

La diversidad funcional de proteína fosfatasa-1 y el papel de nuevas subunidades reguladoras

Recibido el 23 de febrero de 2006

JOSÉ MIGUEL ORTIZ MELÓN *

*Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria*

RESUMEN

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo que regula una gran variedad de procesos celulares y en particular la transmisión de señal. La proteína fosfatasa-1 (PP1) representa el mayor grupo de serina/treonina proteína fosfatasas. PP1 regula el metabolismo del glucógeno, el transporte intracelular, la contracción muscular, la síntesis proteica y la división celular. Esta diversidad funcional es consecuencia de la unión de un pequeño número de subunidades catalíticas con una amplia diversidad de subunidades reguladoras. Describimos aquí la proteína SIPP1, un factor del procesamiento de pre-mRNA que se une a PP1 y a la proteína PQBP-1. Dado que mutaciones en PQBP-1 es una de las causas del síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X y que por otra parte, PQBP-1 se une a ataxina-1 y a otras proteínas con extensiones de poliglutamina causantes de enferme-

* *Correspondencia:* José Miguel Ortiz Melón. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. 39011 Santander. Telf.: 942 202 941. Fax: 942 201 945.

e-mail: ortizjm@unican.es

Abreviaturas: AKAP: A-kinase anchoring protein; Cdc: Cell división cycle; CPI-17: Protein kinase C-potentiated inhibitory protein of PP1; DARP32: Dopamine and cAMP-regulated phosphorotein of 32,000; EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein; GADD34: Growth arrest and DNA damage protein 34; GST: Glutathione-S-transferase; LRR: Leucine-rich repeats; MYPT: Myosin phosphatase targeting subunit; Nek2: NIMA-related kinase 2; NIPP1: Nuclear inhibitor of PP1; NLS: Nuclear localization signal; PP1: Protein phosphatase 1; PP2A/2B: Protein phosphatase 2.^a, 2B; PQBP1: Poliglutamine binding protein 1; SCA-1: Spino cerebellar ataxia 1; SIPP1: Splicing factor that interacts with PQBP1 and PP1; XLMR: X-linked mental retardation.

dades neurodegenerativas, SIPP-1 puede estar implicado en la patogénesis de estas enfermedades.

Palabras clave: PP1.—Moduladores.—SIPP1.—Procesamiento.—Pre-mRNA.

ABSTRACT

The functional diversity of protein phosphatase-1 and the role of new regulatory subunits

Reversible protein phosphorylation is a mechanism that regulates many cellular processes and in particular signal transduction. Protein phosphatase-1 (PP1) is the major group of serin/threonin protein phosphatases. PP1 regulates glycogen metabolism, intracellular transport, muscle contraction, protein synthesis and cell division. The functional diversity of PP1 is due to a small number of catalytic subunits which bind to a large number of regulatory subunits. We describe here the identification of SIPP1, a new interactor, which is an splicing factor of pre-mRNA and binds also PQBP-1 protein. Since mutations in PQBP-1 have been reported in cases of X-linked mental retardation and PQBP-1 binds ataxin-1 and other poliglutamine disease proteins SIPP1 could be an element in the pathogenesis of neurodegenerative disease.

Key words: PP1.—Interactors.—SIPP1.—Splicing.—Pre-mRNA.

LA FOSFORILACIÓN REVERSIBLE DE PROTEÍNAS

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo de regulación celular que afecta a una gran variedad de procesos como el metabolismo, la replicación de DNA, la expresión genética o el ciclo celular (1). Aproximadamente un tercio de todas las proteínas intracelulares están sujetas a regulación por fosforilación, lo que refleja la importancia y diversidad de las funciones reguladas por este mecanismo. El nivel de fosforilación de una proteína es crítico en muchas situaciones y está determinado por las actividades relativas de dos tipos de enzimas opuestos: proteína quinasas y proteína fosfatasas. Las proteína quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo γ -fosforilo desde ATP al grupo OH de los aminoácidos serina, treonina y/o tirosina de proteínas específicas. Las proteína fosfatasas son enzimas hidrolíticos que eliminan un grupo fosforilo de los sustratos (proteínas) fosforilados (Figura 1). La con-

secuencia de estas modificaciones es que cambios en el estado de fosforilación de una proteína pueden afectar a la estructura o actividad de una proteína, a su afinidad a ligandos o a su estabilidad. La regulación de quinasas y fosfatasas proporciona a la célula, por otra parte, capacidad para cambiar rápidamente el estado de fosforilación de proteínas en respuesta a estímulos fisiológicos.

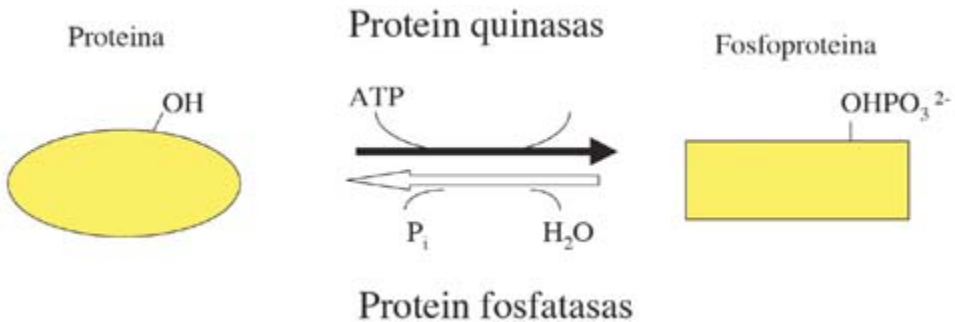


FIGURA 1. Fosforilación reversible de proteínas.

LA SUBUNIDAD CATALÍTICA DE PROTEÍNA FOSFATASA-1

El enzima Proteína fosfatasa-1 es un miembro de la familia de serina/treonina fosfatasas denominada PPP. Esta familia incluye también las subfamilias de PP2A, PP4, PP6, PP2B, PP5 y PP7 (2). Todos estos enzimas tienen una subunidad catalítica de estructura similar. En mamíferos hay tres genes diferentes que dan lugar a cuatro isoformas denominadas PP1 α , PP1 β (también conocida como PP1 δ), PP1 γ 1 y PP1 γ 2. Estas dos últimas isoformas se producen como consecuencia del procesamiento alternativo de un mismo gen. Con la excepción de PP1 γ 2, que se expresa predominantemente en testículos y cerebro, las otras isoformas PP1 α , PP1 β y PP1 γ 1 se expresan en todos los tejidos de mamíferos (3). Las cuatro isoformas comparten una estructura primaria de 260 aminoácidos, prácticamente idéntica, y sus diferencias se limitan a las regiones N y C-terminales. Las isoformas de PP1 muestran una distinta localización subcelular. Así, cada isoforma está presente en el núcleo y en el citoplasma durante la interfase, pero dentro del núcleo PP1 α está

asociado a la matriz nuclear, PP1 β se distribuye por todo el núcleo, mientras que PP1 γ 1 está enriquecida en el nucleolo (4). En neuronas, PP1 β co-localiza con el soma y PP1 γ 1 se localiza en sinapsis (5). Esta distinta localización es debido a diferencias en su afinidad por proteínas diana.

La estructura tridimensional de PP1 es la de un núcleo elíptico con la cadena polipeptídica plegada en 10 α -hélices y 3 láminas β (Figura 2). El centro de la molécula está compuesta por un par de láminas β empaquetadas en forma paralela formando una estructura de tipo sandwich β . El sitio catalítico se localiza en el punto de unión de una hendidura en forma de Y, en la superficie de la molécula. Los tres brazos de la Y se conocen como los canales hidrofóbico, ácido y C terminal. Los aminoácidos invariantes presentes en la parte central del sandwich β interactúan con un par de metales iónicos formando un centro binuclear metálico que cataliza la reacción de fosforilación en una sola etapa, implicando a una molécula de agua activada por metal (6).

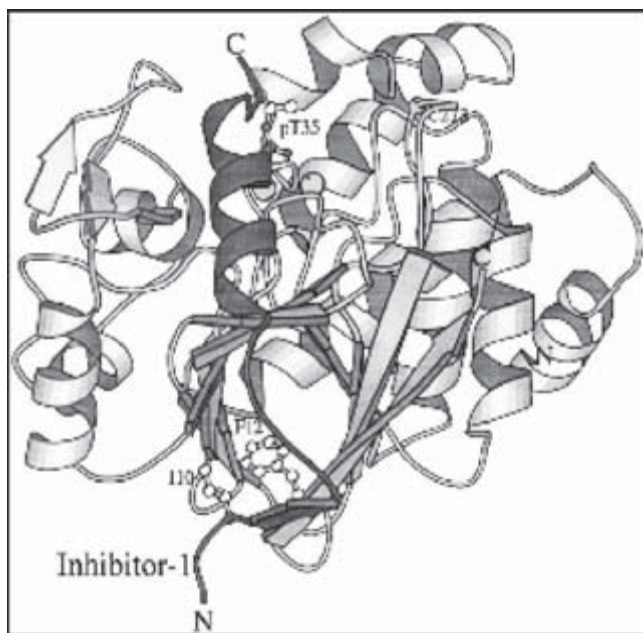


FIGURA 2. Modelo de cintas de la estructura cristalina de la subunidad catalítica de PP1 unida al Inhibidor-1, una proteína reguladora que contiene el motivo RVXF.

El lazo β 12- β 13 protuberante que separa los canales ácido y C terminal contienen una secuencia de aminoácidos no conservada. Esta región, determina la especificidad hacia toxinas inhibitoras como el ácido okadaico, la microcistina -LR, calyculina A y tautomicina y es indispensable para la unión de inhibidores endógenos como el Inhibidor-1, Inhibidor-2 y NIPP1 (7).

Sobre la regulación de su actividad, se sabe que la proteína del ciclo celular Cdc2 fosforila al residuo Thr320 de PP1 cerca del extremo C terminal en fases tempranas de la mitosis. Esto produce la inhibición de PP1 y permite la entrada en mitosis (8). En células en reposo, la regulación de la actividad PP1 no se ejerce por fosforilación de la subunidad catalítica sino por interacciones con diferentes subunidades reguladoras.

HOLOENZIMAS DE PP1

La subunidad catalítica de PP1 descrita anteriormente no existe como proteína libre en las células, sino que ésta, se encuentra unida a un amplio número de proteínas reguladoras constituyendo holoenzimas con diferentes funciones. Hasta la fecha, se han identificado 70 subunidades reguladoras (Tabla 1). De este modo, además de a través de las isoformas, la diversidad de PP1 ha ido aumentando gradualmente durante la evolución por la gran expansión del número de subunidades reguladoras. Una expansión similar ha tenido lugar en el caso del enzima PP2A. En contraste con esta situación, las proteínas quinasas parecen haber seguido una ruta diferente, al haberse diversificado por aumento en el número de subunidades catalíticas. A pesar de esta diferente estrategia de diversificación, el número de ser/tre proteína quinasas y fosfatasa es probablemente igual cuando las consideramos a nivel de holoenzimas.

Las subunidades reguladoras de PP1 se pueden dividir en tres grupos: *a*) moduladores de la actividad enzimática, *b*) proteínas localizadoras-especificadoras de sustrato, y *c*) sustratos (9). Las proteínas típicamente inhibitoras como el Inhibidor-1, DARPP-32, Inhibidor-2 o CPI-17, bloquean la actividad de PP1 frente a todos los sustratos, inducen cambios de conformación en PP1, o se unen al sitio catalítico en su estado fosforilado como pseudo-sustratos. Las

proteínas especificadoras aumentan la actividad fosfatasa hacia algunos sustratos, pero la disminuyen frente a otros. Muchas veces actúan como proteínas localizadoras, anclando a PP1 en localizaciones subcelulares específicas que también contienen sustratos. Por ejemplo, MYPT ancla PP1 a las miofibrillas del tejido muscular y aumenta su actividad específica hacia miosina, pero disminuye su actividad hacia otros sustratos como la glucógeno fosforilasa. Otras subunidades localizadoras están representadas por proteínas que contienen una señal de localización nuclear (NLS) y dirigen a PP1 hacia el núcleo. El tercer grupo de proteínas son sustratos modificados por PP1. Así, por ejemplo, PP1 se asocia directamente con la proteína tirosina fosfatasa Cdc25. La defosforilación de Cdc25 en Ser287 se asocia con la activación de la fosfatasa y representa una etapa clave de regulación en la inducción de la mitosis (10). Otro ejemplo es Nek-2 que es, a la vez, sustrato y proteína localizadora de PP1 al centrosoma.

Las subunidades reguladores de PP1 pueden ser clasificados también como moduladores primarios y secundarios en base a si se originaron como reguladores de PP1 primitivamente, o si adquirieron sitios de unión a PP1 más tarde, en el curso de la evolución.

TABLA 1. *Moduladores de PP1*

Moduladores	Isoformas y homólogos
AKAIs	Inhibidor-1, DARPP32, PPP1R1C
AKAP149	—
AKAP220	—
AKAP450	AKAP450/AKAP350/CG-NAP/Yotiao
ASPPs	ASPP1, ASPP2/p53BP2
Aurora quinasas	Aurora-A, Aurora-B, Ip1(Y)
Bcls	Bcl-2, Bcl-x _L , Bcl-w
BH-protocadherina	—
Bifocal (D)	—
Cdc25	—
Focal adhesión quinasas	—
GADD34s	GADD34, ICP34.5/γ134.5, CreP
Gip1(Y)	—
Grp78	—
G-sustrato	—
G-subunidades	G _M , G _L , G _C , G _D , G _E , G _F , G _C , Gac1(Y), Pig2(Y)

TABLA 1. *Moduladores de PP1 (continuación)*

Moduladores	Isoformas y homólogos
Host-cell-factor	—
Hox11	—
PP2A inhibidores	I ₁ ^{PP2A} /PHAP-I; I ₂ ^{PP2A} /SET/PHAP-IL/TAF-1β
Inhibidor-2	Inhibidor-2, Glc8(Y)
Inhibidor-3	Inhibidor-3/HCG-V, Yfr003c(Y)
Klp38B(D)	—
MYPTs	MYPT1/M110/M130, MYPT2/M20
N-CoR	—
Mek2	—
Neurabinas	Neurabina-I, Neurabina-II/espinofilina
Neurofilamento-L	—
NIPP1	NIPP1/Ard1
Pan 1(Y)	—
Phactrs	Phactr-1,2,3
PHIs	PHI-1/2, CPI-17, KEP1
Fosfofructoquinasa	—
PKR	—
PRIP-1	PRIP-1/p130
Proteína quinasa R	—
PNUTS	PNUTS/R111/p99
PP-1bp80	—
PSF	—
Regs(Y)	—
Retinoblastoma	—
Ribosoma L5	—
RIPP1	—
SARAs	SARA, Endofin
Scd5(Y)	—
Sds22	Sds22/Egp1
Sla1(Y)	—
SNF5	SNF5/INI1
SIPP1	SNP70/NpwBP
Staufen	—
Tau	—
Trithorax	—
TIMAPs	—
Vitamina D ₃ receptor	—

Proteínas que interactúan con PP1. La primera columna muestra en orden alfabético los nombres generales de familias de reguladores de PP1 o el de un representante. Reguladores de levadura y *Drosophila* se designan por (Y) y (D). En la segunda columna los nombres de isoformas y homólogos están separados por / mientras que sinónimos y homólogos están separados por un guión.

LA UNIÓN DE LAS SUBUNIDADES REGULADORAS A PP1. EL SITIO RVXF

Los numerosos moduladores de PP1 no están, como cabría esperar, relacionados estructuralmente. Para poder explicar la situación paradójica de proteínas diferentes capaces de unirse a PP1, se ha propuesto la existencia de motivos de secuencia de aminoácidos tanto en la subunidad catalítica como en las reguladoras, que funcionan como sitios de unión múltiple y que pueden ser compartidos entre sí por diferentes moduladores. Esto constituiría la base de un control combinatorio de PP1, por el que la actividad y especificidad de sustrato de los holoenzimas estaría determinada por la combinación de los sitios de unión que están ocupados.

El mejor conocido y más abundante de estos motivos es el llamado motivo RVXF, en el que X representa cualquier residuo. Este motivo se une a una conformación extendida en el canal hidrofóbico de la molécula de PP1. Los residuos hidrofóbicos que se unen al motivo RVXF están muy conservados en las isoformas de PP1, pero no están presentes en las de PP2A o PP2B, lo que explica, al menos en parte, la selectividad de las proteínas que interaccionan con cada una de las fosfatasas, a pesar de la semejanza en la estructura de las subunidades catalíticas.

A pesar de su importancia, la unión al motivo RVXF tiene escaso efecto en la conformación y actividad de PP1 (11). Hay evidencia no obstante, de que es crucial para los efectos de las subunidades reguladoras sobre PP1. Así por ejemplo, se ha visto que péptidos sintéticos que contienen este motivo, interfieren con la unión de muchos reguladores y afectan las propiedades de muchos holoenzimas. Una interpretación de estos hallazgos es que la unión del motivo RVXF a PP1 aumentaría la concentración local del regulador y promovería la unión de sitios de unión secundarios, lo que determinaría la actividad y/o especificidad del enzima. De acuerdo con esta idea, se ha descrito que en la interacción de MYPT a PP1 la unión del motivo RVXF es un pre-requisito para la unión cooperativa de otros motivos de MYPT a PP1 (12). Es interesante constatar que con frecuencia se encuentran residuos serina o treonina en la proximidad del motivo RVXF y que estos pueden ser fosforilados *in vivo*, lo que da lugar a una disminución de la afinidad del motivo RVXF por PP1.

El motivo RVXF está presente en la mayoría de los moduladores de PP1 conocidos y por algún tiempo se pensó que esto implicaba el que PP1 no podía interactuar simultáneamente con más de un regulador. Sin embargo, observaciones recientes apoyan el concepto de que fosfo-inhibidores y otros reguladores que contienen el motivo RVXF pueden unirse a PP1 simultáneamente. Así por ejemplo el Inhibidor-1 se une a la proteína GADD34, la cual se une también a PP1 formando un complejo trimérico (13). Asimismo moduladores como la proteína quinasa Aurora A (14) o el factor de procesamiento de pre-mRNA SIPP1 (15) contiene dos motivos RVXF funcionales, indicando que pueden interactuar con PP1 en dos maneras diferentes.

OTROS SITIOS DE INTERACCIÓN

Además del motivo RVXF, la mayoría de los moduladores de PP1 contienen sitios de unión secundarios que regulan la especificidad de sustrato o actividad catalítica de PP1. Muchas veces estos sitios de interacción secundarios se sitúan próximos al motivo RVXF. Por ejemplo, el motivo RVXF de NIPP1 está flanqueado por una secuencia polibásica inhibitoria (16). Análogamente, la estructura del complejo de PP1 y el dominio N-terminal de NIPP1 ha revelado que los aminoácidos N-terminal al motivo RVXF remodelan la hendidura catalítica para acomodar la miosina con afinidad aumentada (17). Las proteínas antiapoptóticas Bcl-Xl y Bcl-w contienen, además del motivo RVXF, un motivo FXXR XR que parece estar presente en otros reguladores de PP1 (18). Una tira de seis residuos a continuación del motivo RVXF de neurabina media la interacción selectiva con la isoforma PP1 γ 1 (19). Otros sitios secundarios de interacción se encuentran más alejados del motivo RVXF. Por ejemplo, MYPT contiene repeticiones ankyrina que interactúan específicamente con el extremo C-terminal de PP1 (17). Los determinantes inhibitorios de la subunidad reguladora AKAP220 están localizados a unos 500 aminoácidos del motivo RVXF (11).

Algunos reguladores como Sds22 o el Inhibidor-2 no contienen un motivo RVXF, pero poseen sitios únicos de unión a PP1. Así, Sds22 contiene 12 repeticiones de aminoácidos ricos en leucina (LRR). El Inhibidor-2 contiene al menos cinco sitios de unión a PP1.

Entre ellos hay un motivo IKGI inhibitorio, que se une a un sitio cercano al sitio de unión de RVXF, y un motivo KLHY, del que se predice que funciona como un motivo RVXF y se une al canal de unión de RVXF (20).

FUNCIÓN DE HOLOENZIMAS DE PP1

La proteína fosfatasa PP1 regula numerosos procesos celulares. Así por ejemplo, en el proceso de obtención de energía, cuando los nutrientes son abundantes, PP1 estimula el uso de los materiales más eficientes desde el punto de vista energético, aumentando el almacenamiento de energía en forma de glucógeno y deprimiendo las rutas anabólicas (Figura 3). En un contexto diferente, PP1 posibilita la relajación de la actomiosina durante la contracción muscular, el retorno a patrones basales de síntesis proteica y el reciclado de factores de transcripción y procesamiento de m-RNA. PP1 juega también un papel clave en la recuperación del estrés, aunque favorece la apoptosis cuando el daño celular es grande. PP1 regula asimismo bombas y

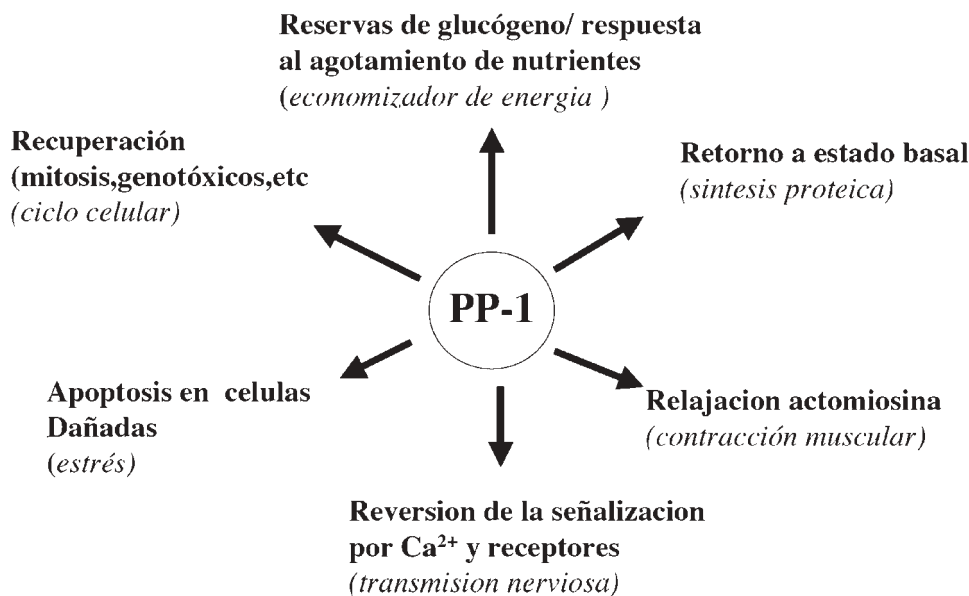


FIGURA 3. Funciones de PP1.

transportadores de iones en varios tejidos y canales iónicos implicados en la excitación neuronal. Finalmente, PP1 promueve la salida de mitosis en el ciclo celular. Este conjunto de funciones han llevado a Ceulemans y Bollen (21) a proponer que PP1 actúa fisiológicamente como un economizador celular y como un comando de reinicio tras la activación de numerosos procesos celulares.

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS SUBUNIDADES REGULADORAS: SIPP1

De consideraciones sobre el número de isoformas y subunidades reguladoras identificadas se deduce que un número todavía importante de subunidades reguladoras aún no han sido descritas. Su identificación y caracterización es importante para poder conocer muchos aspectos de la regulación celular. Para identificar nuevas subunidades reguladoras de PP1 se han utilizado varias aproximaciones experimentales. Inicialmente se encontraron nuevos reguladores durante la caracterización de holoenzimas de PP1 purificados (22). Más recientemente, se han empleado herramientas de bioinformática y espectroscopia de masas. En nuestro grupo, hemos empleado el método de los dos híbridos para rastrear una genoteca de embrión de ratón con las isoformas de PP1 γ 2 y δ . Con ambas subunidades catalíticas se encontró una proteína que no había sido anteriormente relacionada con PP1 (15). Esta proteína había sido previamente descrita como una proteína que interaccionaba en el núcleo con la proteína PQBP-1/Npw38 (23) y también como una proteína capaz de interaccionar con dominios SH3 *in vitro* (24). Dado que durante su caracterización, hemos encontrado que funciona como un factor de procesamiento de pre-mRNA, hemos rebautizado a esta proteína con el nombre de SIPP1 por «factor de splicing que interacciona con PQBP1 y PP1». La proteína SIPP1 tiene 641 residuos de aminoácidos y es una proteína modular con una señal bipartita de localización nuclear (NLS), una región coiled-coil, dos regiones ricas en residuos de prolina y una región rica en residuos de aspartato.

Empleando fusiones de GST con diferentes fragmentos de SIPP1 así como co-inmunoprecipitación hemos demostrado que SIPP1 interacciona con PP1 tanto *in vivo* como *in vitro*. La proteína SIPP1 con-

tiene una secuencia canónica RVXF (R217 KVGf221) y un motivo «RVXF-like» (L306 SVRF310) de unión a PP1. Estudios de mutagénesis han mostrado que ambos motivos están implicados en esta unión. El co-inmunoprecipitado a partir de lisados celulares con SIPP1 resultó ser completamente inactivo, lo que indica que la actividad PP1 estaría totalmente inhibida. Fragmentos de SIPP1 obtenidos en *E. coli*, y que contienen los sitios RVXF, resultan ser solo moderadamente inhibidores, por lo que es posible que los fragmentos de SIPP1 recombinante obtenidos en *E. coli* no posean la conformación adecuada o no hayan sido modificados convenientemente. Asimismo, es también posible que co-inmunoprecipite un tercer componente importante para conseguir la inhibición completa.

FUNCIÓN DE SIPP1 Y PP1 ASOCIADA

Varias líneas de evidencia indican que SIPP1 es un factor de procesamiento de pre-mRNA. Así, en primer lugar, SIPP1 interacciona con RNA (23) y con la proteína PQBP1. Ésta, a su vez, se une a otro factor de procesamiento, la proteína U5-15K, un componente del complejo U4/U6.U5 compuesto por varias proteínas unidas a RNA de pequeño tamaño (snRNP). En segundo lugar, estudios de localización subcelular con fusiones EGFP-SIPP1 muestran que la proteína se localiza en compartimentos nucleares denominados «speckles», que funcionan como lugares de almacenamiento y/o ensamblaje de factores proteicos de la maquinaria del procesamiento de pre-mRNA. Por otra parte, la proteína SIPP1 se ha identificado por espectrometría de masas como un componente de los espliceosomas (25). De acuerdo con un posible papel en el procesamiento de pre-mRNA, se ha encontrado, que un fragmento de 192 aminoácidos (180-372) bloquea casi totalmente el procesamiento de pre-mRNA en extractos nucleares. Por otro lado, utilizando un sistema experimental constituido por una construcción que contiene los genes de β -galactosidasa y luciferasa separados por una secuencia intrónica, se ha encontrado, que SIPP1 era capaz de aumentar la eficiencia de procesamiento del gen reportero más de dos veces, en tanto que fragmentos derivados de SIPP1 no tenían este efecto (26). Asimismo, mutantes en los que SIPP1 se acumula en el citoplasma, son mucho menos efectivos en estimular el procesamiento. Todo ello

indica que SIPP1 afecta el procesamiento de m-RNA. Ahora bien ¿cómo activa SIPP1 el procesamiento de m-RNA? Makarowa y colaboradores (27) han encontrado que SIPP1 y PQBP1 se encuentran asociados establemente con un complejo que no ha experimentado activación catalítica. En resumen, parece que además de una función en el ensamblaje o activación del espliceosoma, SIPP1 podría jugar un papel en la catálisis del «splicing». Finalmente, SIPP1 podría afectar al procesamiento de pre-mRNA, por su capacidad, para «marcar» a factores proteicos específicos para su defosforilación por PP1. En este sentido la desorganización de espliceosomas (que tiene lugar tras la etapa de catálisis) y la relocalización de los factores a los «speckles» se han asociado con sucesos de defosforilación (Figura 4). Algunos factores de procesamiento tienen también funciones en otros procesos como en la transcripción.

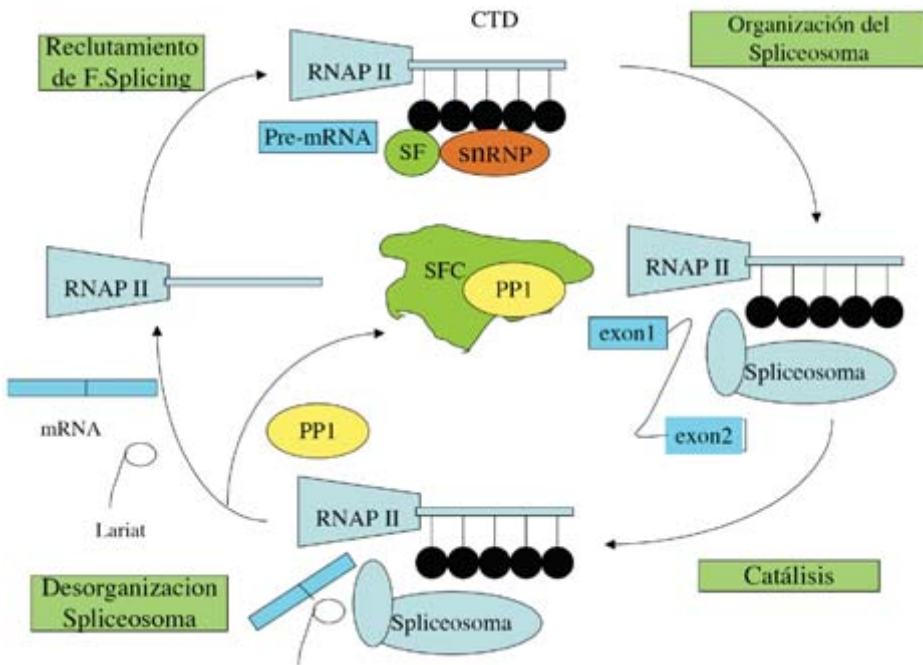


FIGURA 4. Posibles funciones de PP1 en el procesamiento de pre-mRNA.

Un mejor conocimiento de la función de SIPP1 puede tal vez proceder de un mejor conocimiento de sus ligandos. Así, el dominio C

terminal de SIPP1, que es necesario para su localización en los «spec-les», contiene una secuencia rica en prolina que media la unión al dominio WW de PQBP1/Npw38. Este mismo dominio WW se une también al dominio C terminal de RNA polimerasa II y esta interacción aumenta por la fosforilación de este dominio (28).

La mutación de las cuatro secuencias de señalización nuclear (NLS) de SIPP1 no es capaz de impedir su localización nuclear. Esto indica que SIPP1 puede ser traslocado al núcleo por otra proteína, posiblemente PQBP1. PQBP1 es abundante en cerebro y en particular en el cortex e hipocampo, y podría suceder que en estas regiones, la traslocación de SIPP1 estuviera influida por la concentración de PQBP1. La proteína PQBP1 por su parte, se ha asociado recientemente con el síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X (XLMR) por el cual, mutaciones en este gen dan lugar a proteína PQBP1 trunca-da. Debido a que PQBP1 y SIPP1 son co-transportados al núcleo, es posible que algunos efectos de dichas mutaciones puedan ser debidos a una deficiente acumulación nuclear de SIPP1. Resultaría muy interesante examinar la distribución subcelular de SIPP1 en las células de pacientes de retraso mental asociado a mutaciones de SIPP1.

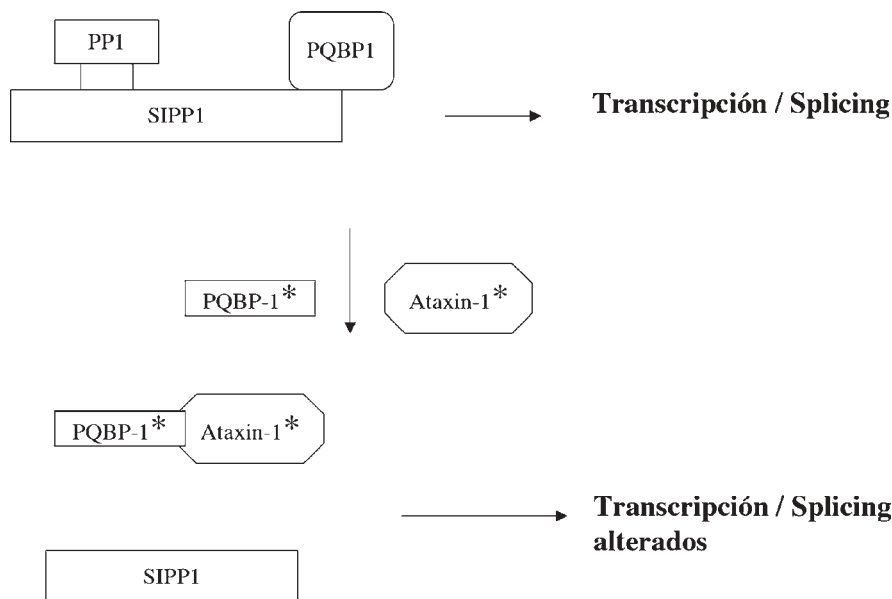


FIGURA 5. SIPP1 y proteínas interaccionantes.

La proteína PQBP1 interacciona también con otras proteínas como ataxina-1, que contienen extensiones de poliglutamina. Esta interacción está aumentada en los casos en los que como consecuencia de mutación, las extensiones de poliglutamina aumentan en número como en el caso de la ataxia espinocerebelar tipo 1 (SCA-1) (29). Una consecuencia del aumento de la interacción PQBP1/ataxina 1 es un aumento de la unión de PQBP-1 al dominio C terminal de RNA polII y por tanto una disminución de la transcripción. Dado que SIPP1 y RNA polII interaccionan con el dominio WW de PQBP1, se puede suponer que la unión de PQBP1 a las extensiones de poliglutamina aumentarían la interacción PQBP1-SIPP1 y por tanto interferiría con la función de SIPP1 en el procesamiento de pre mRNA (Figura 5). Enfermedades neurodegenerativas del tipo de la ataxia tipo 1, o la enfermedad de Huntington, se caracterizan por la formación de agregados nucleares que se forman por extensiones de poliglutamina expandidas. En este contexto la co-expresión de PQBP1 y sus ligandos, ya sea la proteína U5-15K, ataxina 1 o SIPP1, siempre resulta en la formación de cuerpos nucleares de inclusión similares a los que son nucleados por los productos proteicos de los genes de las enfermedades citadas. En todos los casos PQBP1 rodea estos cuerpos de inclusión indicando que los ligandos de PQBP1 siembran las inclusiones. En resumen, estos datos sugieren que SIPP1 puede contribuir a la patología de las enfermedades neurodegenerativas debidas a extensiones de poliglutamina.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HUNTER, T. (2000): «Signaling-2000 and beyond». *Cell* 100: 113-27.
- (2) BARFORD, D.; DAS, A. K., EGLOFF, M. P. (1998): «The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation». *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 133-64.
- (3) SASAKI, K.; SHIMA, H.; KITAGAWA, Y.; IRINO, S.; SUGIMURA, T., NAGAO, M. (1990): «Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alfa in rat hepatocellular carcinomas». *Jpn. J. Cancer Res* 81: 1272-1280.
- (4) ANDREASSEN, P. R.; LACROIX, F. B.; VILLA-MORUZZI, E., MARGOLIS, R. L. (1998): «Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells». *J Cell Biol* 141: 1207-15.

- (5) STRACK, S.; KINI, S.; EBNER, F. F.; WADZINSKI, B. E., COLBRAN, R. J. (1999): «Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain». *J Comp Neurol* 413: 373-84.
- (6) EGLOFF, M. P.; COHEN, P. T.; REINEMER, P., BARFORD, D. (1995): «Cristal structure of the catalytic subunit of the human protein phosphatase 1 and its complex tungstate». *J. Mol. Biol.* 254: 942-59.
- (7) CONNOR, J. H.; KLEEMAN, T.; BARIK, S.; HONKANEN, R. E., SHENOLIKAR, S. (1999): «Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors». *J Biol Chem* 274: 22366-72.
- (8) KWON, Y. G.; HUANG, H. B.; DESDOUITS, F.; GIRAULT, J. A.; GREENGARD, P., NAIRN, A. C. (1997): «Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins». *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3536-41.
- (9) BOLLEN, M. (2001): «Combinatorial control of protein phosphatase-1». *Trends Biochem Sci* 26: 426-31.
- (10) MARGOLIS, S. S.; WALSH, S.; WEISER, D. C.; YOSHIDA, M.; SHENOLIKAR, S., KORNBLUTH, S. (2003): «PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation». *Embo J* 22: 5734-45.
- (11) SCHILLACE, R. V.; VOLTZ, J. W.; SIM, A. T.; SHENOLIKAR, S., SCOTT, J. D. (2001): «Multiple interactions within the AKAP220 signaling complex contribute to protein phosphatase 1 regulation». *J Biol Chem* 276: 12128-34.
- (12) TOTH, A.; KISS, E.; HERBERG, F. W.; GERGELY, P.; HARTSHORNE, D. J., ERDODI, F. (2000): «Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance». *Eur J Biochem* 267: 1687-97.
- (13) CONNOR, J. H.; WEISER, D. C.; LI, S.; HALLENBECK, J. M., SHENOLIKAR, S. (2001): «Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1». *Mol Cell Biol* 21: 6841-50.
- (14) KATAYAMA, H.; ZHOU, H.; LI, Q.; TATSUKA, M., SEN, S. (2001): «Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle». *J Biol Chem* 276: 46219-24.
- (15) LLORIAN, M.; BEULLENS, M.; ANDRÉS, I.; ORTIZ, J. M., BOLLEN, M. (2004): «SIPP1, a novel pre-mRNA splicing factor and interactor of protein phosphatase-1». *Biochem J* 378: 229-38.
- (16) BEULLENS, M.; VAN EYNDE, A.; VULSTEKE, V.; CONNOR, J.; SHENOLIKAR, S.; STALMANS, W., BOLLEN, M. (1999): «Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1». *J Biol Chem* 274: 14053-61.
- (17) TERRAK, M.; KERFF, F.; LANGSETMO, K.; TAO, T., DOMÍNGUEZ, R. (2004): «Structural basis of protein phosphatase 1 regulation». *Nature* 429: 780-4.
- (18) GARCÍA, A.; CAYLA, X.; CAUDRON, B.; DEVEAUD, E.; RONCAL, F., REBOLLO, A. (2004): «New insights in protein phosphorylation: a signature for protein phosphatase 1 interacting proteins». *C R Biol* 327: 93-7.
- (19) CARMODY, L. C.; BAUMAN, P. A.; BASS, M. A.; MAVILA, N.; DEPAOLI-ROACH, A. A., COLBRAN, R. J. (2004): «A protein phosphatase-1gamma1 isoform selectivity determinant in dendritic spine-associated neurabin». *J Biol Chem* 279: 21714-23.

- (20) YANG, J.; HURLEY, T. D., DEPAOLI-ROACH, A. A. (2000): «Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif». *J Biol Chem* 275: 22635-44.
- (21) CEULEMANS, H., BOLLEN, M. (2004): «Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button». *Physiol Rev* 84: 1-39.
- (22) CAMPOS, M.; FADDEN, P.; ALMS, G.; QIAN, Z., HAYSTEAD, T. A. (1996): «Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography». *J Biol Chem* 271: 28478-84.
- (23) KOMURO, A.; SAEKI, M., KATO, S. (1999): «Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine». *J Biol Chem* 274: 36513-9.
- (24) CRAGGS, G.; FINAN, P. M.; LAWSON, D.; WINGFIELD, J.; PERERA, T.; GADHER, S.; TOTTY, N. F., KELLIE, S. (2001): «A nuclear SH3 domain-binding protein that colocalizes with mRNA splicing factors and intermediate filament-containing perinuclear networks». *J Biol Chem* 276: 30552-60.
- (25) ZHOU, Z.; LICKLIDER, L. J.; GYGI, S. P.; REED, R. (2002): «Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome». *Nature* 419: 182-5.
- (26) LLORIAN, M.; BEULLENS, M.; LESAGE, B.; NICOLAESCU, E.; BEKE, L.; LANDUYT, W.; ORTIZ, J. M., BOLLEN, M. (2005): «Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1». *J Biol Chem* 280: 38862-9.
- (27) MAKAROVA, O. V.; MAKAROV, E. M.; URLAUB, H.; WILL, C. L.; GENTZEL, M.; WILM, M., LUHRMANN, R. (2004): «A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing». *Embo J* 23: 2381-91.
- (28) WASHINGTON, K.; AMMOSSOVA, T.; BEULLENS, M.; JEREBSOVA, M.; KUMAR, A.; BOLLEN, M., NEKHAI, S. (2002): «Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II». *J Biol Chem* 277: 40442-8.
- (29) OKAZAWA, H.; RICH, T.; CHANG, A.; LIN, X.; WARAGAI, M.; KAJIKAWA, M.; ENOKIDO, Y.; KOMURO, A.; KATO, S.; SHIBATA, M.; HATANAKA, H.; MOURADIAN, M. M.; SUDOL, M., KANAZAWA, I. (2002): «Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death». *Neuron* 34: 701-13.