

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 ESTRUCTURA DE LA NPM1	1
1.2 LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA NPM1	2
1.3 <i>G-QUADRUPLEX</i>	2
1.4 LA UNIÓN A <i>G-QUADRUPLEX</i> MODULA LA LOCALIZACIÓN DE LA NPM1	3
1.5 OBJETIVO.....	4
2. DESARROLLO	5
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1.1 Expresión y purificación de NPM1-T199D recombinante	5
2.1.1.1 Obtención del clon His-ZZ-NPM1-T199D	5
2.1.1.2 Transformación e inducción de expresión en BL21 codon +.....	5
2.1.1.3 Purificación.....	6
2.1.2 Oligonucleótido de DNA	6
2.1.3 Electroforesis nativa.....	7
2.1.4 Cromatografía de exclusión molecular	7
2.1.5 Fosforilación <i>in vitro</i> de NPM1 por CDK2/CiclinaA2.....	8
2.2 RESULTADOS.....	8
2.2.1 Expresión y purificación de NPM1 T199D	8
2.2.2 Formación de la estructura <i>G-quadruplex</i>	9
2.2.3 wtNPM1 y NPM1-T199D unen G4MYC de forma similar	9
2.2.4 NPM1 fosforilada por CDK2/CiclinaA2 une en menor medida G4MYC 11	
2.3 DISCUSIÓN	12
3. CONCLUSIONES	14
4. BIBLIOGRAFÍA	15

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La nucleofosmina (NPM1, también llamada NPM, B23 o NO38) es una chaperona nuclear ampliamente conservada en vertebrados, de 294 aminoácidos (32,6 kDa) perteneciente a la familia *nucleoplasmina*. La NPM1 desarrolla múltiples funciones relacionadas con el crecimiento celular, como la biogénesis de ribosomas, duplicación del centrosoma, ensamblaje de histonas y regulación de los supresores de tumores p53/TP53 y ARF. Su expresión se incrementa bajo estímulos mitogénicos, estando su disfunción relacionada con diversos cánceres humanos como la leucemia mieloide aguda (AML).

1.1 ESTRUCTURA DE LA NPM1

La conformación nativa de la NPM1 es aparentemente pentamérica. Cada subunidad consta de un núcleo (*core*), un conector y un dominio C-terminal. Se conoce información estructural de alta resolución del núcleo y del dominio C-terminal (**Figura 1**), mientras que el conector se encuentra intrínsecamente desordenado. La estructura del núcleo está formada por hojas- β y es compartida por las proteínas de la misma familia. Es responsable de la oligomerización y le confiere una alta estabilidad. El conector es largo, flexible y posee dos dominios ácidos, cuya función se relaciona con la interacción con histonas. En este conector encontramos el residuo fosforilable T199 de interés para este estudio (indicado en la **Figura 1B**). El dominio C-terminal consta de 3 α -hélices y es responsable de la interacción específica con ácidos nucleicos y de la localización nucleolar de la NPM1.

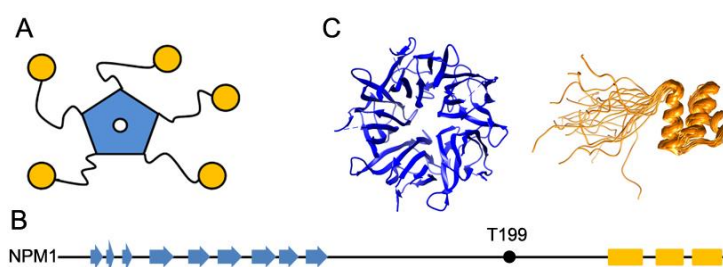


Figura 1 – Representación gráfica de la estructura y secuencia de la NPM1. A) Esquema de la forma pentamérica con los dominios núcleo (azul), conector y C-terminal (amarillo). B) Representación de la estructura secundaria sobre la secuencia, así como la posición aproximada del residuo de interés T199. C) Estructuras 3D de alta resolución del núcleo (izquierda) y del dominio C-terminal (derecha); PDB: 2LLH, 2P1B. Parcialmente extraído de Arregi et al. (2015).

1.2 LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA NPM1

La localización de la NPM1 es principalmente nucleolar (**Figura 2A**), aunque lleva a cabo múltiples funciones que requieren su localización nucleoplasmática y citoplasmática. Por ello, NPM1 es transportada entre estos compartimentos (“*shuttling protein*”) mediante importina α/β y exportina CRM1 (Arregi et al., 2015). Este transporte parece estar regulado por modificación postraduccional, incluyendo fosforilación y acetilación (Gallo et al., 2012). Koike et al. (2010) han descrito la salida al nucleoplasma de NPM1 fosforilada en Thr199 (pT199) y su reclutamiento a sitios de la cromatina conocidos como *foci* de reparación ante daño en el DNA inducido por radiación ionizante (**Figura 2B, C**). La NPM1 interacciona con ácidos nucleicos a través de su región C-terminal, en concreto con los 70 últimos residuos, segmento conocido como C70 (Wang et al., 1994). Se ha descrito su interacción de forma específica y preferencial por formaciones *G-quadruplex* (G4). Según Chiarella et al. (2013) esta interacción específica podría ser la responsable del anclaje nucleolar de la NPM1. La desregulación de la localización de la NPM1 está asociada con patologías. La nucleofosmina se encuentra mutada en un subtipo de leucemia mieloide aguda (AML). Estas mutaciones conllevan la desestructuración del dominio C-terminal de NPM1, perdiendo así la capacidad de asociarse al nucleolo y desencadenando su translocación aberrante al citoplasma (Falini et al., 2005).

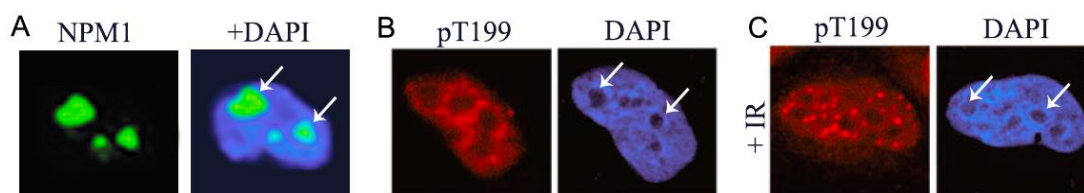


Figura 2 – Localización nucleolar de la NPM1 en condiciones normales (A), salida de la forma fosforilada pT199 al nucleoplasma (B) y reclutamiento a *foci* de reparación ante daño inducido por radiación ionizante (C). Anticuerpo anti-NPM1 (verde), anticuerpo anti-pT199 (rojo) y tinción DAPI nucleoplasmática. Las flechas indican algunos de los nucleolos. Extraído parcialmente de Chiarella et al. (2013) y Koike et al. (2010).

1.3 G-QUADRUPLEX

Los *G-quadruplex* (G4) son estructuras no canónicas de ácidos nucleicos. Secuencias ricas en guanina son capaces de auto-ensamblarse de 4 en 4, vía puentes de hidrógeno tipo *Hoogsteen*, en conformación plana *G-quartet* (**Figura 3A**). Estas

estructuras se asocian de forma apilada en lo que se conoce como *G-quadruplex* (G4). Los G4 necesitan de un catión monovalente por *G-quartet*, potasio o sodio, para coordinar los O6 de las bases de guanina (Balasubramanian et al., 2011).

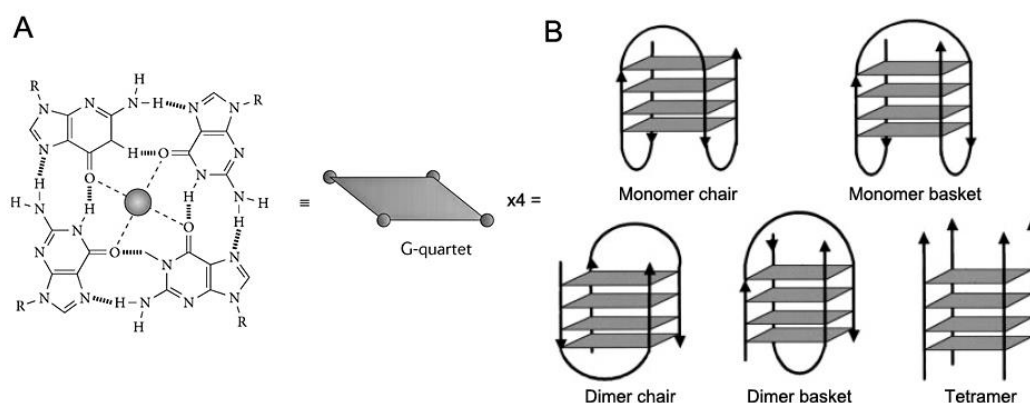


Figura 3 – Estructura del *G-quadruplex*. A) Estructura atómica y representación de un *G-quartet*. B) Variedad de estructuras en las que se pueden ensamblar 4 *G-quartets*. Imágenes parcialmente tomadas de Balasubramanian et al. (2011) y Đapić et al. (2003).

Estas estructuras se descubrieron en regiones teloméricas y más tarde se encontraron en las regiones promotoras de diversos genes pro-proliferativos (Balasubramanian et al., 2011). Secuencias de DNA ribosómico también forman G4, cuya localización es casi exclusivamente nucleolar (Chiarella et al., 2013). Se ha señalado que su presencia en promotores podría reflejar un mecanismo de regulación transcripcional. Se conoce que el promotor del oncogen *c-MYC* forma esta estructura tanto *in vivo* como *in vitro* y se encuentra bien caracterizado, por lo que suele emplearse como modelo de G4 (G4MYC). La mayoría de secuencias *G-quadruplex* pueden adoptar una variedad de conformaciones intra e inter catenarias, comportándose como poblaciones heterogéneas de distintos tamaños (**Figura 3B**).

1.4 LA UNIÓN A *G-QUADRUPLEX* MODULA LA LOCALIZACIÓN DE LA NPM1

Existen múltiples evidencias (Chiarella et al., 2013; Bañuelos et al., 2013) de la unión preferencial de NPM1 por estructuras G4 y su papel en la retención nucleolar de la proteína. Gallo et al. (2012) propusieron un modelo estructural basado en RMN

del complejo NPM1/G4 (**Figura 4**). Si bien la localización subnuclear de la NPM1 está regulada por múltiples factores, el grado de fosforilación parece tener un papel determinante. En la secuencia de NPM1 existen 19 sitios de fosforilación descritos para distintas

quinasas dependientes de ciclina, involucradas en la regulación del ciclo celular. Por ello, se han llevado a cabo diversos estudios mutagénicos para clarificar el papel de la fosforilación en residuos concretos (Negi y Olson, 2006). Con el fin de controlar el grado preciso de fosforilación, estos estudios típicamente constan de la mutación del residuo de interés por alanina (no fosforilable) o la sustitución por un residuo cargado negativamente que imite la fosforilación (mutación “*fosfomimética*”). Estos trabajos han probado ser una manera eficaz de abordar el estudio de la fosforilación, si bien la capacidad de imitar adecuadamente la fosforilación natural de los mutantes fosfomiméticos puede ponerse en entredicho.

Koike et al. (2010) apuntan a que la fosforilación en T199 es crítica para la localización de NPM1 (*apartado 1.2, Figura 2*), pese a que este residuo se encuentra relativamente alejado del segmento C70 que suele considerarse responsable de la unión (residuos 224-294, **Figura 4**). Nuestra hipótesis parte de la evidencia de que la unión a G4 determina el anclaje nucleolar y de que la forma fosforilada p199 parece perder este anclaje. Por ello, sugerimos que este comportamiento se debe a una menor capacidad de unión a G4. Con el fin de estudiar el efecto de la fosforilación en T199 se sustituye la (fosfo)treonina por aspártico, produciéndose el mutante fosfomimético NPM1-T199D. Se compara su afinidad por G4 con la NPM1 silvestre.

1.5 OBJETIVO

En el presente trabajo se estudia la interacción *in vitro* de NPM1 completa humana con *c-MYC G-quadruplex* (G4MYC), tanto de la forma silvestre como del mutante fosfomimético NPM1-T199D, con el objeto de esclarecer el papel de la modificación

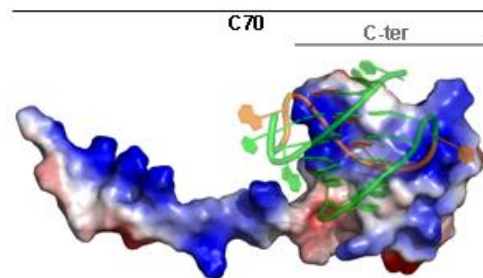


Figura 4. Modelo estructural del complejo NPM1/G4. Representación de la superficie electrostática (azul-positivo, rojo-negativo) del C70 y C-terminal (C-ter) de NPM1, superponiendo la estructura del G4 (Pu241). Imagen tomada de Gallo et al. (2012).

particular en este residuo en la localización y función de la proteína. De forma adicional se emplea la proteína fosforilada *in vitro* por CDK2/CiclinaA2, estudiando así la forma naturalmente modificada de la proteína.

2. DESARROLLO

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Expresión y purificación de NPM1-T199D recombinante

Se parte de preparación de proteína NPM1 silvestre (secuencia humana, código *UniprotKB*: P06748) previamente purificada por el grupo. Se produce el mutante fosfomimético NPM1-T199D.

2.1.1.1 Obtención del clon His-ZZ-NPM1-T199D

Se parte de la construcción YFP-NPM1-T199D generada previamente en el grupo a partir de YFP-wtNPM1 (Arregi et al., 2015), de la cual se extrae, amplifica por PCR y purifica (Qiagen) el fragmento NPM1-T199D, haciendo uso de una polimerasa tipo *high fidelity* (Jena). Por otro lado, se purifica (Qiagen) el plásmido pTG-A20 (Monecke et al., 2009) para producción en *E. coli* con etiqueta N-terminal His-ZZ seguida de sitio de corte para proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*). Se digieren tanto el plásmido como el inserto con las enzimas BamHI y HindIII (New England Biolabs) durante 3h a 37°C. Se inactivan las enzimas térmicamente (80°C, 20 min) y se purifican el plásmido e inserto en kit (Qiagen). Para evitar la re-circularización del plásmido se trata con fosfatasa alcalina (1'5h, 37°C). Tras ello se inactiva térmicamente la enzima. Se liga el fragmento derivado de la PCR y el plásmido con ligasa instantánea (*Instant Sticky-end ligase mix*, New England Biolabs).

2.1.1.2 Transformación e inducción de expresión en BL21 codon +

Se incuban 200 µl de células competentes DH5α con 5 µl de la mezcla de ligación durante 30 min en hielo. Se transforman las células por choque térmico (90 seg a 42°C, seguido de 2 min en hielo). Se siembran en placa con ampicilina e incuban *overnight* a 37°C. Se comprueba la presencia del inserto en algunas colonias por

ensayo de restricción enzimática y mediante secuenciación (Sistemas Genómicos, Valencia); poniendo especial atención en la presencia de la mutación de interés T199D. Se extrae el plásmido (*Spin Miniprep Kit*, Qiagen) y se transforman con 1 μ l de éste, 200 μ l de células competentes BL21-codon+ por choque térmico (mismo procedimiento) y se siembran en placa con ampicilina. Se inoculan algunas colonias en cultivo líquido de 5 ml medio LB con ampicilina e incuban *overnight* a 37°C. Se inoculan los 5 ml de células en 500ml de medio y se incuban a 37°C hasta OD₆₀₀ de 0.4 a 37°C, entonces se baja la temperatura a 18°C hasta OD₆₀₀ de 0.7. Se induce la expresión con IPTG (1mM) y se incuban *overnight*. Se recogen las células tras doble centrifugación a 4500 rpm 22 min en tubos de 50 ml y se conservan a -20°C.

2.1.1.3 Purificación

Para la purificación se emplea un protocolo similar al empleado por Arregi et al. (2015). Brevemente, se resuspenden las células en 20 ml de tampón A (25mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1mM PMSF, 1mM TCEP) por litro de cultivo, complementado con inhibidores de proteasas. Se lisan las células por sonicación en presencia de lisozima (Sigma-Aldrich). La muestra se centrifuga (30 min, 40000 rpm) y se filtra el sobregadante. Se carga la muestra en columna de afinidad HisTrap FF de 5ml (GE Healthcare) equilibrada previamente en tampón A. NPM1-T199D se eluye con un gradiente lineal creciente hasta 1M imidazol. Se corta la etiqueta con proteasa TEV (purificada previamente en el grupo), a la vez que se dializa, y se vuelve a inyectar en la misma columna de afinidad HisTrap FF. Se analizan las muestras por SDS-PAGE 12,5% y tinción Coomassie. Las fracciones seleccionadas se concentran en Amicon (Millipore) antes de ser cargadas en una columna de gel filtración Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare) equilibrada previamente en 25mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM DDT. Se recogen fracciones, analizan en gel y concentran a 20 mg/ml. Se congelan a -80°C con N₂ líquido hasta su uso.

2.1.2 Oligonucleótido de DNA

En el estudio se emplea el oligonucleótido G4MYC (5'-TGGGGAGGGTGGGG-AGGGTGGGGAAGG- 3') comprado a Sigma-Aldrich. Para facilitar la formación

de la estructura *G-quadruplex* se resuspende a 300 μM en tampón 20mM HEPES, 10mM KCl pH 7.5. Algunas muestras se someten a *annealing* calentando 5 min a 95°C y descendiendo 1°C/min (en termociclador) hasta 55°C, después se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. Se conservan a -20°C.

2.1.3 Electroforesis nativa

Se realizan ensayos EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), usualmente empleados para detectar complejos entre proteína y ácidos nucleicos (Hellman y Fried, 2007). Se basan en la electroforesis en condiciones nativas, donde los complejos proteína-DNA migran más lentamente que el DNA en solitario. Se realizan ensayos de titulación bien de DNA a concentraciones fijas de proteína o viceversa. Las mezclas de reacción contienen 20 μl de DNA (0-100 μM) y NPM1 a 5 μM (wt y T199D) en tampón 20mM HEPES, 10mM KCl, 2mM TCEP, 10% glicerol, pH 7.5 (“tampón HEPES/K”). Se incuba 30 min a temperatura ambiente, tras lo que se añade 10 μl de tampón de carga (Hellman y Fried, 2007). Se cargan 15 μl en gel de poliacrilamida nativo 8.5% en tampón 0.5x TBE a temperatura ambiente durante 60 min, 120V; previa pre-migración (sin muestra, 30 min). Se tiñen los geles con GelRed para la detección fluorimétrica de DNA y tras ello con Coomassie, para la detección de proteína. El análisis de imagen se realiza con ImageJ, permitiendo la semi-cuantificación de la intensidad de fluorescencia.

2.1.4 Cromatografía de exclusión molecular

Para los experimentos de unión de wtNPM1 y NPM1-T199D la mezcla de reacción consta de 100 μM G4MYC y 20 μM de pentámero NPM1 (wt y T199D) incubado a T^a ambiente durante 30 min en tampón HEPES/K. Se centrifuga la mezcla 10 min a 14000 rpm y 100 μl del sobregadante se inyectan en columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) previamente equilibrada en el mismo tampón. También se cargan el DNA y NPM1 por separado (controles). En el experimento de fosforilación el tampón es una mezcla de HEPES/K con el medio de reacción y se sigue el mismo procedimiento descrito previamente. Las cromatografías se llevan a cabo a T^a ambiente en un cromatógrafo ÄKTApurifier (GE Healthcare).

2.1.5 Fosforilación *in vitro* de NPM1 por CDK2/CiclinaA2

Para fosforilar wtNPM1 *in vitro* se utiliza el complejo kinasa CDK2/CiclinaA2 *GST tagged* (Sigma-Aldrich) en la siguiente mezcla de reacción: 2µg (20µl) CDK2/CiclinaA2 en 40 µl tampón “kinasa” (25mM MOPS, 25mM MgCl₂, 5mM EGTA, 2mM EDTA, 0.25 mM DTT, pH 7.2) al que se adicionan 50 ng/µl de BSA, 500 µM ATP y 20 µM de pentámero wtNPM1. Se incuba 15 min a 30°C.

2.2 RESULTADOS

En el presente estudio se caracteriza la unión a G4MYC del mutante fosfomimético NPM1-T199D de forma comparada con la forma silvestre wtNPM1. Asimismo, se produce y estudia la unión con la forma fosforilada *in vitro* por CDK2/Ciclina A2.

2.2.1 Expresión y purificación de NPM1 T199D

La proteína NPM1-T199D se expresa en *E. coli* BL21-codon+ a 18°C durante 20 h, tras la adición de IPTG a 1mM. La fracción soluble del lisado celular se carga en columna de afinidad HisTrap, de forma que NPM1-T199D con etiqueta His-ZZ es retenida, junto con posibles contaminantes minoritarios. Se eluyen con un gradiente de imidazol. Se corta la etiqueta (His-ZZ) con proteasa TEV y se vuelve a inyectar en la misma columna, reteniendo ahora las proteínas de afinidad inespecífica y no uniéndose NPM1-T199D. Las fracciones correspondientes se cargaron en una columna de gel filtración Superdex 200 HiLoad 16/60. La pureza de la muestra se confirmó en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (**Figura 5**) y se estimó en torno al 98%. El rendimiento de la purificación fue de 14mg/L de cultivo. En esta fase el mutante fosfomimético presentó un comportamiento similar al de wtNPM1.

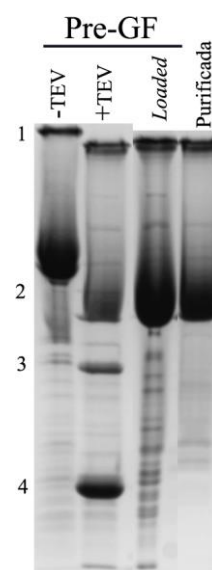


Figura 5 – Gel SDS-PAGE de la purificación de NPM1-T199D. Calles: Previo a corte con proteasa (-TEV), tras ser cortado (+TEV), previo a inyección en columna de gel filtración (*Loaded*) y una de las fracciones de la proteína purificada. Bandas (izquierda): 1- Pentámero NPM1; 2- Monómero NPM1; 3 (+TEV) – Proteasa TEV; 4 (+TEV)-Etiqueta (His-ZZ). Nótese el mayor tamaño de NPM1 cuando se encuentra con la etiqueta (-TEV).

2.2.2 Formación de la estructura *G-quadruplex*

Se estudia el *G-quadruplex* empleando el modelo del promotor c-MYC. Someter la muestra a *annealing* asegura la disociación de estructuras formadas durante la síntesis y resuspensión del oligonucleótido, con objeto de que la solución final contenga las estructuras G4 termodinámicamente más estables (Đapić et al., 2003). Las condiciones a las que se lleva a cabo este proceso son determinantes con respecto al tipo de estructuras obtenidas. Los distintos protocolos para el *annealing* comparten un calentamiento a 95°C por un periodo de 5-15 minutos seguido de un enfriamiento lento que puede conseguirse por diversos medios. El enfriamiento lento es esencial para la formación de estas estructuras y una vez formadas, son altamente estables (Đapić et al., 2003). La presencia de G4 se puede comprobar mediante dicroísmo circular, aunque en este caso no se lleva a cabo dadas las evidencias claras de formación de G4MYC, observándose éste directamente en geles EMSA y en cromatografía de exclusión molecular. Se puede observar en la **Figura 6** el comportamiento heterogéneo de la muestra, siendo una mezcla de poblaciones G4 de distintos tamaños, cuyas estructuras teóricas se han presentado en la **Figura 3** (*apartado 1.3*). Las poblaciones que se retienen en mayor grado en la columna (Vol=17ml) se corresponden con la forma monomérica de G4MYC, mientras que las que eluyen con anterioridad son formaciones oligoméricas de tamaño creciente. En este sentido y como se puede apreciar en la **Figura 6**, la muestra no sometida a *annealing* presenta una mayor heterogeneidad de estructuras en cuanto a tamaño, mientras que este proceso favorece la formación de G4 monomérico.

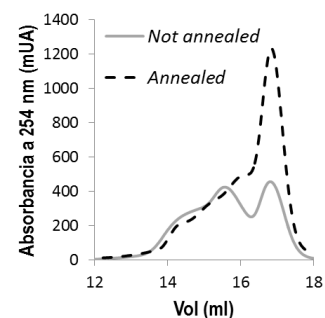


Figura 6 – Cromatograma de exclusión molecular del G4MYC *annealed* y *not annealed*. G4MYC a concentración 100µM. Se observa la composición diferencial de estructuras en ambas muestras.

2.2.3 wtNPM1 y NPM1-T199D unen G4MYC de forma similar

Inicialmente se estudió la interacción proteína/DNA mediante geles nativos EMSA. Cuando NPM1 se mezcla con G4MYC, la tinción de DNA revela que una fracción

del DNA co-migra con la proteína, reteniéndose en la parte superior del gel (**Figura 7**, banda marcada con asterisco). En el mismo gel con tinción Coomasie se revela un complejo de mayor tamaño que la proteína en solitario, que aumenta a mayor concentración de G4MYC (banda marcada con asterisco). En este experimento se titularon concentraciones crecientes de G4MYC (*annealed*) sobre una concentración fija de wtNPM1 o NPM1-T199D de 5 μ M de pentámero. En la **Figura 7C** se muestra la semi-cuantificación de la fluorescencia (DNA) correspondiente a la banda del complejo. Se observa cómo la cantidad de complejo aumenta en función de la concentración de G4MYC, llegando a la saturación, indicativo de una unión específica. No se observan diferencias significativas entre el comportamiento de wtNPM1 y NPM1-T199D, siendo la unión semejante a la previamente descrita

por Bañuelos et al. (2013) para la forma silvestre. El “*smirring*” que se observa a lo largo de la calle en presencia de DNA podría reflejar el equilibrio en la unión-disociación del complejo durante la electroforesis. Se han llevado a cabo titulaciones más completas, así como distintas condiciones con objeto de favorecer la formación del complejo. Sin embargo, no se han conseguido mejores resultados en gels debido a diversos problemas que se expondrán más adelante.

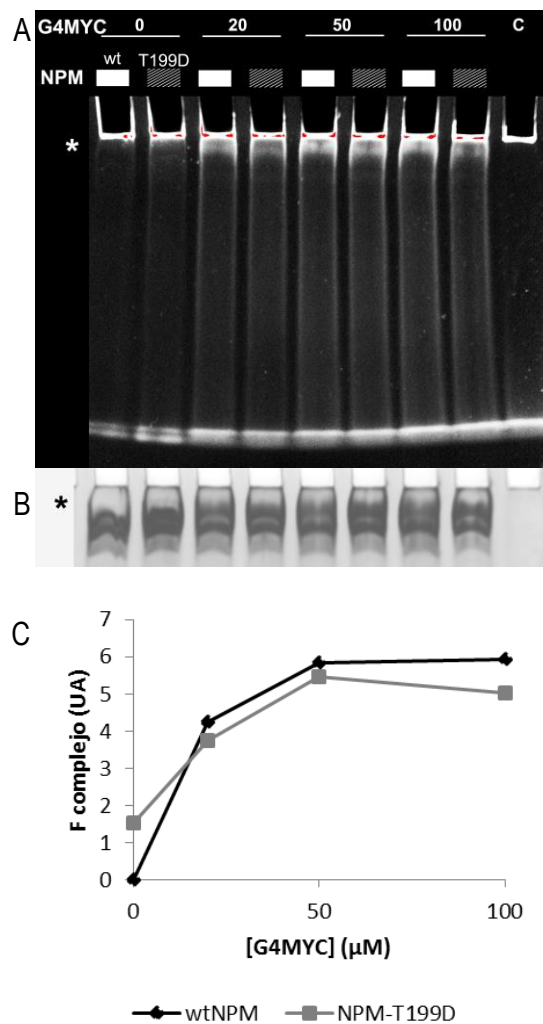


Figura 7. Gel nativo EMSA de la unión a G4MYC de wtNPM1 o NPM1-T199D. A) Tinción GelRed (DNA). B) Tinción Coomasie (proteína). C) Semi-cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la banda del complejo. Se titulan concentraciones crecientes de G4MYC (20, 50, 100 μ M) en presencia de 5 μ M de NPM1 wt (cuadros blancos) o T199D (cuadros grises). “C” indica el control de G4MYC a 50 μ M. Se indica con asterisco la banda del complejo (G4+NPM1).

Así, con objeto de clarificar y confirmar estos resultados, se emplea la cromatografía de exclusión molecular. Se mezcla NPM1:G4 en relación molar 1:5, tanto con G4 *annealed* como no *annealed*. El cromatograma correspondiente al experimento con G4 no *annealed* se muestra en la **Figura 8**. En los experimentos realizados aparece un pico a un volumen de elución de 10.1ml, inferior al de la proteína en solitario (10.8ml wtNPM1 y 11.1ml NPM1-T199D). Además presenta una A_{254nm} elevada, por lo que, atribuimos este pico al complejo NPM1/G4. Éste se forma con ambas proteínas, y tanto con G4 no *annealed* como *annealed* (no mostrado). Se observa la reducción específica de la absorbancia de G4MYC oligomérico ($V=14-15mL$) en las mezclas (N+G4) con respecto al control de G4MYC; indicando la unión preferencial de NPM1 por ellas, descrito previamente por Bañuelos et al. (2013).

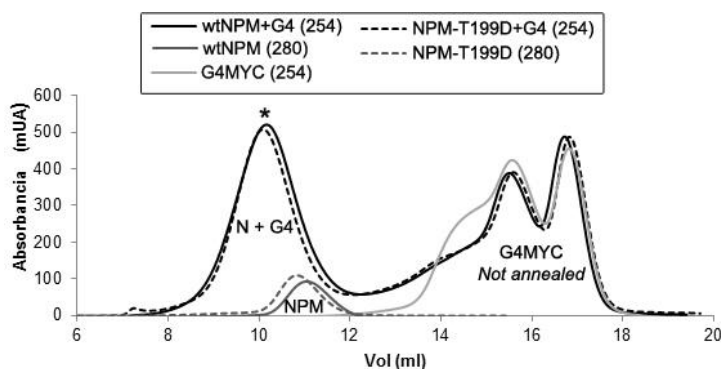


Figura 8 – Cromatograma de mezclas de NPM1 (wt y T199D) con G4MYC not annealed y sus respectivos controles. El complejo (N+G4) eluye a $V=10.1ml$ y se señala con asterisco. La longitud de onda de detección se indica entre paréntesis en la leyenda.

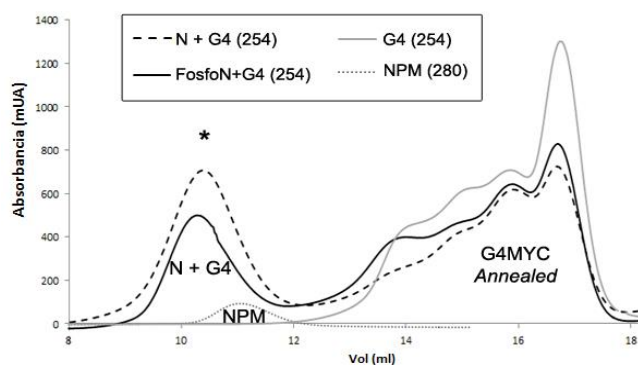


Figura 9. Cromatograma de mezclas de NPM1 fosforilada y no fosforilada con G4 y sus respectivos controles. El complejo (N+G4) eluye a $V=10.1ml$ y se señala con asterisco. La longitud de onda de detección se indica entre paréntesis en la leyenda.

2.2.4 NPM1 fosforilada por CDK2/CiclinaA2 une en menor medida G4MYC

Dado que no se observaron diferencias notables en la unión a G4MYC del mutante fosfomimético respecto a la forma silvestre, se quiso evaluar la unión de la NPM1 fosforilada por el complejo CDK2/CiclinaA2. Ésta es una de las kinasas que la

fosforilan en el residuo T199, aunque también fosforila en otros sitios (S125). Por las razones que se han expuesto anteriormente en los experimentos con el mutante, se observa la formación de complejo NPM1/G4 (**Figura 9**) con ambas proteínas, si bien se observa una diferencia cuantitativa en la unión. La proteína fosforilada presenta menor unión relativa al G4MYC (menor intensidad en el pico N+G4, señalado con asterisco en la **Figura 9**) que la forma no fosforilada (en torno a un 30% menos).

2.3 DISCUSIÓN

Las mutaciones fosfomiméticas han probado ser una aproximación experimental válida en el estudio de las modificaciones por fosforilación en residuos serina y treonina. Suele asumirse que el efecto de la fosforilación está determinado, en gran medida, por la carga introducida. En cambio, cuando la unión necesita una complementariedad estérica estricta además de electrostática, puede ocurrir que la fosforilación no se imite adecuadamente. En este sentido, si la interacción NPM1/G4 necesita de esta complementariedad adicional puede que el mutante fosfomimético no tenga el efecto deseado y que, por ello, siga presentando afinidad por G4. Para comprobarlo, se estudia la unión con la forma fosforilada *in vitro* pNPM1.

Los geles EMSA realizados presentaron varios problemas metodológicos. Es de destacar una elevada intensidad de fluorescencia con la tinción DNA en los controles de proteína de algunos experimentos. En el que se muestra en la **Figura 7**, se aprecia que el control de T199D (sin G4MYC) presenta mayor fluorescencia con respecto a la forma silvestre. Una posible explicación es la presencia (en proporción minoritaria) de DNA contaminante en las preparaciones de proteína, especialmente en el mutante. Los ratios A260/A280 fueron de 0,8 para el mutante y de 0,6 para la forma silvestre (siendo lo idóneo <0,6). No debería afectar significativamente a los experimentos, ya que el DNA contaminante debería verse desplazado por la unión preferencial a G4. Se pudo concluir que la unión a G4 se producía de manera similar para ambas proteínas. Con objeto de complementar esta información se recurre a la cromatografía de exclusión molecular. Los resultados obtenidos son más claros y confirman que ambas proteínas, wtNPM1 y NPM1-T199D, se unen a G4 y de manera similar. Solo se muestra el cromatograma resultado del experimento con G4 no *annealed*, dado que en el que se emplea G4 *annealed* presentó un problema de

concentración (si bien también se observó la presencia del complejo). Cabe comentar que NPM1-T199D presenta un volumen de elución menor que wtNPM1 (10.8-11ml respectivamente). Puede deberse a que la mutación T199D aumenta la repulsión electrostática del conector, incrementando así el *radio de Stokes* de la molécula.

No observándose diferencias significativas se recurre a la fosforilación *in vitro* de NPM1 por CDK2/CiclinaA2. Ésta fosforila al menos en un residuo adicional (S125) además de en T199. También cabe la posibilidad de que se produzcan fosforilaciones en sitios no específicos. En los cromatogramas presentados se puede observar una diferencia en la unión a G4MYC. De acuerdo a la hipótesis inicial, la fosforilación disminuye la afinidad de la NPM1 por estas estructuras y por tanto, podría explicar las diferencias de localización observadas. Sería de gran interés caracterizar el rendimiento de la fosforilación y los lugares específicos en los que se ha fosforilado. Se podría evaluar la fosforilación en p199 por *Western-Blot*, ya que existe un anticuerpo que reconoce específicamente esta fosforilación, empleado en estudios previos (Koike et al., 2010). Aun haciendo uso de esta técnica, no seríamos capaces de discriminar la posible fosforilación en otros residuos.

Cabe destacar que en resultados previos de nuestro grupo en ensayos celulares (**Figura 10**, resultados no publicados) se había observado que la mutación fosfomimética no reproducía el comportamiento de NPM1 fosforilada (en T199) en cuanto a localización subnuclear. Se observó la permanencia del mutante fosfomimético en la región nucleolar, mientras que la forma fosforilada p199-NPM1 sale al nucleoplasma, tal y como se había descrito anteriormente (*apartado 1.2, Figura 2*). Por tanto, los resultados aquí presentados, derivados de estudios *in vitro*, se correlacionan con estos ensayos confirmando la discrepancia entre el comportamiento del mutante fosfomimético y de la forma fosforilada.

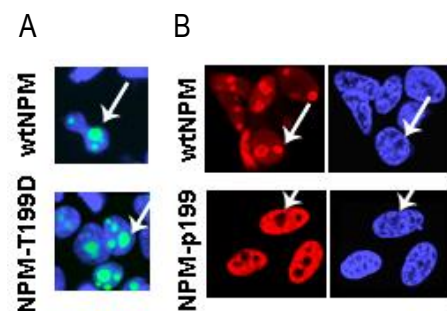


Figura 10 – A) Localización nucleolar del mutante fosfomimético NPM1-T199D. B) La forma fosforilada p199 se transloca al nucleoplasma. Detección fluorescente por fusión con YFP (verde). Inmunotinción con anticuerpos específicos para wt y p199 NPM1 (rojo). DAPI tinción nucleoplasmática (azul). Las flechas señalan algunos de los nucleolos.

Así, algunas de las explicaciones compatibles con estos resultados son: 1) La mutación fosfomimética no imita adecuadamente el efecto de la fosforilación debido a que la unión no se encuentra gobernada exclusivamente por carga electrostática. La fosforilación pT199 podría tener un efecto crítico en la unión a G4. 2) La fosforilación pT199 no es esencial, pero sí lo es la fosforilación en algún otro residuo concreto (fosforilado por CDK2); abordable mediante el empleo de mutantes fosfomiméticos. 3) La unión está gobernada por fosforilaciones múltiples, lo que complicaría la estrategia experimental a seguir.

3. CONCLUSIONES

La unión de la NPM1 a estructuras *G-quadruplex* (G4) tiene un papel fundamental en la función y localización de la proteína (Chiarella et al., 2013). Existen evidencias de regulación de estos procesos por fosforilación de NPM1 (Negi y Olson, 2006). En el presente trabajo se emplea G4MYC como modelo de G4 y se trabaja con la proteína NPM1 completa, secuencia humana. Se ha producido el mutante fosfomimético T199D capaz, en principio, de imitar el efecto de la fosforilación en este residuo. Se ha podido determinar que el mutante fosfomimético NPM1-T199D se une a G4MYC de manera similar con respecto a wtNMP. Por otro lado, se ha comprobado que la fosforilación *in vitro* con la kinasa CDK2/CiclinaA2 provoca una disminución cuantitativa de la afinidad por G4. De acuerdo con las razones descritas en la discusión, no se ha podido determinar si este comportamiento es debido a que el mutante fosfomimético no imita adecuadamente la fosforilación o si ocurre debido a la fosforilación en otro residuo o combinada. Sería de gran interés caracterizar el grado de fosforilación de la proteína y así, poder clarificar estos resultados.

Se sugiere continuar con el estudio de nuevos mutantes fosfomiméticos para otros residuos de interés y realizarlos de forma combinada. Por otro lado, destacar el reciente interés por el estudio de las variantes conformacionales del DNA, como los *G-quadruplex*, dado que parecen ser potentes reguladores de la expresión génica. Además, se ha iniciado la caracterización de la unión de la NPM1 con ubiquitina y APE1, relacionándose con la función de reparación del DNA que realiza en el nucleoplasma. Se sugiere continuar con el estudio de las parejas de interacción de esta proteína con objeto de llevar a cabo una caracterización profunda de NPM1.

4. BIBLIOGRAFÍA

Arregi I. et al. "Leukemia-associated mutations in nucleophosmin alter recognition by CRM1: Molecular basis of aberrant transport." *PloS one* 10.6 (2015): e0130610.

Balasubramanian S. et al. "Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?." *Nature reviews Drug discovery* 10.4 (2011): 261-275.

Bañuelos S. et al. "Recognition of intermolecular G-quadruplexes by full length nucleophosmin. Effect of a leukaemia-associated mutation." *FEBS letters* 587.14 (2013): 2254-2259.

Chiarella S. et al. "Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA." *Nucleic acids research* 41.5 (2013): 3228-3239.

Đapić V. et al. "Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides." *Nucleic acids research* 31.8 (2003): 2097-2107.

Falini B. et al. "Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype." *New England Journal of Medicine* 352.3 (2005): 254-266.

Gallo A. et al. "Structure of nucleophosmin DNA-binding domain and analysis of its complex with a G-quadruplex sequence from the c-MYC promoter." *Journal of Biological Chemistry* 287.32 (2012): 26539-26548. PDB: 2LLH

Hellman LH. and Fried MG. "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions." *Nature protocols* 2.8 (2007): 1849-1861.

Koike A. et al. "Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates." *Cancer research* 70.17 (2010): 6746-6756.

Lee HH. et al. "Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer–pentamer interface." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 69.3 (2007): 672-678. PDB: 2P1B.

Monecke T. et al. "Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP." *Science* 324.5930 (2009): 1087-1091.

Negi S. and Olson M. "Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23." *Journal of cell science* 119.17 (2006): 3676-3685.

Wang D. et al. "The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end." *Journal of Biological Chemistry* 269.49 (1994): 30994-30998.