- 34 Bernier-Villamor, V. *et al.* (2002) ‘Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1’, *Cell*, 108(3), pp. 345–356. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00630-X.
- 35 Bialik, P. and Woźniak, K. (2017) ‘SUMO proteases as potential targets for cancer therapy’, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 71(0), pp. 0–0. doi: 10.5604/01.3001.0010.6667.
- 36 Boddy, M. N. *et al.* (1996) ‘PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia.’, *Oncogene*, 13(5), pp. 971–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806687>.
- 37 Bohren, K. M. *et al.* (2004) ‘A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus’, *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), pp. 27233–27238. doi: 10.1074/jbc.M402273200.
- 38 Bonaventura, A. *et al.* (2016) ‘Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke’, *mdpi.com*. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/1967/htm> (Accessed: 29 April 2018).
- 39 Bose, R. *et al.* (1998) ‘Ceramide generation by the reaper protein is not blocked by the caspase inhibitor, p35’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), pp. 28852–28859. doi: 10.1074/jbc.273.44.28852.
- 40 Bossis, G. *et al.* (2005) ‘Down-Regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 Dimer Activity by Sumoylation’, *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), pp. 6964–6979. doi: 10.1128/MCB.25.16.6964-6979.2005.
- 41 Boysen, G. and Christensen, H. (2001) ‘Stroke severity determines body temperature in acute stroke’, *Stroke*, 32(2), pp. 413–417. doi: 10.1161/01.STR.32.2.413.
- 42 Bredel, M. *et al.* (2005) ‘Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas’, *Cancer Research*, 65(19), pp. 8679–8689. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1204.
- 43 Brouns, R. and De Deyn, P. P. (2009) ‘The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke’, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, pp. 483–495. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.04.001.
- 44 Bruderer, R. *et al.* (2011) ‘Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates’, *EMBO Reports*, 12(2), pp. 142–148. doi: 10.1038/embor.2010.206.
- 45 Bruick, R. K. and McKnight, S. L. (2001) ‘A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF’, *Science*, 294(5545), pp. 1337–1340. doi: 10.1126/science.1066373.
- 46 Budhiraja, R. *et al.* (2009) ‘Substrates Related to Chromatin and to RNA-Dependent Processes Are Modified by Arabidopsis SUMO Isoforms That Differ in a Conserved Residue with Influence on Desumoylation’, *PLANT PHYSIOLOGY*, 149(3), pp. 1529–1540. doi: 10.1104/pp.108.135053.
- 47 Burroughs, A. M. *et al.* (2007) ‘Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold.’, *Biology direct*, 2, p. 18. doi: 10.1186/1745-6150-2-18.
- 48 Cai, Q. *et al.* (2010) ‘Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification’, *PLoS ONE*, 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009720.

- 49 Cancer, A. J. C. on (2017) *AJCC Cancer Staging Manual*, *AJCC Cancer Staging Manual*. doi: 10.1007-978-3-319-40618-3_73.
- 50 Carbia-Nagashima, A. *et al.* (2007) 'RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1 α during Hypoxia', *Cell*, 131(2), pp. 309–323. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.044.
- 51 Castillo, J. *et al.* (1998) 'Timing for fever-related brain damage in acute ischemic stroke.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 29(12), pp. 2455–2460. doi: 10.1161/01.STR.29.12.2455.
- 52 Castillo, J. and Rodríguez, I. (2004) 'Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: Molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice', in *Cerebrovascular Diseases*, pp. 7–18. doi: 10.1159/000074791.
- 53 Ceballos-Chavez, M. *et al.* (2012) 'Control of neuronal differentiation by sumoylation of BRAF35, a subunit of the LSD1-CoREST histone demethylase complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), pp. 8085–8090. doi: 10.1073/pnas.1121522109.
- 54 Di Cera, E. (2011) 'Progress in Molecular Biology and Translational Science: Preface', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. doi: 10.1016/B978-0-12-385504-6.00008-7.
- 55 Cerami, E. *et al.* (2012) 'The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data', *Cancer Discovery*, 2(5), pp. 401–404. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
- 56 Chan, J. Y. H. *et al.* (2011) 'Sumoylation of hypoxia-inducible factor-1 α ameliorates failure of brain stem cardiovascular regulation in experimental brain death', *PLoS ONE*, 6(3). doi: 10.1371/journal.pone.0017375.
- 57 Chen, J. *et al.* (2017) 'CD59 Regulation by SOX2 Is Required for Epithelial Cancer Stem Cells to Evade Complement Surveillance', *Stem Cell Reports*, 8(1), pp. 140–151. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.11.008.
- 58 Cho, W. C. S. (2010) 'Conquering cancer through discovery research', *IUBMB Life*, pp. 655–659. doi: 10.1002/iub.369.
- 59 Chou, Y. T. *et al.* (2013) 'The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer', *Stem Cells*, 31(12), pp. 2607–2619. doi: 10.1002/stem.1518.
- 60 Chung, C. D. *et al.* (1997) 'Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3', *Science*, pp. 1803–1805. doi: 10.1126/science.278.5344.1803.
- 61 Cimarosti, H. *et al.* (2008) 'Increased protein SUMOylation following focal cerebral ischemia', *Neuropharmacology*, 54(2), pp. 280–289. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.09.010.
- 62 Cimarosti, H. *et al.* (2012) 'Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(1), pp. 17–22. doi: 10.1038/jcbfm.2011.146.
- 63 Collins, S. *et al.* (2006) 'Cutting edge: TCR-induced NAB2 enhances T cell function by coactivating IL-2 transcription', *The Journal of Immunology*, 177(12), pp. 8301–8305. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8301.
- 64 Collins, S. *et al.* (2008) 'Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3', *European Journal of Immunology*, 38(2), pp. 528–536. doi: 10.1002/eji.200737157.
- 65 Cox, J. *et al.* (2014) 'Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ', *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(9), pp. 2513–2526. doi: 10.1074/mcp.M113.031591.

- 66 Datwyler, A. L. *et al.* (2011) 'SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(11), pp. 2152–2159. doi: 10.1038/jcbfm.2011.112.
- 67 DAVID (2016) DAVID, DAVID *Bioinformatics Resources 6.7 National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH.* Available at: <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>.
- 68 Deegan, S. *et al.* (2015) 'A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), pp. 305–311. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.076.
- 69 Defronzo RA (2001) 'Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding', *Endocrinology*. W. B. Saunders Co, pp. 737–775. Available at: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10026154561/en/> (Accessed: 6 May 2018).
- 70 Denner, L. (1999) 'Caspases in apoptotic death', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 8(1), pp. 37–50. doi: 10.1517/13543784.8.1.37.
- 71 Desterro, J. M. P. *et al.* (1999) 'Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1', *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), pp. 10618–10624. doi: 10.1074/jbc.274.15.10618.
- 72 Desterro, J. M. P., Thomson, J. and Hay, R. T. (1997) 'Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin', *FEBS Letters*, 417(3), pp. 297–300. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01305-7.
- 73 Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. and Hay, R. T. (1998) 'SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation.', *Molecular cell*, 2(2), pp. 233–239. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80133-1.
- 74 Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M. a (1999) 'Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. 4441', *Trends in Neurosciences*, 22(9), pp. 391–397. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01401-0.
- 75 Dirnagl, U., Simon, R. P. and Hallenbeck, J. M. (2003) 'Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection', *Trends in Neurosciences*, pp. 248–254. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00071-7.
- 76 Dohmen, R. J. *et al.* (1995) 'An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme', *Journal of Biological Chemistry*, 270(30), pp. 18099–18109. doi: 10.1074/jbc.270.30.18099.
- 77 Doshi, A. H., Bou-haidar, P. and Delman, B. N. (2017) *Youmans Neurological Surgery 7th Edition, Youmans Neurological Surgery.* doi: 10.1016/B978-1-4160-5316-3.00055-1.
- 78 Dot, I. *et al.* (2017) 'Diaphragm Dysfunction in Mechanically Ventilated Patients', *Archivos de bronconeumologia*, pp. 150–156. doi: 10.1016/j.arbres.2016.07.008.
- 79 Droscher, M., Chaugule, V. K. and Pichler, A. (2013) 'SUMO rules: Regulatory concepts and their implication in neurologic functions', *NeuroMolecular Medicine*, pp. 639–660. doi: 10.1007/s12017-013-8258-6.
- 80 Du, C. *et al.* (1996) 'Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(2), pp. 195–201. doi: 10.1097/00008506-199610000-00015.
- 81 Eaton, E. M. and Sealy, L. (2003) 'Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-?? by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3', *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), pp. 33416–33421. doi: 10.1074/jbc.M305680200.
- 82 Eckermann, K. (2013) 'SUMO and parkinson's disease', *NeuroMolecular Medicine*, pp. 737–759. doi: 10.1007/s12017-013-8259-5.

- 83 Elrouby, N. and Coupland, G. (2010) 'Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), pp. 17415–17420. doi: 10.1073/pnas.1005452107.
- 84 Endres, M. *et al.* (1998) 'Attenuation of Delayed Neuronal Death after Mild Focal Ischemia in Mice by Inhibition of the Caspase Family', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18(3), pp. 238–247. doi: 10.1097/00004647-199803000-00002.
- 85 Epstein, A. C. R. *et al.* (2001) 'C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation', *Cell*, 107(1), pp. 43–54. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00507-4.
- 86 Fanis, P. *et al.* (2012) 'Five Friends of Methylated Chromatin Target of Protein-Arginine-Methyltransferase[Prmt]-1 (Chtop), a Complex Linking Arginine Methylation to Desumoylation', *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(11), pp. 1263–1273. doi: 10.1074/mcp.M112.017194.
- 87 Feuk, L., Carson, A. R. and Scherer, S. W. (2006) 'Structural variation in the human genome', *Nature Reviews Genetics*, pp. 85–97. doi: 10.1038/nrg1767.
- 88 Finak, G. *et al.* (2008) 'Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer', *Nature Medicine*, 14(5), pp. 518–527. doi: 10.1038/nm1764.
- 89 Fischer, T. *et al.* (2009) 'Diverse roles of HP1 proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), pp. 8998–9003. doi: 10.1073/pnas.0813063106.
- 90 Fisher, M. *et al.* (2009) 'Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations', *Stroke*, 40(6), pp. 2244–2250. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.541128.
- 91 Flotho, A. and Melchior, F. (2013) 'Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease', *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp. 357–385. doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311.
- 92 Fong, H., Hohenstein, K. A. and Donovan, P. J. (2008) 'Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells', *Stem Cells*, 26(8), pp. 1931–1938. doi: 10.1634/stemcells.2007-1002.
- 93 Fradejas, N. *et al.* (2010) 'Caspase-11 mediates ischemia-induced astrocyte death: Involvement of endoplasmic reticulum stress and C/EBP homologous protein', *Journal of Neuroscience Research*, 88(5), pp. 1094–1105. doi: 10.1002/jnr.22280.
- 94 Furlan, M. *et al.* (1996) 'Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra', *Annals of Neurology*, 40(2), pp. 216–226. doi: 10.1002/ana.410400213.
- 95 Le Gallo, M. *et al.* (2012) 'Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes', *Nature Genetics*, 44(12), pp. 1310–1315. doi: 10.1038/ng.2455.
- 96 Gangemi, R. M. R. *et al.* (2009) 'SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity', *Stem Cells*, 27(1), pp. 40–48. doi: 10.1634/stemcells.2008-0493.
- 97 Gao, J. *et al.* (2013) 'Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal', *Science Signaling*, 6(269). doi: 10.1126/scisignal.2004088.
- 98 García-Gutiérrez, P. *et al.* (2011) 'The transcription factor Krox20 is an E3 ligase that sumoylates its Nab coregulators', *EMBO Reports*, 12(10), pp. 1018–1023. doi: 10.1038/embor.2011.152.

- 99 Garcia-Dominguez, M., March-Diaz, R. and Reyes, J. C. (2008) 'The PHD domain of plant PIAS proteins mediates sumoylation of bromodomain GTE proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), pp. 21469–21477. doi: 10.1074/jbc.M708176200.
- 100 Garcia-Dominguez, M. and Reyes, J. C. (2009) 'SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, pp. 451–459. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.07.001.
- 101 Garcia, J. H. *et al.* (1994) 'Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat).', *The American Journal of Pathology*, 144(1), pp. 188–99.
- 102 Garvin, A. J. *et al.* (2013) 'The deSUMOylase SENP7 promotes chromatin relaxation for homologous recombination DNA repair', *EMBO Reports*, 14(11), pp. 975–983. doi: 10.1038/embor.2013.141.
- 103 Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. (2007) 'Concepts in sumoylation: A decade on', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 947–956. doi: 10.1038/nrm2293.
- 104 Gelmetti, V. *et al.* (1998) 'Aberrant Recruitment of the Nuclear Receptor Corepressor-Histone Deacetylase Complex by the Acute Myeloid Leukemia Fusion Partner ETO', *Molecular and Cellular Biology*, 18(12), pp. 7185–7191. doi: 10.1128/MCB.18.12.7185.
- 105 Geurts, M. *et al.* (2016) 'Temporal profile of body temperature in acute ischemic stroke: Relation to infarct size and outcome', *BMC Neurology*, 16(1). doi: 10.1186/s12883-016-0760-7.
- 106 Ghosh, H. *et al.* (2016) 'Several posttranslational modifications act in concert to regulate gephyrin scaffolding and GABAergic transmission', *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms13365.
- 107 Gocke, C. B., Yu, H. and Kang, J. (2005) 'Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates', *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), pp. 5004–5012. doi: 10.1074/jbc.M411718200.
- 108 Gong, L. and Yeh, E. T. H. (2006) 'Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3', *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp. 15869–15877. doi: 10.1074/jbc.M511658200.
- 109 González-Prieto, R. *et al.* (2015) 'c-Myc is targeted to the proteasome for degradation in a SUMOylation-dependent manner, regulated by PIAS1, SENP7 and RNF4', *Cell Cycle*, 14(12), pp. 1859–1872. doi: 10.1080/15384101.2015.1040965.
- 110 Graham, F. L. *et al.* (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.', *The Journal of general virology*, 36(1), pp. 59–74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- 111 Green, M. R. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th edition (June 15, 2012). Available at: <http://www.amazon.com/Molecular-Cloning-Laboratory-Edition-Three/dp/1936113422>.
- 112 Grégoire, S. and Yang, X.-J. (2005) 'Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors.', *Molecular and Cellular Biology*, 25(6), pp. 2273–2287. doi: 10.1128/MCB.25.6.2273-2287.2005.
- 113 Gu, J. *et al.* (2014) 'SENP1 protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via a HIF1 α -dependent pathway', *Cardiovascular Research*, 104(1), pp. 83–92. doi: 10.1093/cvr/cvu177.
- 114 Guo, C. *et al.* (2013) 'SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia', *The EMBO Journal*, 32(11), pp. 1514–1528. doi: 10.1038/emboj.2013.65.

- 115 Guo, D. *et al.* (2004) 'A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes.', *Nature genetics*, 36, pp. 837–41. doi: 10.1038/ng1391.
- 116 Guo, Z. K. *et al.* (2009) '[Construction and expression of vector encoding Sox2 with mutated SUMO acceptor site]', *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 25(11), pp. 967–969. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19900357.
- 117 Güre, a O. *et al.* (2000) 'Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 97(8), pp. 4198–4203. doi: 10.1073/pnas.97.8.4198.
- 118 Habara-Ohkubo, a (1996) 'Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells.', *Cell structure and function*, 21(2), pp. 101–110. doi: 10.1247/csf.21.101.
- 119 Haferlach, T. *et al.* (2010) 'Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: Report from the international microarray innovations in leukemia study group', *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), pp. 2529–2537. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4732.
- 120 van Hagen, M. *et al.* (2009) 'RNF4 and VHL regulate the proteasomal degradation of SUMO-conjugated Hypoxia-Inducible Factor-2 α ', *Nucleic Acids Research*, 38(6), pp. 1922–1931. doi: 10.1093/nar/gkp1157.
- 121 Hammer, E., Heilbronn, R. and Weger, S. (2007) 'The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA topoisomerase I in vitro and in vivo', *FEBS Letters*, 581(28), pp. 5418–5424. doi: 10.1016/j.febslet.2007.10.040.
- 122 Han, B. H. *et al.* (2002) 'Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury.', *The Journal of biological chemistry*, 277(33), pp. 30128–30136. doi: 10.1074/jbc.M202931200.
- 123 Han, Z. J. *et al.* (2018) 'The post-Translational modification, SUMOylation, and cancer (Review)', *International Journal of Oncology*, pp. 1081–1094. doi: 10.3892/ijo.2018.4280.
- 124 Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 125 Hara, H. *et al.* (1997) 'Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17(4), pp. 370–5. doi: 10.1097/00004647-199704000-00002.
- 126 Hara, H. *et al.* (1997) 'Inhibition of interleukin 1 converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5), pp. 2007–2012. doi: 10.1073/pnas.94.5.2007.
- 127 Hay, R. T. (2005) 'SUMO: A history of modification', *Molecular Cell*, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.012.
- 128 Hecker, C. M. *et al.* (2006) 'Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs', *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp. 16117–16127. doi: 10.1074/jbc.M512757200.
- 129 Hediger, F. and Gasser, S. M. (2006) 'Heterochromatin protein 1: Don't judge the book by its cover!', *Current Opinion in Genetics and Development*, pp. 143–150. doi: 10.1016/j.gde.2006.02.013.

- 130 Heiss, W. D. *et al.* (1999) ‘Which targets are relevant for therapy of acute ischemic stroke?’, *Stroke*, 30(7), pp. 1486–9. doi: 10.1161/01.str.26.2.254.
- 131 Hendriks, I. A. *et al.* (2014) ‘Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner’, *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(10), pp. 927–936. doi: 10.1038/nsmb.2890.
- 132 Hendriks, I. A. *et al.* (2015) ‘System-wide identification of wild-type SUMO-2 conjugation sites’, *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms8289.
- 133 Hendriks, I. A. and Vertegaal, A. C. O. (2016) ‘Label-free identification and quantification of SUMO target proteins’, in *Methods in Molecular Biology*, pp. 171–193. doi: 10.1007/978-1-4939-6358-4_13.
- 134 Hernández, M. J. and Herrera, C. L. (2015) ‘Ictus: proceso asistencial integrado’. Available at: <https://www.repositoriosalud.es/handle/10668/1913> (Accessed: 5 May 2018).
- 135 Herr, W. and Cleary, M. A. (1995) ‘The POU domain: Versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain’, *Genes and Development*, pp. 1679–1693. doi: 10.1101/gad.9.14.1679.
- 136 Den Hertog, H. M. *et al.* (2011) ‘An early rise in body temperature is related to unfavorable outcome after stroke: Data from the PAIS study’, *Journal of Neurology*, 258(2), pp. 302–307. doi: 10.1007/s00415-010-5756-4.
- 137 Hickey, C. M., Wilson, N. R. and Hochstrasser, M. (2012) ‘Function and regulation of SUMO proteases’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 755–766. doi: 10.1038/nrm3478.
- 138 Hietakangas, V. *et al.* (2006) ‘PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), pp. 45–50. doi: 10.1073/pnas.0503698102.
- 139 Hiragami, K. and Festenstein, R. (2005) ‘Heterochromatin protein 1: A pervasive controlling influence’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 2711–2726. doi: 10.1007/s00018-005-5287-9.
- 140 Hochstrasser, M. (2009) ‘Origin and function of ubiquitin-like proteins’, *Nature*, pp. 422–429. doi: 10.1038/nature07958.
- 141 Huang, L. E. *et al.* (1996) ‘Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit’, *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), pp. 32253–32259. doi: 10.1074/jbc.271.50.32253.
- 142 Hussenet, T. *et al.* (2010) ‘SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas’, *PLoS ONE*, 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008960.
- 143 Idicula, T. T. *et al.* (2008) ‘The Effect of Physiologic Derangement in Patients with Stroke Treated with Thrombolysis’, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 17(3), pp. 141–146. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.01.010.
- 144 Ihara, M., Yamamoto, H. and Kikuchi, A. (2005) ‘SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4.’, *Molecular and cellular biology*, 25(9), pp. 3506–3518. doi: 10.1128/MCB.25.9.3506-3518.2005.
- 145 Ishida, S. *et al.* (1998) ‘The genomic breakpoint and chimeric transcripts in the EWSR1-ETV4/E1AF gene fusion in Ewing sarcoma.’, *Cytogenetics and cell genetics*, 82(3–4), pp. 278–83. doi: ccg82278 [pii].
- 146 Ivan, M. *et al.* (2001) ‘HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing’, *Science*, 292(5516), pp. 464–468. doi: 10.1126/science.1059817.

- 147 Ivanov, A. V. *et al.* (2007) 'PHD Domain-Mediated E3 Ligase Activity Directs
Intramolecular Sumoylation of an Adjacent Bromodomain Required for Gene
Silencing', *Molecular Cell*, 28(5), pp. 823–837. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.012.
- 148 Ja Lee, Y. *et al.* (2009) 'SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance',
Journal of Neurochemistry, 109(1), pp. 257–267. doi: 10.1111/j.1471-
4159.2009.05957.x.
- 149 Jaakkola, P. *et al.* (2001) 'Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau
Ubiquitylation Complex by O2-Regulated Prolyl Hydroxylation', *Science*, 292(5516),
pp. 468–472. doi: 10.1126/science.1059796.
- 150 Jacobs, S. A. and Khorasanizadeh, S. (2002) 'Structure of HP1 chromodomain bound
to a lysine 9-methylated histone H3 tail', *Science*, 295(5562), pp. 2080–2083. doi:
10.1126/science.1069473.
- 151 Jensen, O. N. (2006) 'Interpreting the protein language using proteomics', *Nature
Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 391–403. doi: 10.1038/nrm1939.
- 152 Jia, X. *et al.* (2011) 'SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic
property of human prostate cancer cell', *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(4), pp.
230–238. doi: 10.1093/jmcb/mjr002.
- 153 Johnson, B. V., Rathjen, J. and Rathjen, P. D. (2006) 'Transcriptional control of
pluripotency: decisions in early development', *Current Opinion in Genetics and
Development*, pp. 447–454. doi: 10.1016/j.gde.2006.08.012.
- 154 Johnson, E. S. *et al.* (1997) 'The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for
conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer', *EMBO Journal*,
16(18), pp. 5509–5519. doi: 10.1093/emboj/16.18.5509.
- 155 Johnson, E. S. (2004) 'Protein Modification by SUMO', *Annual Review of
Biochemistry*, 73(1), pp. 355–382. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074118.
- 156 Johnson, E. S. and Blobel, G. (1997) 'Ubc9p is the conjugating enzyme for the
ubiquitin-like protein Smt3p', *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), pp. 26799–
26802. doi: 10.1074/jbc.272.43.26799.
- 157 Jones-Villeneuve, E. M. *et al.* (1983) 'Retinoic acid-induced neural differentiation of
embryonal carcinoma cells.', *Molecular and Cellular Biology*, 3(12), pp. 2271–2279.
doi: 10.1128/MCB.3.12.2271.
- 158 Jones, D. O., Cowell, I. G. and Singh, P. B. (2000) 'Mammalian chromodomain
proteins: Their role in genome organisation and expression', *BioEssays*, pp. 124–137.
doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<124::AID-BIES4>3.0.CO;2-E.
- 159 Jones, N. M. and Bergeron, M. (2001) 'Hypoxic preconditioning induces changes in
HIF-1 target genes in neonatal rat brain.', *Journal of cerebral blood flow and
metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and
Metabolism*, 21, pp. 1105–1114. doi: 10.1097/00004647-200109000-00008.
- 160 Juarez-Vicente, F., Luna-Pelaez, N. and Garcia-Dominguez, M. (2016) 'The Sumo
protease Senp7 is required for proper neuronal differentiation', *Biochimica et
Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(7), pp. 1490–1498. doi:
10.1016/j.bbamcr.2016.03.028.
- 161 Junior, N. *et al.* (2014) 'Pathophysiology of Cerebral Ischemia', *Global Journal of
Animal Scientific Research*, 2(1), pp. 64–71. Available at:
<http://www.gjasr.com/index.php/GJASR/article/view/24> (Accessed: 29 April 2018).
- 162 Jürgen Dohmen, R. (2004) 'SUMO protein modification', *Biochimica et Biophysica
Acta - Molecular Cell Research*, pp. 113–131. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.021.
- 163 Kagey, M. H., Melhuish, T. A. and Wotton, D. (2003) 'The polycomb protein Pc2 is a
SUMO E3', *Cell*, 113(1), pp. 127–137. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00159-4.

- 164 Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001) 'Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53', *Molecular Cell*, 8(3), pp. 713–718. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00349-5.
- 165 Kaikkonen, S. *et al.* (2009) 'SUMO-Specific Protease 1 (SEN1) Reverses the Hormone-Augmented SUMOylation of Androgen Receptor and Modulates Gene Responses in Prostate Cancer Cells', *Molecular Endocrinology*, 23(3), pp. 292–307. doi: 10.1210/me.2008-0219.
- 166 Kamachi, Y., Uchikawa, M. and Kondoh, H. (2000) 'Pairing SOX off: With partners in the regulation of embryonic development', *Trends in Genetics*, pp. 182–187. doi: 10.1016/S0168-9525(99)01955-1.
- 167 Kamitani, T., Kito, K., *et al.* (1998) 'Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), pp. 11349–11353. doi: 10.1074/jbc.273.18.11349.
- 168 Kamitani, T., Nguyen, H. P., *et al.* (1998) 'Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), pp. 3117–3120. doi: 10.1074/jbc.273.6.3117.
- 169 Kamitani, T., Nguyen, H. P. and Yeh, E. T. H. (1997) 'Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule', *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), pp. 14001–14004. doi: 10.1074/jbc.272.22.14001.
- 170 Karami, S. *et al.* (2017) 'Novel SUMO-Protease SENP7S Regulates β -catenin Signaling and Mammary Epithelial Cell Transformation', *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/srep46477.
- 171 Kashyap, A. K. *et al.* (2005) 'Biochemical and genetic characterization of Yra1p in budding yeast', *Yeast*, 22(1), pp. 43–56. doi: 10.1002/yea.1185.
- 172 Keene, J. D. (2007) 'RNA regulons: Coordination of post-transcriptional events', *Nature Reviews Genetics*, pp. 533–543. doi: 10.1038/nrg2111.
- 173 Kerscher, O. (2007) 'SUMO junction—what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs', *EMBO reports*, 8(6), pp. 550–555. doi: 10.1038/sj.embor.7400980.
- 174 Kim, J. H. and Baek, S. H. (2009) 'Emerging roles of desumoylating enzymes', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, pp. 155–162. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.12.008.
- 175 Kolli, N. *et al.* (2010) 'Distribution and paralogue specificity of mammalian deSUMOylating enzymes', *Biochemical Journal*, 430(2), pp. 335–344. doi: 10.1042/BJ20100504.
- 176 Kotaja, N. *et al.* (2002) 'PIAS Proteins Modulate Transcription Factors by Functioning as SUMO-1 Ligases', *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), pp. 5222–5234. doi: 10.1128/MCB.22.14.5222-5234.2002.
- 177 Kumar, A. and Zhang, K. Y. J. (2013) 'Computational Investigation of SENP:SUMO Protein-Protein Interaction for Structure Based Drug Design', *Molecular Informatics*, 32(3), pp. 267–280. doi: 10.1002/minf.201200124.
- 178 Lachner, M. *et al.* (2001) 'Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins', *Nature*, 410(6824), pp. 116–120. doi: 10.1038/35065132.
- 179 Lapenta, V. *et al.* (1997) 'SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family', *Genomics*, 40(2), pp. 362–366. doi: 10.1006/geno.1996.4556.
- 180 Laplante, I., Béliveau, R. and Paquin, J. (2004) 'RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells', *Journal of Neurobiology*, 60(3), pp. 289–307. doi: 10.1002/neu.20036.

- 181 Laslo, P. *et al.* (2006) ‘Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates’, *Cell*, 126(4), pp. 755–766. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.052.
- 182 Le, D. A. *et al.* (2002) ‘Caspase activation and neuroprotection in caspase-3- deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation’, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), pp. 15188–15193. doi: 10.1073/pnas.232473399 [doi]\r232473399 [pii].
- 183 Lechner, M. S. *et al.* (2005) ‘The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), pp. 929–937. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.04.016.
- 184 Lee, L. *et al.* (2013) ‘SUMO and alzheimer’s disease’, *NeuroMolecular Medicine*, pp. 720–736. doi: 10.1007/s12017-013-8257-7.
- 185 Lee, Y. J. *et al.* (2007) ‘Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells’, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(5), pp. 950–962. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600395.
- 186 Lee, Y. J. *et al.* (2016) ‘Global SUMOylation facilitates the multimodal neuroprotection afforded by quercetin against the deleterious effects of oxygen/glucose deprivation and the restoration of oxygen/glucose’, *Journal of Neurochemistry*, pp. 101–116. doi: 10.1111/jnc.13643.
- 187 Lee, Y. ja *et al.* (2011) ‘Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage’, *PLoS ONE*, 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0025852.
- 188 Leira, R. *et al.* (2006) ‘Hyperthermia is a surrogate marker of inflammation-mediated cause of brain damage in acute ischaemic stroke’, *J Intern Med*, 260(4), pp. 343–349. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01694.x.
- 189 Li, D. *et al.* (2014) ‘Sox2 is involved in paclitaxel resistance of the prostate cancer cell line PC-3 via the PI3K/Akt pathway’, *Molecular Medicine Reports*, 10(6), pp. 3169–3176. doi: 10.3892/mmr.2014.2630.
- 190 Li, G. *et al.* (2017) ‘Hypothermia exerts early neuroprotective effects involving protein conjugation of SUMO-2/3 in a rat model of middle cerebral artery occlusion’, *spandidos-publications.com*. Available at: <https://www.spandidos-publications.com/mmr/16/3/3217?text=fulltext> (Accessed: 8 May 2018).
- 191 Li, S. J. and Hochstrasser, M. (1999) ‘A new protease required for cell-cycle progression in yeast’, *Nature*, 398(6724), pp. 246–251. doi: 10.1038/18457.
- 192 Liang, Y. C. *et al.* (2016) ‘SUMO5, a novel poly-SUMO isoform, regulates PML nuclear bodies’, *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep26509.
- 193 Lima, C. D. and Reverter, D. (2008) ‘Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7’, *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), pp. 32045–32055. doi: 10.1074/jbc.M805655200.
- 194 Lin, X. *et al.* (2003) ‘Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding’, *Molecular Cell*, 11(5), pp. 1389–1396. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00175-8.
- 195 Linnik, M. D., Zobrist, R. H. and Hatfield, M. D. (1993) ‘Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats.’, *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 24(12), pp. 2002–2008; discussion 2008–2009. doi: 10.1161/01.STR.24.12.2002.

- 196 Liu, B. *et al.* (1998) 'Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), pp. 10626–10631. doi: 10.1073/pnas.95.18.10626.
- 197 Liu, K. *et al.* (2013) 'The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis', *Cellular Signalling*, pp. 1264–1271. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.02.013.
- 198 Liu, T. *et al.* (1993) 'Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex', *Stroke*, 24(11), pp. 1746–50; discussion 1750–1. doi: 10.1161/01.STR.24.11.1746.
- 199 Loddick, S. A., MacKenzie, A. and Rothwell, N. J. (1996) 'An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat', *NeuroReport*, 7(9), pp. 1465–1468. doi: 10.1097/00001756-199606170-00004.
- 200 Loftus, L. T. *et al.* (2009) 'Sumo-2/3-ylation following in vitro modeled ischemia is reduced in delayed ischemic tolerance', *Brain Research*, 1272, pp. 71–80. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.034.
- 201 Long, J., Zuo, D. and Park, M. (2005) 'Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin', *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), pp. 35477–35489. doi: 10.1074/jbc.M504477200.
- 202 Loyola, A. *et al.* (2009) 'The HP1 α -CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin', *EMBO Reports*, 10(7), pp. 769–775. doi: 10.1038/embor.2009.90.
- 203 Lucerna, M. *et al.* (2003) 'NAB2, a corepressor of EGR-1, inhibits vascular endothelial growth factor-mediated gene induction and angiogenic responses of endothelial cells', *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp. 11433–11440. doi: 10.1074/jbc.M204937200.
- 204 Luengo-Fernandez, R. *et al.* (2013) 'Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the oxford vascular study', *Stroke*, 44(10), pp. 2854–2861. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001584.
- 205 Luo, J. *et al.* (2013) 'Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO', *NeuroMolecular Medicine*, pp. 692–706. doi: 10.1007/s12017-013-8253-y.
- 206 Ma, J., Endres, M. and Moskowitz, M. A. (1998) 'Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischaemia in mice', *British Journal of Pharmacology*, 124(4), pp. 756–762. doi: 10.1038/sj.bjp.0701871.
- 207 MacManus, J. P. and Linnik, M. D. (1997) 'Gene Expression Induced by Cerebral Ischemia: An Apoptotic Perspective', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 17(8), pp. 815–832. doi: 10.1038/aj.jcbfm.9590266.
- 208 Madu, I. G. *et al.* (2013) 'Identification and characterization of a new chemotype of noncovalent SENP inhibitors', *ACS Chemical Biology*, 8(7), pp. 1435–1441. doi: 10.1021/cb400177q.
- 209 Maison, C. *et al.* (2011) 'SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 \pm to pericentric heterochromatin', *Nature Genetics*, 43(3), pp. 220–227. doi: 10.1038/ng.765.
- 210 Maison, C. *et al.* (2012) 'The SUMO protease SENP7 is a critical component to ensure HP1 enrichment at pericentric heterochromatin', *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(4), pp. 458–460. doi: 10.1038/nsmb.2244.
- 211 Maison, C. and Almouzni, G. (2004) 'HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 296–304. doi: 10.1038/nrm1355.

- 212 Malagelada, C. *et al.* (2005) ‘Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell
death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures’, *Neurobiology of*
Disease, 20(1), pp. 27–37. doi: 10.1016/j.nbd.2005.01.028.
- 213 Martin, S. *et al.* (2007) ‘Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in
neuronal function and dysfunction’, *Nature Reviews Neuroscience*, pp. 948–959. doi:
10.1038/nrn2276.
- 214 Martins, A. H. B. *et al.* (2005) ‘Neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma
cells modulates kinin B2 receptor gene expression and function.’, *The Journal of*
biological chemistry, 280(20), pp. 19576–19586. doi: 10.1074/jbc.M502513200.
- 215 Masui, S. *et al.* (2007) ‘Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4
expression in mouse embryonic stem cells’, *Nature Cell Biology*, 9(6), pp. 625–635.
doi: 10.1038/ncb1589.
- 216 Matera, A. G. and Wang, Z. (2014) ‘A day in the life of the spliceosome’, *Nature*
Reviews Molecular Cell Biology, pp. 108–121. doi: 10.1038/nrm3742.
- 217 Matic, I. *et al.* (2010) ‘Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals
an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif’,
Molecular Cell, 39(4), pp. 641–652. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.026.
- 218 Matsuzaki, S. *et al.* (2015) ‘SUMO1 affects synaptic function, spine density and
memory’, *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/srep10730.
- 219 Matunis, M. J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) ‘A novel ubiquitin-like modification
modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between
the cytosol and the nuclear pore complex’, *Journal of Cell Biology*, 135(6), pp. 1457–
1470. doi: 10.1083/jcb.135.6.1457.
- 220 Maxwell, P. H. *et al.* (1999) ‘The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-
inducible factors for oxygen-dependent proteolysis’, *Nature*, 399(6733), pp. 271–275.
doi: 10.1038/20459.
- 221 McBurney, M. W. and Rogers, B. J. (1982) ‘Isolation of male embryonal carcinoma
cells and their chromosome replication patterns’, *Developmental Biology*, 89(2), pp.
503–508. doi: 10.1016/0012-1606(82)90338-4.
- 222 Melchior, F. (2000) ‘SUMO - Nonclassical Ubiquitin.’, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16,
pp. 591–626. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.591.
- 223 Mikolajczyk, J. *et al.* (2007) ‘Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)-specific
Proteases PROFILING THE SPECIFICITIES AND ACTIVITIES OF HUMAN
SENPs’, *ASBMB*. Available at: <http://www.jbc.org/content/282/36/26217.short>
(Accessed: 29 April 2018).
- 224 Millán, M. *et al.* (2008) ‘Body temperature and response to thrombolytic therapy in
acute ischaemic stroke’, *European Journal of Neurology*, 15(12), pp. 1384–1389. doi:
10.1111/j.1468-1331.2008.02321.x.
- 225 Mirecka, A., Morawiec, Z. and Wozniak, K. (2016) ‘Genetic Polymorphism of SUMO-
Specific Cysteine Proteases – SENP1 and SENP2 in Breast Cancer’, *Pathology and*
Oncology Research, 22(4), pp. 817–823. doi: 10.1007/s12253-016-0064-7.
- 226 Mossessova, E. and Lima, C. D. (2000) ‘Ulp1-SUMO crystal structure and genetic
analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth
in yeast’, *Molecular Cell*, 5(5), pp. 865–876. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80326-3.
- 227 Motamedi, M. R. *et al.* (2008) ‘HP1 Proteins Form Distinct Complexes and Mediate
Heterochromatic Gene Silencing by Nonoverlapping Mechanisms’, *Molecular Cell*,
32(6), pp. 778–790. doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.026.
- 228 Murphy, M. *et al.* (2016) ‘TCF7L1 Modulates Colorectal Cancer Growth by Inhibiting
Expression of the Tumor-Suppressor Gene EPHB3’, *Scientific Reports*, 6. doi:
10.1038/srep28299.

- 229 Nacerddine, K. *et al.* (2005) 'The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice', *Developmental Cell*, 9(6), pp. 769–779. doi: 10.1016/j.devcel.2005.10.007.
- 230 Nagai, S. *et al.* (2008) 'Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase', *Science*, 322(5901), pp. 597–602. doi: 10.1126/science.1162790.
- 231 Nakayama, J. *et al.* (2001) 'Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly', *Science (New York, NY)*, 292(5514), pp. 110–113. doi: 10.1126/science.1060118.
- 232 Namura, S. *et al.* (1998) 'Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(10), pp. 3659–68. doi: 10.1523/jneurosci.4246-09.2009.
- 233 Nayak, A. and Müller, S. (2014) 'SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond', *Genome Biology*, 15(7), p. 422. doi: 10.1186/s13059-014-0422-2.
- 234 Nichols, J. *et al.* (1998) 'Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4', *Cell*, 95(3), pp. 379–391. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81769-9.
- 235 Nozawa, R. S. *et al.* (2010) 'Human POGZ modulates dissociation of HP1 α from mitotic chromosome arms through Aurora B activation', *Nature Cell Biology*, 12(7), pp. 719–727. doi: 10.1038/ncb2075.
- 236 Oeffinger, M. and Zenklusen, D. (2012) 'To the pore and through the pore: A story of mRNA export kinetics', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, pp. 494–506. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.02.011.
- 237 Okamoto, K. *et al.* (1990) 'A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells', *Cell*, 60(3), pp. 461–472. doi: 10.1016/0092-8674(90)90597-8.
- 238 Okuma, T. *et al.* (1999) 'In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(3), pp. 693–698. doi: 10.1006/bbrc.1998.9995.
- 239 Okumura-Nakanishi, S. *et al.* (2005) 'Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells', *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), pp. 5307–5317. doi: 10.1074/jbc.M410015200.
- 240 Okura, T. *et al.* (1996) 'Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(10), pp. 4277–4281.
- 241 Olsen, S. K. *et al.* (2010) 'Active site remodelling accompanies thioester bond formation in the SUMO E1', *Nature*, 463(7283), pp. 906–912. doi: 10.1038/nature08765.
- 242 Ong, S.-E. *et al.* (2002) 'Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics', *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5), pp. 376–386. doi: 10.1074/mcp.M200025-MCP200.
- 243 Pachernik, J. *et al.* (2005) 'Retinoic acid-induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells is potentiated by leukemia inhibitory factor', *Physiol Res*, 54(2), pp. 257–262. doi: 705 [pii].
- 244 Palancade, B. and Doye, V. (2008) 'Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties?', *Trends in Cell Biology*, pp. 174–183. doi: 10.1016/j.tcb.2008.02.001.
- 245 Palmieri, S. L. *et al.* (1994) 'Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages

- involved in implantation', *Developmental Biology*, 166(1), pp. 259–267. doi: 10.1006/dbio.1994.1312.
- 246 Palvimo, J. J. (2007) 'PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription.', *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 6), pp. 1405–8. doi: 10.1042/BST0351405.
- 247 Paquin, J. *et al.* (2002) 'Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), pp. 9550–5. doi: 10.1073/pnas.152302499.
- 248 Peters, M., Wielsch, B. and Boltze, J. (2017) 'The role of SUMOylation in cerebral hypoxia and ischemia', *Neurochemistry International*, pp. 66–77. doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.011.
- 249 Pevny, L. H. and Lovell-Badge, R. (1997) 'Sox genes find their feet', *Current Opinion in Genetics and Development*, pp. 338–344. doi: 10.1016/S0959-437X(97)80147-5.
- 250 Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), p. 45e–45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- 251 Picard, N. *et al.* (2012) 'Identification of Estrogen Receptor as a SUMO-1 Target Reveals a Novel Phosphorylated Sumoylation Motif and Regulation by Glycogen Synthase Kinase 3', *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), pp. 2709–2721. doi: 10.1128/MCB.06624-11.
- 252 Pinto, M. P. *et al.* (2012) 'Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(10), pp. 1958–1966. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.07.010.
- 253 Pitti, R. M. *et al.* (1996) 'Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family', *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), pp. 12687–12690. doi: 10.1074/jbc.271.22.12687.
- 254 Potts, P. R. and Yu, H. (2005) 'Human MMS21/NSE2 Is a SUMO Ligase Required for DNA Repair', *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), pp. 7021–7032. doi: 10.1128/MCB.25.16.7021-7032.2005.
- 255 Pozzi, B. *et al.* (2017) 'SUMO conjugation to spliceosomal proteins is required for efficient pre-mRNA splicing', *Nucleic Acids Research*, 45(11), pp. 6729–6745. doi: 10.1093/nar/gkx213.
- 256 Probst, A. V., Dunleavy, E. and Almouzni, G. (2009) 'Epigenetic inheritance during the cell cycle', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 192–206. doi: 10.1038/nrm2640.
- 257 Pyle, S. J., Roberts, K. G. and Reuhl, K. R. (2001) 'Delayed expression of the NFH subunit in differentiating P19 cells', *Developmental Brain Research*, 132(1), pp. 103–106. doi: 10.1016/S0165-3806(01)00289-9.
- 258 Rabuffetti, M. *et al.* (2000) 'Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines', *J Neurosci*, 20(12), pp. 4398–4404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844008> <http://www.jneurosci.org/content/20/12/4398.full.pdf>.
- 259 Rao, G. *et al.* (2013) 'Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs', *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), pp. 793–804. doi: 10.1038/aps.2013.56.
- 260 Rappsilber, J. *et al.* (2003) 'Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome', *Genome Research*, pp. 1231–1245. doi: 10.1101/gr.473902.

- 261 Reith, J. *et al.* (1996) 'Body temperature in acute stroke: Relation to stroke severity, infarct size, mortality, and outcome', *Lancet*, 347(8999), pp. 422–425. doi: 10.1016/S0140-6736(96)90008-2.
- 262 Reverter, D. and Lima, C. D. (2004) 'A basis for SUMO protease specificity provided by analysis of human Senp2 and a Senp2-SUMO complex', *Structure*, 12(8), pp. 1519–1531. doi: 10.1016/j.str.2004.05.023.
- 263 Reverter, D. and Lima, C. D. (2006) 'Structural basis for SENP2 protease interactions with SUMO precursors and conjugated substrates', *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(12), pp. 1060–1068. doi: 10.1038/nsmb1168.
- 264 Rhodes, D. R. *et al.* (2004) 'ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining Platform', *Neoplasia*, 6(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/S1476-5586(04)80047-2.
- 265 Rhodes, D. R. *et al.* (2007) 'Oncomine 3.0: Genes, Pathways, and Networks in a Collection of 18,000 Cancer Gene Expression Profiles', *Neoplasia*, 9(2), pp. 166–180. doi: 10.1593/neo.07112.
- 266 Rodda, D. J. *et al.* (2005) 'Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2', *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), pp. 24731–24737. doi: 10.1074/jbc.M502573200.
- 267 Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Hay, R. T. (2001) 'SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting', *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp. 12654–12659. doi: 10.1074/jbc.M009476200.
- 268 Roger, V. *et al.* (2011) 'Heart Disease and Stroke Statistics-2011 Update.', *American Heart Association, Circulation*(123), pp. 18–209.
- 269 Romeo, K. *et al.* (2015) 'The SENP7 SUMO-Protease presents a module of two HP1 interaction motifs that locks HP1 protein at pericentric heterochromatin', *Cell Reports*, 10(5), pp. 771–782. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.004.
- 270 Rosas-Acosta, G. *et al.* (2005) 'A Universal Strategy for Proteomic Studies of SUMO and Other Ubiquitin-like Modifiers', *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(1), pp. 56–72. doi: 10.1074/mcp.M400149-MCP200.
- 271 Rosenberg, G. A. *et al.* (1996) 'Proteolytic Cascade Enzymes Increase in Focal Cerebral Ischemia in Rat', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(3), pp. 360–366. doi: 10.1097/00004647-199605000-00002.
- 272 Rosner, M. H. *et al.* (1990) 'A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo.', *Nature*, 345(6277), pp. 686–692. doi: 10.1038/345686a0.
- 273 Rothwell, N. J. and Relton, J. K. (1993) 'Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischaemic brain damage', *Cerebrovascular & Brain Metabolism Reviews.*, 5(3), pp. 178–198.
- 274 Rouvière, J. O., Geoffroy, M. C. and Palancade, B. (2013) 'Multiple crosstalks between mRNA biogenesis and SUMO', *Chromosoma*, pp. 387–399. doi: 10.1007/s00412-013-0408-y.
- 275 Rubió (2014) 'Estudios farmacológicos y clínicos post-ictus con NurAiDTM II MLC601/901', *Dossier científico*.
- 276 Sachdev, S. *et al.* (2001) 'PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies', *Genes and Development*, 15(23), pp. 3088–3103. doi: 10.1101/gad.944801.
- 277 Saigusa, S. *et al.* (2009) 'Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy', *Annals of Surgical Oncology*, 16(12), pp. 3488–3498. doi: 10.1245/s10434-009-0617-z.

- 278 Saitoh, H. and Hincey, J. (2000) 'Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3', *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), pp. 6252–6258. doi: 10.1074/jbc.275.9.6252.
- 279 Saitoh, H., Pizzi, M. D. and Wang, J. (2002) 'Perturbation of SUMOlation enzyme Ubc9 by distinct domain within nucleoporin RanBP2/Nup358', *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp. 4755–4763. doi: 10.1074/jbc.M104453200.
- 280 Salceda, S. and Caro, J. (1997) 'Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes', *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), pp. 22642–22647. doi: 10.1074/jbc.272.36.22642.
- 281 Sapetschnig, A. *et al.* (2002) 'Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1', *EMBO Journal*, 21(19), pp. 5206–5215. doi: 10.1093/emboj/cdf510.
- 282 Schielke, G. P. *et al.* (1998) 'Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 18(2), pp. 180–5. doi: 10.1097/00004647-199802000-00009.
- 283 Schmidt, D. and Müller, S. (2002) 'Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(Track II), pp. 2872–7. doi: 10.1073/pnas.052559499.
- 284 Schoorlemmer, J. *et al.* (1995) 'Regulation of Oct-4 gene expression during differentiation of EC cells', *Molecular Biology Reports*, 21(3), pp. 129–140. doi: 10.1007/BF00997235.
- 285 Schroeter, M. *et al.* (1994) 'Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion.', *Journal of neuroimmunology*, 55(2), pp. 195–203. doi: 10.1016/0165-5728(94)90010-8.
- 286 Seeler, J. S. and Dejean, A. (2003) 'Nuclear and unclear functions of sumo', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 690–699. doi: 10.1038/nrm1200.
- 287 Serra-Pérez, A. *et al.* (2008) 'Glucose promotes caspase-dependent delayed cell death after a transient episode of oxygen and glucose deprivation in SH-SY5Y cells', *Journal of Neurochemistry*, 106(3), pp. 1237–1247. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05467.x.
- 288 Sharma, P. *et al.* (2013) 'Senp1 Is Essential for Desumoylating Sumo1-Modified Proteins but Dispensable for Sumo2 and Sumo3 Deconjugation in the Mouse Embryo', *Cell Reports*, 3(5), pp. 1640–1650. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.016.
- 289 Shen, L. *et al.* (2006) 'SUMO protease SENP1 induces isomerization of the scissile peptide bond', *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(12), pp. 1069–1077. doi: 10.1038/nsmb1172.
- 290 Shen, L. N. *et al.* (2006) 'The structure of SENP1-SUMO-2 complex suggests a structural basis for discrimination between SUMO paralogues during processing.', *The Biochemical journal*, 397(2), pp. 279–288. doi: 10.1042/BJ20052030.
- 291 Shen, L. N. *et al.* (2009) 'Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase', *Biochemical Journal*, 421(2), pp. 223–230. doi: 10.1042/BJ20090246.
- 292 Shen, Z. *et al.* (1996) 'UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins', *Genomics*, 36(2), pp. 271–279. doi: 10.1006/geno.1996.0462.
- 293 Shio, Y. and Eisenman, R. N. (2003) 'Histone sumoylation is associated with transcriptional repression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), pp. 13225–13230. doi: 10.1073/pnas.1735528100.
- 294 Shin, E. J. *et al.* (2012) 'DeSUMOylating isopeptidase: A second class of SUMO protease', *EMBO Reports*, 13(4), pp. 339–346. doi: 10.1038/embor.2012.3.

- 295 Shlien, A. and Malkin, D. (2009) 'Copy number variations and cancer', *Genome Medicine*. doi: 10.1186/gm62.
- 296 Silveirinha, V., Stephens, G. J. and Cimarosti, H. (2013) 'Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia', *Journal of Neurochemistry*, pp. 580–591. doi: 10.1111/jnc.12347.
- 297 Smothers, J. F. and Henikoff, S. (2000) 'The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer', *Current Biology*, 10(1), pp. 27–30. doi: 10.1016/S0960-9822(99)00260-2.
- 298 Solari, M. *et al.* (2009) 'P19 neuronal differentiation and retinoic acid metabolism as criteria to investigate atrazine, nitrite, and nitrate developmental toxicity', *Toxicological Sciences*, 113(1), pp. 116–126. doi: 10.1093/toxsci/kfp243.
- 299 Song, J. *et al.* (2005) 'Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: A reversal of the bound orientation', *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp. 40122–40129. doi: 10.1074/jbc.M507059200.
- 300 Stroemer, R. P. and Rothwell, N. J. (1998) 'Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1beta in the rat.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18(8), pp. 833–9. doi: 10.1097/00004647-199808000-00003.
- 301 Suh, H. Y. *et al.* (2012) 'Crystal structure of DeSI-1, a novel deSUMOylase belonging to a putative isopeptidase superfamily', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80(8), pp. 2099–2104. doi: 10.1002/prot.24093.
- 302 Svaren, J. *et al.* (1996) 'NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli.', *Molecular and cellular biology*, 16(7), pp. 3545–53. doi: 10.1128/MCB.16.7.3545.
- 303 Takahashi, K. *et al.* (2007) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors', *Cell*, 107(5), pp. 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- 304 Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) 'Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors', *Cell*, 126(4), pp. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- 305 Takahashi, N. *et al.* (2011) 'TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂', *Nature Chemical Biology*, 7(10), pp. 701–711. doi: 10.1038/nchembio.640.
- 306 Talantov, D. *et al.* (2005) 'Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions.', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(20), pp. 7234–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0683.
- 307 Tanabe, M. and Kanehisa, M. (2012) 'Using the KEGG database resource', *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPPL.38). doi: 10.1002/0471250953.bi0112s38.
- 308 Taniguchi, T. *et al.* (2016) 'Resveratrol directly targets DDX5 resulting in suppression of the mTORC1 pathway in prostate cancer', *Cell Death and Disease*, 7. doi: 10.1038/cddis.2016.114.
- 309 Tatham, M. H. *et al.* (2001) 'Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9', *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp. 35368–35374. doi: 10.1074/jbc.M104214200.
- 310 Tatham, M. H. *et al.* (2005) 'Unique binding interactions among Ubc9, SUMO and RanBP2 reveal a mechanism for SUMO paralog selection', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(1), pp. 67–74. doi: 10.1038/nsmb878.
- 311 Tempé, D., Piechaczyk, M. and Bossis, G. (2008) 'SUMO under stress: Figure 1', *Biochemical Society Transactions*, 36(5), pp. 874–878. doi: 10.1042/BST0360874.

- 312 de Thé, H., Pandolfi, P. P. and Chen, Z. (2017) ‘Acute Promyelocytic Leukemia: A
Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure’, *Cancer Cell*, pp. 552–560. doi:
10.1016/j.ccell.2017.10.002.
- 313 Thiru, A. *et al.* (2004) ‘Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and
HP1 localisation to heterochromatin’, *EMBO Journal*, 23(3), pp. 489–499. doi:
10.1038/sj.emboj.7600088.
- 314 Thomas, P. and Smart, T. G. (2005) ‘HEK293 cell line: A vehicle for the expression of
recombinant proteins’, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3
SPEC. ISS.), pp. 187–200. doi: 10.1016/j.vascn.2004.08.014.
- 315 Thrift, A. G. *et al.* (2017) ‘Global stroke statistics’, *International Journal of Stroke*, pp.
13–32. doi: 10.1177/1747493016676285.
- 316 Tian, T. (2012) ‘Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer
stem-like cells derived from gastric cancer’, *Journal of Biomedical Research*, 26(5),
pp. 336–345. doi: 10.7555/JBR.26.20120045.
- 317 Tipney, H. and Hunter, L. (2010) ‘An introduction to effective use of enrichment
analysis software.’, *Human genomics*, 4(3), pp. 202–6. doi: 10.1186/1479-7364-4-3-
202.
- 318 Tolkunova, E. *et al.* (2007) ‘PIAS Proteins as Repressors of Oct4 Function’, *Journal
of Molecular Biology*, 374(5), pp. 1200–1212. doi: 10.1016/j.jmb.2007.09.081.
- 319 Tsuruzoe, S. *et al.* (2006) ‘Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO
conjugation’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(4), pp.
920–926. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.130.
- 320 Tuthill, M. C. *et al.* (2003) ‘N-myc oncogene expression in neuroblastoma is driven by
Sp1 and Sp3’, *Molecular Genetics and Metabolism*, 80(1–2), pp. 272–280. doi:
10.1016/S1096-7192(03)00133-1.
- 321 Tyanova, S. *et al.* (2016) ‘The Perseus computational platform for comprehensive
analysis of (prote)omics data’, *Nature Methods*, pp. 731–740. doi:
10.1038/nmeth.3901.
- 322 Tyanova, S., Temu, T. and Cox, J. (2016) ‘The MaxQuant computational platform for
mass spectrometry-based shotgun proteomics’, *Nature Protocols*, 11(12), pp. 2301–
2319. doi: 10.1038/nprot.2016.136.
- 323 Valko, M. *et al.* (2007) ‘Free radicals and antioxidants in normal physiological
functions and human disease’, *The International Journal of Biochemistry & Cell
Biology*, 39(39), pp. 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- 324 Vertegaal, A. C. O. *et al.* (2004) ‘A proteomic study of SUMO-2 target proteins’,
Journal of Biological Chemistry, 279(32), pp. 33791–33798. doi:
10.1074/jbc.M404201200.
- 325 Vertegaal, A. C. O. *et al.* (2006) ‘Distinct and Overlapping Sets of SUMO-1 and
SUMO-2 Target Proteins Revealed by Quantitative Proteomics’, *Molecular & Cellular
Proteomics*, 5(12), pp. 2298–2310. doi: 10.1074/mcp.M600212-MCP200.
- 326 Vertegaal, A. C. O. (2007) ‘Small ubiquitin-related modifiers in chains.’, *Biochemical
Society transactions*, 35(Pt 6), pp. 1422–3. doi: 10.1042/BST0351422.
- 327 Vethantham, V., Rao, N. and Manley, J. L. (2007) ‘Sumoylation Modulates the
Assembly and Activity of the Pre-mRNA 3’ Processing Complex’, *Molecular and
Cellular Biology*, 27(24), pp. 8848–8858. doi: 10.1128/MCB.01186-07.
- 328 Viera, I., Castellanos, M. and Zardón, M. (2010) ‘Un Acercamiento a La Ontología De
Genes Y Sus Aplicaciones’, *Rcim.Sld.Cu.* Available at:
http://www.rcim.sld.cu/revista_21/articulo_pdf/ontologiadegenes.pdf.
- 329 Villalonga, J. (2008) ‘Fisiopatología de la isquemia cerebral’. Available at:
<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=EDpk9iOQtD4C&oi=fnd&pg=PA13&>

- dq=1.%09Fisiopatología+de+la+isquemia+cerebral+%5Beditor%5D+Joan+Montaner
+Autor+Montaner+Villalonga,+Joan+&ots=W9_ULGmd7X&sig=3pJAxLzG4o2Lm
D-EhcwAtuLL6Q (Accessed: 29 April 2018).
- 330 Wang, L. *et al.* (2009) 'FOS proliferating network construction in early colorectal cancer (CRC) based on integrative significant function cluster and inferring analysis', *Cancer Investigation*, 27(8), pp. 816–824. doi: 10.1080/07357900802672753.
- 331 Wang, Q. F. *et al.* (2011) 'MLL fusion proteins preferentially regulate a subset of wild-type MLL target genes in the leukemic genome', *Blood*, 117(25), pp. 6895–6905. doi: 10.1182/blood-2010-12-324699.
- 332 Wang, W. L. *et al.* (2009) 'Detection and characterization of EWSR1/ATF1 and EWSR1/CREB1 chimeric transcripts in clear cell sarcoma (melanoma of soft parts)', *Modern Pathology*, 22(9), pp. 1201–1209. doi: 10.1038/modpathol.2009.85.
- 333 Wang, Y. D. *et al.* (2013) 'OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway', *Cell Death and Disease*, 4(8). doi: 10.1038/cddis.2013.272.
- 334 Wang, Z. *et al.* (2013) 'Transient ischemia induces massive nuclear accumulation of SUMO2/3-conjugated proteins in spinal cord neurons', *Spinal Cord*, 51(2), pp. 139–143. doi: 10.1038/sc.2012.100.
- 335 Weger, S., Hammer, E. and Heilbronn, R. (2005) 'Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo', *FEBS Letters*, 579(22), pp. 5007–5012. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.088.
- 336 Wegner, M. (1999) 'From head to toes: The multiple facets of Sox proteins', *Nucleic Acids Research*, pp. 1409–1420. doi: 10.1093/nar/27.6.1409.
- 337 Wei, F., Schöler, H. R. and Atchison, M. L. (2007) 'Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), pp. 21551–21560. doi: 10.1074/jbc.M611041200.
- 338 Wei, W. *et al.* (2008) 'A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(3), pp. 454–459. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.028.
- 339 Wiley, S. R. *et al.* (1995) 'Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.', *Immunity*, 3(6), pp. 673–82. doi: 10.1016/1074-7613(95)90057-8.
- 340 Wohlschlegel, J. A. *et al.* (2004) 'Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*', *The Journal of biological chemistry*, 279(44), pp. 45662–45668. doi: 10.1074/jbc.M409203200.
- 341 Wu, M. *et al.* (2009) 'Histone marks and chromatin remodelers on the regulation of neurogenin1 gene in RA induced neuronal differentiation of P19 cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(2), pp. 264–271. doi: 10.1002/jcb.22122.
- 342 Wu, Y. *et al.* (2012) 'Sumoylation represses nanog expression via modulating transcription factors oct4 and sox2', *PLoS ONE*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0039606.
- 343 Wu, Y. C. *et al.* (2012) 'Chemotherapeutic sensitivity of testicular germ cell tumors under hypoxic conditions is negatively regulated by SENP1-controlled sumoylation of OCT4', *Cancer Research*, 72(19), pp. 4963–4973. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0673.
- 344 Xiao, Z. *et al.* (2015) 'System-wide Analysis of SUMOylation Dynamics in Response to Replication Stress Reveals Novel Small Ubiquitin-like Modified Target Proteins and Acceptor Lysines Relevant for Genome Stability', *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(5), pp. 1419–1434. doi: 10.1074/mcp.O114.044792.

- 345 Xie, Z. *et al.* (2010) 'Foxm1 transcription factor is required for maintenance of
pluripotency of P19 embryonal carcinoma cells', *Nucleic Acids Research*, 38(22), pp.
8027–8038. doi: 10.1093/nar/gkq715.
- 346 Yamanaka, S. (2007) 'Strategies and New Developments in the Generation of Patient-
Specific Pluripotent Stem Cells', *Cell Stem Cell*, pp. 39–49. doi:
10.1016/j.stem.2007.05.012.
- 347 Yang, P. *et al.* (2013) 'SUMO1 regulates endothelial function by modulating the
overall signals in favor of angiogenesis and homeostatic responses', *American Journal
of Translational Research*, 5(4), pp. 427–440.
- 348 Yang, S. H. *et al.* (2006) 'An extended consensus motif enhances the specificity of
substrate modification by SUMO', *EMBO Journal*, 25(21), pp. 5083–5093. doi:
10.1038/sj.emboj.7601383.
- 349 Yang, W., Sheng, H., Homi, H. M., *et al.* (2008) 'Cerebral ischemia/stroke and small
ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation - A new target for therapeutic
intervention?', *Journal of Neurochemistry*, pp. 989–999. doi: 10.1111/j.1471-
4159.2008.05404.x.
- 350 Yang, W., Sheng, H., Warner, D. S., *et al.* (2008) 'Transient global cerebral ischemia
induces a massive increase in protein sumoylation', *Journal of Cerebral Blood Flow
and Metabolism*, 28(2), pp. 269–279. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600523.
- 351 Yang, W. *et al.* (2012) 'Analysis of oxygen/glucose-deprivation-induced changes in
SUMO3 conjugation using SILAC-based quantitative proteomics', *Journal of
Proteome Research*, 11(2), pp. 1108–1117. doi: 10.1021/pr200834f.
- 352 Yao, Y. *et al.* (2014) 'Cobalt and nickel stabilize stem cell transcription factor OCT4
through modulating its sumoylation and ubiquitination', *PLoS ONE*, 9(1). doi:
10.1371/journal.pone.0086620.
- 353 Ye, F. *et al.* (2011) 'Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma',
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 137(1), pp. 131–137. doi:
10.1007/s00432-010-0867-y.
- 354 Zaidan, N. Z. *et al.* (2018) 'Compartmentalization of HP1 Proteins in Pluripotency
Acquisition and Maintenance', *Stem Cell Reports*, 10(2), pp. 627–641. doi:
10.1016/j.stemcr.2017.12.016.
- 355 Zhang, F.-P. *et al.* (2008) 'Sumo-1 Function Is Dispensable in Normal Mouse
Development', *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), pp. 5381–5390. doi:
10.1128/MCB.00651-08.
- 356 Zhi, X. *et al.* (2016) 'Silencing speckle-type POZ protein by promoter
hypermethylation decreases cell apoptosis through upregulating Hedgehog signaling
pathway in colorectal cancer', *Cell death & disease*, 7(12), p. e2569. doi:
10.1038/cddis.2016.435.
- 357 Zhou, W., Ryan, J. J. and Zhou, H. (2004) 'Global analyses of sumoylated proteins in
Saccharomyces cerevisiae. Induction of protein sumoylation by cellular stresses',
Journal of Biological Chemistry, 279(31), pp. 32262–32268. doi:
10.1074/jbc.M404173200.
- 358 Zhu, H. *et al.* (2015) 'SPOP E3 Ubiquitin Ligase Adaptor Promotes Cellular
Senescence by Degrading the SENP7 deSUMOylase', *Cell Reports*, 13(6), pp. 1183–
1193. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.083.

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos y becas:

- Plan Nacional del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad
- Proyecto de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía
- EMBO (European Molecular Biology Organization) Short Term Fellowship
- Becas Talenta de la Junta de Andalucía
- Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte

12 Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, el Dr. Mario García Domínguez, todo lo que ha hecho por mí a lo largo de todos estos años. Nos conocimos ya hace casi 10 años gracias a una beca para tener una experiencia en el verano en un laboratorio mientras estaba estudiando la carrera, y desde entonces supe que quería hacer la tesis con él. Gracias por tu apoyo y confianza, gracias por tu atención constante y gracias por servirme de guía. Sé que ha supuesto para ti un “SUMO” esfuerzo y te estaré agradecido por siempre. Así mismo, quiero agradecer la inestimable colaboración del Dr. Benoît Gauthier y su continua disposición.

Así mismo, quiero dar las gracias al Dr. Víctor Sánchez Margalet por acogerme en su departamento así como a las compañeras Dora, Carmen y María José por haberme tratado como un miembro más del equipo y por haber hecho que impartir docencia sea tan bonito e ilusionante gracias a toda vuestra ayuda.

Quiero dar las gracias a todo el equipo de CABIMER, con el que he convivido durante tantos años creciendo juntos, viviendo experiencias inolvidables y aprendiendo a conocer la ciencia de una manera diferente. En primer lugar quiero agradecer a mis compañeros y excompañeros de laboratorio Ale, Amador, Ana, Anabel, Flora, Gloria, Jesús, Juanfri, Lea Cariño, Luismi, Maca, María Mundi, Marta, Nacho, Rosana, Rosella y Víctor su profesionalidad y compañerismo. En concreto, me gustaría agradecer tanto a Pablo como a Curro todo lo que me han enseñado y el cariño y la paciencia con la que lo han hecho, siendo esenciales, por ello, en todos los logros que he conseguido. Especialmente quiero también agradecer a mi compañera Noelia haber estado ahí en todos los momentos, tanto en los buenos como en los malos, siempre atenta y pendiente de mí para que no decayera. Gracias amiga. Así mismo, quería agradecer la acogida que me brindaron en mis inicios en CABIMER en el laboratorio de Epigenética Alicia, Elena, Gonzalo, María y Tati ya que vosotros di mis primeros pasos en la ciencia. Vuestra ayuda, junto con la del Dr. José Carlos Reyes ha sido fundamental en mi formación. Entre todos habéis conseguido que crezca tanto profesional como personalmente.

A parte de a mis compañeros de laboratorio, quiero escribir unas palabras para mis vecinas de laboratorio. Querida Rocío, gracias por toda tu ayuda, me ha encantado vivir contigo y Ricardo los primeros pasos de tu hija. Queridas Almu y Jenna, empezamos juntos nuestras tesis, y ahora las estamos terminando juntos. Compartimos sufrimientos y problemas y habéis sido un hombro en el que apoyarme. Pero también compartimos sueños y muchas muchas risas. Gracias por estar a mi lado durante todos estos años y por haberos convertido en parte de mi familia. Sé que seremos amigos para siempre.

A parte de mis experiencias en CABIMER, también quería agradecer la ayuda que me han prestado mis compañeros en las estancias que he realizado en Leiden y Oxford. Muchas gracias al Dr. Román González, Dr. Alfred Vertegaal y al Dr. Chris Murphy por haber hecho posible dichas estancias. Queridos Stefano, Claudia Scarpelli, Christine, Anurag, Francesco, Claudia de Siena, Ana Piccinini y Xavi, con los que he vivido tantísimas risas, formáis parte de mi vida de una manera muy especial, nunca olvidaré mi Oxford Team. Habéis hecho que mi estancia haya sido uno de los mejores momentos de mi vida. Os quiero.

Quisiera dar las gracias a toda mi familia. Queridos Luisa, Tere, Berta, Bertita, Ale y Manu os quiero con toda mi alma. No quiero olvidarme de mi abuelo, que aunque ya no esté con nosotros, sigo teniendo muy presente. Te quiero allá donde estés. Gracias a mi madre, por su trabajo constante, su lucha diaria para que no me faltara nada. Aún recuerdo esos años sin parar de estudiar y con las expectativas puestas en que el teléfono sonara. Gracias por estar siempre ahí de una manera inagotable. Gracias, en especial, a mi abuela, ya que siempre ha sido un ejemplo de esfuerzo, trabajo, tesón y constancia. Fuiste una pionera, de las primeras mujeres en tener estudios, la primera en conducir en el pueblo, la única mujer junto a miles de militares en una colonia española ejerciendo como matrona. Me demostraste que podría conseguir cualquier sueño que me propusiera si luchaba por él sin importar desde dónde partieras. Gracias por cuidarme como una madre y por haber sido tú la persona que me dio la mano para entrar en este mundo en mi nacimiento.

Finalmente, quisiera dar las gracias a una persona sin la que este trabajo no podría haber sido posible, la persona que en solo unos días se convertirá en mi marido, Jesús. Has sido mi apoyo en los duros momentos que acontecen cuando pasas tantos meses de estancia, fuera de tu hogar. Gracias a toda tu familia, que ahora ya es y será para siempre mi familia. Mi querida Luli, que me ha alimentado durante todos estos años de tesis. Tus croquetas, tu ensaladilla, tus empanadas, tus fajitas, y un largo etc. Luli, creo que nadie se ha reído en este mundo tanto

como yo contigo y con tu hijo. Queridos Jose y Pili, María y Javi, Carlos y Sandra, Alberto y Lorena, y mis sobrinitos Álvaro, Helena y Marina, os quiero con todo mi corazón. Jesús, has sido un pilar fundamental para realizar todos los experimentos diarios con ganas e ilusión. La vida cobra sentido al estar junto a ti. Por siempre, juntos. *Spice up your life...Come what may...*