



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
de Ciencias Biológicas

MECANISMOS MOLECULARES DE ACTIVACIÓN DE
NF- κ B REGULADOS POR EL COACTIVADOR TIF2

Ignacio Martín Nojek Barbieri

Director de tesis: **Dra. Mónica Alejandra Costas**

**Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones
Médicas Dr. Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires**

Buenos Aires, Noviembre de 2005

A Patricia Barbieri y Carlos Nojek

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale”.

Marie Curie (1867 - 1934)

“Don't gain the world and lose your soul, wisdom is better than silver or gold”.

Bob Marley (1945-1981)

RESUMEN**MECANISMOS MOLECULARES DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B REGULADOS POR EL COACTIVADOR TIF2**

NF- κ B es un factor de transcripción que induce numerosas respuestas biológicas. Previamente habíamos demostrado que la sobreexpresión de coactivadores de receptores nucleares aumentaba la actividad transcripcional de NF- κ B en forma dosis dependiente. En este trabajo se estudió el mecanismo molecular por el cual el coactivador TIF2 regula la actividad de NF- κ B y la importancia fisiológica de esta interacción. Encontramos que TIF2 interacciona físicamente y en forma directa con RelA, que la actividad de TIF2 es necesaria para una óptima actividad de NF- κ B, y que no es redundante con la actividad de los otros miembros de coactivadores de la familia p160. Demostramos que TIF2 interacciona físicamente y en forma directa con p38 MAPK, y que posee etiquetas de fosforilación para p38 MAPK. En particular encontramos que TIF2 es sustrato de p38, y su actividad modulada en respuesta a TNF- α . Encontramos que p38 α y β promueven la degradación de I κ B α en respuesta a TNF- α , y que la fosforilación por p38 en la serina 1323 de TIF2 es requerimiento para una actividad óptima de TIF2. Además encontramos que TIF2 está localizado en el citoplasma y que TIF2 es capaz de asociarse a complejos inactivos de NF- κ B, que en respuesta a TNF- α se vuelven activos y migran al núcleo. De acuerdo con estos resultados, propusimos un modelo molecular por el cual TIF2 regula en forma positiva la actividad transcripcional de NF- κ B a través de la formación de un complejo general activo formado por TIF2, p38 MAPK, RelA, IKK e I κ B.

Palabras clave: NF- κ B, actividad transcripcional, coactivadores, TIF2, p38 MAPK, I κ B α , IKK.

ABSTRACT**NF- κ B MOLECULAR ACTIVATION MECHANISMS REGULATED BY TIF2 COACTIVATOR**

NF- κ B transcription factor induces numerous biologic responses. We have previously found that over expression of nuclear receptor coactivators enhanced NF- κ B transcriptional activity in a dose response manner. In this thesis work we studied the molecular mechanisms by which TIF2 regulates NF- κ B activity and the physiological importance of this interaction. We found that TIF2 physically interacts in a direct way with RelA. Moreover, TIF2 activity is necessary for an optimal activity of NF- κ B, and this activity is not redundant with the other coactivator members of the p160 family. We demonstrated that TIF2 physically interacts in a direct way with p38 MAPK, and that it has phosphorylation tags for this kinase. In particular, we found that TIF2 is a p38 substrate, and its activity is modulated by TNF. In addition, p38 α and β enhance I κ B α degradation in response to TNF, and phosphorylation of TIF2 by p38 in serine 1323 is a requirement for optimal activity of TIF2. We also found that TIF2 localizes in cytoplasm and can associate to inactive NF- κ B complexes, which become active and migrate to the nucleus in response to TNF. On behalf of these results, we proposed a molecular model where NF- κ B transcriptional activity is regulated in a positive manner by TIF2 through the assembly of a general active complex containing TIF2, p38 MAPK, RelA, IKK and I κ B.

Key words: NF- κ B, transcriptional activity, coactivators, TIF2, p38 MAPK, I κ B α , IKK.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Mónica Costas, quien tuvo la valentía de tomarme como becario hace seis años. Quiero agradecerle el haberme permitido entrar a su grupo de investigación y haber confiado en mí durante estos difíciles años. Mi agradecimiento por todo el esfuerzo, dedicación y ganas que tuvo durante mi formación doctoral. A pesar de no contar con los recursos económicos con los que cuenta la mayoría de los grupos de investigación en Argentina, siempre logró, de una u otra manera, que la línea de investigación siguiera adelante, que se cumplieran los objetivos pactados y que el grupo fuera independiente. Quiero agradecerle también por su excelente actitud humana, recuerdo, entre otras cosas, las innumerables veces que me llevó en auto, desviándose de su camino, cuando yo debía usar muletas.

Un agradecimiento especial a dos personas que valoro mucho, no sólo por su nivel académico y científico, sino por su excelente condición humana. Dos amigos del alma que siempre estuvieron al lado mío, en las buenas y en las malas, ayudando con cuanto cosa necesitara: el Dr. Federico Coluccio Leskow y el Dr. Daniel Hochbaum. Dos científicos en formación con los cuales tuve el grandísimo privilegio de compartir espacio laboral, y de los cuales tengo los mejores recuerdos. Debo agradecerles a ambos la valiosa ayuda que me brindaron para la realización de esta tesis, ya sea a través de materiales de laboratorio como ideas para diferentes experimentos. Gracias también al Dr. Altschuler, quien tuvo que ver en todo esto.

Quiero agradecer especialmente a mis dos compañeras de trabajo. El pase más antiguo fue de Georgina “alegría” Coló, a quien tuve el privilegio de ayudarla a dar sus primeros pasos en el laboratorio y compartir tantas carcajadas durante los *happy hours*. La voluntariosa Fernanda Rubio se incorporó un año más tarde, y más tímidamente se incorporó al grupo. Atenta como nadie, siempre estuvo dispuesta a dar una mano en lo que fuera necesario (su memoria me impresiona). A ambas quiero agradecer por todos estos años compartidos en el laboratorio, por aguantarme y por hacer que la vida cotidiana fuera aún más entretenida.

Otra persona que estuvo incondicionalmente al lado del laboratorio fue Santiago Werbahj, a quien quiero agradecer no sólo por ser el que me enseñó a pipetear en los primeros tiempos del LFBM, sino por el gran aporte que hace constantemente al grupo. Por ser una persona coherente y consecuente, y porque gran parte de lo que hacemos en el laboratorio sería imposible sin su ayuda.

Gracias al Dr. Víctor Nahmod, por permitir que nos mudáramos a la sección del Lanari que tenía a cargo en 2001, por las discusiones y numerosos aportes que le hizo al laboratorio.

Quiero destacar que este trabajo de investigación no hubiera sido posible sin la valiosa ayuda de otros grupos de investigación. Quiero agradecer la valiosa ayuda del grupo de la doctora Elisa Bal de Kier Joffé, a Alejandro Adam, Martín Kransnapolsky, al Dr. Alejandro Urtreger (el Lalo), del Hospital Roffo, quienes siempre tuvieron una excelente predisposición, y permitieron que varios de los experimentos mostrados en este trabajo pudieran ser realizados.

Agradezco a los grupos de investigación del Intituto Lanari que incondicionalmente nos ayudaron y apoyaron: al grupo del Dr. Kotsias, en particular a Yanina y a Sol; al laboratorio de la Dra. Arrizurieta: Pablo Azurmendi, Carolina Muchnik, Elizabeth, Francisco, Ilse y demás colaboradores. Al laboratorio de la Dra. Molinas: Paola, Rosana, Nora y colaboradores. A la Dra. Laura Kornblihtt, al Dr. Finkielman, Mariano Schuman, al Dr. Barkat, Silvina Landa, Azucena Alvarez y colaboradores. Gracias a los Profesores de la UBA, quienes mantienen el prestigio de nuestra Universidad.

Un agradecimiento especial a la sección de radiología por las innumerables veces que fui a revelar las placas radiográficas y por los buenos momentos compartidos: Pablo, Federico y Darío, con quienes no dejamos de asombrarnos de la “infraestructura y los infradotados”.

No puedo dejar de mencionar a gente que indirectamente “colaboró” en este trabajo, y que siempre hizo que la cotidianeidad dejara paso al asombro: Oscar, Roxi, Cristina, Paco (siempre creí que era sordo, por eso le gritaba), Diego y la “meditabunda” Magdalena, quien siempre me preparaba los mates a la mañana.

Un hito marco un antes y un después en la vida “lanaresca”. Eso fue la llegada del Dr. Claudio Pereira, a quien le tengo que agradecer la mera presencia, la infinidad de veces que interrumpió sus obligaciones para darme una mano en lo que fuera necesario y sobre todo la posibilidad de tenerlo como una referencia científica. Aunque él se esmere por negarlo, el compartir ideas con él fue de una grandísima ayuda. Junto con el Dr. Pereira vino León “Berti” Bouvier, a quien le tengo que agradecer por toda la ayuda incondicional brindada en el campo científico, las ideas generadas, por tener siempre a mano una solución a mis problemas. Al poco tiempo se sumó Gaspar “Gasman” Cánepa, engranaje fundamental en el laboratorio, *recordman* de minipreps,

cinéfilo y amante de la buena vida, con quien compartimos ideas y proyectos. No me olvido de Mariana Miranda, siempre dispuesta a ayudar. Gracias por estar siempre.

Otra persona a quien quiero agradecer es a Pablo Echeverría, quien trajo una brisa de cambio y renovación al laboratorio. Aunque su tema de investigación estaba alejado del tema de coactivadores, siempre estuvo presente aportando ideas, nuevos experimentos y discusiones que enriquecieron enormemente al laboratorio. Sin dudas su presencia en el laboratorio resultó de un importante empujón al grupo.

Un agradecimiento especial al grupo del Dr. Sergio Angel, quien además de brindarnos a la eminencia Pablo Echeverría, nos brindó de valiosa ayuda en el INTECH-Chascomús con el uso del microscopio de fluorescencia. Gracias Pablo “Pochi” Strobl, Naty y Caro.

Gracias a la Dra. Lorena Franco, por los primeros experimentos en el LFBM, a Tamara Tanos, Manuel de la Mata, y colaboradores del LFBM, Emiliano Merlo, a la Dra. Luciana Molinero.

Un agradecimiento muy especial a Inés Fernández Avendaño, a quien tuve la grandiosa fortuna de conocer hace más de diez años, y con quien compartí (y compartiré) gran parte de mi vida. Mi infinito agradecimiento por todo lo que me enseñó y enseña, por estar incondicionalmente a mi lado, por su inmensa alegría. Por ser el espejo donde me reflejo. Por ser un equipo. Gracias.

Gracias Teli, Juan, Sofia y Horacio (mi familia postiza). Gracias a mis amigos del alma, a mis hermanos elegidos: Jorge, Gianni, Wences, Francisco, Kico, Rómulo, Garza, Hoch...

Gracias a mi familia, ya que nada de ésto hubiera sido posible sin su ayuda. Gracias a mis hermanos Juan y Sebas. Por estar siempre cerca. Gracias a mis padres por el apoyo incondicional que siempre tuve, y por poner lo mejor de sí para que yo pudiera llevar a cabo cuanto proyecto tuviera en la cabeza. Gracias por enseñarme lo que soy hoy.

A todos ellos: muchas gracias.

ABREVIATURAS UTILIZADAS (EN ORDEN DE APARICIÓN).....	12
INTRODUCCIÓN.....	1
1. NF-κB: UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RÁPIDAMENTE ACTIVABLE	2
1.1 ESTRUCTURA MOLECULAR DE NF- κ B.....	2
1.2 PROTEÍNAS I κ B: UNA FAMILIA DE INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD NF- κ B	3
1.2.1 Estructura general de la molécula inhibidora	3
1.2.2 Mecanismo de acción.....	4
1.3 IKK QUINASA DE I κ B, REGULADORA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE I κ B.....	6
1.4 ACTIVACIÓN DE NF- κ B	7
1.5 NF- κ B REGULA NUMEROSOS GENES INVOLUCRADOS EN DISTINTAS RESPUESTAS CELULARES	8
1.6 ROL TUMORIGÉNICO DE NF- κ B	9
2. TNF: CITOQUINA INFLAMATORIA ACTIVADORA DE NF-κB	10
2.1 ACCIONES BIOLÓGICAS.....	10
2.2 RECEPTORES DE TNF	11
2.3 APOPTOSIS Y NECROSIS ASOCIADO A TNF	12
3. ASPECTOS BÁSICOS DE LA APOPTOSIS.....	14
3.1. INHIBIDORES DE LA ACCIÓN DE LAS CASPASAS: PROTEÍNAS IAP.....	15
3.2 DOS VÍAS DE ACTIVACIÓN: LA EXTRÍNSECA Y LA INTRÍNSECA	15
3.4 APOPTOSIS Y NF- κ B	17
3.5 ROL ANTIAPOPTÓTICO DE NF- κ B	18
3.6 LA OTRA CARA DE LA MONEDA: ROL PROAPOPTÓTICO DE NF- κ B	20
4. VÍAS DE ACTIVACIÓN DE NF-κB	21
4.1 ELEMENTOS REGULADORES DE LAS SEÑALES: LAS QUINASAS	21
4.3 p38 MAPK JUEGA UN ROL CRÍTICO DURANTE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE	23
4.3.1 Un rol dual para p38 en proliferación.....	24
4.3.2 Rol de p38 en diferenciación celular.....	25
4.3.3 Los caminos se cruzan: p38 MAPK y NF- κ B	26
5. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	27
5.2 MAQUINARIA BASAL DE LA TRANSCRIPCIÓN	28
5.3 COMPLEJO MEDIADOR.....	30
5.4 EL BALANCE DE COACTIVADORES DETERMINA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL	31
5.4.1 Complejos coactivadores.....	31
5.4.2 Coactivadores generales de la transcripción: CBP y p300.....	33
5.4.2.1 Estructura de CBP y p300.....	34
5.4.2.2 CBP y su rol en la actividad de NF- κ B	35
6. COACTIVADORES DE RECEPTORES ESTEROIDEOS DE LA FAMILIA P160	35
6.1 RECEPTORES NUCLEARES.....	37
6.1.1 Mecanismos funcionales de los receptores nucleares.....	37
6.1.2 Modelo clásico de activación de los receptores nucleares	38
6.2 ESTRUCTURA GENERAL DE SRCs.....	39
6.3 MECANISMOS DE ACCIÓN	40
6.4 SRC-1.....	42
6.4.1 SRC-1 juega un rol importante en el desarrollo y función del cerebro.....	43
6.4.2 Rango de acción de SRC-1	44
6.5 RAC3.....	45
6.5.1 “Amplificado En Tumores de Mama”.....	46
6.5.2 Mecanismo de acción de RAC3	47
6.6 TIF2: FACTOR INTERMEDIARIO DE LA TRANSCRIPCIÓN	47
6.6.1 Estructura general.....	48
6.6.2 Rol fisiológico.....	48
6.6.3 TIF2 es clave en el metabolismo de los lípidos	49
6.6.4 Rango de acción.....	50

6.6.5 Localización celular	51
6.7 ACTIVIDADES DIRIGIDAS CONTRA LA CROMATINA	51
6.7.1 Acetilación de histonas	52
RESUMEN DE OBSERVACIONES A REMARCAR	54
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. CULTIVO DE CÉLULAS.....	58
2. VECTORES DE EXPRESIÓN Y PLÁSMIDOS REPORTEROS UTILIZADOS	58
3. SUCLONADO DE P38 DENTRO DEL PCDNA3	59
4. CONSTRUCCIÓN DEL ANTISENTIDO DE TIF2.....	60
4.1 DISEÑO DE LOS <i>PRIMERS</i> :	60
4.2 PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO PRODUCIDO POR PCR A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	61
4.3 SUBCLONADO DEL FRAGMENTO DE TIF2 EN EL VECTOR T-EASY	61
5. CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES PUNTUALES DE TIF2.....	62
6. TRADUCCIÓN Y MARCACIÓN <i>IN VITRO</i> DE REL A Y P38	65
7. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	66
8. EXTRACCION DE ADN PLASMÍDICO POR GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO	67
9. KIT PARA PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE QIAGEN.....	68
10. CUANTIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO	69
11. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	69
12. GELES NATIVOS DE AGAROSA.....	69
13. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES DE CÉLULAS EN CULTIVO... 70	70
14. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS CELULARES.....	71
15. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA	72
16. ESTIMULACIÓN CON CITOQUINAS.....	74
17. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS.....	74
17.1 COSECHA DE LAS CÉLULAS	74
17.2 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA (β -GAL)	74
17.3 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA.....	75
18. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (<i>PAGE-SDS</i>).....	76
19. ENSAYOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	76
20. PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST-TIF2.....	78
21. ENSAYO DE COPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS GST-TIF2.....	79
22. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	80
23. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA	81
RESULTADOS.....	83
1. TIF2 ES NECESARIO PARA EL FUNCIONAMIENTO DE NF-κB	84
2. TIF2 INTERACCIONA FÍSICAMENTE CON REL A	87

2.1 TIF2 INTERACCIONA EN FORMA DIRECTA CON RELA.....	89
3. EL COMPLEJO TIF2/NF-κB REQUIERE DE P38 MAPK PARA SU ACTIVACIÓN	90
3.1 CINÉTICA DE ACTIVACIÓN DE P38	91
3.2 LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B UTILIZA ACTIVIDAD P38	91
3.3 TIF2 ES FOSFORILADO POR P38 MAPK.....	94
3.4 TIF2 INTERACCIONA FÍSICAMENTE CON P38 MAPK	96
4. TIF2 FORMA PARTE DE UN COMPLEJO MULTIPROTEICO QUE ACTIVA A NF-κB.....	98
4.1 TIF2 INTERACCIONA FÍSICAMENTE CON I κ B α	98
4.2 TIF2 INTERACCIONA FÍSICAMENTE CON IKK.....	100
5. LOCALIZACIÓN CELULAR DE IκBα E IKK.....	101
6. LOCALIZACIÓN CELULAR DE P38 Y RELA.....	103
7. TIF2 LOCALIZA EN EL CITOPLASMA	106
8. P38 PROMUEVE LA DEGRADACIÓN DE IκBα.....	109
9. LA SERINA 1323 DE TIF2 ES UN BLANCO DE FOSFORILACIÓN PARA P38 MAPK.....	111
CONCLUSIONES.....	115
DISCUSIÓN.....	116
1. MODELO DE ACCIÓN DE TIF2.....	117
2. TIF2: ¿UN NUEVO MECANISMO TRANSACTIVADOR, DIFERENTE AL CLÁSICO?.....	119
3. TIF2 TIENE UNA ALTA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN PROTEICA.....	120
4. ¿LA P38 MAPK ACTIVA A TIF2?	122
5. ACCIONES CONCERTADAS DE TIF2 Y P38 MAPK	123
6. SEÑALES QUE ACTIVAN A TIF2.....	123
7. LA IMPORTANCIA DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE TIF2	126
8. ¿QUEDA TODO EN FAMILIA?	127
BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS UTILIZADAS (EN ORDEN DE APARICIÓN)

- NF- κ B**: Factor Nuclear kappa B; *Nuclear Factor kappa B*
- EMSA**: ensayo de cambio de movilidad electroforética; *electromovility shift assay*
- RHD**: Dominio de Homología a Rel; *Rel Homology Domain*
- NLS**: Señal de Localización Nuclear; *Nuclear Localization Signal*
- I κ B**: Inhibidor de NF- κ B
- NES**: Señal de Exportación Nuclear; *Nuclear Export Signal*
- CRM1**: proteína receptora de secuencias NES; *Chromosome Maintenance Region 1*
- IKK**: quinasa de I κ B; *IkappaB Kinase*
- Hsp**: Proteína de Choque Térmico; *Heat Shock Protein*
- LPS**: lipopolisacárido
- HTLV-1**: Virus de Leucemia de células T de humanos; *Human T cell Leukemia virus*
- IL**: Interleuquina
- G-CSF**: Factor Estimulador de Colonias de granulocitos; *Granulocyte Colony-Stimulating factor*
- GM-CSF**: Factor Estimulador de Colonias de granulocitos-Macrófagos; *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
- TNF**: Factor de Necrosis Tumoral; *Tumor Necrosis Factor*
- TNFR**: Receptor de TNF; *TNF Receptor*
- INF**: Interferón
- VCAM**: Molécula de Adhesión de Células Vasculares; *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
- ELAM**: Molécula de Adhesión de Leucocitos Endoteliales; *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule*
- ICAM**: Molécula de Adhesión Intercelular; *Intercellular Adhesion Molecule*
- TRAF**: Factor Asociado al Receptor de TNF; *TNF Receptor-associated factor*
- PMN**: neutrófilos polimorfonucleares
- MHC**: Complejo Mayor de Histocompatibilidad; *Major Histocompatibility Complex*
- NO**: Oxido Nítrico
- iNOS**: Oxido Nítrico Sintasa inducible
- AP-1**: Proteína Activadora-1; *Activator Protein-1*
- FADD**: Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte; *FAS-associated Protein with Death Domain*
- TRADD**: Proteína con Dominio de Muerte Asociada al Receptor de TNF; *TNF-Receptor Associated Death Domain protein*
- TRAF**: proteína Asociada al Receptor de TNF; *TNFR-associated Protein*
- RIP**: Proteína que Interactúa con Receptor; *Receptor Interacting Protein*
- ROS**: Especies de Oxígeno Reactivo; *Reactive Oxygen Species*
- IAP**: Proteína Inhibidora de Apoptosis; *Inhibitor of Apoptosis Protein*
- Smac**: Segundo Activador de Caspasas Derivado de Mitocondria; *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*
- DIABLO**: Proteína de Bajo Punto Isoeléctrico de Unión Directa a IAP; *Direct IAP Binding Protein with Low pI*
- AIF**: Factor Inductor de Apoptosis; *Apoptosis-Inducing Factor*
- MEK**: quinasa de MAPK regulada por estímulos extracelulares; *MAPK extracellular signal-regulated kinase*
- MnSOD**: Superóxido Dismutasa de Manganeso; *Mn Superoxide Dismutase*
- MAPK**: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos; *Mitogen-Activated Protein Kinase*

ERK: Quinasa Relacionada con Señales Extracelulares; *extracellular Signal Regulated Kinase*

JNK: Quinasa C-Jun N-terminal; *c-Jun N-terminal Kinase*

MK: Quinasas activadas por MAPK; *MAPK-activated protein Kinases*

MSK: Quinasa activada por mitógenos y Estrés; *Mitogen- and Stress- Activated Protein Kinase*

RSK: Quinasa Ribosomal; *Ribosomal S6 Kinase*

COX-2: Ciclo-oxigenasa-2; *Cyclooxygenase-2*

CHOP: Proteína de Homología a C/EBP; *C/EBP Homologous Protein*

TBP: Proteína de Unión a TATA; *TATA Binding Protein*

TAF: Factor Asociado a TBP; *TBP Associated Factor*

TF: Factor de Transcripción, *Transcription Factor*

Pol II: ARN Polimerasa II

TRAP: Proteína Asociada al Receptor de Tiroides; *Thyroid Receptor Associated Protein*

DRIP: Proteína de Interacción del Receptor de Vitamina D

SWI/SNF: reguladores positivos del gen HO y SUC2; *mating type switch, SWI/Sucrose Non-Fermenting*

ASC-2: Complejo Cointegrador De Señales Activadoras; *Activator Signal Coactivator-2*

SRC: Coactivador de Receptores Esteroides; *Steroid Receptor Coactivator*

CBP: Proteína de Unión a CREB; *CREB Binding Protein*

CARM: Metiltransferasa de Arginina Asociada a Coactivador; *Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase*

PRMT: Metiltransferasa de Arginina; *Protein Arginine Methyl-transferase*

CREB: Proteína de Unión a Elementos Respondedores a cAMP; *cAMP-Response Element Binding protein*

TIF2/GRIP1/SRC-2/NCoA2: Factor Intermediario de la Transcripción; *Transcription intermediary Factor*

SRC-1: Coactivador de Receptores Esteroides; *Steroid Receptor Coactivator*

RAC3/SRC3/AIB1/TRAM1/P/CIP: Coactivador Asociado a Receptor; *Receptor-associated Coactivator*

PKA: Proteína Quinasa A

PR: Receptor de Progesterona

ER: Receptor de Estrógeno

AR: Receptor de Andrógeno

TR: Receptor de la hormona Tiroidea

GR: Receptor de Glucocorticoides

MR: Receptor de Mineralocorticoides

SRF: Factor de Respuesta en Suero; *Serum Response Factor*

ONRs: Receptores Nucleares Huérfanos; *Orphan Nuclear Receptors*

DBD: Dominio de Unión al ADN; *DNA Binding Domain*

LBD: Dominio de Unión del Ligando; *Ligand Binding Domain*

AF: Función de Activación; *Activating Function*

HRE: Elementos Respondedores a Hormona; *Hormone Response Element*

AD: Dominio de Activación transcripcional

NID: Dominio de Interacción con receptores Nucleares; *Nuclear receptor Interactin Domain*

CID: Dominio de Interacción con CBP; *CBP Interacting Domain*

HAT: actividad de Transfencia de grupos Acetilos a Histonas; *Histone Acetyl Transferase*

SDN: Núcleo Sexualmente Dimórfico; *Sexual Dimorphic Nucleus*

RXR: receptor de ácido trans retinoico

PPAR γ : Receptor del Proliferador del Peroxisoma Activado

TH: Hormona Tiroidea

AML: Leucemia Mieloide Aguda; *Acute Myeloid Leukemia*

RAR: Receptor del Acido trans-Retinoico

HEK: células Embrionarias de Riñón Humano; *Human Embryonary Kydney cells*

INTRODUCCIÓN

**“Your theory is crazy, but it's not
crazy enough to be true”.**

Niels Bohr (1885-1972)

1. NF- κ B: UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RÁPIDAMENTE ACTIVABLE

El Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción activable de eucariotas, expresado en un amplio número de tejidos, sobre todo de particular importancia para las células del sistema inmune. Fue descrito por primera vez en 1986 como un factor nuclear necesario para la transcripción de la cadena liviana kappa de las inmunoglobulinas en células B (de ahí viene su nombre) (1). En células B maduras y en plasmocitos, NF- κ B está localizado en el núcleo donde se une a una región de 10 pares de bases del *enhancer* intrónico kappa y activa la transcripción. Originalmente se pensaba que NF- κ B no se producía en otras células que no fueran las B, dado que no podía ser detectado en otras líneas celulares mediante ensayos de cambios de movilidad electroforética (EMSA o *gel shift*), usando el sitio de unión de la cadena liviana kappa. Más tarde se descubrió que la habilidad de unirse a estas secuencias estaba enmascarada por un inhibidor (2, 3), y ahora ya se sabe que NF- κ B preexiste en el citoplasma de la mayoría de las células en su forma inactiva, unido a su molécula inhibitoria. Luego de la señal apropiada, NF- κ B es liberado de su inhibidor y transloca al núcleo donde es capaz de regular la actividad transcripcional de genes específicos (2, 3). Es de notar que NF- κ B es un factor activable que responde a diversas señales, y el hecho de que no requiera de síntesis de proteína, permite a la señal ser transmitida rápidamente.

Actualmente es sabido que el factor de transcripción NF- κ B regula positivamente la expresión de numerosos genes involucrados en respuestas inmune e inflamatoria en mamíferos, como citoquinas, moléculas de adhesión celular, factores del complemento e inmunoreceptores (4) siendo clave para gatillar la primera línea de defensa contra las amenazas de la salud del organismo.

1.1 Estructura molecular de NF- κ B

NF- κ B existe en el citoplasma celular de la mayoría de los tipos celulares como homodímeros o heterodímeros de una familia de proteínas emparentadas (5). Cada miembro de esta familia contiene una región amino terminal conservada de 300 aminoácidos llamada Dominio de Homología a rel (RHD), donde están presentes los dominios de unión al ADN, de dimerización, de interacción con distintos miembros de proteínas de la familia I κ B y la señal de localización nuclear (NLS) (figura 1). Tanto los

dominios amino-terminales como los carboxilo-terminales están involucrados en la unión de esta molécula al ADN (6)

La primera molécula de NF- κ B descrita fue el heterodímero formado por las subunidades p50 y p65 (7). Esta proteína es la que hoy en día se conoce como NF- κ B, aunque ya se sabe que existe una gran diversidad de miembros. Hasta el momento fueron identificadas en células de mamíferos cinco proteínas que pertenecen a la familia de NF- κ B: Rel-A, c-Rel, Rel-B, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100) (8) (figura 1). Debido a que cada una de estas dos proteínas de la familia rel que forman el complejo hace contacto con la mitad del sitio de unión al ADN, las pequeñas variaciones en la secuencia consenso de 10 pares de bases ($5'$ GGGGYNNCCY $3'$) confieren una preferencia específica por las combinaciones de rel seleccionadas para armar el dímero de NF- κ B (9). Aunque la mayoría de las combinaciones de proteínas que conforman el dímero NF- κ B son transcripcionalmente activas, algunas combinaciones actúan como complejos inactivos o represivos de la transcripción. Por ejemplo las combinaciones p50/p65, p50/c-rel, p65/p65, y p65/c-rel son transcripcionalmente activas, mientras que los homodímeros p50/p50 y p52/p52 son transcripcionalmente represivos (10-14).

La estructura general del dímero p50 forma una molécula tipo “mariposa” con el sitio de unión al ADN unido fuertemente en el centro, y los dominios tipo inmunoglobulinas formando las “alas” en la periferia (15, 16).

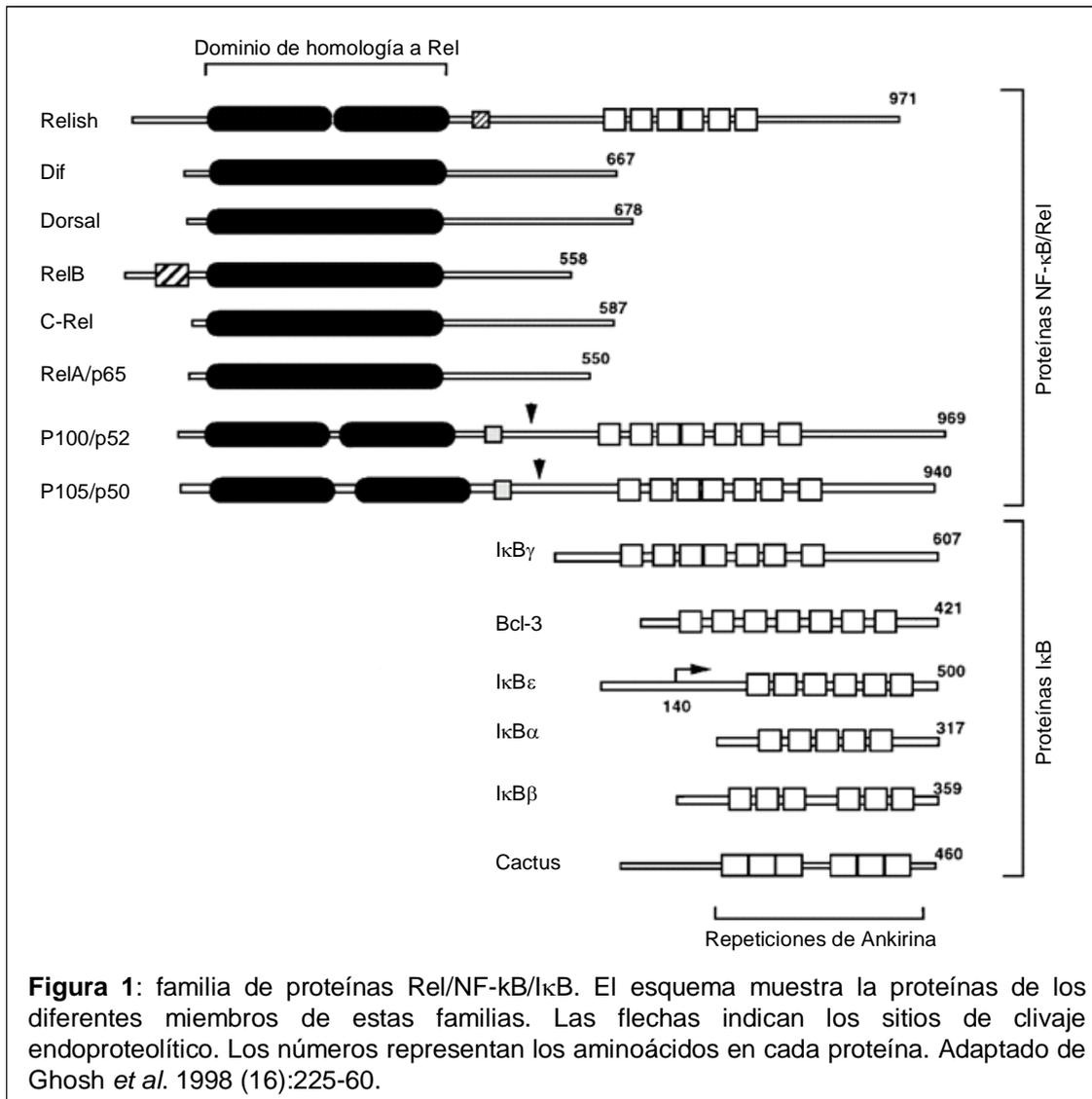
1.2 Proteínas I κ B: una familia de inhibidores de la actividad NF- κ B

1.2.1 Estructura general de la molécula inhibidora

El mecanismo clásico de activación de NF- κ B descrito hasta el momento sugiere que NF- κ B está presente en el citoplasma celular en su forma inactiva, regulado por su factor inhibitorio I κ B, el cual se une a NF- κ B enmascarando el sitio de localización nuclear, y por lo tanto reteniéndola en el citoplasma de la célula (figura 2).

I κ B comprende una familia de moléculas inhibitorias, dentro de las cuales están incluidas I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , BCL-3 y los precursores p100 y p105 (17) (figura 1). La proteína inhibitoria mejor caracterizada es I κ B α , ya que fue la primera en ser

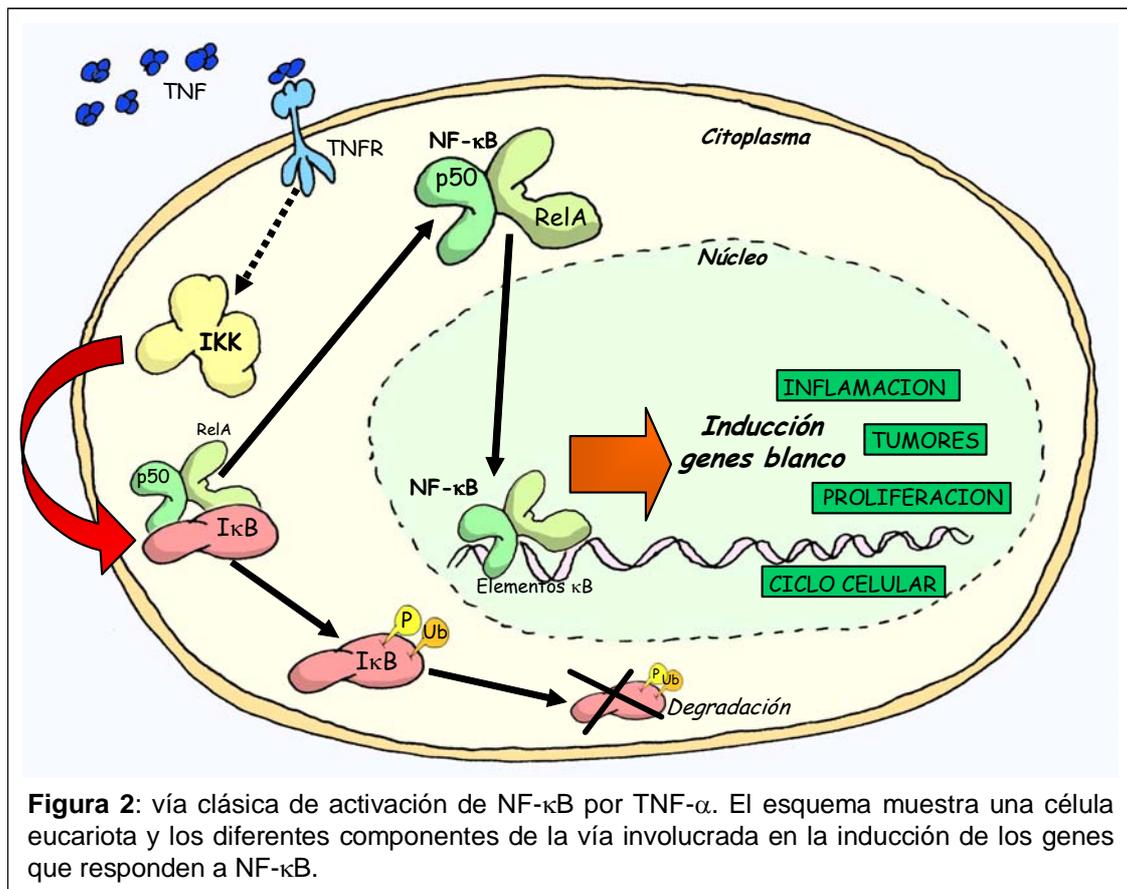
clonada (18, 19). $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ es una proteína de unos 37 kDa que tiene una organización tripartita, también vista en $\text{I}\kappa\text{B}\beta$: un dominio amino-terminal que es fosforilado en respuesta a señales, un dominio central con cinco repeticiones de ankirina involucrado en la interacción entre proteínas, y un dominio carboxilo-terminal ácido que está unido al dominio de repeticiones de ankirina por un dominio vinculante, que es sensible a proteasas, que permanece protegido por la unión con p65 (20).



1.2.2 Mecanismo de acción

Fisiológicamente la característica que define a $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ es su capacidad de regular, en forma rápida y transitoria, la inducción de la actividad del NF-κB. Luego de la

inducción de la cascada de activación de NF- κ B, I κ B α es fosforilado en las serinas 32 y 36, luego se ubiquitina en las lisinas 21 y 22 y queda marcado para su degradación por el proteosoma 26S (21). Este proceso deja descubierto el sitio de localización nuclear (NSL), posibilitando a NF- κ B para que interactúe con la maquinaria de importación y translocación al núcleo, donde se une a secuencias consenso de determinados genes para activar su transcripción (22). Una vez dentro del núcleo NF- κ B debe acceder a los promotores y *enhancers* de los genes que regula, antes de que pueda estimular su transcripción (figura 2).



La respuesta de NF- κ B ocurre prácticamente en todas las células y la especificidad y la selectividad de este proceso es crucial para que NF- κ B sea capaz de mantener la salud del organismo. En parte esto podría deberse a la activación diferencial de distintos complejos de NF- κ B, que tienen distintas especificidades de unión al ADN, por ende, llevando a la modulación de genes diferentes, y por lo tanto, a diversas acciones biológicas (23).

Al inhibir la actividad de NF- κ B también se regula negativamente su propia actividad, ya que NF- κ B induce la transcripción de I κ B (24). Esta regulación ocurre a través de los sitios κ B que existen en el promotor de I κ B α (25).

Las nuevas moléculas de I κ B α sintetizadas son acumuladas en el citoplasma, pero también en el núcleo, donde regulan en forma negativa la transcripción dependiente de NF- κ B. Este proceso se logra a través de la inhibición de la interacción de NF- κ B con el ADN y la exportación de NF- κ B nuevamente al citoplasma (26). Esta función de I κ B α se logra a través de un dominio llamado secuencia de exportación nuclear (NES) presente en la región C-terminal de I κ B α (27). La secuencia NES está constituida por señales de transporte transferibles que son necesarias y suficientes para mediar un rápido y activo transporte del núcleo al citoplasma, a través de una proteína conocida como CRM1, la cual se la conoce como receptor de secuencias NES (28-31).

1.3 IKK quinasa de I κ B, reguladora de la actividad proteolítica de I κ B

Según el modelo clásico, la activación de NF- κ B se logra a través de la inducción de la degradación proteolítica de I κ B en el citoplasma. Sin embargo, el modelo clásico de activación de NF- κ B está en discusión dado que existen trabajos donde sugieren que el complejo NF- κ B:I κ B es capaz de moverse del citoplasma al núcleo y *vice versa* (32-38). Determinadas señales extracelulares inician una cascada de señalización que llevan a la activación de la quinasa de I κ B, capaz de fosforilar a I κ B en residuos de serina específicos en la región amino-terminal (Ser32 y Ser36 para I κ B α , Ser19 y Ser23 para I κ B β) (39, 40). Esta quinasa es conocida como IKK, y juega un rol clave en el proceso de activación de NF- κ B.

IKK es un complejo compuesto por tres subunidades: IKK α (IKK1), IKK β (IKK2) e IKK γ (NEMO, IKKAP) (41). IKK α e IKK β son las subunidades catalíticas del complejo, compartiendo un 52% de identidad de secuencia, y 65% de identidad en los dominios catalíticos. La tercera subunidad, IKK γ /NEMO, es la subunidad regulatoria, y no está relacionada con las subunidades catalíticas (42). Aunque estudios *in vitro* demuestran especificidades similares por sus sustrato, la IKK β es la quinasa de I κ B más potente (43).

Por medio de análisis de filtración por gel se determinó que la IKK es un gran complejo, de 700-9000 kDa de tamaño, lo que sugiere la presencia de componentes adicionales. Recientemente se determinó que Cdc37 y Hsp90, proteínas involucradas en procesos de maduración, activación y tráfico de proteínas involucradas en transducción de señales, ciclo celular, desarrollo y regulación transcripcional (44, 45), sirven como componentes adicionales del complejo de IKK (46).

1.4 Activación de NF- κ B

Uno de los aspectos más interesantes de NF- κ B es que puede ser activado por una amplia variedad de estímulos asociados al estrés o al daño celular. Existen potentes inductores de la activación de NF- κ B: citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina (IL)-1 β y el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), productos bacterianos y virales como lipopolisacáridos (LPS), esfingomielinasa, RNA doble cadena, la proteína Tax del virus de la leucemia de células T de humanos (HTLV-1); estímulos proapoptóticos y necróticos como radicales libres de oxígeno, luz ultravioleta y radiación γ (47).

Aún no existe total entendimiento o concordancia acerca de cómo los estímulos extracelulares e intracelulares gatillan la activación de NF- κ B, y en qué puntos las cascadas de señalización convergen.

Los mecanismos de activación explicados anteriormente son los aplicados a los activadores más potentes de NF- κ B, sin embargo existen otras vías de activación: hipoxia y la exposición de las células a radiación de onda corta (254 nm) (48, 49). En la primera se observa la fosforilación de I κ B α por una tirosina quinasa (fosforilación en tirosina, no en serina) y su posterior interacción con la fosfo-inositol 3 quinasa (PI3K), sin la degradación por el proteosoma 26S (48). En la segunda vía se observa la degradación de I κ B α por el proteosoma 26S, pero es un proceso que no depende de la fosforilación de las serinas ni de la tirosina (49). En ambos casos, la activación de NF- κ B es considerablemente más lenta y débil que la activación por TNF- α , IL-1 o LPS (41).

1.5 NF- κ B regula numerosos genes involucrados en distintas respuestas celulares

El factor de transcripción NF- κ B está involucrado en la inducción de numerosos genes, como muestra la tabla 1 (7).

Tabla 1: Inducción de genes que responden a NF- κ B

Tipo de proteínas	Proteínas inducidas	Respuesta celular involucrada
Citoquinas	IL-1, IL-2, IL-2R, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF α , TNF β , INF β	Activación de células del sistema inmune
Moléculas de adhesión	VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1	Migración celular y reparación
Proteínas de fase aguda	Angiotensinógeno, proteína amiloide del suero, glicoproteína ácida α 1, proteína C3 del complemento, factor B del complemento	Inflamación
Proteínas Rel e I κ B	I κ B α , p105, c-Rel	Regulación de la respuesta NF- κ B
Proteínas inhibitorias de la apoptosis	Bcl2, TRAF1, TRAF2, A20, IEX-1L	Inhibición de la apoptosis
Proteínas proapoptóticas	Ligando de Fas	Apoptosis
Protooncogenes	c-Myc, ciclina D1	Tumorigénesis

En particular, NF- κ B estimula la producción de citoquinas esenciales para la respuesta inmune: IL-1, IL-6, TNF α , linfotoxina e interferón γ . Estas citoquinas tienen múltiples efectos y contribuyen al proceso de inflamación (50).

NF- κ B juega un papel crucial en muchas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide y el asma. También está implicado en otras enfermedades como la arterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas (51) y cáncer (52, 53). En células asociadas a estas enfermedades, NF- κ B presenta localización nuclear constitutiva y está aumentada su actividad transcripcional. En la tabla 4 se enumeran algunas de las enfermedades asociadas a la actividad anormal de NF- κ B.

1.6 Rol tumorigénico de NF- κ B

En ciertas células cancerígenas ha evolucionado un mecanismo por el cual NF- κ B sufre una activación descontrolada, que se contrapone a las señales proapoptóticas desatadas por la sobreexpresión oncogénica.

Se ha encontrado que la mayoría de los miembros de la familia de NF- κ B están sobreexpresados o mutados debido a diferentes procesos de translocaciones en diversos tipos de líneas celulares y leucemias o linfomas (52, 54-57). Sin embargo, existen otras evidencias que vinculan a NF- κ B con la transformación celular independientemente de los eventos de translocación cromosomal. NF- κ B es activado por varias proteínas transformantes y, en algunos casos, es requerido para la transformación inducida por virus. Además, su rol como factor anti-apoptótico y regulador en la transición del ciclo celular contribuye a la progresión de la tumorigénesis. La actividad de NF- κ B se ve aumentada en varios tipos de cáncer humanos, como por ejemplo cáncer de mama (57), carcinoma de pulmón (58), cáncer de tiroides (52), leucemias linfoides T y B (59), melanomas (60), cáncer de colon (61), cáncer de vejiga (62) y varios tumores inducidos por virus (63-65).

Algunos autores han mostrado que células provenientes de tumores de mama que no responden a tratamiento hormonal (receptor de estrógeno negativos), dependen de NF- κ B para su proliferación celular aberrante evitando la apoptosis (66-68). Es más, en estos tipos de tumores, a diferencia de los receptor de estrógeno positivos, existe una alta activación de NF- κ B y además muestran un incremento en la expresión de p65 en comparación a las otras líneas tumorales (69).

NF- κ B contribuye a la tumorigénesis de otras maneras que inhibiendo la apoptosis, tal como se describe más adelante. Esta molécula es capaz de activar protooncogenes como c-Myc y la ciclina D1 (70, 71). De esta manera, existe un estímulo directo en el cual está involucrado este factor de transcripción en la proliferación celular. También se propone a NF- κ B como el vínculo entre inflamación y cáncer, en trabajos donde estudian modelos de ratón que espontáneamente desarrollan carcinoma hepatocelular, un tipo de cáncer asociado con inflamación. En estos estudios logran desactivar a NF- κ B en los últimos estadios del desarrollo del tumor, y observan que hay apoptosis de los hepatocitos transformados del carcinoma hepatocelular, el cual no es capaz de progresar (72).

2. TNF: CITOQUINA INFLAMATORIA ACTIVADORA DE NF- κ B

2.1 Acciones biológicas

El TNF produce un amplio espectro de respuestas a nivel del organismo, incluyendo fiebre, shock, daño de tejido, necrosis tumoral y anorexia. A nivel celular promueve la inducción de otras citoquinas y moléculas inmunorreguladoras (73). El TNF- α es una citoquina que induce respuestas celulares pleiotrópicas, incluyendo proliferación, diferenciación, así como también apoptosis y necrosis (74). La respuesta depende del tipo de célula blanco que esté involucrada, y poco se sabe acerca de las razones que causan un tipo de respuesta u otra.

El TNF- α es vital para el mantenimiento de la homeostasis inmune, sin embargo la superproducción de esta citoquina puede llevar a la predominancia de efectos proinflamatorios que caracterizan estados patológicos graves tales como la sepsis.

Existe como un trímero de 52 kDa o en su forma sin procesar, como una molécula de 26 kDa unida a membrana (75). Esta citoquina puede actuar sobre los leucocitos polimorfonucleares (PMN), que son el principal tipo celular que está presente en procesos proinflamatorios agudos. Estas células responden al TNF- α incrementando su adhesión a las células endoteliales, induciendo una actividad procoagulante que lleva a la trombosis y necrosis de los tejidos inflamados (76). Una vez que los PMN se han extravasado a la zona inflamada, se produce la desgranulación de estas células en forma localizada en el sitio de inflamación.

Otro efecto del TNF- α en un estado de inflamación agudo es la inducción de fiebre y proteínas de fase aguda (77).

En respuesta a una infección, la presentación del antígeno, así como la activación linfocitaria, se realiza en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El TNF- α induce la expresión de estas moléculas: MHC clase I, al actuar sobre las células endoteliales y fibroblastos de la dermis (78) y MHC clase II en macrófagos y células del páncreas (79). En células endoteliales, el TNF- α induce la expresión de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y de otras moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y ELAM-1, incrementando de este modo la adhesión de células T y de células presentadoras de antígeno en la zona de infección (80, 81).

En los macrófagos actúa directamente induciendo la síntesis de IL-1, e indirectamente al estimular la unión de macrófagos a las células endoteliales, favoreciendo la presentación de antígeno, así como la activación de células T y B. Por otro lado, esta citoquina ejerce una función antiparasitaria en macrófagos vía la producción de óxido nítrico (NO) (82, 83).

Esta citoquina ejerce una amplia gama de respuestas biológicas, las cuales son generadas a través de la activación de la cascada de señales que se detallará a continuación.

2.2 Receptores de TNF

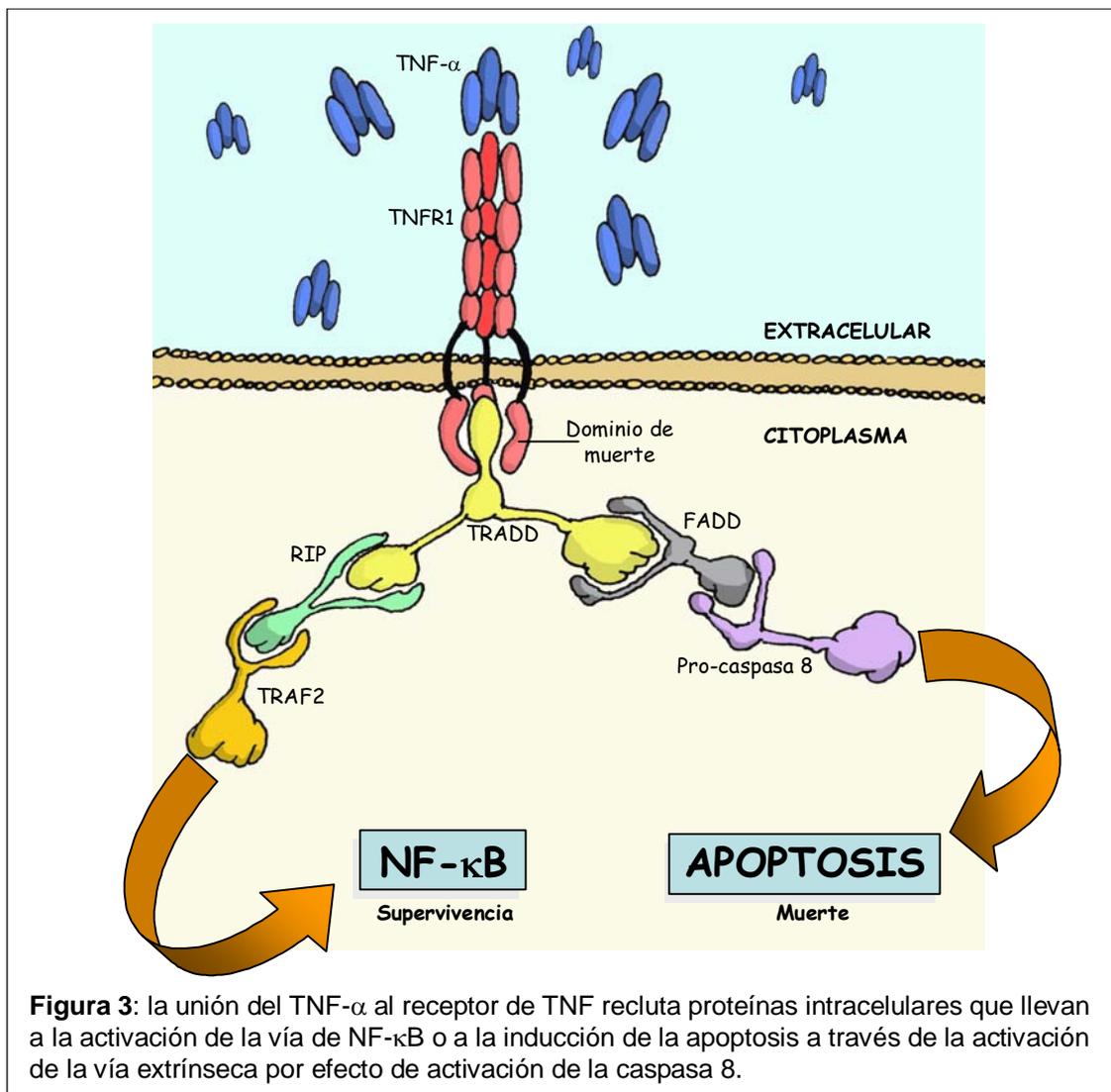
TNF- α tiene dos receptores diferentes, ambos de amplia distribución en todos los tejidos, localizados en la superficie celular: TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75) (84). La similitud estructural de ambos receptores está limitada a los dominios extracelulares (85). Los dominios intracelulares de los subtipos p55 y p75 son muy diferentes, lo cual indica que utilizan distintas vías de transducción de señales. La exposición de células a TNF resulta en la activación de dos factores de transcripción: AP-1 (86) y NF- κ B (87). Estos factores de transcripción median la inducción de citoquinas y genes inmunorregulatorios, así como también metaloproteinasas. En la mayoría de los tipos celulares la activación del factor de transcripción NF- κ B ocurre primordialmente a través del TNFR1 (88).

Ambos receptores carecen de dominios enzimáticos, y su capacidad de transducir señales es dependiente de la interacción con proteínas que se asocian en sus dominios citoplasmáticos (84). La unión del ligando a su receptor induce la formación de un cluster de receptor, y resulta en el reclutamiento de las proteínas involucradas en la cascada de señalización a los dominios citoplasmáticos del receptor de la citoquina (figura 3).

Por otro lado, la trimerización del receptor de TNF dada por la unión de su ligando, resulta en el reclutamiento de TRADD, que es capaz de interactuar con la proteína FADD (*Fas-associated protein with death domain*), quien activa la maquinaria apoptótica (89).

TNFR1 interactúa con TRADD (*TNF-receptor 1-associated death domain protein*), que funciona como un adaptador para el reclutamiento de otras proteínas como

es el caso de la serina treonina quinasa RIP (*receptor-interacting protein*), proteína esencial para la activación de NF- κ B, y TRAF2 (*TNFR-associated protein*) (90, 91). Este complejo proteico luego activa a la quinasa que fosforila al factor inhibitorio κ B, (IKK), produciendo la subsiguiente activación del factor de transcripción NF- κ B, como ya se ha descrito (figura 3).



2.3 Apoptosis y necrosis asociado a TNF

Se sabe que el TNF- α es una proteína que ejerce efectos citotóxicos y citostáticos contra líneas celulares tumorales, y originalmente fue identificada como un factor que lleva a necrosis hemorrágica rápida en tumores transplantables de ratón TNF, de ahí el nombre

de esta citoquina (92). La acción selectiva de esta monoquina contra líneas tumorales no es debido a diferencias en el número de receptores con alta afinidad por TNF, ya que muchas células normales muestran las respuestas características a TNF sin estar inhibido su crecimiento. La citotoxicidad selectiva del TNF contra líneas tumorales y los otros efectos de esta molécula estarían mediados por la activación de dos vías bioquímicas independientes (figura 3), en las cuales el factor de transcripción NF- κ B juega un rol crucial para la supervivencia celular a través de la inducción de genes antiapoptóticos (93-101). La inducción de estos genes protectores podría ser la razón por la cual se explica que la mayoría de las células que son resistentes a la muerte que poseen el TNFR1, se sensibilizan a la muerte inducida por TNF- α con inhibidores de la síntesis del ARN o de proteínas, como la cicloheximida o la actinomicina D (102). Estas observaciones se condicen con experimentos donde muestran que células naturalmente resistentes al TNF- α transfectadas con un vector de expresión para I κ B, se vuelven sensibles y mueren por apoptosis (99, 101, 103).

El TNF puede inducir apoptosis o necrosis según el tipo celular y el contexto de señales que se activen dentro de la célula. La tabla 2 resume las principales diferencias entre la apoptosis y la necrosis.

La apoptosis es una forma de muerte celular que ocurre normalmente en condiciones fisiológicas y que consiste en la eliminación de tipos celulares específicos, como ocurre en procesos tales como desarrollo y metamorfosis o en la maduración de células T en timo, donde son eliminados los clones con alta afinidad por lo propio. Más adelante se detallarán las características principales de este proceso.

El TNF fue inicialmente identificado como una proteína derivada del suero de macrófagos que inducía la necrosis en tumores sólidos de ratón (102). Si bien hoy en día la mayoría de los trabajos coinciden que luego de la activación del TNFR1 se activa la vía de las caspasas, existen numerosos estudios donde está descrito un rol necrótico e independiente de caspasas para TNF. Por ejemplo, en células L929sAhFas el TNF lleva a la muerte por necrosis (104) y en células L929 transfectadas con el Receptor Fas las células mueren por necrosis cuando la vía de las caspasas está bloqueada (105, 106). Trabajos más recientes involucran a la JNK y a la proteína de choque térmico-90 (HSP90) en el control del balance de muerte por apoptosis o necrosis provocada en respuesta al TNF (107, 108).

A pesar de esto, resulta importante destacar que sólo muy pocos tipos celulares son espontáneamente sensibles a la muerte por TNF- α , tal es el caso de las células L929 (fibroblastos de ratón), a menos que la vía de activación de NF- κ B sea bloqueada (99, 101, 103, 143). De esta manera, el tratamiento de células HEK 293 entre otras, con TNF- α produce la activación de varias MAPKs, de NF- κ B, pero no se induce la muerte celular.

A pesar de que se sabe mucho acerca de la señalización que ocurre luego de la activación de los TNFRs, los mecanismos exactos de la cascada de señalización que determinan la vida o la muerte de la célula no están del todo clarificados. La activación de la vía de supervivencia a través de NF- κ B o la vía apoptótica dependen del contexto en donde se encuentre la célula.

Tabla 2: principales diferencias entre apoptosis y necrosis.

	Apoptosis	Necrosis
Membrana plasmática	Intacta hasta el final del proceso	Ruptura temprana
Citoplasma	Se encoje y se fragmenta en cuerpos apoptóticos	Se hincha y estalla
Mitocondria	Se achica Salida del citocromo C al citosol y activación de caspasas	Se hinchan Pérdida de la permeabilidad del poro transitorio Pérdida de la fuerza protón motriz, estallido respiratorio, muerte rápida
Muerte	Fisiológica controlada Contenidos en los cuerpos apoptóticos	Accidental y descontrolada Contenidos liberados al exterior celular, aumento de respuesta inflamatoria
Membrana nuclear	Se pierde rápidamente	No se pierde
Cromatina	Fragmentada	Intacta hasta el final

3. ASPECTOS BÁSICOS DE LA APOPTOSIS

La muerte celular programada es un proceso activo y altamente controlado de autodestrucción celular (también llamado suicidio celular o apoptosis). Juega un rol clave tanto en procesos fisiológicos como patológicos. En el primero de los casos este proceso está involucrado en la eliminación de tipos celulares específicos, como ocurre en el desarrollo fetal, metamorfosis o en la maduración de los linfocitos T. Mientras que en procesos patológicos está involucrada cuando hay un aumento desregulado en la apoptosis, como es el caso del SIDA, Alzheimer, infartos, fallas cardíacas, Parkinson, y otras enfermedades neurodegenerativas; o donde la apoptosis esta disminuída y

entonces se produce un aumento en la proliferación celular, dando lugar a enfermedades como por ejemplo cáncer, lupus eritematoso y herpes, entre otras.

La apoptosis involucra cambios morfológicos característicos como el encogimiento celular, fragmentación del ADN, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados sin que se gatille el proceso inflamatorio (109), a diferencia de la necrosis que involucra un proceso inflamatorio, debido a que el contenido celular es liberado al exterior.

Se han caracterizado algunos de los agentes responsables de este fenómeno, en particular las proteasas intracelulares responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos: las caspasas. En el proceso de apoptosis, las caspasas funcionan como *iniciadoras* de la señal en respuesta a estímulos pro-apoptóticos, o como *efectoras* del proceso. También fueron descubiertos diversos reguladores de las caspasas, incluyendo activadores e inhibidores, así como también las cascadas de señalización que activan la maquinaria de muerte celular (109).

3.1. Inhibidores de la acción de las caspasas: proteínas IAP

Existe una familia de inhibidores endógenos directos de las caspasas (IAPs) conservados a lo largo de la evolución animal, que están involucrados en la inhibición de la actividad de las caspasas (110) (figura 4). Entre los miembros de esta familia están las proteínas IAPs, X-IAP, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP y livin, quienes inhiben la actividad de la caspasa-3 y -7, así como también la activación de la caspasa-9 mediada por Apaf-1/citocromo c (111-113). El efecto inhibitor de las IAPs puede ser revertido por Smac/DIABLO, quien se une a los miembros de las IAPs neutralizando su actividad antiapoptótica (114) (figura 4).

3.2 Dos vías de activación: la extrínseca y la intrínseca

A pesar de que existen muchos caminos por los cuales se activan las caspasas, solamente dos de ellos han sido descritos en detalle, y cada uno de ellos depende del estímulo apoptótico: *la vía extrínseca* y *la vía intrínseca*. El primero se centra en la familia de receptores de membranas (como el TNF, Fas y TRAIL), donde las caspasas son activadas dentro de un mecanismo de señalización que comienza con la unión del

ligando al receptor en la superficie celular (115-117). Cuando el receptor es activado por su ligando, se recluta la procaspasa-8 al complejo, e inducida por su proximidad con el receptor, se produce su activación, que consiste en el clivado del dominio N-terminal, y la liberación de este dominio en el citoplasma (118-122). De esta manera, es capaz de interactuar con varias proteínas, incluyendo la procaspasa-3, que una vez activada completa el programa de muerte celular (123) (figura 4). La vía intrínseca provoca la permeabilización de la mitocondria y la liberación de distintos factores, tanto pro- como anti- apoptóticos (118, 124). La apertura del poro trae consigo la salida de otros factores apoptóticos mitocondriales, tal es el caso de el segundo activador de caspasas derivado de mitocondria (Smac), también llamado DIABLO (por proteína de bajo punto isoeléctrico de unión directa a IAP), el factor inductor de apoptosis (AIF), que actúa de manera independiente de caspasas (123, 125) (figura 4) y miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y la liberación del citocromo-c (119).

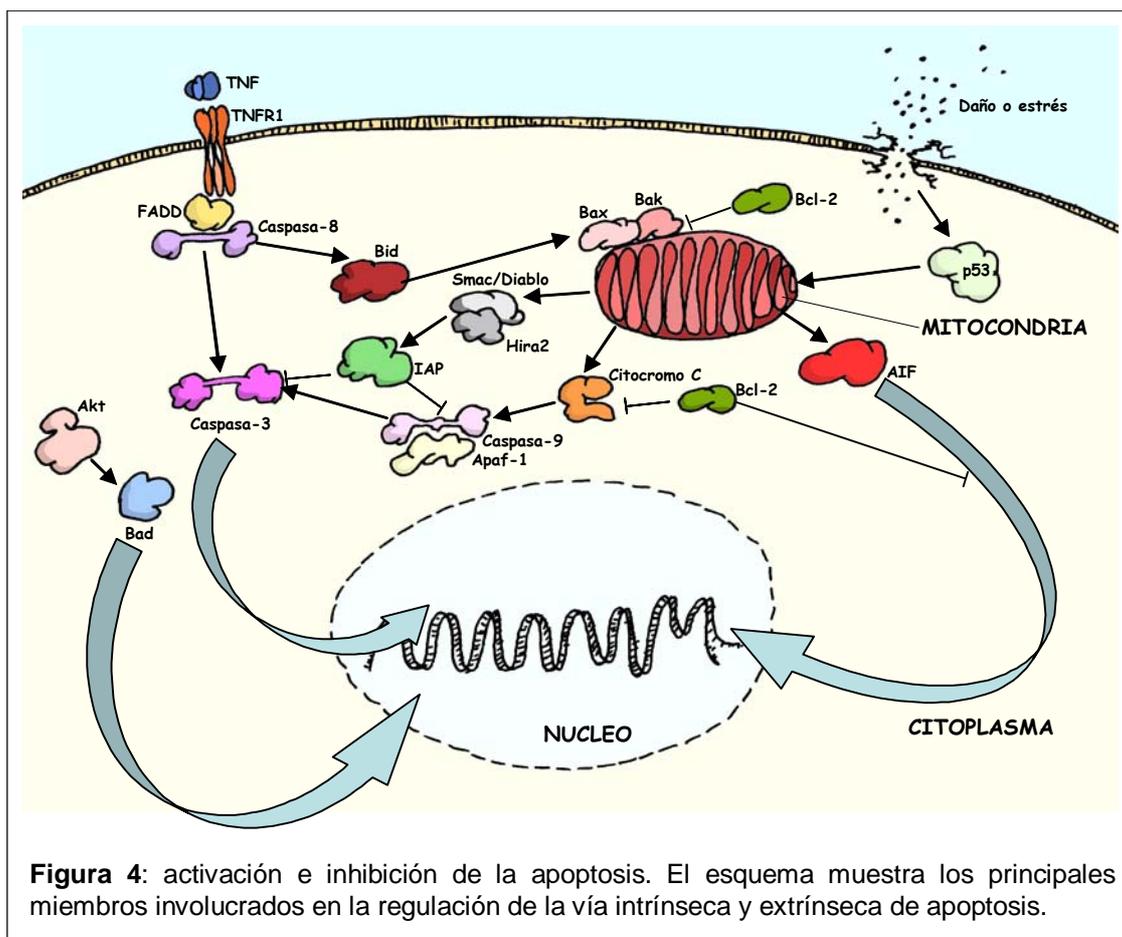


Figura 4: activación e inhibición de la apoptosis. El esquema muestra los principales miembros involucrados en la regulación de la vía intrínseca y extrínseca de apoptosis.

3.4 Apoptosis y NF- κ B

Los diferentes heterodímeros de NF- κ B tienen diversos roles, a veces contrapuestos en la modulación de la muerte celular por apoptosis. Si bien ahora está considerado que NF- κ B tiene un rol anti-apoptótico, existen algunos trabajos donde NF- κ B cumple un rol como agente pro-apoptótico. En algunos casos, c-Rel ha sido asociado con el proceso apoptótico la promoción de la muerte por apoptosis, dado que el aumento en la expresión y acumulación de c-Rel dentro del núcleo correlaciona con la inducción de apoptosis en varios tejidos (126-128). En osteoblastos murinos el TNF induce apoptosis, y está mediada por NF- κ B (129). La apoptosis inducida por el alfavirus también requiere de la forma activa de NF- κ B (130).

Tabla 3: productos de los genes blanco regulados por NF- κ B con actividad apoptótica o antiapoptótica *

<i>Proteínas antiapoptóticas</i>	<i>Función en apoptosis</i>
IAPs	
c-IAP1, c-IAP2, XIAP	Inhibe caspasa-3 y -7. Previene de la activación de la pro-caspasa-9
Familia Bcl-2	
Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1/A1, NR13	Antagonizan con los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
Moléculas adaptadoras	
TRAF-1, TRAF-2	Molécula adaptadora, aumenta la activación de NF- κ B
Otras	
A20	Bloquea la vía de muerte de TNF- α
MnSOD	Despeja especies reactivas de oxígeno
c-FLIP	Interfiere con la activación de las pro-caspasas-8 y -10
DcR1 (receptor "señuelo" 1)	Señuelo del receptor de muerte Trail
GADD45 β	Inhibe la activación de JNK en respuesta a TNF- α
<i>Proteínas proapoptóticas</i>	<i>Función en apoptosis</i>
Ligandos	
FasL, TRAIL	Ligando de receptor de muerte
Receptores	
Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6	Receptor de muerte
Factores de transcripción	
p53	Supresor tumoral, factor de transcripción
c-Myc	Factor de transcripción involucrado en progresión celular
Familia de Bcl-2	
Bcl-xS	Antagoniza con los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2

*Adaptada de Kucharczak et al. 2003 (22):8961-82

Contrastando con estos resultados, varios trabajos demuestran que ratones deficientes en la actividad de NF- κ B mueren durante la embriogénesis, y resaltan la importante actividad protectora de apoptosis de este factor de transcripción, necesaria para el normal desarrollo embrionario (96, 131). Sumado a lo anterior, la sobreexpresión de RelA protege a las células de la apoptosis inducida por TNF- α o la mediada por agentes quimioterapéuticos (96, 98, 132-134). También se demostró que la inhibición de NF- κ B aumenta la sensibilidad a apoptosis de líneas celulares derivadas de leucemias (133).

Dentro de los genes blanco regulados por NF- κ B que podrían proveer de funciones anti-apoptóticas están incluidos los que codifican para la familia de IAP, TRAF1 y TRAF2, Bcl-xL y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (70, 100, 135). Como resume la tabla 3, NF- κ B induce la transcripción de numerosos genes capaces de suprimir la muerte celular (136). Estos genes poseen sitios de unión funcionales en sus zonas regulatorias, y se inducen en respuesta a estímulos de muerte (136).

3.5 Rol antiapoptótico de NF- κ B

Además de su rol como regulador de la respuesta inflamatoria e inmune, las subunidades de NF- κ B son importantes reguladores de la apoptosis y la proliferación celular, por lo que permitiría a esta molécula funcionar como un importante regulador de la tumorigénesis (137). De hecho, se ha encontrado hiperactivación o sobreexpresión de estas moléculas en distintos tipos de tumores tales como leucemias, linfomas, mielomas, carcinomas y adenocarcinomas (138-141) (tabla 4).

El fenotipo de ratones p65^{-/-}, que mueren durante el desarrollo embrionario debido a una apoptosis masiva de hepatocitos, sugiere que NF- κ B jugaría un rol importante en la protección de las células al mecanismo de apoptosis. El efecto transformante de las células sería la consecuencia de una función antiapoptótica (103, 137, 142, 143).

Existen tres modelos generales por los cuales NF- κ B regularía el proceso de apoptosis: (1) por la regulación directa de genes que inhiben o promueven la apoptosis; (2) a través de la regulación del ciclo celular, el cual puede sensibilizar a la célula a

señales apoptóticas; y (3) a través de la interacción con proteínas cuyo nivel afecta el balance de vida o muerte celular.

La actividad antiapoptótica de NF- κ B depende de la inducción de genes, y son varios los genes antiapoptóticos que son inducidos por este factor de transcripción (tabla 3). Los productos de los genes inducidos por NF- κ B pueden bloquear el programa apoptótico gatillado por receptores de muerte o por vía de las mitocondrias. La importancia relativa de estos factores depende del tipo celular y la situación particular en donde se haga el estudio. La inducción incluye genes inhibidores de la apoptosis (IAPs), factores tipo Bcl2, factor 1 y 2 asociados a receptor de TNF (TRAF1 y TRAF2), A20 e IEX-1L (100, 137, 144, 145). Estas proteínas antiapoptóticas realizan sus actividades de manera coordinada, bloqueando el proceso de muerte celular programada en varios niveles a lo largo de la cascada de señales que desatan el proceso.

Tabla 4: enfermedades asociadas con una actividad anormal de NF- κ B*

Tipo de alteración de NF- κ B	Enfermedad
Mutación de I κ B	Enfermedad de Hodgkin (I κ B α e I κ B ϵ)
Actividad quinasa sobre I κ B constitutiva	Enfermedad de Hodgkin Leucemia linfoblástica aguda infantil
Rearreglos genéticos, amplificación o sobre-expresión de NF- κ B	Linfomas, mielomas y leucemias Varios carcinomas y adenocarcinomas
Actividad nuclear aberrante de NF- κ B	Artritis reumatoidea, asma, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, varios carcinomas, melanoma
Activación de NF- κ B dañada	Ataxia, lupus eritematoso sistémico

*Adaptada de Perkins 2000 (25):434-40.

NF- κ B inhibe la apoptosis generada por agentes que dañan el ADN y que actúan a través de la cascada que depende de mitocondria, a través de la regulación de la expresión de miembros de la familia de Bcl-2, como A1, Bcl-xL, Bax y el posible inhibidor de apoptosis IEX-1L (144, 146, 147).

Debido a su propiedad de inhibir la apoptosis, NF- κ B juega un rol central en la regulación de las respuestas inmune innata y adaptativa. La eliminación específica por apoptosis de células infectadas con bacterias y virus es una estrategia de defensa efectiva ya que el sellado del cuerpo apoptótico previene de la liberación de restos

celulares de las células infectadas o dañadas, y que podría resultar en la activación del proceso inflamatorio (148).

Como se describió anteriormente, la citoquina TNF tiene la capacidad de matar células tumorales. Una evidencia a favor del rol protector de NF- κ B es la sensibilidad a apoptosis por TNF que adquieren células que expresan una forma dominante negativa de I κ B α , o aquellas líneas celulares que no expresan p65 (103, 143). Aparentemente esta función protectora del NF- κ B no se da solamente en células estimuladas con TNF, sino también células tratadas con radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos. Esto sugiere que NF- κ B jugaría un rol antiapoptótico en varios sistemas (98, 142).

3.6 La otra cara de la moneda: rol proapoptótico de NF- κ B

Por otro lado, y sólo bajo ciertas circunstancias, el factor de transcripción NF- κ B puede promover la muerte celular (137). Por ejemplo en cooperación con AP-1, NF- κ B puede inducir la expresión del ligando de Fas en células T. Más aún, en células CD4⁺ y CD8⁺ puede inducir o reprimir la apoptosis dependiendo de la naturaleza del activador (137).

Existen reportes donde describen un efecto proapoptótico de NF- κ B en modelos de daño neuronal, induciendo el supresor tumoral p53, quien estaría implicado en la disminución de la viabilidad neuronal en respuesta a isquemia o reperfusión e insultos tóxicos (137, 149). Existen otros estudios donde demuestran que el supresor de tumores p53 es capaz de activar a NF- κ B a través de MEK1 y pp90rsk, y que el NF- κ B juega un rol esencial en la promoción de apoptosis, dado que la inhibición de este factor revierte el efecto apoptótico mediado por p53 (150). Sin embargo, otros autores sugieren que p53 escapa de inhibir el efecto de NF- κ B, y de esta manera disminuir drásticamente los niveles de expresión de proteínas antiapoptóticas, reguladas por NF- κ B, produciendo el efecto apoptótico (151).

La activación de genes que causan muerte no es la única vía por la cual NF- κ B está involucrado en la promoción de la apoptosis. Resulta de marcada importancia el tiempo que le toma a NF- κ B inducir la expresión de determinados genes claves en el proceso de salvación de la célula. Según el contexto celular y las vías de activación de NF- κ B, llevará más o menos tiempo este proceso de activación de la salvación. Por ejemplo c-Rel regula en forma positiva la expresión de la superóxido dismutasa de

manganeso (MnSOD), quien convierte el O_2^- a H_2O_2 suprimiendo la muerte celular. Ese tiempo de síntesis es suficiente como para que se gatille la apoptosis de las células HeLa (152).

4. VÍAS DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B

4.1 Elementos reguladores de las señales: las quinasas

Las proteínas quinasas son enzimas que agregan en forma covalente un fosfato en serina, treonina o tirosina en proteínas específicas dentro de la célula. Esta fosforilación de proteínas puede controlar su actividad enzimática, la interacción con otras proteínas o moléculas, su localización celular, y su capacidad para ser degradado por proteasas.

La familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se compone de proteínas quinasas cuya función y regulación ha sido conservada durante la evolución desde organismos unicelulares como levaduras, hasta organismos más complejos como los humanos (153).

La superfamilia de las MAPK consiste en tres cascadas de serin/treonin quinasas: quinasas relacionadas con señales extracelulares (ERKs), p38 MAPK y la quinasa C-Jun N-terminal (JNK) (154) (figura 5). Las primeras responden a factores de crecimiento u otras señales mitogénicas externas promoviendo la proliferación celular y diferentes señales de muerte celular. Las otras dos cascadas son típicamente descritas como quinasas activadas por estrés que promueven procesos inflamatorios, o en algunos casos, muerte celular programada (155, 156).

Los últimos estudios demuestran que diversas cascadas de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) contribuyen a la transmisión de estímulos extracelulares que finalmente terminan en la fosforilación directa o indirecta de varios factores de transcripción produciendo alteraciones en la expresión génica. Las MAPKs catalizan también la fosforilación y activación de varias proteínas quinasas, llamadas proteínas quinasas activadas por MAPKs (MKs). Las MKs son quinasas relacionadas entre sí que median un amplio rango de funciones biológicas en respuestas a mitógenos y estímulos de estrés (157). Entre ellas están las de estabilización y regulación de la traducción del ARNm, regulación de la transcripción y reorganización de la actina (157).

La familia de MK está compuesta por 11 miembros que generalmente se activan por mitógenos, estímulos de estrés, o ambos. Ellos son: las quinasas R6 ribosomales (RSKs), las quinasas activadas por estrés y mitógenos (MSKs), las quinasas que interactúan con las MAPKs (MNKs), las proteínas quinasas 2, 3 y 5 (MK2, MK3 y MK5).

4.2 La vía de p38 MAPK está involucrada en una amplia gama de respuestas biológicas

Descrita por primera vez en el año 1994, la cascada de p38 MAPK regula una variedad de respuestas a estrés celular, inflamación y otras señales. En células de mamíferos, las isoformas de p38 son fuertemente activadas por estrés ambiental y citoquinas proinflamatorias, pero no por estímulos mitogénicos (158).

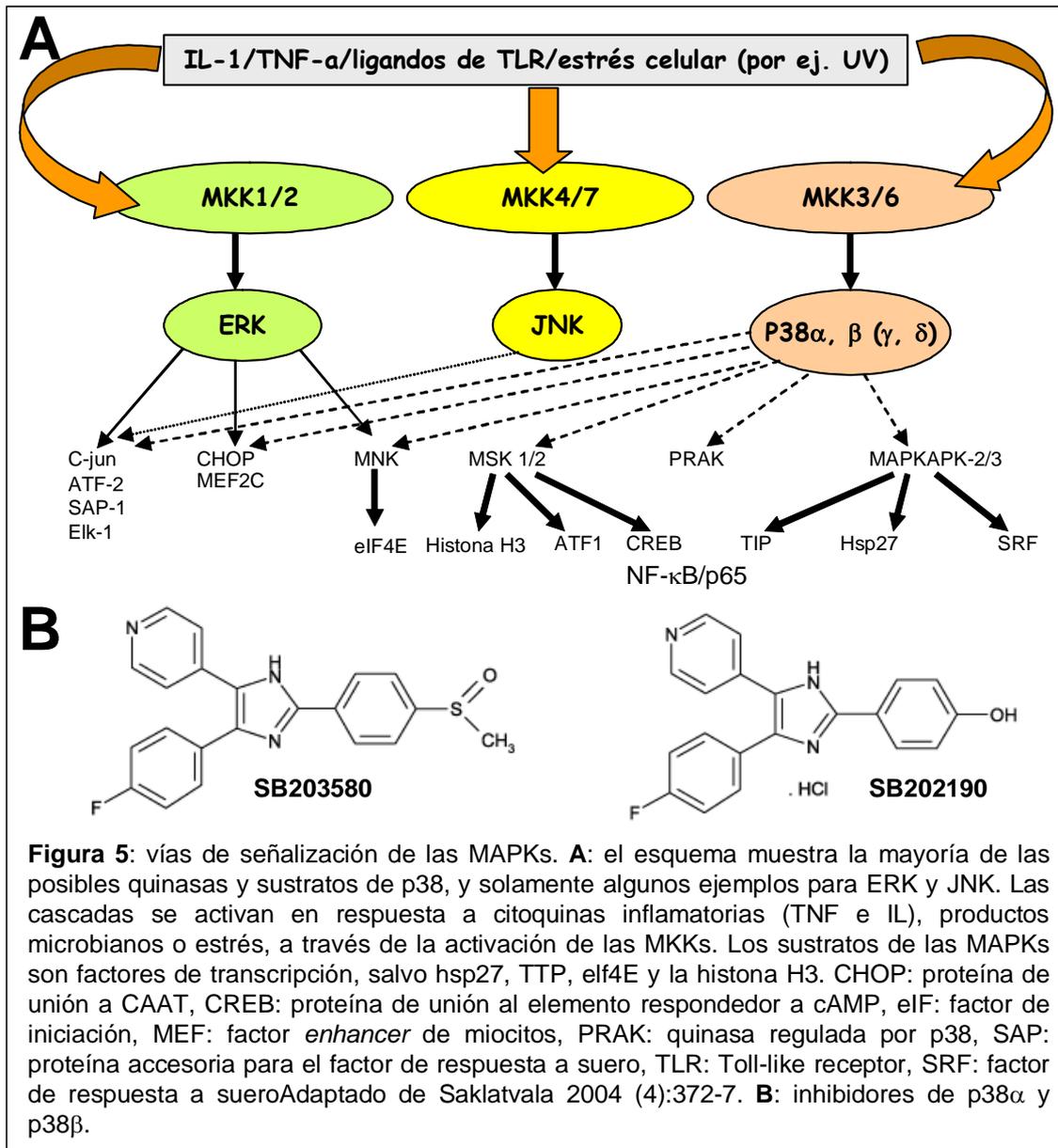
Existen cuatro isoformas de p38 MAPK (también conocida como CSBP, mHOG1, RK y SAPK2): α , β , γ y δ , que difieren en los tejidos donde son expresadas y la afinidad por activadores y los efectores (159) (figura 5). Las isoformas α y β son las que están expresadas en la mayoría de los tejidos, mientras que las isoformas γ y δ tienen una expresión mucho más limitada (160). Las isoformas α y β pueden ser inhibidas con los inhibidores específicos SB203580 y SB202190 (figura 5B).

P38 MAPK es relativamente inactiva en la forma no fosforilada y es activada rápidamente por fosforilación en dos motivos Thr-Gly-Tyr (161, 162). MAPK quinasa-3 y -6 (MKK3 y MKK6 respectivamente) fosforilan a p38 MAPK, en cuestión de minutos luego de la exposición a estímulos como TNF- α , interlequina-1 o choque térmico (figura 5). La especificidad en la activación de p38 resultaría de la formación de complejos funcionales entre MKK3/6 y diferentes isoformas de p38, y el posterior reconocimiento selectivo del *loop* de activación de las isoformas de p38 por MKK3/6 (163).

La inactivación ocurre rápidamente y es mediada por fosfatasas como la proteína fosfatasa-1, la proteína fosfatasa-2A, o la fosfatasa MAPK (164-166). Estas fosfatasas son, en algunos casos, activadas por la fosfo-p38 MAPK.

Está demostrado que p38 está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de células quiescentes. Sin embargo, luego de la estimulación celular la localización de

p38 no está del todo clara. Algunas evidencias muestran que luego de la activación p38 transloca del citoplasma al núcleo (167), pero por otro lado, otros grupos de trabajo demuestran que luego del estímulo celular la forma activa de p38 es capaz de permanecer en el citoplasma (168).



4.3 p38 MAPK juega un rol crítico durante la activación del sistema inmune

Un gran número de evidencias demuestran que la actividad de p38 es crítica para las respuestas inmune e inflamatorias, ya que p38 es activado en macrófagos,

neutrófilos y células T por numerosos mediadores extracelulares de la inflamación como quimioattractantes, citoquinas, quemoquinas y lipopolisacárido bacteriano (169).

P38 también regula la respuesta inmune estabilizando el ARNm de células específicas involucradas en el proceso inflamatorio (169). Por ejemplo, la inhibición de p38 bloquea la producción del mediador inflamatorio prostaglandina H₂ al inhibir la expresión de la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) (170). Luego del bloqueo de p38 se observó que la disminución de la COX-2 se debía a la desestabilización de su ARNm (171). También se reportó que p38 es capaz de estabilizar el ARNm del TNF- α y THP-1, en monocitos humanos (172, 173); el ARNm de la proteína inflamatoria (MIP)-1a (172) y del factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GMCSF) (174), el factor de crecimiento endotelial vascular (175), metaloproteinasas de la matriz 1 y 3 (176).

El mecanismo preciso por el cual p38 estabiliza el ARNm aún permanece desconocido. Es claro que requiere de la proteína quinasa activada por MAPK (MAPKAPK-2)-2, elementos ricos en AU (ARE) en un ARNm inflamatorio y el proceso de deadenilación (177).

Si bien los mecanismos involucrados en las funciones inmunes de p38 recién ahora están empezando a emerger, se demostró que la forma activa de esta quinasa es capaz de asociarse con varios blancos celulares. Entre ellos la fosfolipasa A2 citosólica, la proteína Tau asociada a microtúbulos, factores de transcripción como ATF1 y 2, MEF2A, Sap-1, eLK-1, NF- κ B, Ets-1 y p53 (178) (figura 5). El hecho de que pueda asociarse con esta gran variedad de factores demuestra que p38 sería clave para diversas funciones biológicas, y algunas de ellas se detallarán a continuación.

4.3.1 Un rol dual para p38 en proliferación

Dependiendo del tipo celular y el estímulo, p38 puede tener un rol positivo o negativo en la proliferación celular. Sería requerida p38 en células Swiss 3T3 inducidas por FGF-2 (179), para la proliferación de células hematopoyéticas inducidas por el factor estimulador de colonias de granulocitos (180) y la proliferación de células de la línea FD-EPO dependientes de eritropoyetina (181).

En forma contraria, en CCL39 y en fibroblastos NIH 3T3, p38 tiene un rol inhibitorio en la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S, probablemente mediada por la inhibición de la expresión de ciclina D1 (182, 183).

Las p38 MAPKs fueron implicadas tanto como reguladores positivos y negativos en la supervivencia celular. Por ejemplo, en células PC12, p38 participa en apoptosis gatillada por la extracción del factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Este proceso podría ser mediado por la inducción del ligando que activa el receptor de la citoquina FAS (184). Por otro lado la activación de p38 protege a cardiomiocitos neonatales primarios de rata de apoptosis inducida por anisomicina (185).

4.3.2 Rol de p38 en diferenciación celular

Recientemente se le atribuyó un rol importante a p38 en diferenciación de varios tipos de células de vertebrados. La diferenciación de adipositos de fibroblastos 3T3 L1 inducida por insulina fue bloqueada por la expresión de un dominante negativo de p38 α o la incubación de las células con el inhibidor específico SB203580 (186). De la misma manera, la expresión de una mutante constitutivamente activa del activador de p38 (MKK6) indujo diferenciación adipocítica (187). Curiosamente, p38 puede también fosforilar la proteína de homología de C/EBP (CHOP), cuya expresión ectópica bloquea la diferenciación de 3T3 L1. Estos datos sugieren que p38 podría tener un rol negativo en la regulación de la diferenciación de las 3T3 L1 (188). Esta contradicción podría ser explicada bajo la consideración de que C/EBP β tiene mayor abundancia que CHOP a través del proceso de diferenciación, y p38 fosforilaría preferentemente a C/EBP β en lugar de CHOP, llevando a la diferenciación adipocítica (187).

Otro rol de p38 es en diferenciación biogénica. La diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos inducida por medio de cultivo reducido en suero correlaciona con niveles altos de activación de la cascada de p38 (189). El tratamiento con SB203580 retarda la elongación y alineamiento de mioblastos y previene la fusión de mioblastos en miotúbulos, así como también la inducción de genes específicos de músculo (190). Más aún, la expresión de MKK6 promueve la capacidad de MyoD (un activador de la transcripción en biogénesis) para diferenciar fibroblastos 10T1/2 a células musculares, mientras que el tratamiento con SB203580 inhibe la actividad de MyoD (191).

La diferenciación neuronal también parecería ser mediada por p38. En tratamientos de células PC12 con SB203580 o la transfección con la forma inactiva de MKK6 o mutantes de p38, resultó en una marcada inhibición en el crecimiento de neuritas inducidas con el factor de crecimiento neuronal (192). Otros procesos de

diferenciación que requieren la activación de p38 incluyen el factor 5 de crecimiento y diferenciación de células ATDC5 (193), diferenciación eritroide de células de ratón SKT6 inducidas con eritropoyetina (181), y la hipertrofia y patológica postnatal cardíaca (194, 195).

4.3.3 Los caminos se cruzan: p38 MAPK y NF- κ B

Las MAPKs pertenecen a una familia de quinasas que son esenciales para la transferencia de señales desde la superficie celular al núcleo y la posterior inducción de genes específicos. Como se describió más arriba, esta quinasa tiene un papel importante en la activación del sistema inmune. Por este motivo, no es casual que se la vea asociada con el factor que enciende los genes responsables de la activación del sistema inmune. En particular, esta quinasa está íntimamente asociada a NF- κ B. Existen varios trabajos donde demuestran que la vía de activación de NF- κ B depende de la actividad de p38 MAPK.

Está demostrado que la p38 MAPK es crítica para la expresión de genes inducidos por estímulos de LPS (158, 196-198), y que la inhibición de la p38 MAPK con el competidor específico SB 203580 reduce la liberación de citoquinas (158, 199). Otro estudio muestra que la sobreexpresión de MEKK1 es capaz de incrementar la transcripción mediada por NF- κ B (200). Estudios más recientes demostraron que el uso de SB203580 o la expresión de un dominante negativo de p38 reducen significativamente los niveles de activación de NF- κ B, sin alterar la unión de NF- κ B a su secuencia específica (197). En el mismo estudio, los autores demuestran que p38 no es capaz de fosforilar a p65, aunque sí es capaz de fosforilar componentes de la maquinaria basal de transcripción, proponiendo un rol indirecto en la regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B (197). De acuerdo con resultados obtenidos en nuestro laboratorio, y en concordancia con otros autores, la inhibición de p38 reduce la actividad de NF- κ B (103, 199).

Dentro de la familia de las MAPKs existe un miembro que es capaz de fosforilar a RelA/p65 en la serina 276 cuando las células son estimuladas con TNF- α . Se trata de la quinasa-1 activada por mitógenos y estrés (MSK1), identificada anteriormente como quinasa de histona H3 y CREB nuclear (201). Un aspecto interesante de esta quinasa es

que actúa río abajo de p38 y ERK MAPKs (figura 5). Además es activada por TNF- α , y es capaz de asociarse con p65, promoviendo de alguna manera la inducción de genes que responden a NF- κ B (201).

Los mecanismos moleculares exactos por los cuales p38 activa a NF- κ B aún no se conocen. Se ha demostrado que esta quinasa no fosforila a p65, por lo tanto debe tener un rol indirecto en la activación de esta vía. Dado que el objetivo primordial de este trabajo de tesis es caracterizar mecanismos de activación del factor de transcripción NF- κ B, es necesario introducir a los mecanismos que actúan a nivel de la regulación de la transcripción.

5. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

La expresión de genes que codifican para proteínas en los organismos eucariotas está orquestada y elaborada de manera tal que genes sumamente específicos son prendidos y apagados en forma temporal y espacial según los requerimientos de la célula.

El vasto incremento en la complejidad genética requerido para sostener las funciones celulares características de eucariotas ha resultado en una concomitante evolución del empaquetamiento de la cromatina del ADN, y de los factores regulatorios de la cromatina (202). El descubrimiento de que muchos de los coactivadores y represores, reclutados por los reguladores de la transcripción, tienen actividad dirigida sobre la cromatina, ha hecho entender aún más el proceso de regulación génica (203-205). Está claro que la estructura local de la cromatina y el estado de acetilación en las regiones promotoras proveen puntos regulatorios que permiten a la célula incrementar el rango de respuestas transcripcionales.

En el campo de la regulación génica, un concepto importante que surgió en los últimos años es la existencia de grandes complejos coactivadores de la transcripción, que facilitan la acción de los activadores de secuencias específicas. Entre los coactivadores existen subunidades individuales y grupos de subunidades enteras que se comparten o mezclan, lo que indica que estos grandes complejos son dinámicos y modulares en naturaleza, aumentando la versatilidad para permitir respuestas transcripcionales en un rango mucho más expandido y preciso. La presencia o ausencia

de las subunidades individuales en los complejos coactivadores estaría sujeta al control celular, dándole a la célula un control más preciso de la actividad génica (206-209).

El balance relativo de expresión de coactivadores y correpresores en un determinado contexto celular determina la actividad de los factores de transcripción. Este balance de coactivadores y correpresores depende del contexto celular, y va a ser diferente según el tipo de tejido y la vía que se haya activado en respuesta a una señal extracelular. Existe un tipo de factores de transcripción involucrados en las respuestas a estímulos proliferativos, de supervivencia, metabolismo y diferenciación celular: los receptores nucleares.

5.2 Maquinaria basal de la transcripción

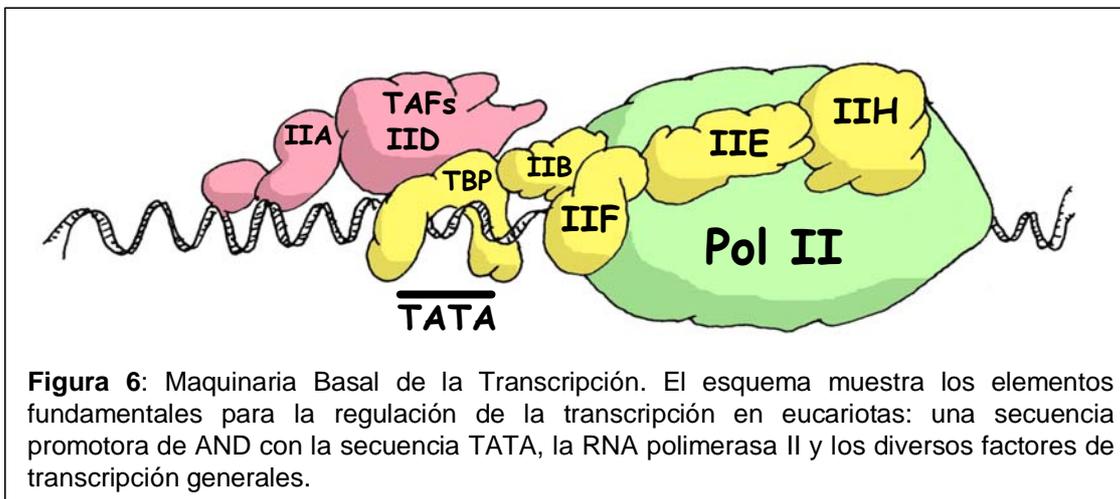
En trabajos iniciales, a mediados de los 80s, se trató de describir cómo activadores de unión a secuencias específicas de ADN eran capaces de estimular la iniciación de la transcripción por la maquinaria transcripcional de eucariotas. Surgieron trabajos donde describen la manera por la cual el factor de transcripción general TFIID se une a secuencias nucleotídicas TATA, presentes en muchos de los promotores de eucariotas. Esta unión fue sugerida como una representación de la iniciación de la transcripción (210-212). Luego la proteína de unión a TATA (TBP) fue identificada y sustituyó funcionalmente a TFIID en la dirección de la formación del complejo de preiniciación (213, 214).

Trabajos posteriores propusieron que TFIID contenía a TBP así como también factores que se asocian a TBP (TAFs), que actuarían como puente entre activadores de secuencias específicas de ADN y la maquinaria basal de transcripción, funcionando como coactivadores para mediar la transcripción dependiente de activadores (215).

Más tarde se identificaron una serie de polipéptidos asociados con TBP (los TAFs) (216), y actualmente está establecido que TFIID está compuesto por TBP y 10 o más (dependiendo del organismo) TAFs (217).

Experimentos *in vitro* revelaron que los TAFs son requeridos para la activación de varias clases de activadores, pero no para la transcripción basal. Una caracterización más en detalle de estos componentes de TFIID reveló que diferentes tipos de activadores pueden interactuar en forma directa con TAFs específicos, lo que sugiere que los activadores podrían utilizar diferentes TAFs como adaptadores para reclutar a TFIID a los diferentes promotores (218-223) (figura 6).

Se piensa que los TAFs estabilizan la unión del promotor con TFIID haciendo contactos con secuencias de ADN específicas a nivel del iniciador (INR) y elementos que se encuentran río abajo del promotor (DPE), que son secuencias que están presentes en zonas cercanas al sitio de iniciación de la transcripción en una cantidad de promotores (224-228). Los contactos de TAF logran aumentar la alta afinidad de TFIID por las secuencias en el promotor, y serían necesarias para lograr mayores niveles de actividad transcripcional en el ambiente restrictivo de la cromatina. Estudios recientes sugieren que los TAFs contribuirían para la activación de la transcripción de otras maneras. Por ejemplo, la subunidad más grande de TFIID, TAF250, es capaz de reclutar múltiples actividades enzimáticas, incluyendo actividades de proteína quinasa y de transferencia de grupos acetilos a las histonas (HAT) (229-231).



Se sabe que el core de la RNA polimerasa II eucariótica (Pol II) requiere de varios factores además del TFIID (TFIIA, B, C, E, F y H) para hacer blanco preciso en los promotores. Estos factores de transcripción generales (GTFs) también asisten con el desenrollado y la descondensación del ADN del promotor, así como también la transición de la iniciación de la transcripción a la elongación del ARN transcripto (232, 233). La Pol II y los GTFs (la llamada maquinaria basal de transcripción) están conservados entre eucariotas tanto en forma estructural como funcional. Sin embargo, a pesar de que en experimentos *in vitro* se ha demostrado que la maquinaria basal de transcripción es suficiente para mediar la transcripción basal, se sabe que el alto grado de regulación y la actividad transcripcional selectiva requieren la acción de activadores de secuencia específica. Estos se unen a elementos en el ADN que promueven la

transcripción (llamados elementos *enhancer*), que, en metazoarios, pueden estar ubicados hasta varias kilobases alejados del promotor. Es sabido que los activadores (y represores) sirven como componentes críticos del circuito regulatorio que asegura la transcripción precisa de un determinado gen, de acuerdo a las necesidades de la célula (234).

5.3 Complejo mediador

El fraccionamiento bioquímico de la maquinaria general de transcripción reveló otras actividades que pueden regular la respuesta de estos coactivadores, reprimiendo la transcripción basal o aumentando la transcripción activada. La identificación de complejos de coactivadores que interactúan con la Pol II, llamados Mediadores, provee evidencia experimental para suponer que algunos coactivadores de secuencias específicas de ADN funcionan reclutando la Pol II a las regiones promotoras de sus genes blanco (235, 236). Estos resultados son consistentes con la existencia de módulos funcionales y estructurales independientes dentro de la familia de complejos de coactivadores.

La interacción directa de coactivadores con el complejo mediador de la transcripción y la copurificación con la Pol II, sugiere un modelo en donde esta clase de cofactores vinculan los activadores de la transcripción y la Pol II para promover la formación de un complejo estable de preiniciación a nivel del promotor. Sin embargo, estos grandes complejos de coactivadores son multifuncionales y podrían contribuir a la activación de la transcripción en varios pasos limitantes, o promover la activación de diferentes maneras en los distintos genes (234). Estos complejos son reclutados al ADN a través de interacciones con activadores transcripcionales de secuencia específica, incluyendo a los receptores nucleares como receptor de vitamina D y el receptor de la hormona tiroidea (237, 238).

Si bien estos complejos de cofactores sirven de puente entre activadores que se encuentran a distancia del promotor y el promotor en sí con la Pol II, también funcionan induciendo cambios conformacionales en la estructura nucleosomal sobre distintos componentes del complejo activador (239).

5.4 El balance de coactivadores determina la actividad transcripcional

Los coactivadores son moléculas que se encuentran en forma limitante dentro de la célula, capaces de formar complejos que modulan en forma positiva la actividad transcripcional, interactuando con diversos factores de transcripción (240).

La regulación de la transcripción es dependiente no sólo de la activación del factor de transcripción y el remodelado de la cromatina, sino también de la presencia de coactivadores o correpresores (241, 242). Los coactivadores generalmente no se unen al ADN, sino que son reclutados en los promotores blancos a través de interacciones entre proteínas con los factores de transcripción blanco, y funcionan como moléculas vinculantes entre las proteínas de unión al ADN y las enzimas modificadoras que facilitan las alteraciones de la estructura local.

Existen numerosos reportes de coactivadores ya caracterizados, sin embargo nueva evidencia emergente sugiere que el repertorio de coactivadores es mucho más grande que el anticipado anteriormente.

5.4.1 Complejos coactivadores

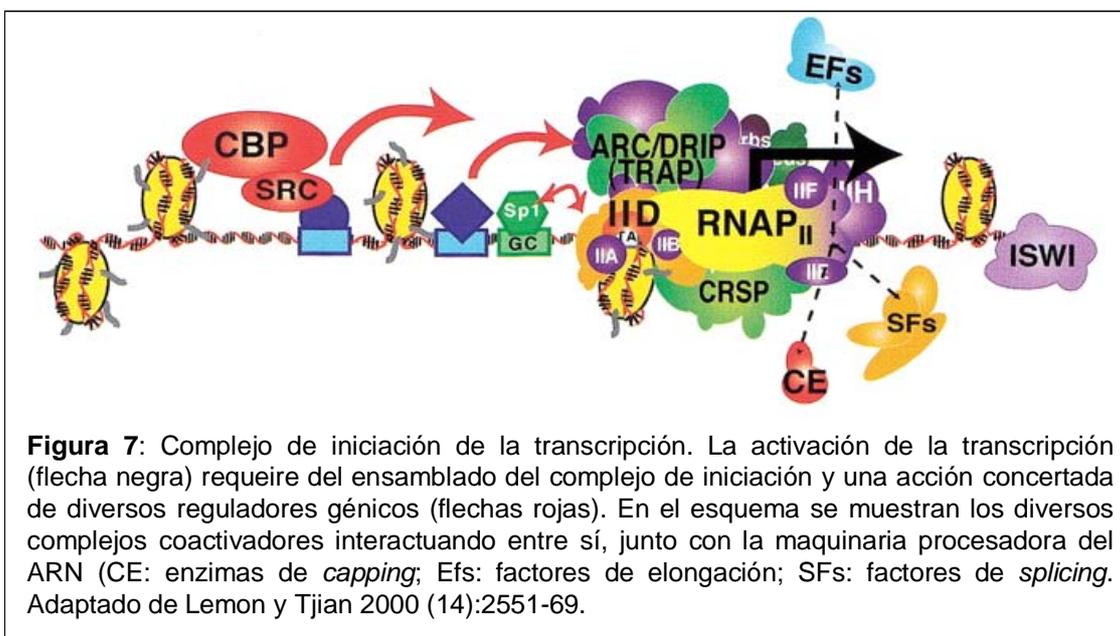
El complejo multiproteico TRAP/DRIP (que contiene a la proteína asociada al receptor tiroideo y la proteína que interactúa con el receptor de la vitamina D) interactúa con los receptores nucleares y con la maquinaria basal de transcripción, e influenciando en la transcripción mediada por receptores nucleares (243, 244). Este es un complejo que está formado por más de una docena de proteínas, e interactúa con los receptores nucleares de manera ligando dependiente a través de un solo componente denominado PBP (por proteína de unión a PPAR)/TRAP220/DRIP205. Este complejo reclutador de cofactores interactúa directamente con los factores de transcripción generales para activar la transcripción de genes blanco (240) (figura 7).

Por otro lado, el complejo SWI/SNF (cambio defectuoso/anti fermentador de sucrosa), está presente en células de mamíferos y es homólogo al complejo presente en células de *Drosophila*. Está demostrado que interviene en la regulación transcripcional de los receptores nucleares (245) ya que su actividad ATPasa puede ser reclutada por varios receptores nucleares, provocando el posterior remodelamiento -dependiente de ATP- de la cromatina, a través de la acetilación de histonas (240) (figura 7).

El complejo cointegrador de señales activadoras (ASC-2) contiene un subconjunto de proteínas del grupo tritórax que pueden metilar la histona H3 cuando es reclutado por los receptores nucleares a regiones específicas de la cromatina (246).

El complejo de coactivadores de receptores esteroideos de la familia p160 (SRC) está compuesto por miembros con actividad de transferencia de grupos acetilos, capaces de asociarse con el coactivador general CBP (proteína de unión a CREB), p300, el factor asociado a p300/CBP y metiltransferasas que incluyen a la metiltransferasa de arginina asociada a coactivador (CARM1) y metiltransferasa de arginina asociada a proteína (PRMT1). Estas enzimas remodeladoras de la cromatina son reclutadas a los promotores a través de interacciones entre los receptores nucleares y los SRCs de la familia p160, de forma ligando dependiente (247, 248) (figura 7).

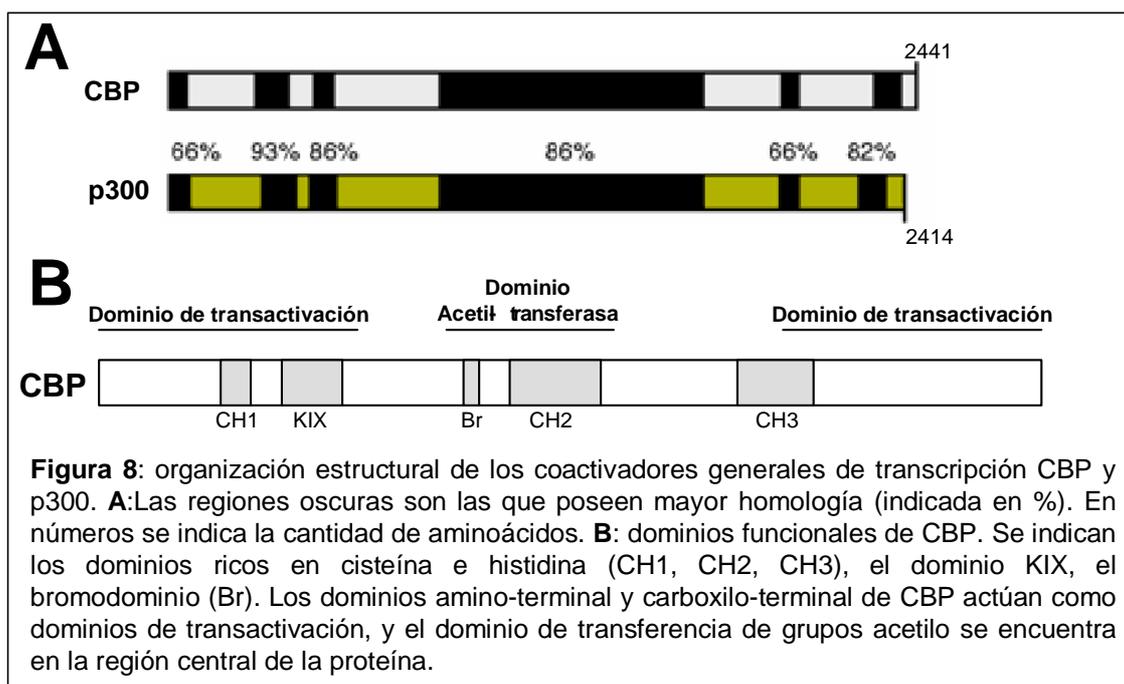
Nuestro laboratorio se centra en el estudio funcional de esta familia de coactivadores, y en particular este trabajo de tesis doctoral focaliza los estudios en uno de los miembros de la familia p160 de coactivadores de receptores esteroideos. A continuación se describen los miembros con los cuales estos factores son capaces de interactuar. Uno de los factores más importantes con los que interactúan los coactivadores de la familia p160 es CBP (figura 7), el cual se describe a continuación.



5.4.2 Coactivadores generales de la transcripción: CBP y p300

La proteína de unión a CREB (CBP) es una proteína altamente conservada, que comparte un 89% de homología a nivel del ADN con su homólogo murino, mientras que a nivel de proteína comparten un 95% (249). CBP está sumamente relacionada con p300: estas proteínas comparten un 63% de homología a nivel de proteína (250) (figura 8).

Ambas proteínas son claves en la interacción entre diferentes proteínas, es por esta razón que CBP se ha hecho la fama de “promiscua” (251). Tanto CBP como p300 son extremadamente versátiles en su habilidad por hacer de puente físico entre factores de unión al ADN y la maquinaria basal de transcripción, resultando en aumento en la actividad transcripcional de estos factores.



CBP fue identificada inicialmente en ensayos de interacción de proteínas, en asociación con la proteína de unión a elementos respondedores a cAMP (CREB), un factor de transcripción (252). Hoy en día se sabe que CBP y p300 son capaces de hacer contacto y conectar las funciones de proteínas, entre la que se puede citar a factores de transcripción como JUN, CREB, E1A, E2F, NF- κ B, receptores de hormonas, coactivadores de la familia p160, receptores nucleares, p53, proteínas de la maquinaria de transcripción basal (249).

Tanto p300 como CBP pueden nuclear el ensamblado de diversos cofactores en el complejo coactivador (253) incrementando la concentración relativa de estos factores en el ambiente transcripcional local. De esta manera se facilita las interacciones proteicas y las interacciones de las proteínas con el ADN. Dado el repertorio limitado de activadores, coactivadores y cofactores disponibles para las diversas respuestas celulares, lo más probable es que provean de sinergismo transcripcional y cooperación para armar grandes complejos regulatorios (254, 255).

Además de su función como puente entre factores de transcripción y la maquinaria basal de transcripción, CBP/p300 también son transferasas de grupos acetilos (HAT) (256, 257) (figura 8), y por lo tanto son capaces de producir modificaciones en las histonas y, a través de esta actividad enzimática, provocar el ambiente permisivo para la transcripción. Además de la acetilación de histonas, CBP es capaz de acetilar otras proteínas, como por ejemplo a la proteína supresora de tumores p53, regulando de esta manera su función como factor de transcripción (258).

Los ratones p300^{-/-} y CBP^{-/-} muestran fenotipos letales embrionarios similares, y defectos en crecimiento y el cerrado del tubo neural (259). Por otro lado, se demostró que fibroblastos p300^{-/-} tienen defectos específicos en la transcripción dependiente de ácido retinoico, pero mantienen actividad CREB normal (259). Ratones CBP^{+/-} muestran defectos en la diferenciación hematopoyética (260), y tienen probabilidades altas de desarrollar patologías hematopoyéticas a medida que envejecen. Estas patologías se observan en ratones CBP^{+/-}, no así en ratones p300^{+/-}.

5.4.2.1 Estructura de CBP y p300

Los genes de CBP y p300 están conservados en un gran número de organismos multicelulares, desde gusanos hasta humanos. A pesar de que CBP y p300 comparten una gran homología, los distintos análisis de ambas moléculas demuestran que tienen no sólo funciones sobrepuestas, sino que poseen funciones únicas para cada uno de ellos. En ensayos basados en transfecciones, ambos son capaces de transactivar a la mayoría de los factores de transcripción de secuencia específica (250, 261).

CBP y p300 comparten varias regiones conservadas presentes en muchos de los dominios conocidos de proteínas, algunos de ellos están esquematizados en la figura 8: (1) el bromodominio, el cual se encuentra en los HATs de mamíferos; (2) tres dominios

ricos en cisteínas e histidinas (llamados CH1, CH2 y CH3); (3) un dominio KIX; y (4) un dominio de homología a ADA2, el cual muestra gran similitud con el factor de transcripción de levaduras Ada2p. Los dominios CH1, CH3 y el dominio KIX estarían involucrados en la mediación de la interacción entre proteínas, ya que un número importante de proteínas es capaz de interactuar con estos dominios (262). El bromodominio es capaz de interactuar con numerosas proteínas acetiladas y también podría reconocer distintos motivos de acetilación de nucleosomas (263).

5.4.2.2 CBP y su rol en la actividad de NF- κ B

La unión de CBP a NF- κ B es esencial para la activación de este factor de transcripción, y aparentemente es dependiente de la fosforilación de p65 por la PKA (264-266). La asociación entre CBP/p300 y la subunidad p65 de NF- κ B ocurre a través de una interacción bivalente, que consiste en una interacción independiente de la fosforilación de NF- κ B por PKA y una interacción que sí es dependiente de la fosforilación por PKA. En la interacción dependiente de la fosforilación está involucrado el dominio KIX de CBP. La mutagénesis de CBP que abarque cualquiera de estas dos regiones (la dependiente de fosforilación por PKA y la independiente) provoca una disminución en la transactivación de NF- κ B.

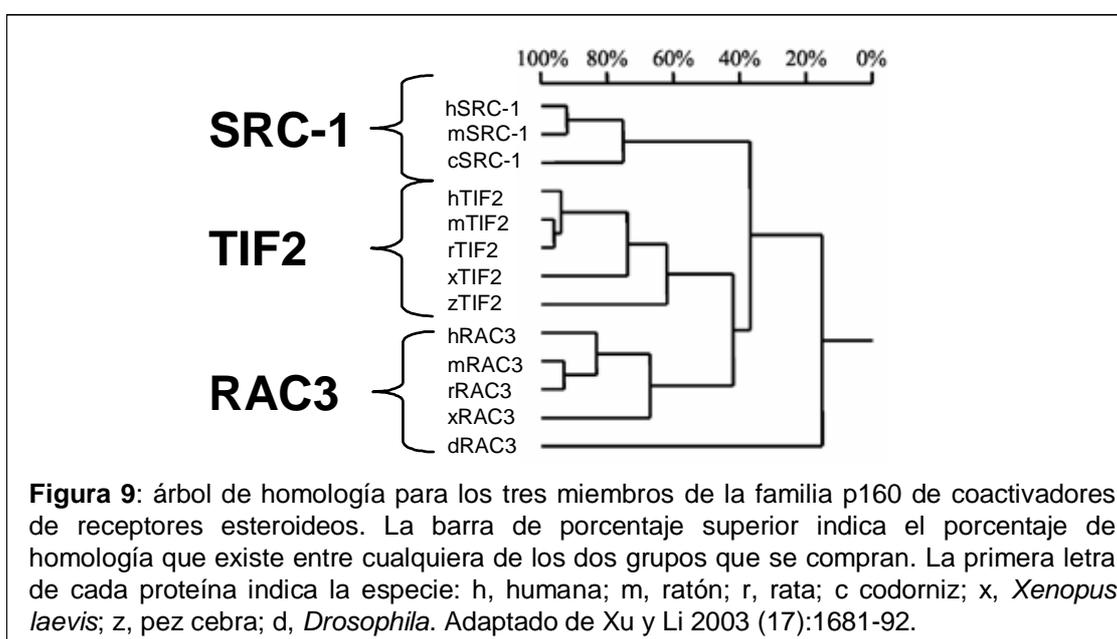
Para que NF- κ B sea capaz de unirse a CBP (y por lo tanto aumentar su actividad) es necesario que el sitio de interacción con CBP (en el extremo amino-terminal de p65) sea desenmascarado. Este sitio permanece tapado por su propio extremo carboxilo-terminal y la fosforilación de p65 por PKA libera al extremo amino-terminal de p65, el cual queda desenmascarado y libre para interactuar con CBP (266).

6. COACTIVADORES DE RECEPTORES ESTEROIDEOS DE LA FAMILIA P160

La familia de coactivadores de receptores esteroideos p160 (SRC) incluye un grupo de factores sumamente estudiados que funcionan a través de modificaciones enzimáticas, alterando directamente o indirectamente la estructura de la cromatina, y facilitando la iniciación de la transcripción de numerosos factores de transcripción. Sus tres miembros son SRC-1, el factor intermediario de la transcripción-2 (TIF2; conocido también como GRIP1, SRC-2, NCoA2) y RAC3 (conocido también como SRC3, AIB1,

TRAM1, P/CIP (267). Estos tres miembros poseen una alta homología, y es por ello que se los agrupa dentro de la misma familia (figura 9).

Existen reportes donde muestran la alteración en la expresión de coactivadores, aparentemente específica para determinados tipos celulares y tejidos. Por ejemplo el estradiol disminuye la expresión del ARNm de SRC-1 y la T3 aumenta su expresión en células pituitarias GH3 de ratas (268). El ácido retinoico aumenta la expresión de RAC3 en A549 y MCF-7 (269, 270). La estimulación de la PKA está asociada con la reducción de TIF2, pero no con su expresión (271). Algunos autores postulan que la expresión de RAC3 puede ser regulada positivamente por el ácido retinoico (272).



SRC-1 y TIF2 fueron identificados a través de ensayos de interacción con receptores esteroideos (PR, ER, TR y GR), y de ahí deviene el nombre de la familia que los incluye (273-278). RAC3, por su parte, fue identificado en una región cromosómica amplificada de una línea celular derivada de cáncer de mama, y posteriormente caracterizado como coactivador de receptores nucleares homólogo a SRC-1 y TIF2 (278-283). Los tres miembros de la familia SRC son capaces de interactuar con los receptores nucleares de forma ligando dependiente, y aumentar en forma significativa los niveles de transcripción de los receptores nucleares en comparación con líneas que expresan niveles normales de estos coactivadores (248).

Además de servir como coactivadores de los receptores nucleares, nuestro grupo de trabajo y otros autores vimos que estas moléculas son capaces también de

interaccionar y promover significativamente la actividad transcripcional de otros factores de transcripción, como el factor de respuesta en suero (SRF) (255), la proteína de activación-1 (AP-1) (284), NF- κ B (285), y la proteína de unión a elementos regulatorios de cAMP (CREB) (278). Cuando estos coactivadores son expresados en cultivos celulares, funcionan no sólo como coactivadores generales de los receptores nucleares, sino también como coactivadores de un número limitado de otros factores de transcripción.

6.1 Receptores nucleares

Los receptores nucleares componen una familia de factores de transcripción de eucariotas que regulan la expresión de genes en respuesta a señales endócrinas. Se los divide en receptores de tipo I (receptores esteroideos clásicos), que translocan al núcleo luego de la activación por ligando, y receptores de tipo II, que son retenidos dentro del núcleo aún en la ausencia de su ligando. (247). La identificación de la familia de receptores nucleares llevó a la práctica de una sucesiva serie de experimentos donde se usaron secuencias de oligonucleótidos degenerados, usados bajo condiciones de baja estringencia en experimentos de mapeo. Estas secuencias estaban basadas en las regiones conservadas de los receptores nucleares y usadas con el objeto de identificar clones que estuvieran relacionadas con los receptores nucleares. Estos experimentos permitieron descubrir la existencia de ADN codificantes que contienen dominios similares a aquellos presentes en los receptores nucleares. Ya que los ligandos para estas proteínas no habían sido previamente identificados, se los llamó receptores huérfanos (ONRs), y se los clasifica como receptores del tipo III dentro de la superfamilia de receptores nucleares (286, 287).

6.1.1 Mecanismos funcionales de los receptores nucleares

Los receptores nucleares están compuestos por cuatro módulos funcionales independientes. Estos son: el dominio modulador, el dominio de unión al ADN (DBD), la región bisagra y el dominio de unión al ligando (LBD) (286). El dominio modulador contiene generalmente una función de activación transcripcional (AF-1) y puede

interactuar con coactivadores de receptores esteroideos (SRCs) para aumentar la actividad del complejo receptor (288-291).

El dominio más conservado entre los receptores nucleares es el DBD, compuesto por dos módulos de dedos de zinc de 66 a 70 aminoácidos, y una extensión carboxilo-terminal (CTE). Los receptores nucleares pueden unirse al ADN en forma de monómeros, homodímeros y heterodímeros (292, 293), y la unión al sitio que contiene los elementos respondedores a la hormona también podría regular el reconocimiento del ligando (294).

Por su lado, la región bisagra es altamente variable tanto en longitud como en secuencia primaria. Como su nombre lo indica, funciona como bisagra entre el DBD y el LBD. Esta región debe ser lo suficientemente flexible como para permitir una rotación del DBD de 180°, permitiéndole a algunos receptores unirse como dímeros a los elementos respondedores de hormona (292), y también como sitio de anclaje para algunas proteínas correpressoras (295, 296).

El LBD es un dominio multifuncional que media la unión del ligando, la dimerización, la interacción con proteínas de choque térmico, la localización nuclear y las funciones de transactivación. Esta última función es dependiente de la presencia un motivo altamente conservado llamado Función de Activación-2 (AF-2), localizado en el extremo carboxilo-terminal del LBD (286).

6.1.2 Modelo clásico de activación de los receptores nucleares

El modelo de acción de los receptores nucleares (incluyendo al receptor de estrógeno (ER α y ER β), receptores de progesterona (PR-A y PR-B), el receptor de andrógeno (AR), el receptor de glucocorticoide (GR), y al receptor de mineralocorticoides (MR)) generalmente está representado por un receptor inactivo presente en el citoplasma acompañado por proteínas de choque térmico, el cual luego de la unión de la hormona cambia su conformación, forman homodímeros, se unen a sus elementos respondedores a hormonas (HREs) dentro del núcleo, reclutan coactivadores, y aumentan la transcripción de sus genes blanco (247, 297)

Este modelo es válido para algunos receptores esteroideos, sin embargo, la mayoría de los receptores nucleares se encuentran en forma constitutiva dentro del

núcleo y generalmente unidos al ADN en ausencia de su ligando, actuando como represores de la transcripción de genes (295, 296, 298-301).

La unión del ligando al receptor nuclear crea un cambio conformacional en su estructura, y permite que los coactivadores interactúen con él (302) y éstos son los que contienen los elementos que regulan en forma positiva la transcripción (303), a través de cambios a nivel de la cromatina o a nivel del receptor nuclear que son importantes para la modulación de su actividad. Dentro de las modificaciones que sufren los receptores nucleares están las que se producen por ubiquitinación, sumoilización, acetilación, metilación y fosforilación. Estas modificaciones se originan a través de la acción coordinada de numerosas enzimas involucradas en varios eventos de señalización celular: quinasas, acetil transferasas, deacetilasas, metil transferasas, demetilinas y enzimas relacionadas con la sumoilización y ubiquitinación (303).

Finalmente, la transactivación dependiente de ligando depende del reclutamiento de coactivadores y correguladores, y en este proceso el dominio AF-2 juega un rol esencial. Para modular la transcripción de sus genes blanco los receptores nucleares interactúan con proteínas de la maquinaria general de transcripción, y junto con otros factores proteicos son los que orquestan el ambiente permisivo para la transcripción.

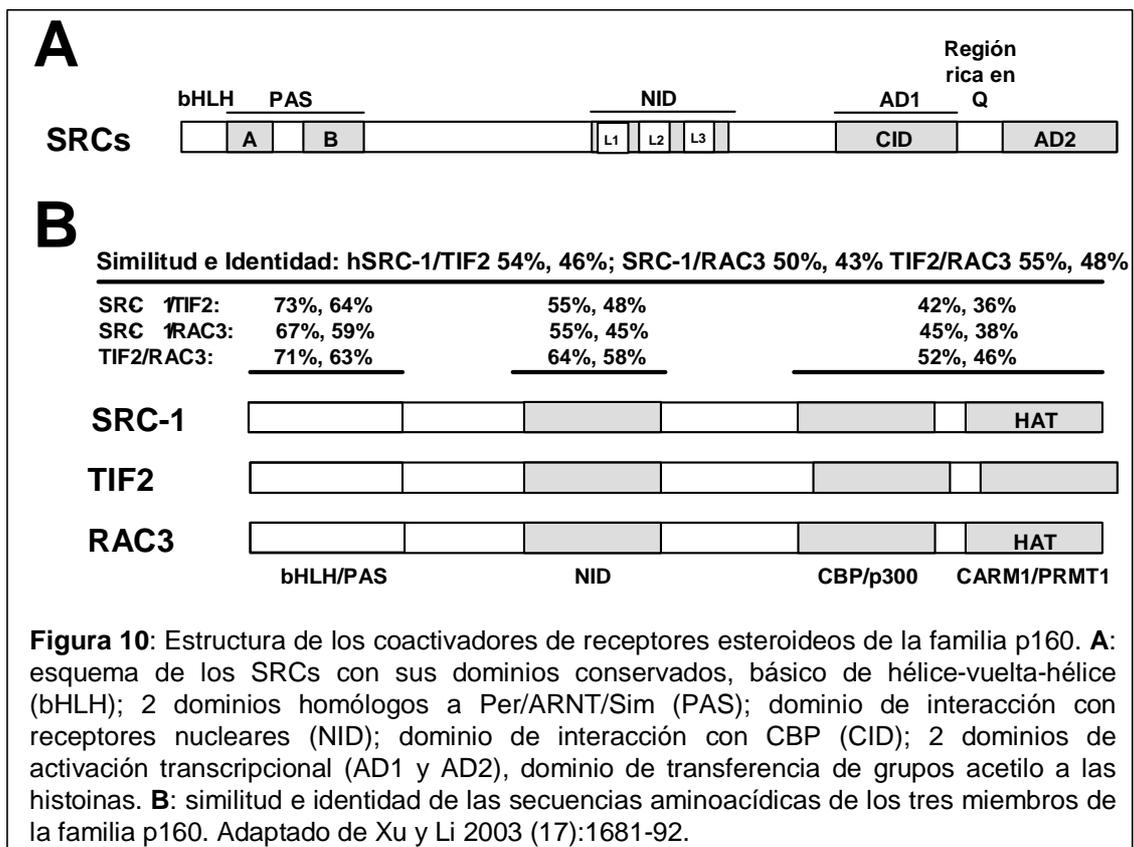
6.2 Estructura general de SRCs

Las proteínas codificadas por la familia de genes de la familia de SRC, tanto en humanos como en roedores, tienen una masa de alrededor de 160 kDa, y entre ellos tienen una similitud de secuencia de 50-55%, y una identidad de secuencia de 43-48%. Los miembros de esta familia comparten una estructura común que incluye un dominio básico de hélice-vuelta-hélice en el extremo amino-terminal, un dominio de homología Per/ARNT/Sim (PAS), un dominio de activación transcripcional carboxilo-terminal, y una región central que contiene tres motivos de LXXLL (donde L es leucina y X es cualquier aminoácido) que interactúa con receptores nucleares (241, 278, 281, 304-306) (figura 10).

Los SRCs tienen dos dominios de activación transcripcional (AD1 y AD2) (figura 10). La región AD1 es responsable de la interacción con CBP y p300, pero no interacciona con los receptores nucleares (277, 280, 291). La región AD2 es capaz de interaccionar con metiltransferasas, las cuales provocan el remodelamiento de la

cromatina en forma local, y el ensamblado de la maquinaria de transcripción alrededor del promotor (307, 308).

El motivo LXXLL dentro del NID forma una hélice-alfa anfipática que une la hendidura hidrofóbica de los LBD de los receptores nucleares luego de la unión del ligando (309). Aunque mutaciones en alguno de los tres motivos de LXXLL (L1, L2 y L3, ver figura 10) no produce la anulación de la interacción del SRC con los receptores nucleares, se vio que diferentes motivos de LXXLL y el contexto de la secuencia donde se encuentran estos motivos, tienen una unión diferencial para diferentes receptores nucleares (310).



6.3 Mecanismos de acción

Está demostrado que SRC-1 y RAC3 contienen actividad histona acetil transferasa (HAT), presentes en los dominios carboxilo-terminales (281, 311). A pesar de que estos dos coactivadores poseen actividad HAT, esta actividad es mucho más débil que aquella presente en CBP, p300 y p/CAF. En experimentos *in vitro* de ensayos transcripcionales de cromatina, con mutaciones sitio-dirigidas en los dominios de SRC-

1 involucrados en acetilación, se puede apreciar que la función coactivadora no está afectada, demostrando que este dominio no es esencial para el correcto funcionamiento y demostrando la cooperatividad que existe entre los componentes que forman el complejo de iniciación de la transcripción (311, 312).

Los coactivadores de la familia p160 también son capaces de interactuar con coactivadores generales como la proteína de unión a CREB (CBP) y p300 (312, 313), permitiendo a los receptores nucleares reclutar más enzimas con actividad HAT a la vecindad de los sitios blanco luego de la unión al ligando. Sumado a la actividad HAT, la metilación de proteínas mediada por coactivadores en la maquinaria de transcripción también contribuiría a la regulación de los receptores nucleares (307). Por ejemplo, la metil transferasa de arginina asociada a coactivadores (CARM-1) se une a la región carboxilo-terminal de los coactivadores de la familia p160 y es capaz de metilar a la histona H3, aumentando de esta manera la activación transcripcional mediada por los receptores nucleares (314).

Aunque los miembros de la familia de SRCs tienen cierta redundancia funcional, cada vez hay más evidencia que sugiere que los SRCs tienen roles diferentes en procesos biológicos. A pesar de que los tres miembros de la familia p160 poseen propiedades similares en cuanto a interacción con receptores nucleares y el aumento de su transactivación, varios reportes sugieren que sus actividades no se solapan, y que existe una división entre las funciones de SRC-1 y TIF2 *versus* RAC3 (278). El RNAm y los niveles de proteínas de RAC3 son mayores en líneas celulares de cáncer de mama como las BT-474, MCF-7 y ZR75 en comparación con otras líneas celulares (279). SRC-1 y TIF2 están expresados en bajos niveles en estas líneas celulares, lo que sugiere que RAC3 está específicamente involucrado en la patogénesis de estos tipos de tumores. Más aún, la viabilidad de ratones SRC-1^{-/-} podría deberse en parte a la sobreexpresión compensatoria que se observa de TIF2 en algunos tejidos (315). Los niveles de RAC3 no cambian en estos tejidos en comparación con los ratones salvajes, apoyando al diferente rol funcional de este coactivador *versus* TIF2 y SRC-1. Los ratones SRC-1^{-/-} exhiben resistencia parcial a hormonas y una reducción en el crecimiento de órganos blancos de esteroides en respuesta a estimulación hormonal (315). Mientras que la eliminación de TIF2 demuestra que juega un rol crítico en las funciones reproductivas del ratón (316), los ratones RAC3^{-/-} poseen retardo en el crecimiento, tamaño menor y función reproductiva reducida del desarrollo de la glándula mamaria (317, 318).

SRC-1 y TIF2 poseen preferencias de unión a nueve diferentes receptores nucleares similares, pero estas preferencias no son idénticas. Por ejemplo, el AR se une perfectamente bien a TIF2, mientras que lo hace de manera muy débil a SRC-1 (319). Las preferencias de los receptores nucleares a diferentes coactivadores está vinculada con la estructura del dominio de unión del ligando de los receptores nucleares (306, 319-322). Por ejemplo, el receptor de vitamina D y el ER β interactúan con distintos motivos del dominio de interacción con los receptores nucleares del RAC3 (323), lo mismo ocurre con distintos dominios TIF2 y las afinidades que tienen los dominios de este coactivador para interactuar con el GR y el TR (320).

Así como existen diferencias en cuanto a las afinidades por los diferentes receptores nucleares y diferencias en cuanto a la utilización de distintos dominios en los sitios de unión a los receptores nucleares en los coactivadores, también está demostrado que existe cierto orden por el cual los coactivadores van armando el complejo con los receptores nucleares. Está demostrado, por ejemplo, el efecto que tienen las interacciones iniciales entre coactivador y receptor en el ensamblado del complejo coactivador en el promotor del virus de tumor mamario murino (MMTV): luego del tratamiento con esteroides, tanto el PR como el GR son reclutados al promotor MMTV, y se produce la posterior inducción de la transcripción. Se vio que el PR recluta preferencialmente a SRC-1 y CBP, mientras que el GR se asocia preferencialmente con TIF2, quien luego recluta a pCAF (324).

Se sugiere que los distintos SRCs juegan roles diferenciales en procesos biológicos y esta diferencia funcional puede resultar en parte por el reclutamiento preferencial de coactivadores. El contenido del complejo coactivador en un determinado contexto fisiológico regulará en forma positiva o negativa la actividad transcripcional de cada factor de transcripción con el que interactúa.

6.4 SRC-1

SRC-1 fue identificada en 1995 a través de ensayos de doble híbrido en levaduras interactuando y promoviendo la actividad transcripcional del PR. Mediante ensayos de *northern blot* de tejidos humanos y líneas celulares se determinó que se expresa como dos ARNm de 5.5 y 7.5 kb en una variedad de tejidos (273).

Localizado en el cromosoma 2 (p23) en humanos, y en el cromosoma 12 (A2-3) en ratón (325, 326), el gen que codifica para el coactivador SRC-1 codifica para una proteína ampliamente expresada en muchos tejidos y tipos celulares. La expresión de SRC-1 fue detectada por ensayos de *northern blot* en tejidos de cerebro, músculo esquelético, pulmón, riñón, pituitaria, estómago, bazo, testículos, corazón, páncreas, hígado, hipotálamo, glándula adrenal y glándula tiroidea (268, 272). La proteína de SRC-1 fue identificada en testículos, cerebro, pulmón, hígado y corazón (278, 315). El fenotipo de ratones *knock out* para el gen de SRC-1 está caracterizado por la viabilidad y fertilidad de ambos sexos, sin embargo, se observa una significativa disminución de crecimiento de órganos blanco de hormonas esteroideas, como la próstata, testículos y glándula mamaria, en respuesta a estimulación hormonal (315).

6.4.1 SRC-1 juega un rol importante en el desarrollo y función del cerebro

Al nacimiento, las gónadas de las ratas producen testosterona que es convertida a dihidrotestosterona y estradiol en el cerebro. La dihidrotestosterona activa al AR y da como resultado un comportamiento masculino (incrementando comportamientos típicamente masculinos). En ratas macho el estradiol activa el ER y de ello resulta el desarrollo del núcleo sexualmente dimórfico (SDN) y un comportamiento defeminizado (una disminución de comportamientos típicamente femeninos). La infusión de testosterona en cerebros de ratas femeninas en etapa neonatal también da como resultado un mayor tamaño del SDN y desarrollo de comportamiento masculino.

La regulación negativa de SRC-1 por infusión de oligonucleótidos *antisense* en el hipotálamo de ratas femeninas tratado con andrógenos en estado neonatal reduce significativamente el volumen del SDN y bloquea el comportamiento defeminizado. De la misma manera, ratas macho tratadas con el *antisense* de SRC-1 en etapa neonatal, muestran niveles más altos de comportamiento femenino. Estos resultados sugieren que SRC-1 juega un rol importante en el desarrollo del SND y la defeminización comportamental mediado por el ER durante la diferenciación sexual en el desarrollo del cerebro (327).

6.4.2 Rango de acción de SRC-1

Varios estudios indican que SRC-1 es capaz de mediar las interacciones funcionales entre los dominios AF-1 y AF-2 de los receptores esteroideos, lo que indicaría que el ensamblado del complejo de iniciación de la transcripción podría estar asistida por este coactivador (291).

Este coactivador posee un amplio rango de especificidad para el aumento de activación de la transcripción de los receptores nucleares dependientes de ligando. Entre estos receptores se encuentran el receptor de progesterona, el receptor de glucocorticoides, el receptor de estrógeno, el receptor de la hormona tiroidea (TR), los receptores de ácido trans retinoico (RXR) (273), el factor nuclear 4 de hepatocitos (HNF-4) (328) y el receptor del proliferador del peroxisoma activado (PPAR γ) (329).

En ratones SRC-1^{-/-} se observa una resistencia parcial a la hormona tiroidea ya que los niveles de hormona tiroidea T₃ y T₄ y tirotropina (TSH) están significativamente aumentados en el suero con respecto a los ratones normales. Estos resultados demuestran que SRC-1 es requerido para la regulación negativa de TSH por T₃, apoyando la hipótesis de que la resistencia a TH en humanos puede ser causada por defectos en coactivadores del TR, como SRC-1 (330).

El rol de SRC-1 en la función del receptor activado por proliferadores en peroxisoma (PPAR γ) estaría relacionado según el tejido, ya que en hígado, los genes regulados por el factor de transcripción PPAR γ no requerirían de su función (331), pero en grasa parda, el PPAR γ gatilla el reclutamiento de un complejo coactivador que contiene PCG-1, SRC-1 y CBP/p300, necesarios para su activación (332). La inactivación de SRC-1 impide la actividad termogénica de PGC-1 en la grasa parda, disminuye el expendio de energía, y provoca obesidad si se trata al animal con una dieta rica en grasas (333).

Además de estos receptores nucleares, es notable la capacidad de SRC-1 en la activación de otros factores de transcripción no relacionados con los receptores nucleares: AP-1 (334) y NF- κ B (335).

La gran promiscuidad de SRC-1 llevó a algunos autores al estudio del rol de esta molécula en funciones antagónicas, como la que existe entre el receptor de glucocorticoides y NF- κ B. Se demostró, por estudios de expresión de plásmidos reporteros, que la sobreexpresión de SRC-1 aumenta la actividad transcripcional del GR

y del NF- κ B de forma dosis-coactivador dependiente. Además, se demostró que la sobreexpresión de SRC-1 es capaz de revertir el efecto inhibitorio que existe entre estos dos factores de transcripción (336).

6.5 RAC3

Localizado en el cromosoma humano 20 (q12) (279, 326), este coactivador presenta un amplio rango de expresión. Basado en ensayos de *northern blot* (272, 281-283, 315), la expresión del gen para este coactivador fue localizada en placenta, páncreas, pulmón, riñón, cerebro, hígado, útero, pituitaria, glándula mamaria y testículos. La proteína se expresa en testículos, pulmón, hígado, cerebro, corazón y glándula mamaria (278, 318).

RAC3 es un coactivador de receptores esteroideos. Es capaz de promover la activación transcripcional de receptores activados por ligando en células de mamíferos, como el receptor de progesterona, el receptor de estrógeno y el RAR (280, 283).

RAC3 es una proteína que posee un peso molecular de 154 kDa, posee seis motivos consenso LXXL, los cuales están altamente cargados y que formarían las hélices anfipáticas capaces de interactuar con dominios hidrofóbicos de diversas proteínas y en particular, de los receptores nucleares. A diferencia de SRC-1 y TIF-2, RAC3 posee 26 residuos consecutivos de glutamina.

Esta proteína tiene una potente actividad histona acetiltransferasa, se une directamente a receptores nucleares estimulando su actividad transcripcional en forma hormona dependiente. Además, es capaz de reclutar a los coactivadores generales CBP y p/CAF, formando un complejo multiproteico de coactivación (281).

En ratones RAC3^{-/-} machos, la función reproductiva está levemente reducida, mientras que en ratones hembra el desarrollo y las funciones del sistema reproductivo son anormales (318). En primer lugar, los niveles de estrógenos están reducidos en hembras RAC3^{-/-}, lo que causa un retraso en el desarrollo pubertal claramente evidenciado por un retraso en la abertura de la vagina y en el desarrollo de las glándulas mamarias (318). Además, el desarrollo alveolar de las glándulas mamarias en respuesta a estímulos combinados de estrógeno y progesterona disminuye significativamente en hembras RAC3^{-/-}, sugiriendo que RAC3 estaría involucrado en la proliferación celular

estimulada por progesterona y diferenciación glandular durante el desarrollo alveolar de mama (318).

6.5.1 “Amplificado En Tumores de Mama”

Una característica notable de RAC3 o AIB1 (por *Amplified In Breast cancer*) es que posee frecuencias de amplificación variable en tumores de mama humanos (279, 337). Más aún, el ARNm de RAC3 también está sobreexpresado en varios tipos de tumores de mama (279, 338). Sin embargo, sólo el 10% de tumores de mama presentan niveles elevados de proteína RAC3 (339). La sobreexpresión de RAC3 en tumores de mama invasivos está correlacionado con altos niveles del receptor del factor-2 de crecimiento epidérmico (HER2)/neu (338, 340). En pacientes tratados con tamoxifeno, se observa el alto nivel de expresión de RAC3, y por esto se lo asocia con la resistencia a esta droga, y a una peor tasa de supervivencia del paciente. Aquellos pacientes con niveles altos de RAC3 y HER2 muestran la peor respuesta a la terapia con tamoxifeno (340).

Es de destacar que RAC3 interacciona con los receptores de estrógeno en forma ligando dependiente, y la actividad transcripcional de dicho receptor se ve aumentada cuando se transfectan células con este coactivador (279), por lo que estos autores sugieren que éste podría contribuir al desarrollo de cáncer en aquellos tejidos donde se exprese, y particularmente al cáncer dependiente de esteroides.

En células de cáncer de mama, RAC3 puede ser reclutado al promotor de respuesta a estrógeno de ciclina D1, promoviendo la expresión de ciclina D1, mientras que la depleción de RAC3 en células de cáncer de mama MCF-7 reduce de forma significativa la proliferación celular mediada por estrógenos y la inhibición de la apoptosis (339, 341).

RAC3 también estaría involucrado en la tumorigénesis de la glándula mamaria por la expresión del virus tumoral v-HA-ras de tumor mamario, en células epiteliales, dado que en ratones RAC3^{-/-} estos tumores están suprimidos (342). Estos descubrimientos indican que al menos RAC3 junto con otros coactivadores, podrían jugar un rol permisivo en la iniciación y progresión de cáncer de mama.

6.5.2 Mecanismo de acción de RAC3

Todavía no están del todo claros los mecanismos bioquímicos por los cuales RAC3 ejerce su efecto coactivador. Algunos trabajos postulan mecanismos de acción a través de diversas señales que terminan modificando la molécula. Por ejemplo, se encontró a RAC3 asociado con la quinasa IKK (343). Esta quinasa podría fosforilar a RAC3 y promover la localización nuclear de RAC3. Más aún, nuestro grupo determinó que RAC3 es capaz de aumentar la expresión de genes mediada por NF- κ B (285), mientras que los niveles de expresión del factor-1 regulatorio de interferón, un reconocido gen blanco de NF- κ B, están reducidos en ratones RAC3^{-/-} (343). Estas observaciones apoyan los descubrimientos hechos por nuestro laboratorio, que demuestran que RAC3 juega un rol importante en la respuesta inmune e inflamatoria, así como también en la supervivencia celular mediada por NF- κ B.

Por otro lado, recientemente se han caracterizado seis sitios de fosforilación de RAC3 y demostrado que diferentes señales producen diferentes patrones de fosforilación de RAC3 (344). Estas fosforilaciones de RAC3 serían requeridas para una óptima interacción con los activadores transcripcionales y otros coactivadores. Esto se debería a que distintas combinaciones de sitios fosforilados serían responsables de la función diferencial de distintos factores de transcripción, y por lo tanto, cumpliendo diferentes funciones fisiológicas. Estos autores demuestran que múltiples quinasas están involucradas en sitios específicos de fosforilación de RAC3: p38 MAPK, JNK, IKKs y PKA (344). De acuerdo a observaciones hechas por el grupo de O'Malley, RAC3 es un sustrato de la IKK, y su localización celular depende de su fosforilación (343).

6.6 TIF2: Factor Intermediario de la Transcripción

TIF2 fue identificado por primera vez en 1996, en ensayos de doble híbrido de levadura, asociado al dominio de unión de hormona del receptor de glucocorticoides (276). El gen que codifica para TIF2 está localizado en el cromosoma humano 8 (q21),

y su ARNm detectado en numerosos tejidos: placenta, testículos, cerebro, hígado, corazón y útero (272, 277, 315). La proteína TIF2 fue detectada en testículos, pulmón, cerebro, hígado y corazón, mediante ensayos de *western blot* (278). Mediante ensayos de inmunohistoquímica, fueron detectados diferentes niveles de TIF2 inmunoreactivo en células epiteliales de varios tejidos, entre ellos el tracto gastrointestinal, el páncreas, el riñón, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, pulmón y glándula adrenal. La proteína TIF2 es también expresada en células del estroma del colon, del útero y en glándula mamaria. Mediante ensayos de inmunohistoquímica, no se detectó a TIF2 en hepatocitos, glándula tiroide ni músculo estriado (345).

6.6.1 Estructura general

Esta molécula posee dos dominios de activación autónomos AD1 y AD2 capaces de estimular la transcripción (277). Posee un único dominio de interacción con receptores nucleares (NID), compuesto por tres módulos que contienen el motivo LXXLL. La actividad del dominio AD1 estaría mediada por CBP, mientras que el dominio AD2 es independiente de la interacción con CBP (306). En 1998 el grupo dirigido por Gronemeyer demostró que un péptido conteniendo el NID del TIF-2 es capaz de inhibir la actividad dependiente de ligando de numerosos receptores nucleares, demostrando de esta manera que la actividad AF2 de los receptores nucleares es dependiente del TIF-2 endógeno o de otros coactivadores que reconozcan una superficie similar en los dominios LBD de los receptores nucleares (306).

6.6.2 Rol fisiológico

Los ratones TIF2^{-/-} muestran crecimiento somático normal, sin embargo la fertilidad de ellos está disminuida en forma significativa tanto en machos como en hembras. La hipofertilidad en machos se debe a la disminución en el número de espermatozoides, maduración defectuosa en del acrosoma espermática y degeneración testicular dependiente de la edad. Los defectos en la fertilidad masculina podrían estar originados en las células de Sertoli, ya que TIF2 está expresado en los testículos, y más

específicamente en este tipo celular. La ausencia de TIF2 en este tipo celular lleva a la acumulación de lípidos, apoptosis germinal, y desprendimiento de las células germinales de las células de Sertoli (316).

La hipofertilidad en ratones TIF2^{-/-} femeninos se debe a la hipoplasia de la placenta causada por la falta de TIF2 en células estromales que llevan al desarrollo de la placenta (316). Los ratones TIF2^{-/-} no presentan un comportamiento sexual diferente al de los ratones normales, sin embargo cuando ratas son tratadas con oligonucleótidos antisentido para TIF2 en el hipotálamo, estas ratas hembras salvajes presentan un bloqueo en el comportamiento sexual (346).

6.6.3 TIF2 es clave en el metabolismo de los lípidos

Esta demostrado que TIF2 juega un rol importante en el metabolismo de los lípidos y el balance energético (333). En tejido adiposo blanco, TIF2 funciona como coactivador para PPAR γ . En ratones TIF2^{-/-}, el tejido adiposo blanco expresa niveles superiores de leptina y niveles inferiores de genes involucrados en la antilipólisis, reabsorción y atrapado de ácidos grasos. Entre estos genes están las perlipinas, la proteína de unión a ácidos grasos aP2, lipasa de lipoproteína y el PPAR γ , provocando niveles de lipólisis mayores y un bajo potencial para el almacenamiento de los ácidos grasos. En el tejido de grasa parda, SRC-1 es mejor coactivador que TIF2 en cuanto a la estabilización del complejo formado por PPAR γ y PGC-1 para la activación de la transcripción. La ausencia de TIF2 en grasa parda provoca un aumento en la expresión de la proteína desacoplada-1, PGC-1 y acetil coenzima A oxidasa, provocando niveles más altos de expendio de energía debido al aumento de oxidación de ácidos grasos y el desacoplamiento de la respiración. Como resultado, los ratones TIF2^{-/-} muestran una mayor temperatura corporal bajo condiciones de frío, menos acumulación de grasas, bajos niveles de glicemia y triglicéridos, y una mayor sensibilidad a insulina. Estos ratones son más aptos para protegerse contra la obesidad inducida por una dieta rica en grasas o la hiperfagia (333).

6.6.4 Rango de acción

Capaz de interactuar de forma hormona dependiente con el receptor de glucocorticoides, el receptor de estrógeno, el receptor de mineralocorticoides, el receptor tiroideo, el receptor de la vitamina D y el receptor del ácido retinoico, TIF-2 es una proteína de un peso molecular de 160 kDa, que según estudios hechos *in vitro*, es capaz de asociarse a los dominios LBD de varios receptores dependientes de ligando. Por otro lado, estudios hechos *in vivo*, demuestran que esta proteína es capaz de asociarse con RAR α , el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona en presencia de hormona, pero no es capaz de asociarse en presencia de antagonistas hormonales (276, 277, 347). También es capaz de asociarse con ROR α , un receptor nuclear huérfano que tiene un rol importante en el desarrollo del cerebro, el crecimiento celular, la diferenciación, el metabolismo de lípidos, el mantenimiento de la homeostasis y la oncogénesis (348).

Li y colaboradores demostraron que en células T47D, el GR recluta preferentemente a TIF2 entre los coactivadores de la familia p160, mientras que el PR interactúa con SRC-1 (324).

Está demostrada la participación de estas moléculas en el desarrollo de leucemias, tal es el caso de TIF2 y CBP, en los cuales se observan eventos de translocación y fusión génica a otras proteínas clave en leucemia mieloide aguda (AML) (349-357). Se ha visto que en determinados pacientes con AML existen inversiones que provocaron la fusión entre una proteína llamada MOZ a TIF2. Se sugiere que TIF2 haría de puente para interactuar con otros coactivadores, como CBP, y de esta manera, la expresión de los genes regulados por MOZ se vería aumentada por cambios conformacionales en la cromatina de sus genes blanco, dando lugar al fenotipo AML (354). También está demostrado que la fusión MOZ-TIF2 actúa como dominante negativo para la actividad transcripcional de los activadores dependientes de CBP, como el factor de supresión tumoral p53 (355).

La expresión de TIF2 y CBP es mayor en carcinomas intraductales que en glándula mamaria normal, mientras que los niveles del correpresor NCoR son menores en carcinomas invasivos que en carcinomas intraductales, sugiriendo que cambios en el patrón de expresión de correguladores podría ocurrir durante la progresión del cáncer (358).

6.6.5 Localización celular

En cuanto a la localización celular de TIF2, hay bastante discrepancia y distintos resultados. Algunos trabajos sugieren que en determinados tipos celulares, la localización de TIF2 es nuclear, y está localizada en forma heterogénea, como ocurre en células COS-1 (359). Sin embargo, en los mismos cultivos celulares, la distribución de TIF2 varía desde una distribución uniforme, a una altamente concentrada en focos nucleares (360-362). Se ha demostrado que existe colocalización entre TIF2 y varios receptores nucleares, entre ellos el GR, ER α , AR, TR y el receptor del ácido retinoico (RAR α) (362-364). Por otro lado, se vio que el AR es capaz de cambiar la distribución de TIF2, del núcleo al citoplasma (365), y también se vio que TIF2 colocaliza con componentes del proteosoma, lo que por otro lado significaría que el proteosoma 26S podría degradar a TIF2, regulando de esta manera la actividad del mismo (361). Otros trabajos muestran que TIF2 estaría esencialmente localizado en el núcleo de mioblastos proliferativos, sin embargo hay expresión de TIF2 en el citoplasma de este tipo celular (366). Durante el proceso de diferenciación de miocitos se induce la localización de TIF2 al núcleo, y luego se produce la interacción del coactivador con MEF2 (un factor promotor de miocitos) para funcionar de una manera cooperativa en el control de diferenciación y miogénesis (366). Se postula que diferentes MAPks regulan el tráfico de SRCs, a través de diferentes cascadas de señalización que terminan activando el transporte diferencial de los SRCs del citoplasma al núcleo (366).

6.7 Actividades dirigidas contra la cromatina

La mínima unidad de cromatina es el nucleosoma, que consiste en 146 pares de bases de ADN enrollado alrededor de un octámero de proteínas de histonas compuestas por un heterotetrámero (H3-H4) $_2$ y dos dímeros H2A-H2B (367, 368). Las histonas vinculantes, como la H1 y otras proteínas asociadas a la cromatina empaquetan el ADN en estructuras más ordenadas.

La estructura de la cromatina puede variar desde la eucromatina, donde las regiones genómicas están relajadas y transcripcionalmente activas, a heterocromatina, donde las regiones genómicas se encuentran de forma más ordenada, condensada y silenciada (369-371).

Los resultados más recientes sugieren que las actividades dirigidas contra la cromatina juegan un rol importante en la facilitación de la unión de activadores y la maquinaria general de transcripción al ADN cromosomal. Más aún, muchos coactivadores reclutados por activadores tienen actividad modificadora de las histonas y están directamente involucrados en la alteración de la estructura local de la cromatina para facilitar la activación de la transcripción. Es el caso de los complejos remodeladores del nucleosoma dependientes de ATP, que utilizan energía para perturbar o reorganizar la estructura de la cromatina por desestabilización y desplazamiento de los contactos entre el ADN y las histonas, para luego permitir la unión de activadores y el aparato transcripcional a las regiones promotoras y *enhancers* (368, 372, 373).

6.7.1 Acetilación de histonas

Los genes transcripcionalmente activos están correlacionados con un incremento en la acetilación de las histonas, mientras que los genes silenciados (como aquellos ubicados en la heterocromatina) son asociados generalmente con histonas hipoacetiladas (374). Las proteínas involucradas en este proceso de transferencia de grupos acetilos a las histonas (HAT) forman parte del otro grupo de modificadores de la cromatina. Ya fue descrito un gran número de coactivadores de la transcripción en mamíferos con actividad HAT. Entre ellos la proteína de unión a CREB (CBP) y la proteína que interactúa con E1A (p300), los coactivadores de la familia p160, representada por SRC-1, TIF2 y RAC3 y pCIP, entre otros (349, 375). Además de transferir grupos acetilos a las histonas, algunas de estas proteínas pueden transferir grupos acetilos a otros sustratos, y estas modificaciones pueden contribuir significativamente al mecanismo general de activación de la transcripción de un determinado grupo de genes. Por ejemplo, p300 es capaz de acetilar a p53 y aumentar la unión de este factor de transcripción al ADN (258).

Muchas actividades modificadoras de histonas exhiben selectividad por histonas en particular, así como también lisinas individuales dentro de las histonas. Esta selectividad es especialmente prominente dentro de un contexto de sustratos nucleosomales (281, 311, 376). De esta manera, los diferentes complejos con actividad HAT promueven la formación de patrones diferentes de acetilación, y puede ser posible que las secuencias de histonas acetiladas puedan ser reconocidas por dominios

modulares específicos e intrínsecos a las actividades que harán blanco sobre la cromatina.

RESUMEN DE OBSERVACIONES A REMARCAR

NF- κ B es un factor de transcripción clave en procesos antiapoptóticos y oncogénicos que regula numerosos genes involucrados en ciclo celular y proliferación, y además está sobreexpresado e hiperactivado en diversos tipos de tumores. Su actividad transcripcional está regulada en forma positiva por diversos coactivadores, algunos de ellos también sobreexpresados en los mismos tipos de tumores. Este es el caso de los coactivadores de la familia p160, los cuales hemos encontrado que juegan un rol clave en diferentes modelos antiapoptóticos de una manera independiente de esteroides. Estos coactivadores poseen etiquetas que les permiten interactuar con receptores nucleares, sin embargo no se sabe aún con certeza cuál es el mecanismo de interacción con NF- κ B. Nada contradice la posibilidad de reclutamiento de otras moléculas regulatorias, o modificaciones post-traduccionales de los coactivadores de la familia p160 como fosforilación y señales alternativas de localización nuclear o citoplasmática. En algunos tumores se ve localización citoplasmática de coactivadores, lo que sugiere que la localización puede ser modulada para cumplir roles alternativos a los clásicos de intermediarios en la remodelación de la cromatina.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

De acuerdo con los antecedentes previamente mencionados se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

- 1- TIF2 es un factor necesario para la actividad de NF- κ B
- 2- Los mecanismos por los cuales el coactivador TIF2 aumenta la actividad transcripcional de NF- κ B no están solamente vinculados a su capacidad de reclutar actividad acetilasa de histonas, sino también, probablemente a otras actividades enzimáticas, o a su participación como moléculas “*scaffold*” sobre los factores de transcripción.
- 3- TIF2 no es una molécula de localización estrictamente nuclear, pudiendo cambiar su localización y actividad según las señales de su entorno
- 4- La localización y actividad del coactivador TIF2 están moduladas por las mismas señales (TNF- α) que activan a factores de transcripción (NF- κ B) con los cuales TIF2 se asocia.
- 5- El coactivador TIF2 podrá funcionar como un “integrador” de las señales de ciertas MAPKs y la activación de NF- κ B.

Para el testeo de estas hipótesis, se plantearon los objetivos que se detallan a continuación.

El objetivo principal de este trabajo es descubrir cuáles son los mecanismos moleculares por los cuales el coactivador TIF2 regula la actividad de NF- κ B, y la importancia fisiológica de la interacción entre este factor de transcripción y el coactivador. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1- Determinar si TIF2 es un factor necesario para la actividad de NF- κ B.
- 2- Determinar si TIF2 interacciona físicamente con miembros de la familia NF- κ B, así como con moléculas asociadas con su activación.
- 3- Determinar si TIF2 es sustrato de quinasas (p38 MAPK) activables por las mismas señales que activan a NF- κ B (TNF- α).
- 4- Determinar si estas señales pueden modificar la localización de TIF2 y su actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

**“The secret to creativity is knowing
how to hide your sources”.**

Albert Einstein (1879-1955)

1. CULTIVO DE CÉLULAS

Todo el manipuleo con células en cultivo se realizó en estrictas condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar, material plástico estéril descartable, y soluciones previamente autoclavadas o filtradas.

Células embrionarias humanas de riñón HEK 293 fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagles' serum) alta glucosa (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y gentamicina para evitar la contaminación con bacterias.

Las células fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ 5% en placas de plástico de 10 cm, y repicadas cuando su crecimiento llegara aproximadamente a un 90% de confluencia, lo que equivale a un repique cada cuatro días aproximadamente. Para levantar las células se utiliza Tripsina 1X (0.25% p/v y 1 mM de EDTA en PBS 1X).

SOLUCIONES UTILIZADAS

<i>PBS 10X</i>	
NaCl	1.37 M
KCl	26.8 mM
KH ₂ PO ₄	14.7 mM
Na ₂ HPO ₄	43 mM
Llevar a pH=7.4	

2. VECTORES DE EXPRESIÓN Y PLÁSMIDOS REPORTEROS UTILIZADOS

El plásmido reportero κB-Luciferasa fue gentilmente cedido por el Dr. Omar A. Coso, LFBM, Universidad de Buenos Aires.

Se utilizó el vector de expresión para la proteína β-Galactosidasa (RSV-β-gal) para normalizar los datos de unidades relativas de luciferasa obtenidos.

El plásmido pCR3.1 se utilizó como control de las transfecciones, y es el que se llama “vector vacío”.

El vector de expresión de pRC-HA-Rel-A humano fue gentilmente cedido por el Dr. J. DiDonato, Cleveland Clinic, y fue utilizado para la traducción de RelA *in vitro*.

El vector de expresión de pSG5-TIF2 fue gentilmente donado por el Dr. H. Gronemeyer, y fue descrito por Voegel *et al.* (306).

Los vectores de expresión de bacterias GST-TIF2[1-766] y GST-TIF2[766-1462] fueron donados gentilmente por el Dr. Kushner y fueron descritos por Webb *et al.* (290).

El vector de expresión pCEFL-HA-p38 fue gentilmente cedido por el Dr. Omar A. Coso, LFBM, Universidad de Buenos Aires, y fue utilizado para transfectar células para los ensayos de quinasas. Este vector no contiene promotor T7, necesario para la traducción *in vitro* de p38. Por este motivo p38 se subclonó dentro del vector pCDNA3 de Invitrogen. A continuación se detalla el procedimiento de subclonado.

El vector TIF2 antisentido se construyó a partir del subclonado del extremo 5' de pSG5-TIF2 en el vector pCR3.1 de invitrogen. A continuación se detalla el procedimiento de subclonado.

Los vectores de expresión de los mutantes puntuales de TIF2 (S1323A y S1323D) se construyeron a partir del pSG5-TIF2 utilizando el kit de mutagénesis sitio-dirigida de Stratagene (*QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit*). Se detalla el procedimiento de construcción más adelante, en esta sección.

3. SUCLONADO DE p38 DENTRO DEL PCDNA3

Se cortan 10 µg de vector pCEFL-HA-p38 con las enzimas de restricción BamH I y Not I en *buffer* D de Promega. El fragmento se corrió en gel de agarosa al 0.8%, y de ahí se eluyó cortando el fragmento y purificándolo con columnas de purificación de Promega (*Wizard PCR Preps DNA Purification System for Rapid Purification of DNA Fragments*). Utilizando el mismo método, se purificó la banda correspondiente al vector pCDNA3 cortado con BamH I y Not I.

Ambos fragmentos fueron cuantificados mediante espectrofotometría a 260 nm, y ligados con la enzima T4 ligasa del fago T4 (Promega). Para la reacción de ligación de HA-p38 a pCDNA3 se utilizó una relación 1:3 pCDNA3:HA-p38, en el *buffer* correspondiente para la ligasa del fago T4 (Promega). La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 16 horas, y posteriormente se transformaron *E. coli* DH5α para amplificar el nuevo plásmido pCDNA3-HA-p38.

4. CONSTRUCCIÓN DEL ANTISENTIDO DE TIF2

Para la construcción del antisentido de TIF2 se levantó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el extremo 5' del RNAm de TIF2 tomando como molde el pSG5-TIF2. El producto de PCR se ligó con el vector T-Easy (Promega). Luego, el inserto se cortó con enzimas de restricción XhoI y Hind III, y se lo insertó en la orientación antisentido dentro del vector pCR3.1 de Invitrogen (Figura 11A).

4.1 Diseño de los *primers*:

Los *primers* utilizados para la amplificación del fragmento del extremo 5' de TIF2 fueron:

Primer 5': 5'**CCGCTCGAG**TTCAAGATGAGTGGGATGGGAG^{3'} (en **negrita** está marcado el sitio para la enzima de restricción Not I).

Primer 3': 5'CCCA**AAGCTT**CACGCAAATCAAGCAGGACTG^{3'} (en **negrita** está marcado el sitio para la enzima de restricción Hind III).

Las secuencias de los *primers* se diseñaron de tal forma que la secuencia quede flanqueada por dos sitios de corte para dos enzimas de restricción, Not I y Hind III, de forma tal de poder clonar más fácilmente esta secuencia dentro del vector pCDNA3.1.

Como templado de la reacción de PCR se utilizó el vector pSG5-TIF2. Con estos *primers* se amplificó una secuencia nucleotídica de 762 pares de bases. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl:

pSG5-TIF2 10 ng	2 µl
Buffer 10X Taq	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer 5' 10 µM	1 µl
Primer 3' 10 µM	1 µl
Taq (5 U/µl)	0.5 µl
H ₂ O	38 µl

Se utilizó un termociclador programado para seguir el siguiente programa:

A- 5 min. a 94 °C (desnaturalización inicial del ADN)

- B- 30 seg. a 94 °C (desnaturalización de cada ciclo)
- C- 1 min. a 55 °C (unión de los primers al templado)
- D- 1 min. a 72 °C (elongación)
- E- Volver al punto B y repetir 30 veces.
- F- 5 min. a 72 °C (elongación final)

El producto de PCR se resuspendió en el *buffer* de siembra 6X (0.25% p/v de azul de bromo fenol; 0.25% p/v de Xylen Cyanol; 30% p/v de glicerol) antes de sembrarlo en un gel de agarosa 1% en *buffer* TAE 1X con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La separación por gradiente electroforético (o “corrida”) se realizó a 100 V durante 2 horas. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV, y fotografiados con una máquina fotográfica digital Kodak con los filtros correspondientes (figura 11A).

4.2 Purificación del fragmento producido por PCR a partir de geles de agarosa

La banda correspondiente al fragmento 5' del RNAm de TIF2 de 762 pares de bases se cortó del gel bajo luz UV, y luego se lo purificó de la agarosa utilizando el kit GeneClean (Bio 101). Este se basa en la utilización de una suspensión de partículas de alta afinidad al ADN doble cadena de más de 150 pares de bases.

El mismo procedimiento se utilizó para purificar el vector pCR3.1 cortado con las enzimas de restricción Not I y Hind III.

4.3 Subclonado del fragmento de TIF2 en el vector T-Easy

El producto de PCR fue ligado durante 16 horas a 4 °C en el vector T-Easy (Promega) utilizando un volumen de reacción de 2.5 µl:

T-Easy	0.25 µl
Buffer 2X	1.25 µl
Producto PCR	0.5 µl
H ₂ O	0.25 µl
Ligasa T4	0.25 µl

Con el producto de la ligación se transformaron *E. coli* DH5 α quimiocompetentes siguiendo el protocolo de transformación detallado más abajo, y se plaquearon las bacterias en placas de Petri con LB Agar suplementado con X-Gal para distinguir colonias blancas (T-Easy con inserto) de las azules (negativas). Se picaron con palillos estériles 10 colonias blancas al azar para realizar amplificaciones de ADN a pequeña escala. Se chequeó la presencia del fragmento amplificado por PCR mediante cortes con las enzimas de restricción Not I y Hind III (figura 11A).

Se eligió un clon positivo al azar y se tomó su preparación de ADN a pequeña escala para cortar 3 μ g de ADN con Not I y Hind III. El producto del corte con las enzimas de restricción se corrió en un gel de agarosa al 1%, y de allí se procedió a la purificación del fragmento de TIF2 (de 762 pares de bases) utilizando el kit GeneClean (Bio 101) (figura 11A).

El fragmento purificado se utilizó para ligarlo dentro del vector pCR3.1 (Invitrogen) ya cortado con Not I y Hind III y purificado. Para la reacción de ligación del fragmento de TIF2 antisentido en el vector pCR3.1 se utilizó una relación 1:3 pCR3.1:fragmento TIF2 en un volumen final de 20 μ l.

El producto ligado con la enzima ligasa T4 del fago T4 (Promega) fue utilizado para transformar *E. coli* DH5 α , las cuales fueron crecidas a 37 °C en placas de LB sólido suplementado con ampicilina 0.1 mg/ml como agente selectivo. Se picaron 10 colonias al azar y se realizaron preparaciones de ADN a pequeña escala, para chequear mediante cortes con Not I y Hind III cuáles de ellas eran clones positivos (figura 11A). Se eligió un clon positivo al azar, el cual se utilizó para preparar ADN a gran escala, y posteriormente purificarlo utilizando columnas de resina de intercambio iónico (Qiagen-tip 500).

5. CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES PUNTUALES DE TIF2

Se construyeron dos mutantes puntuales de TIF2 utilizando el kit de mutagénesis sitio dirigida de Stratagene (*QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit*) sobre el plásmido pSG5-TIF2.

Al primer mutante (S1323A) se le cambió el residuo aminoacídico serina 1323 por uno de alanina. Al segundo mutante (S1323D) se le cambió el residuo de serina 1323 por uno de ácido aspártico.

Para la construcción de los mutantes puntuales de TIF2 se diseñaron primers con cambios en la secuencia nucleotídica codificante para la serina 1323. Estos cambios se hicieron de manera tal que se sustituyera la serina 1323 original por una alanina o ácido aspártico. El plásmido pSG5-TIF2 se utilizó como molde para las PCRs, donde se utilizó la DNA polimerasa PfuTurbo, la cual replica ambas cadenas del plásmido con alta fidelidad, y sin desplazar los *primers* de oligonucleótidos mutantes. Los *primers* mutantes, cada uno complementario a las cadenas opuestas del vector pSG5-TIF2, fueron extendidos durante los ciclos de temperaturas. La incorporación de los oligonucleótidos generaron los nuevos plásmidos mutados. Luego de la PCR, los productos de reacción fueron tratados con la endonucleasa DpnI, la cual es específica para ADN metilado o hemimetilado, y se usó para digerir el pSG5-TIF2.

Luego el producto fue utilizado para transformar E. coli DH5a con el fin de amplificar ambas construcciones.

Secuencia nucleotídica codificante salvaje de TIF2 (está remarcado el codón que codifica para la serina 1323):

...^{5'}TCCAGGCTTTACTGGGGCTACGACTCCCCAG**AGC**CCACTTATGTCACCCCGAATG
GCACA^{3'}...

5.1 Secuencias de los primers mutantes utilizados:

Serina por Alanina (S1323A):

Primer 1 (sentido): ^{5'}GGGGCTACGACTCCCCAG**GCG**CCACTTATGTCACCCCG^{3'}
Primer 2 (antisentido): ^{5'}CGGGGTGACATAAGTGG**CGC**CTGGGGAGTCGTAGCCCC^{3'}

Serina por Acido aspártico (S1323D):

Primer 1 (sentido): ^{5'}GGGGCTACGACTCCCCAG**GAT**CCACTTATGTCACCCCG^{3'}
Primer 2 (antisentido): ^{5'}CGGGGTGACATAAGTGG**ATC**CTGGGGAGTCGTAGCCCC^{3'}

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l:

Buffer de reacción 10X	2.5 μ l
pSG5-TIF2 (10ng)	1 μ l
Primer sentido (125ng)	1 μ l
Primer antisentido (125 ng)	1 μ l
dNTPs	0.5 μ l
QuickSolution	1.5 μ l
DNA pol PfuUltra	0.5 μ l
H ₂ O	17 μ l

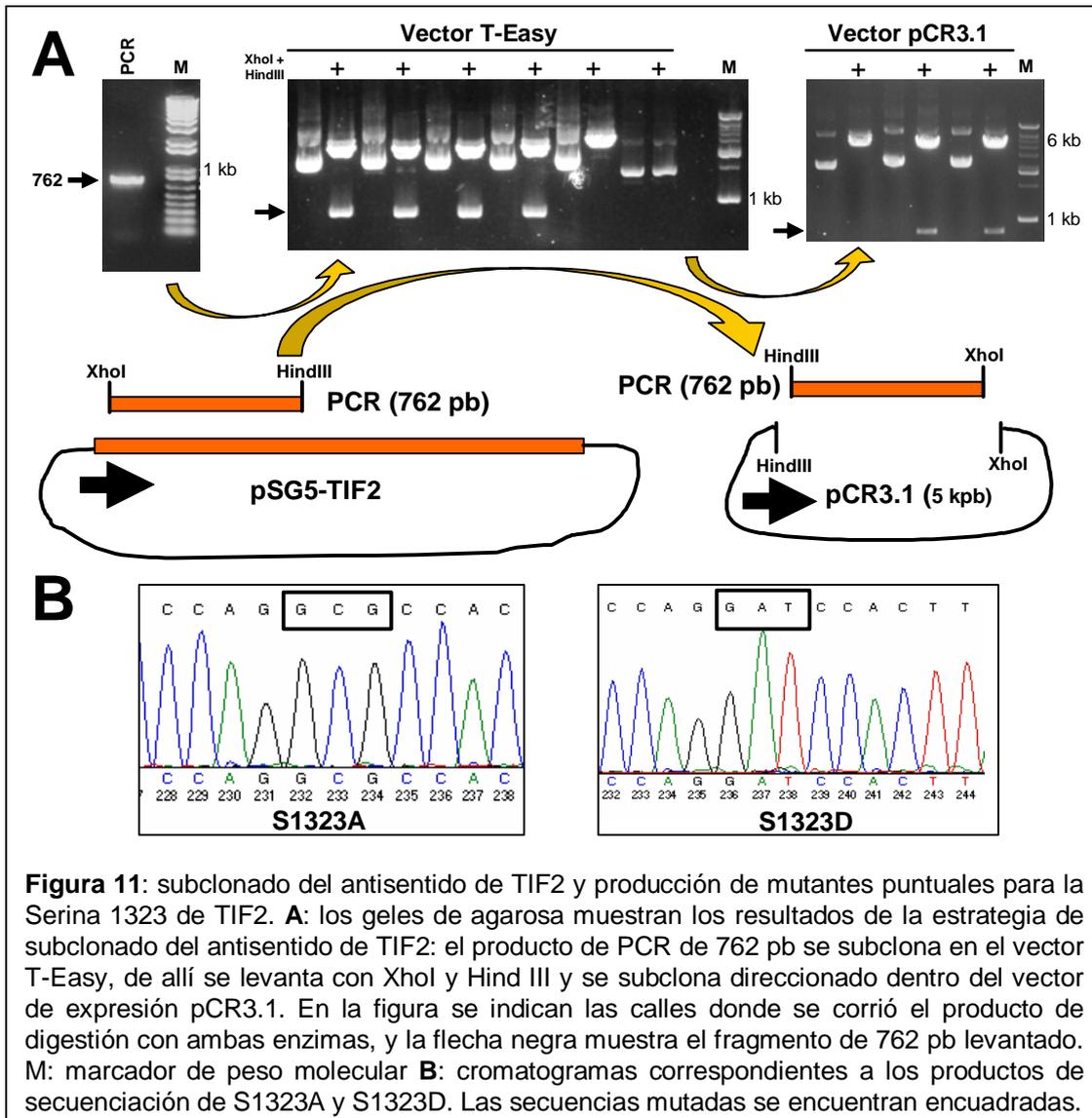
Se utilizó un termociclador programado para seguir el siguiente programa:

- A- 1 min. a 95 °C (desnaturalización inicial del ADN)
- B- 50 seg. a 95 °C (desnaturalización de cada ciclo)
- C- 50 seg. a 60 °C (unión de los *primers* al templado)
- D- 10 min. a 68 °C (elongación)
- E- Volver al punto B y repetir 18 veces.
- F- 7 min. a 68 °C (elongación final)

Finalmente se agregó 1 μ l de endonucleasa *Dpn* I (10 U/ μ l) directamente sobre los productos de amplificación, y se incubaron durante 1 hora a 37 °C para digerir el molde de pSG5-TIF2 salvaje.

Los productos obtenidos se mandaron a secuenciar, y para ello se diseñó el siguiente *primer*:

Primer de secuenciación de TIF2: 5' CAGAGGGAAATCCTGAACCA 3'. Los cromatogramas obtenidos se pueden observar en la figura 11B.



6. TRADUCCIÓN Y MARCACIÓN *IN VITRO* DE RelA Y p38

Para la traducción *in vitro* de ambas proteínas se utilizó un kit de traducción *in vitro* de germen de trigo (*TNT Coupled wheat germ extract systems*, Promega). Para ello primeramente se linearizaron los plásmidos pCDNA3-HA-p38 y pRC-HA-RelA con enzimas de restricción (Xho I y Not I respectivamente). Luego se realizó la reacción de traducción en un volumen final de 50 μ l:

Extracto de germen de trigo	25 μ l
Buffer de reacción	2 μ l
Polimerasa de ARN T7	1 μ l

Aminoácidos (menos metionina) 1 mM	1 μ l
[³⁵ S]Metionina	2 μ l
inhibidor de RNAsa (10 U/ μ l)	4 μ l
Plásmido cortado 1 μ g	2 μ l
H ₂ O	13 μ l

La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 2 horas.

7. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Se transformaron bacterias competentes con el plásmido que se deseaba amplificar.

A 100 μ l de bacterias quimiocompetentes *Escherichia coli* (DH5 α o BL21) se agregaron 50-100 ng de ADN plasmídico y se agitó suavemente para mezclar. Se incubaron las bacterias durante 15 minutos en hielo. Se colocaron las bacterias a 42°C para producirles el choque térmico. Se agregó 1 ml de *LB* y se incubaron a 37 °C durante 50 minutos, con el fin de que se exprese la resistencia a antibiótico que posee el plásmido.

Se plaquearon 100 μ l en una placa de Petri con *LB*-agar suplementada con ampicilina o kanamicina 0.1 mg/ml, para seleccionar las bacterias transformadas. Todos los plásmidos utilizados en este trabajo llevan la resistencia a ampicilina, salvo el TIF2-GFP que lleva resistencia a kanamicina. Los cultivos se dejaron crecer durante toda la noche en la estufa de 37 °C. Se picaron colonias al azar y se crecieron en 5 ml de medio *LB* con ampicilina 0.1 mg/ml durante 12 horas a 37 °C con agitación (270 rpm).

Luego se procedió a la purificación y amplificación del ADN plasmídico.

SOLUCIONES UTILIZADAS

LB (Luria-Bertani)

Triptona	10 g/l
Extracto de levaduras	5 g/l
NaCl	5 g/l

LB-agar

LB + 15 g/l de ágar

8. EXTRACCION DE ADN PLASMÍDICO POR GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO

Los plásmidos más utilizados fueron purificados por medio de esta técnica, dado que se obtienen altos rendimientos.

Se partió de un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido que se deseaba amplificar, se creció durante 24 horas a 37 °C a 300 rpm en 500 ml de *terrific broth* suplementado con ampicilina 0.1 mg/ml. Se centrifugaron las bacterias a 4 °C a 5.000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspenden las bacterias en 40 ml *buffer P1* con RNAsa A 100 µg/ml. Se agregaron 40 ml de *buffer P2* y se mezcló inmediatamente (5 minutos a temperatura ambiente). Se agregaron 40 ml de *buffer P3* y se mezcló inmediatamente (5 minutos a temperatura ambiente y luego 25 minutos en hielo).

Se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos y se filtró con un embudo con gasa para que no pasen los restos de bacterias. Se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se dejó al menos 1 hora a -20 °C, para que precipite el ADN.

Se centrifugó a 8.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 100 ml de EtOH 70% y se centrifugó a 8.000 rpm durante 30 minutos. Con cuidado se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente.

El *pellet* fue resuspendido con TE pH=8 (10 ml) y colocado en tubos falcon de 15 ml con 300 µl de Bromuro de Etidio 1%.

Se agregó la misma masa de CsCl que la solución que contenía el ADN con el bromuro de etidio y se incubó la solución a 37 °C para solubilizar las sales de Cesio.

Se pasó el contenido de los tubos de 15 ml a tubos de plástico especiales para ultracentrífuga. Luego se sellaron los tubos de plástico con el calentador y se centrifugaron a 55.000 rpm a temperatura ambiente (22 °C) durante 12 horas.

Se extrajo la banda (se ve con luz UV) con una jeringa y se colocó la mezcla extraída en un tubo de 15 ml. Se realizaron lavados seriados con un volumen de butanol saturado en agua para extraer el bromuro de etidio. Se llevó a tres veces el volumen con H₂O y se agregaron 2.5 volúmenes de EtOH 100% y 10 % de NaAcO 3M, para precipitar el ADN. Se centrifugó a 8.000 rpm durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con EtOH 70%. Se dejó secar el *pellet*, y el ADN se resuspendió con 400 µl de H₂O.

Se realizó una nueva precipitación de ADN con 1 vol de isopropanol y 10 % de NaAco 3 M, y se lavó con EtOH 70%. Finalmente el ADN se resuspende en 500 μ l H₂O.

SOLUCIONES UTILIZADAS

Terrific Broth

Triptona 12 g/l

Extracto de levadura 24 g/l

Glicerol 4 ml/l

Antes de usar se agregan 100 ml/l de K₂HPO₄ 0.72 M/KH₂PO₄ 0.17 M

Buffer P1

Tris-HCl pH 8 50 mM

EDTA 10 mM

RNAsa A 100 μ g/ml

Buffer P2:

NaOH 0.2 N

SDS 1%

Buffer P3

Acetato de potasio pH 5.2 3 M

9. KIT PARA PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE QIAGEN

Este protocolo de purificación de plásmidos está basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado, seguido por la unión del ADN plasmídico a la columna de intercambio aniónico obtenida comercialmente, todo bajo las condiciones apropiadas de baja sal y pH. Luego se remueven el RNA, proteínas, solventes e impurezas de bajo peso molecular mediante un lavado con una concentración media de sal. Finalmente, el ADN plasmídico es eluido de la columna con *buffer* de alta sal, y luego es concentrado y desalado por precipitación con isopropanol.

Se siguieron todos los pasos que indica el manual de instrucciones del proveedor, utilizando siempre las columnas “Quiagen-tip 500”, que rinden aproximadamente 1 μ g/ μ l de TE o agua, resuspendiendo el producto final en un volumen de 500 μ l de TE o agua.

10. CUANTIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Una vez disuelto en TE o agua, el ADN plasmídico fue cuantificado midiendo la absorbancia de la solución a 260 nm en un *gene quant*. Las concentraciones se calcularon multiplicando el valor de absorbancia obtenido por el factor de dilución por la constante de absorbancia molar.

11. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se efectuaron diversas digestiones con enzimas de restricción para chequear que los plásmidos utilizados fueran realmente los necesarios para realizar las distintas transfecciones u otros ensayos.

Las digestiones con las enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de temperatura y salinidad indicadas por el manual del fabricante (Promega/New Englan Biolabs). Se utilizaron las unidades enzimáticas y los *buffers* allí recomendados.

12. GELES NATIVOS DE AGAROSA

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con *buffer TBE 1X* o *TAE 1X* al 1-1.5 %, con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de sembrar, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de *buffer de siembra 6X*. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta, utilizando una cámara fotográfica digital (Kodak).

Se utilizaron distintos marcadores de peso molecular según el tamaño de las bandas esperadas.

Se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular:

1Kb Ladder (Gibco BRL)

1 Kb Ladder (New England Biolabs)

100 bp (New England Biolabs)

SOLUCIONES UTILIZADAS

TBE 1X

Tris base	8.9 mM
Acido bórico	8.9 mM
EDTA	2 mM

TAE 50X (1 litro)

Tris base	242 g
Acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH 8	57.1 ml

Buffer de siembra 6X

Azul de bromofenol	0.25 % p/v
Xylen Cyanol	0.25 % p/v
Glicerol	30 % v/v

13. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES DE CÉLULAS EN CULTIVO

Para determinar los niveles de diferentes proteínas presentes en el núcleo mediante ensayos de *western blot* se extrajeron las proteínas nucleares. Para un mayor rendimiento de la técnica, las células se encontraban en un 80% de confluencia al momento de la extracción. Con el siguiente protocolo adaptado, cada placa de 10 cm de células HEK 293 rindió aproximadamente 50 μ l de extracto nuclear. Se siguió el siguiente protocolo para la extracción de proteínas nucleares (todos los pasos se realizaron en hielo o en centrifuga refrigerada):

Se levantaron las células en 1 ml de *buffer* PBS con *rubber*, y se recolectaron en microtubos de 1.5 ml. Luego de centrifugarlas durante 2 minutos a 1.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 μ l de *buffer* PBS. Este paso se repitió 2 veces para lavar las células.

Se eliminó el sobrenadante y se estimó el volumen celular empaquetado (VCE). Se resuspendió con 1 volumen igual al VCE de solución NE1. Se dejó reposando en hielo durante 15 minutos. Se agregó NP-40 10% v/v de manera tal que quede al 0.5 % v/v. Se vortexeó el microtubo durante 10 segundos e inmediatamente se pasó al paso siguiente.

Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. El *pellet* eran los núcleos y en el sobrenadante quedaron proteínas del citoplasma. Se separó el sobrenadante en un tubo

aparte, se centrifugó a 10.000 rpm para eliminar el debris celular, descartando el *pellet* y apartando el sobrenadante en un nuevo microtubo. En esta fase se encontraban las proteínas del citoplasma.

El *pellet* del paso anterior (los núcleos) se lavó al menos dos veces más con 1 volúmen de NE1 para eliminar proteínas del citoplasma que estuvieran contaminando.

Se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el *pellet* en 2/3 del VCE con solución NE2. Se dejó reposar en hielo con agitación (en agitador orbital) durante 30 minutos.

Se vortexeó el microtubo durante 30 segundos y centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para que precipiten los restos nucleares. Se descartó el *pellet*, y el sobrenadante se pasó a nuevos microtubos, en alícuotas de 5 μ l. Las muestras se guardaron a -70 °C para su posterior uso.

SOLUCIONES UTILIZADAS

NE1 (Nuclear Extract 1)

10 mM HEPES pH 8.0

1.5 mM MgCl₂

10 mM KCl

1 mM DTT

NE2 (Nuclear extract 2)

20 mM HEPES pH 8.0

1.5 MgCl₂

25 % Glicerol

420 mM NaCl

0.2 mM EDTA

1 mM DTT

0.5 mM PMSF

14. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EXTRACTOS CELULARES

La determinación de la concentración de proteínas en las muestras se realizó mediante el método de Bradford: 5 ml de extracto (diluídos en 395 ml de H₂O) con 100 μ l de reactivo de Bradford 5X (BioRad). La concentración se determinó a partir de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 580 nm en un espectrofotómetro

y la extrapolación de la misma en una curva realizada con patrones estándar de BSA (0.5-10 μg).

15. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

15.1 Transfección por el método de CaCl_2

Para los ensayos de actividad quinasa se transfectaron HEK 293 crecidas en placas de 10 cm con 10 ml de medio DMEM suplementado a una densidad de 8×10^5 células/placa. A las 24 horas se incuban las células con 1 ml de la mezcla de transfección conteniendo una masa total de 3 μg de ADN plasmídico, y a las 16 horas se cambió el medio de cultivo por nuevo medio suplementado. Luego del cambio de medio, las células se dejaron crecer durante 48 horas en la estufa de cultivo para luego estimularlas y procesarlas para el ensayo.

Para los ensayos reporteros se realizaron las transfecciones de células HEK 293 crecidas en placas de seis pocillos (cada pocillo tiene aproximadamente 3 cm de diámetro) en 1 ml de medio DMEM suplementado a una densidad inicial de 2×10^5 células/pocillo. A las 24 horas de sembradas las células, éstas se incubaron con 100 μl mezcla de transfección. Finalmente, en cada pocillo se utilizaron 300 ng de los diferentes vectores de expresión junto con 8 ng del vector κB -luciferasa y 4 ng del vector RSV- β -galactosidasa. A las 16 horas post-transfección se cambió el medio de transfección por nuevo medio DMEM suplementado.

La mezcla de transfección se preparó en el momento de la transfección de la siguiente manera: en un microtubo de 1.5 ml se preparó la mezcla ADN: CaCl_2 y en un microtubo separado se colocaron 500 μl de *Buffer* HeBS 2X. Luego se incorporó gota a gota la mezcla de ADN: CaCl_2 en el tubo que contenía el *buffer* HeBS. Como esta incorporación debía ser realizada con agitación, mientras se agregaban las gotas de la mezcla se burbujeara el segundo tubo con una pipeta de 2 ml acoplada a una propipeta automática. La mezcla de transfección se dejó a temperatura ambiente (en el flujo laminar) durante 30 minutos para luego ser incorporada a las diferentes placas. Con el objetivo de determinar eficiencia de transfección con este método, se realizaron diversas transfecciones transitorias utilizando el protocolo antes mencionado. En la figura 12 se

muestran células HEK 293 transfectadas en forma transitoria con vectores de expresión para GFP visualizadas con microscopia de fluorescencia (12A, B y D) y ensayos de coloración *in situ* utilizando el método de precipitación de X-Gal de Promega (células azules son positivas) para RSV-beta-galactosidasa (12C).

SOLUCIONES UTILIZADAS

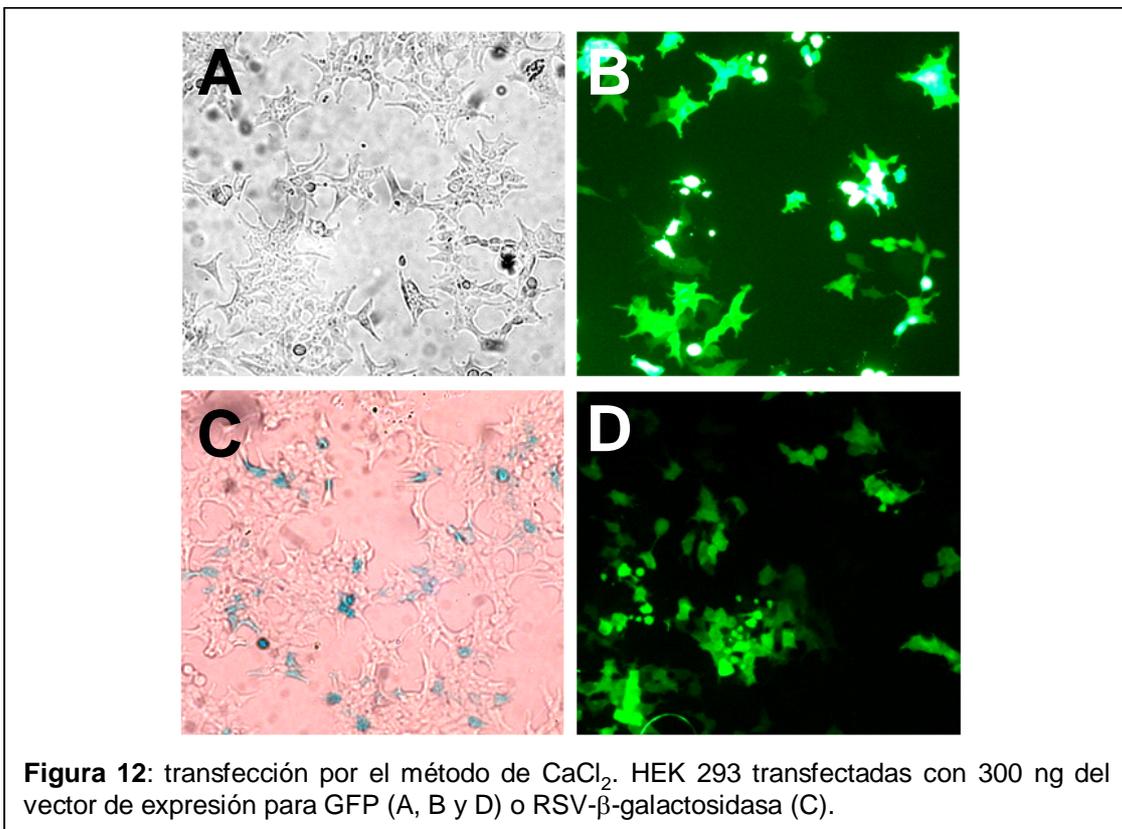
Mezcla ADN:CaCl₂ (tubo 1)

ADN plasmídico	3 µg
CaCl ₂ 2 M (250 mM final)	62 µl
H ₂ O	435 µl

HeBS 2X (tubo 2) 500 µl

HEPES	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1.5 mM
Llevado a pH=7.12	

Mezcla de transfección: tubo 1 + tubo 2



16. ESTIMULACIÓN CON CITOQUINAS

Las células fueron estimuladas con TNF- α humano recombinante (Calbiochem o SIGMA) en una concentración final de 10-40 ng/ml, según se indica en cada figura de los resultados. Para los ensayos reporteros de luciferasa, las células fueron incubadas durante 5 horas con la citoquina a 37 °C 64 horas post-transfección. Para el resto de los ensayos, el tiempo de estimulación varió de 15 a 50 minutos, según se indica en cada una de las figuras.

17. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS

17.1 Cosecha de las células

Se cosechan las células a las 5 horas de haberlas estimulado con TNF para luego realizar el análisis de la expresión de los plásmidos transfectados. Para la cosecha de las células, se lavaron 2 veces con *PBS 1X*, y se retiró todo el líquido con una bomba de vacío.

Se agregaron 200 μ l/pocillo de *Reporter Lysis Buffer 1X* comercial (Promega), para lisar las células. Se dejó actuar por 15 minutos y luego se colectaron los extractos con “*rubber policeman*” y recolectados en un microtubo de 1.5 ml.

Se eliminan los restos celulares por centrifugación (5 minutos a 10.000 rpm) y se pasa el sobrenadante a un nuevo microtubo.

17.2 Medición de la actividad β -galactosidasa (β -gal)

La enzima β -galactosidasa es sensible a los ciclos de congelado y descongelado del extracto. Por esto se realizaron los ensayos inmediatamente luego de producir los extractos.

Para medir la actividad presente en los extractos de células transfectadas, se incubaron 20 μ l de extracto con 20 μ l del sustrato cromogénico ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido) en *buffer β -gal 1X*, durante 1 hora a 37 °C. Luego se detuvo la reacción con el agregado de 100 μ l de Na_2CO_3 1M, que además intensifica el color amarillo de la

reacción; se cuantificó la aparición del producto coloreado (orto-nitro-fenol) midiendo la absorbancia a 415 nm en un lector de Elisa.

SOLUCIONES UTILIZADAS:

Buffer β -gal 2X:

Na ₂ HPO ₄	0.2 M
NaH ₂ PO ₄	0.2 M
MgCl ₂	2 mM
β -mercapto-etanol	0.1 M
ONPG	1.33 mg/ml

17.3 Medición de la actividad luciferasa

El ensayo de actividad de la enzima de luciferasa se realizó luego de obtener los extractos. Para medir la actividad presente en los extractos se tomaron 15 μ l de extracto y se pasaron a microtubos de 1.5 ml. Luego se agregaron 50 μ l del reactivo para el ensayo de luciferasa (*Luciferase Assay System Freezer 1-Pack*, Promega).

Inmediatamente después de agregar el reactivo para el ensayo de luciferasa, se colocó el microtubo en un contador beta, y se inició la lectura de 30 segundos para cada tubo.

Las Unidades Relativas de Luciferasa (URL) corresponden al promedio de las cuentas por segundo y en todos los casos se relativizan los valores al valor obtenido en un tubo, expresándolo como porcentaje de actividad. Para el análisis de los datos se normalizaron los valores de luciferasa obtenidos con los obtenidos para el ensayo de β -galactosidasa, es decir el cociente entre URL y los valores de β -galactosidasa.

Como control se utilizó 15 μ l de *Reporter Lysis Buffer* en lugar de extracto celular.

18. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (*PAGE-SDS*)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron utilizando minigeles de poliacrilamida. Se prepararon geles de 8, 10 o 12% de acrilamida con SDS. Las muestras se incubaron a 95 °C en *cracking buffer* por 10 minutos. La corrida de las muestras proteicas se realizó con un marcador de peso molecular como referencia (BioRad) a un voltaje de entre 60 y 150 V usando *buffer de corrida* 1X.

SOLUCIONES UTILIZADAS

Cracking buffer (Laemmli buffer) 5X

Tris pH 6.8	0.3125 M
SDS	10 %
Glicerol	25 %
Bromo Fenol Blue	0.05 %
β-mercaptoetanol	10 %

Buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS) 5X (1 litro)

Tris base	15.1 g
Glicina	94 g
SDS 10 %	50 ml

19. ENSAYOS DE WESTERN BLOT

La transferencia se realizó en frío durante 1 hora con *buffer de transferencia*, utilizando una membrana de difluoruro de polivinilo PVDF (BioRad) previamente activada en metanol 100% durante 5 minutos. La transferencia de proteínas se realizó en frío durante 2 horas a 100 V con *buffer de transferencia*.

Una vez terminada la transferencia se procedió al tratamiento de las membrana para incubarlas con los diferentes anticuerpos:

Se bloquearon durante 2 horas con *TTBS* 5% leche en polvo descremada a temperatura ambiente. Esto se realiza para evitar el pegado inespecífico del primer anticuerpo a utilizar, ya que la albúmina bovina se unirá en aquellos lugares de la membrana donde no hubiera proteínas unidas.

Se realizaron lavados de la membrana con *TTBS* de 10 minutos para quitar el exceso de las proteínas de la leche. Se incubaron las membranas con la solución que

contiene el anticuerpo diluido en TTBS con 0.5% p/v BSA, y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante dos horas o durante toda la noche (según corresponda para cada anticuerpo). La concentración de anticuerpo varió de acuerdo a cada uno.

Luego de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados de las membranas con *TTBS* de 10 minutos cada uno, para quitar el exceso del primer anticuerpo utilizado.

Se agregó el anticuerpo secundario diluido en TTBS 0.5% p/v BSA, que reconoce las FC (Fracción Constante) del anticuerpo primario, conjugado con la proteína HRP (peroxidasa de rabanito) para que reaccione con el sustrato para que dé el producto quimioluminiscente.

Se realizaron tres lavados de las membranas con *TTBS* de 10 minutos cada uno, para quitar el exceso del anticuerpo secundario utilizado. Se realizó un cuarto lavado con TBS (sin el detergente Tween 20).

La membrana es apoyada sobre un vidrio y se procedió a la visualización de las proteínas utilizando la solución para la detección inmuno-fluorescente. Se bañó la membrana con volúmenes iguales de solución de H₂O₂ con *solución luminol amplificada* durante 1 minuto, luego del cual se limpió el exceso con una servilleta, se la cubrió con film plástico y se la expone a la película radiográfica durante 1-15 minutos.

Las membranas que deben ser reutilizadas para un segundo bloteo, se lavaron 3 veces con TTBS (10 minutos cada lavado), y se incubaron durante 1 hora a 50°C en TTBS. Para las cuantificaciones densitométricas se utilizó el programa *NIH image* (NIH).

SOLUCIONES UTILIZADAS

TTBS

Tris pH 7.5	20 Mm
NaCl	9 g/l
Tween 20	0.05 %

Buffer de transferencia 5X (1 litro)

Glicina	15.1 g
Tris base	72.4 g

En el momento de la transferencia, la solución 1X se prepara con 20 % metanol.

Solución luminol
 Luminol (Sigma) 22.5 mg
 Disolver en 50 ml de una solución 0.1 M de Tris-HCl pH=8, luego filtrar con membrana de 0.3 μ (Millipore)

Solución amplificadora
 Acido p-coumárico (Sigma) 18.5 mg
 Disolver en 1.25 ml dimetil-sulfóxido (DMSO)

Solución luminol-amplificadora final
 Solución Luminol 220 μ l
 Solución Amplificadora 50 ml

Solución H₂O₂
 H₂O₂ 100% 2 μ l
 0.1 M de Tris-HCl pH=8 10 ml

20. PREPARACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES GST-TIF2

Se crecieron *E. coli* BCL-21 en 20 ml de *LB* transformadas con los plásmidos de expresión GST-TIF2[1-766] y GST-TIF2[766-1462] durante toda la noche a 37°C. Se agregaron los 20 ml de bacterias a 250 ml de *LB*, y se dejó crecer hasta que el cultivo llegó a una densidad óptica de 0.6-0.8 a 600 nm. Se agregó IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) 1 mM. Se incubaron las bacterias inducidas a 37°C durante dos horas y media y luego se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos.

El *pellet* bacteriano se resuspendió en PBS con inhibidores de fosfatasa, se agregaron 100 ml de lisozima 10 mg/ml (0.2 mg/ml concentración final), y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Se agregaron 50 μ l de DTT (ditiotreitól) 1 M y 0.7 ml de sarcosil al 10% (p/v en PBS). Se sonicaron las bacterias durante 4 minutos, con 30 segundos de intervalo y pulsos de 25 segundos. Se centrifugó el producto sonicado durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se transvasó el sobrenadante a un tubo de 15 ml donde se agrega Tritón X-100 al 20% v/v, y se completa el volumen hasta 10 ml con PBS con inhibidores de fosfatasa. Se incubó durante 30 minutos en hielo y con agitación.

Para la unión de la proteína recombinante se utilizaron esferas de sefarosa con glutation (Amersham). Se usaron 250 μ l (se usan diluidas al 50% v/v, con PBS) por

cada 250 ml de cultivo originales, y se incubó durante 2 horas a 4 °C con agitación suave. Luego se centrifugaron a 2.000 rpm durante 2 minutos a 4 °C y el *pellet* (proteína recombinante unida al glutatión de las esferas de sefarosa) se lavó 4 veces con 5 ml de PBS con inhibidores de fosfatasa. El producto del último lavado se resuspendió en 250 µl de PBS con inhibidores de fosfatasa y se guardó a 4°C para su posterior uso en ensayos de interacción de proteínas o en ensayos de quinasas.

Para determinar la masa y la calidad de proteína recombinante producida, se sembró el producto en un gel SDS-PAGE al 6% poliacrilamida, y se lo comparó con un patrón de BSA de masa conocida corrido en calles paralelas, además de un patrón de peso molecular. Para teñir las proteínas se utilizó una solución conteniendo coomassie brilliant blue R 250 0.25% (p/v) en metanol:agua:ácido acético (5:5:1). Los geles se secaron sobre papel Whatman 3 M durante 1 hora a 80°C.

21. ENSAYO DE COPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS GST-TIF2

Células HEK 293 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos a una densidad de 2.5×10^4 células/pocillo en DMEM alta glucosa. 24 horas más tarde fueron estimuladas con 20 ng/ml de TNF- α por 30 minutos, en los casos que corresponda. Luego las células fueron lisadas con 300 µl de *buffer* de lisis, y 50 µl de extracto proteico fueron incubados con 1 µg de proteína recombinante GST-TIF2 durante 2 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados con *buffer de lisis* para eliminar las proteínas inespecíficas. Se desnaturalizaron las muestras con 10 µl de *cracking buffer*, y se separaron por gradiente electroforético en geles de poliacrilamida 10-12%. Se transfirieron las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilo PDVF (BioRad) y se realizaron ensayos de *western blot* usando diferentes anticuerpos específicos para determinar las proteínas involucradas en la interacción con las proteínas recombinantes de TIF2. Para las cuantificaciones densitométricas se utilizó el programa *NIH image* (NIH).

SOLUCIONES UTILIZADAS

<i>Buffer de lisis</i>	
Hepes pH 7.4	50 mM
NaCl	250 mM

Nonidet P40	1% v/v
EDTA	1mM

22. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Para los ensayos de inmunofluorescencia se cultivaron 2.5×10^5 células HEK 293 en placas de 6 pocillos sobre vidrios circulares de 12 mm de diámetro. A las 24 horas se estimularon las células con TNF- α 20 ng/ml durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y luego se fijaron las células con *buffer* de fijación (3% paraformaldehído, 0.02% glutaraldehído) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS, y los vidrios fueron colocados en pocillos de una placa de 24 pocillos. Se permeabilizan las células con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10-15 minutos. Se lavaron las células fijadas 2 veces con PBS durante 5 minutos. Se realizó el bloqueo con PBS 3% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente con PBS. Las incubaciones con el anticuerpo primario se realizaron durante toda la noche a 4 °C. La dilución de los anticuerpos se realizaron en PBS 3% BSA. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 15 minutos, y se realizaron las incubaciones con los anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS durante 15 minutos y se montaron sobre cubreobjetos con una solución de PBS:glicerol (1:1).

Para la visualización de TIF2-GFP se transfectaron las células por el método de CaCl_2 , se fijaron a los portaobjetos de 12 mm, y se montaron sobre cubreobjetos.

Las muestras en todos los casos fueron analizadas con un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon), con el filtro de epifluorescencia adecuado. Las imágenes digitales se tomaron con la cámara digital acoplada al microscopio, y salvadas como imágenes TIFF de 32 bits en una computadora, para luego ser analizadas utilizando el programa Adobe Photoshop.

23. ENSAYOS DE ACTIVIDAD QUINASA

Para los ensayos de actividad de p38 MAPK se transfectaron en forma transitoria HEK 293 con 3 μg de pCEFL-HA-p38, por el método de CaCl_2 . 40 horas post-transfección las células fueron estimuladas (o no, según se indique en cada caso) con 10 ng/ml de TNF- α durante 30 minutos. Las células fueron lavadas con PBS 1X tres veces y lisadas con *buffer de lisis K*. La p38 MAPK fue inmunoprecipitada de los lisados celulares mediante la incubación con anticuerpos específicos (Santa Cruz) durante 2 horas a 4 °C. Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron del resto de las proteínas del lisado celular mediante el uso de esferas de sefarosa conjugadas con proteína A (Santa Cruz). Luego se lavaron una vez con *buffer 1*, una vez con *buffer 2* y una vez con *buffer de reacción de quinasas*.

Posteriormente para ensayar la actividad quinasa de p38 sobre TIF2, las proteínas inmunoprecipitadas fueron resuspendidas en 30 μl del *buffer* de reacción conteniendo 1 μCi de [^{32}P]- γ -ATP, 20 μM ATP frío y 1 μg de sustrato (GST-TIF2[1-766 o GST-TIF2[766-1462] según se indique). La mezcla de reacción se incubó a 30 °C durante 30 minutos. La reacción fue detenida con el agregado de 10 μl de *Cracking Buffer* e incubadas durante 10 minutos a 100 °C.

Las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida al 8%, y la separación por gradiente electroforético se realizó a 100 V. Luego el gel se secó durante 1 hora a 80 °C sobre una lámina de papel secante (Whatman 3M), y expuesto a película radiográfica durante 24 horas. Para las cuantificaciones densitométricas se utilizó el programa *NIH image* (NIH).

SOLUCIONES UTILIZADAS

<i>Buffer de lisis K</i>	
HEPES pH=7.5	25 mM
NaCl	0.3 M
MgCl ₂	1.5 mM
EDTA	0.2 mM
DTT	0.5 mM
Triton X-100	1% v/v
Vanadato de Sodio	0.5 % p/v
PMSF	1 mM
Leupeptina	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Buffer 1 de quinasa (en PBS 1X)

NP-40	1% v/v
Vanadato de Sodio	2 mM

Buffer 2 de quinasa

Tris pH=7.5	100 mM
LiCl	0.5 M

Buffer de reacción de quinasas

MOPS pH=7.5	12.5 mM
b-glicerofosfato	12.5 mM
MgCl ₂	7.5 mM
EGTA	0.5 mM
Fluoruro de sodio	0.5 mM
Vanadato de sodio	0.5 mM

RESULTADOS

**“You must be the change you
want to see in the world”.**

Mahatma Gandhi (1869-1948)

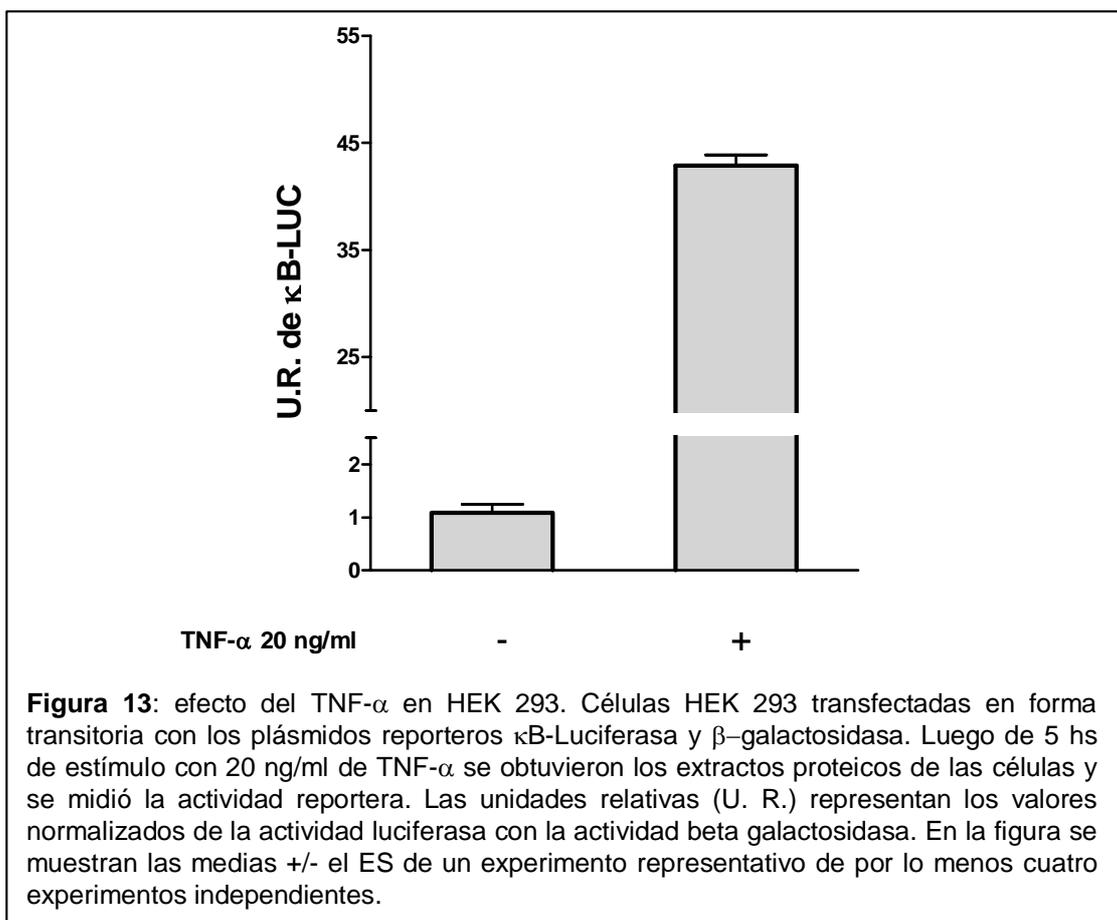
**“Ask not what your country can
do for you; ask what you can do
for your country”**

John F. Kennedy (1917-1963)

1. TIF2 ES NECESARIO PARA EL FUNCIONAMIENTO DE NF- κ B

Como se describió en la introducción, es sabido que el tratamiento de diferentes líneas celulares con la citoquina inflamatoria TNF- α produce un aumento significativo en la activación de NF- κ B con respecto a células no estimuladas con la citoquina, y posteriormente se produce la inducción de los genes que responden a NF- κ B (87, 377).

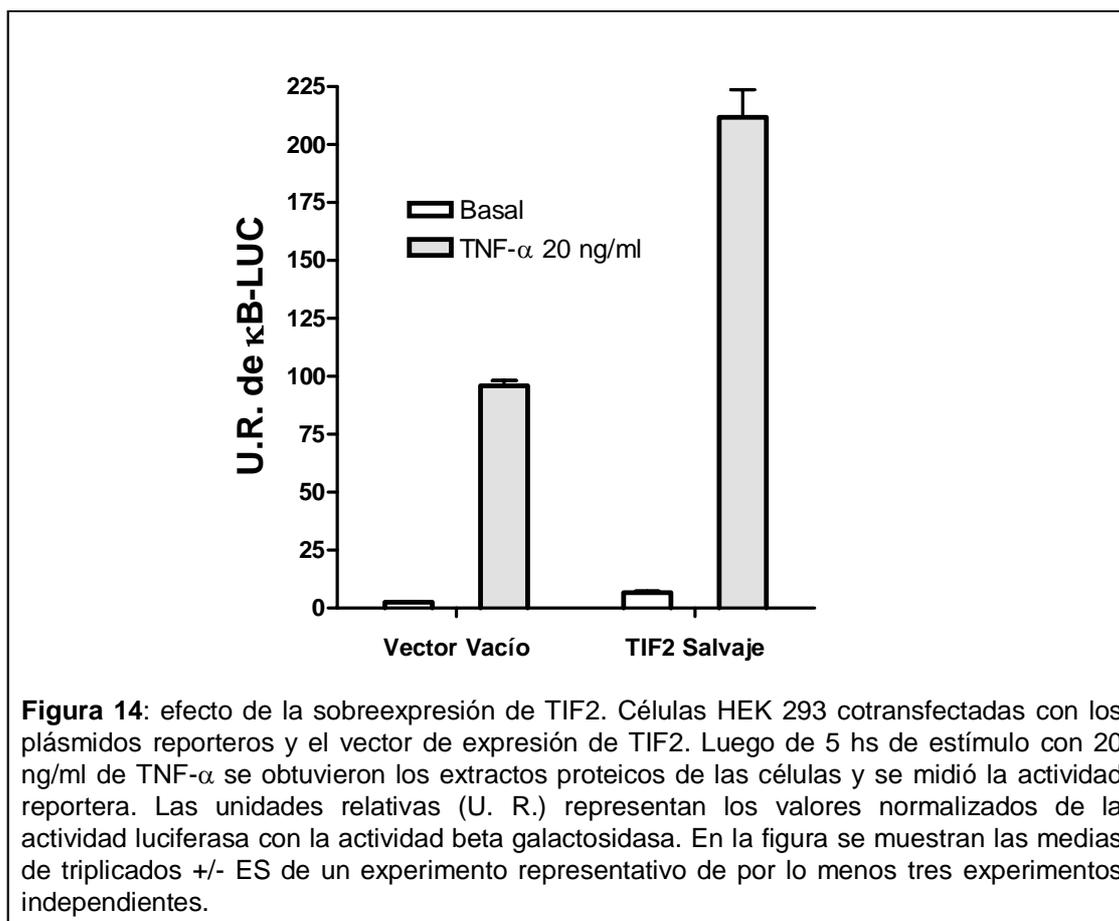
Con el objetivo de determinar los niveles de activación de NF- κ B en respuesta a TNF- α en HEK 293 se realizaron ensayos de transfecciones transitorias con el vector reportero que expresa luciferasa, bajo el control de un promotor que contiene elementos respondedores a NF- κ B. Luego de 5 horas de tratamiento de estas células con 20 ng/ml de TNF- α se produce un incremento significativo en la actividad de NF- κ B con respecto a las células que no fueron estimuladas (figura 13). En este modelo experimental se logró una activación de NF- κ B de aproximadamente unas 40-50 veces usando dosis de 20 ng/ml de TNF- α , con respecto a las células no tratadas (figura 13).



En el 2001 en nuestro laboratorio se vio que TIF2 era un coactivador de NF- κ B (378), coincidentemente con trabajos publicados por otros autores (379). Para esclarecer los mecanismos moleculares de acción y la importancia del coactivador TIF2 en la respuesta de activación de NF- κ B ante el estímulo inflamatorio de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , se realizaron diversos ensayos de actividad transcripcional de NF- κ B.

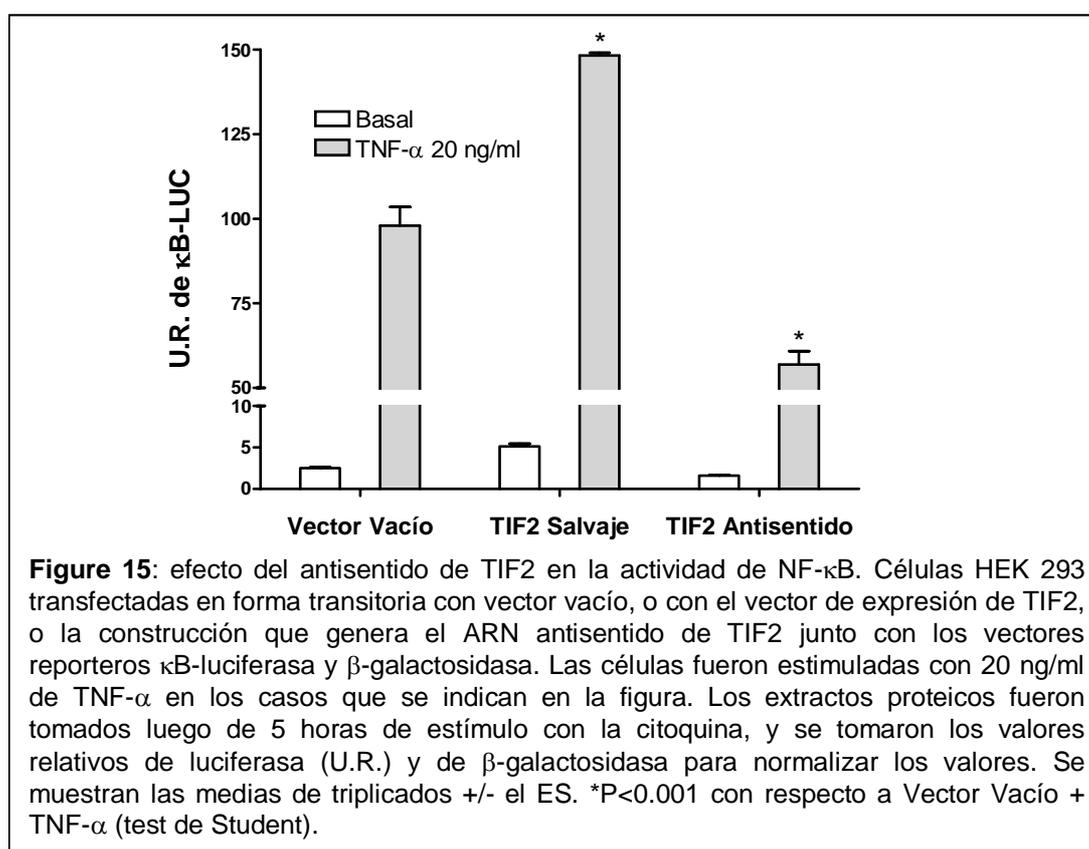
Con el objetivo de determinar los efectos de la sobreexpresión de TIF2 en la actividad transcripcional de NF- κ B se habían realizado ensayos de co-transfección transitoria con el vector de expresión para TIF2 junto con el vector de expresión del gen reportero luciferasa controlado por el promotor con elementos que responden a NF- κ B.

Como puede observarse en la figura 14, la sobreexpresión de TIF2 causó un aumento significativo en los niveles de activación de NF- κ B con respecto a aquellas células que poseían niveles normales de expresión del coactivador TIF2 (figura 14).



Los resultados obtenidos demostraron que la actividad de NF- κ B se ve aumentada significativamente con la sobreexpresión de este miembro de la familia p160 con respecto a aquellas células que expresan niveles normales de TIF2. ¿Qué tan necesario es TIF2 en la transactivación de NF- κ B? Para probar ello se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

En primer lugar se anuló la actividad de TIF2, y analizó la actividad de NF- κ B. Para ello se realizaron construcciones antisentido contra el ARNm de TIF2 y se midió actividad transcripcional de NF- κ B a través de ensayos reporteros. La construcción del antisentido de TIF2 se encuentra detallada en la sección de *materiales y métodos* de este trabajo.



La figura 15 muestra que la sobreexpresión de la construcción antisentido contra TIF2 logra disminuir significativamente la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α , con respecto a aquellas células que expresan la forma endógena de TIF2, o bien las que fueron transfectadas con la versión salvaje de TIF2. Esta disminución en la actividad de NF- κ B es de aproximadamente un 40% (figura 15).

Estos resultados demuestran que TIF2 es necesario para la normal actividad de NF- κ B

2. TIF2 INTERACCIONA FÍSICAMENTE CON RelA

Dada la importancia de los coactivadores en la actividad de NF- κ B, y en particular el efecto de transactivación de TIF2 sobre NF- κ B, se evaluó si TIF2 era capaz de interactuar físicamente con RelA, el componente más estudiado del dímero NF- κ B, y los posibles dominios involucrados. Para ello se realizaron ensayos de coprecipitación de proteínas, utilizando dominios recombinantes de TIF2 conjugados con transferasa S de glutation (GST) como “carnada” en extractos proteicos de células HEK 293. Se produjeron y purificaron proteínas de fusión conteniendo el dominio amino-terminal (del aminoácido 1 al 766) y el dominio que abarcaba la totalidad del dominio carboxi-terminal (del aminoácido 766 al 1462) de TIF2 en bacterias *Escherichia coli* BL21 según se detalla en MATERIALES Y MÉTODOS (figura 16).

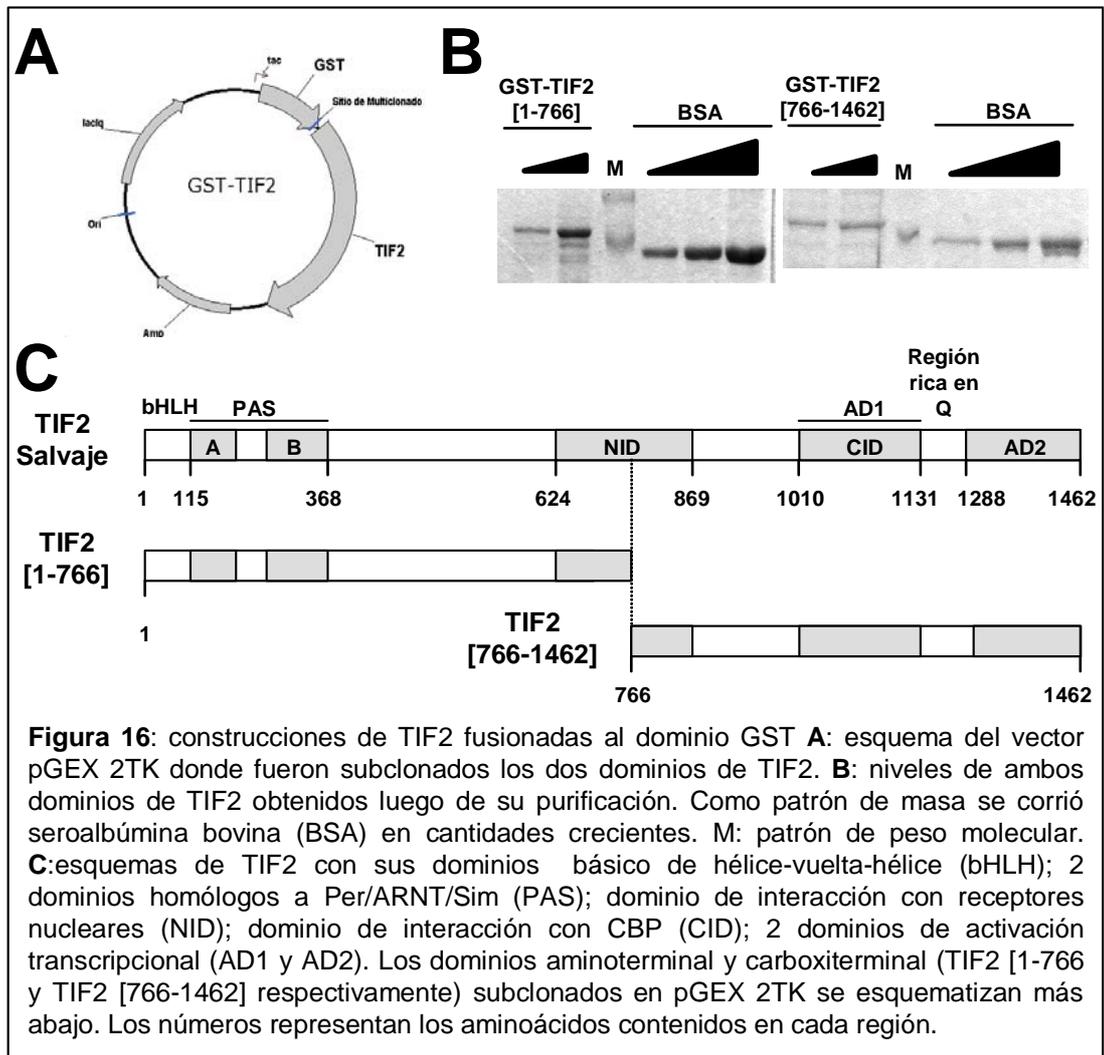
Las proteínas de fusión GST-TIF2[1-766] y GST-TIF2[766-1462] se incubaron con extractos proteicos de HEK 293 estimuladas o no con TNF- α 20 ng/ml. Utilizando glutation unido a sefarosa, se precipitaron las proteínas unidas a GST-TIF2 utilizadas como “carnada”. Estos precipitados fueron analizados por PAGE- y se determinó por ensayos de *western blot* la presencia de proteínas capaces de unirse a las distintas porciones de TIF2.

Se comprobó que RelA es capaz de unirse a ambos dominios de TIF2, y formar parte del complejo que se une al coactivador (figura 17). De esta manera demostramos que TIF2 es capaz de interactuar físicamente con RelA.

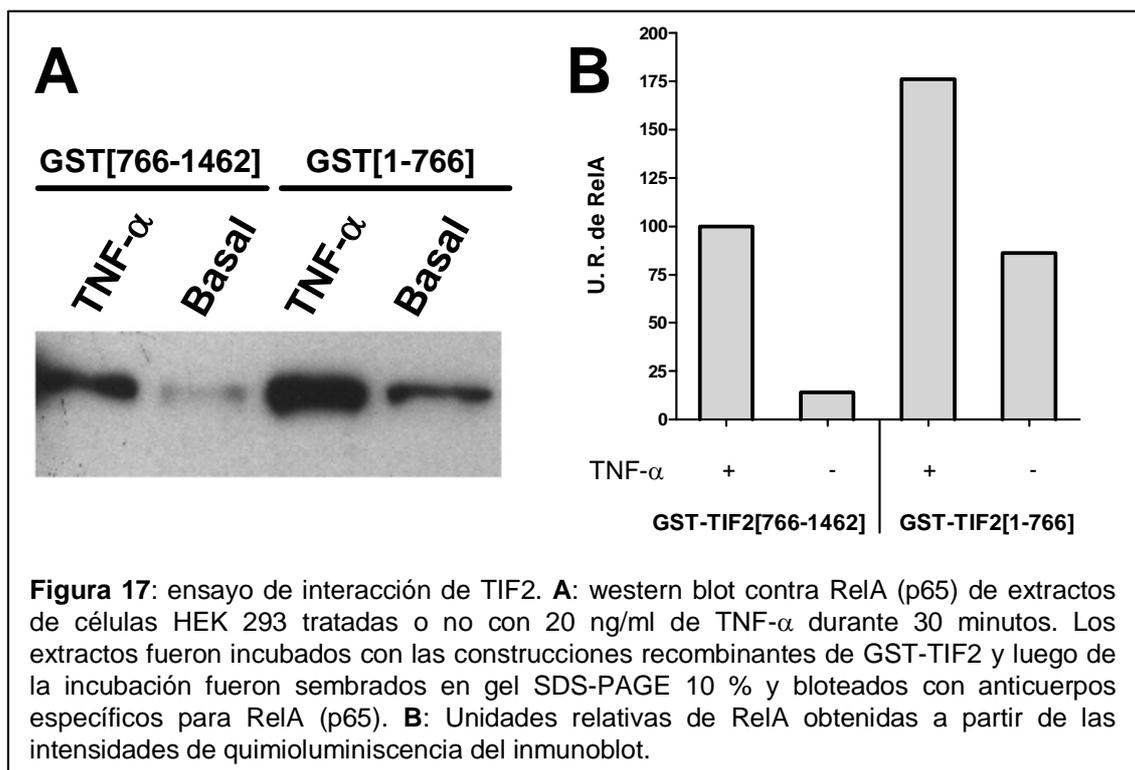
Como puede verse en la figura 17, RelA pudo ser detectado tanto en complejos conteniendo el extremo amino-terminal de TIF2, como el carboxilo-terminal. Puede observarse también que la unión de RelA con TIF2 se da preferencialmente sobre el dominio amino-terminal del coactivador (GST-TIF2[1-766]) (figura 17B).

La unión con el dominio carboxilo-terminal de TIF2 (GST-TIF2[766-1462]) es aproximadamente diez veces mayor luego de la activación de NF- κ B en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α en comparación con la interacción que se da en condiciones basales.

Esta diferencia no es tan notoria en la interacción que se observa con el dominio amino-terminal (figura 17B).



Con estos resultados se demostró que se requiere de una estimulación previa con la citoquina inflamatoria para que RelA se una a TIF2, y puede suponerse que se requiere mayor cantidad de RelA unido a TIF2 para que se produzca la activación de NF- κ B. Si bien estos resultados demuestran que existe una interacción física entre TIF2 y RelA, no aseguran que esta interacción se dé en forma directa.

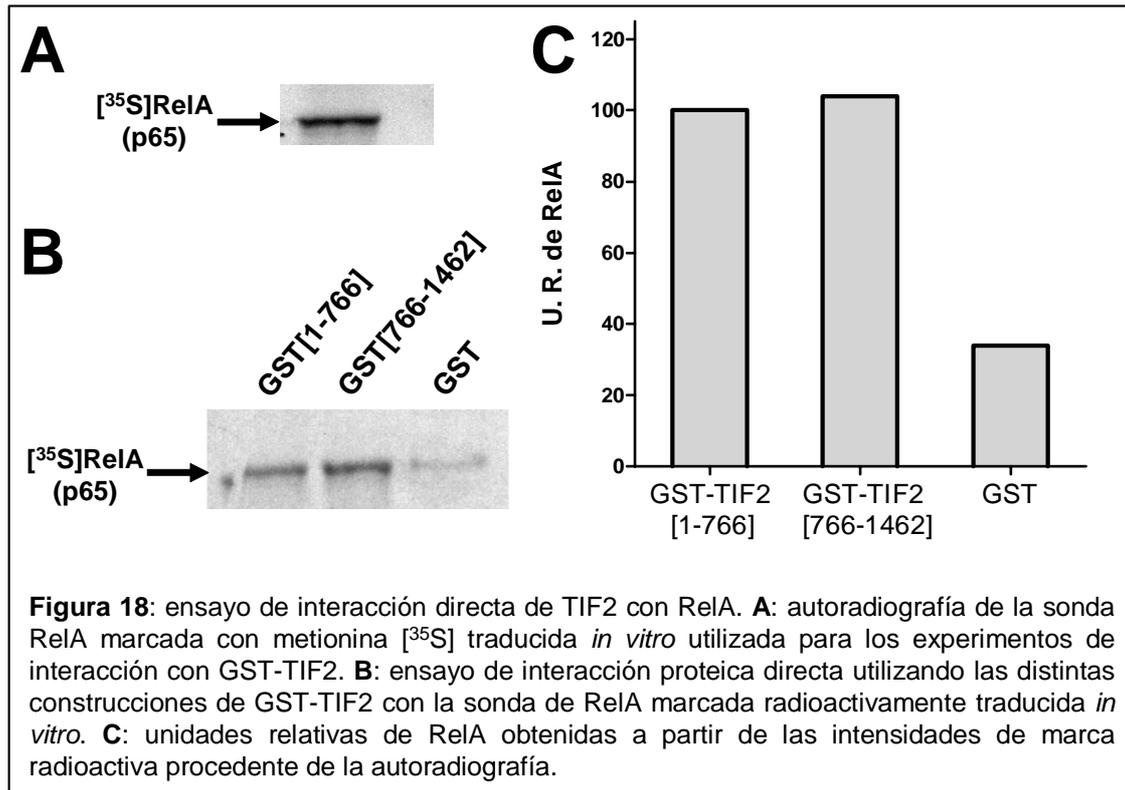


2.1 TIF2 interacciona en forma directa con RelA

Dada la importancia demostrada anteriormente de TIF2 en la transactivación de NF- κ B, se realizaron ensayos para comprobar si la interacción física entre TIF2 y RelA podía darse en forma directa.

Para ello se expresó la proteína RelA *in vitro* a través de la expresión de RelA en un sistema de componentes de germen de trigo (ver figura 18A y el detalle experimental en la sección de materiales y métodos), se marcó radioactivamente con un isótopo de azufre en metionina. Se incubó RelA recombinante y marcada con ambos dominios de GST-TIF2 recombinantes obtenidos de la expresión en bacterias. Luego de sendos lavados y precipitaciones, se obtuvo el complejo que interacciona con GST-TIF2 y se separaron las fases por gradiente electroforético.

La figura 18B demuestra por primera vez que RelA es capaz de unirse en forma directa al coactivador con la misma intensidad para el dominio amino-terminal (TIF2-GST[1-766]) como para el carboxi-terminal (TIF2-GST[766-1462]).



De esta manera, se demostró por primera vez que TIF2 es capaz de interaccionar físicamente, y además en forma directa, con el componente más estudiado de NF- κ B (RelA/p65).

La siguiente interrogante fue acerca de la interacción de TIF2 con los otros miembros regulatorios de la vía de activación de NF- κ B.

3. EL COMPLEJO TIF2/NF- κ B REQUIERE DE P38 MAPK PARA SU ACTIVACIÓN

Como se mencionó en la parte introductoria de este trabajo, la actividad de NF- κ B depende de la activación de p38 MAPK (197, 380). El mecanismo por el cual p38 MAPK activa a NF- κ B no está del todo claro, pero se sabe que no es través de la fosforilación de p65 (197). Estos autores proponen que la MAPK p38 tendría un rol indirecto en la activación de este factor de transcripción y en la regulación de sus numerosas actividades biológicas (197). ¿Cuál sería el rol de p38 sobre la actividad NF- κ B? La hipótesis planteada por nuestro laboratorio sugiere que existe una interacción

entre p38 MAPK y el coactivador TIF2, y a través de esta interacción TIF2 es capaz de producir su efecto transactivador sobre NF- κ B. Para resolver esta incógnita se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

En primer lugar se determinó si p38 era capaz de modular la actividad de NF- κ B a través de la interacción con el coactivador TIF2.

3.1 Cinética de activación de p38

En diferentes líneas celulares la activación de p38 MAPK en respuesta a TNF- α ocurre a los pocos minutos luego del estímulo con la citoquina. Dado que se analizarían niveles de interacción entre p38 y TIF2, se determinó la cinética de activación de p38 por TNF- α en la línea celular HEK 293. Las células fueron estimuladas con diferentes tiempos de incubación con 20 ng/ml TNF- α y se realizaron ensayos de *western blot* con los extractos proteicos provenientes de esta línea celular. Se analizaron los niveles de p38 MAPK activos luego de 15, 20, 30 y 45 minutos de tiempo de incubación.

Los resultados mostrados en la figura 19 demuestran que a los 15 minutos luego del estímulo con 20 ng/ml de TNF- α , p38 ya se encuentra en su estado activo (fosforilado) dentro de las células (figura 19A). También puede observarse en la figura 19 que luego de 45 minutos de incubación de las células con 20 ng/ml de TNF- α aún hay presencia de p38 en su estado activo. Estos resultados demuestran que tanto la concentración utilizada de TNF- α como los tiempos de estímulo con los que se trabajó son los adecuados para estudiar los efectos sobre p38 MAPK en esta línea celular.

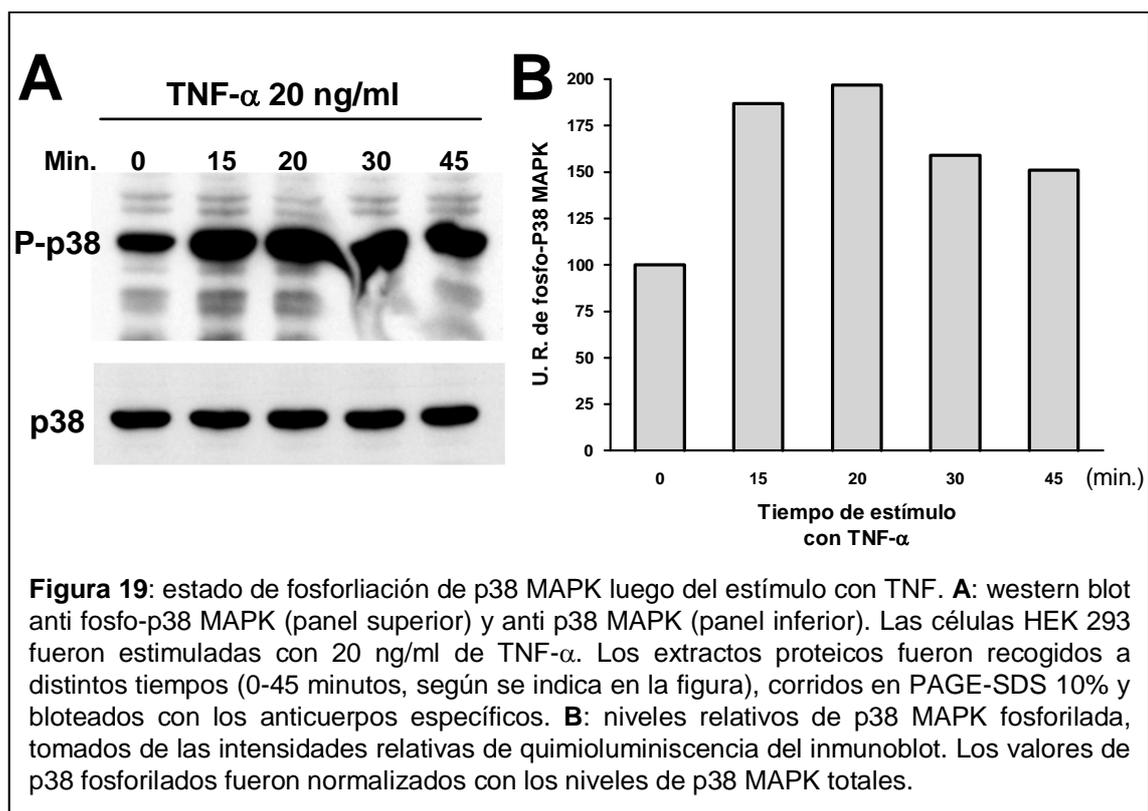
3.2 La activación de NF- κ B utiliza actividad p38

Para estudiar el rol de p38 MAPK en la activación de NF- κ B en HEK 293 se realizaron ensayos de actividad de NF- κ B en presencia de un inhibidor específico para las isoformas α y β de p38 MAPK (SB203580). Para ello las células fueron transfectadas en forma transitoria con vectores de expresión para el gen reportero κ B-luciferasa (ver materiales y métodos). Luego de la pre-incubación de las células con el inhibidor específico SB203580, se estimularon las células con 20 ng/ml de TNF- α . Se

tomaron extractos proteicos con los cuales se midieron los niveles de actividad de NF- κ B a través de la medición de las unidades relativas de luciferasa regulada por elementos κ B.

Los resultados obtenidos demuestran que la activación de NF- κ B en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α es dependiente de la actividad de p38, ya que el tratamiento con SB203580 disminuye significativamente la actividad de NF- κ B con respecto a aquellas células que no fueron pretratadas con el inhibidor (figura 20).

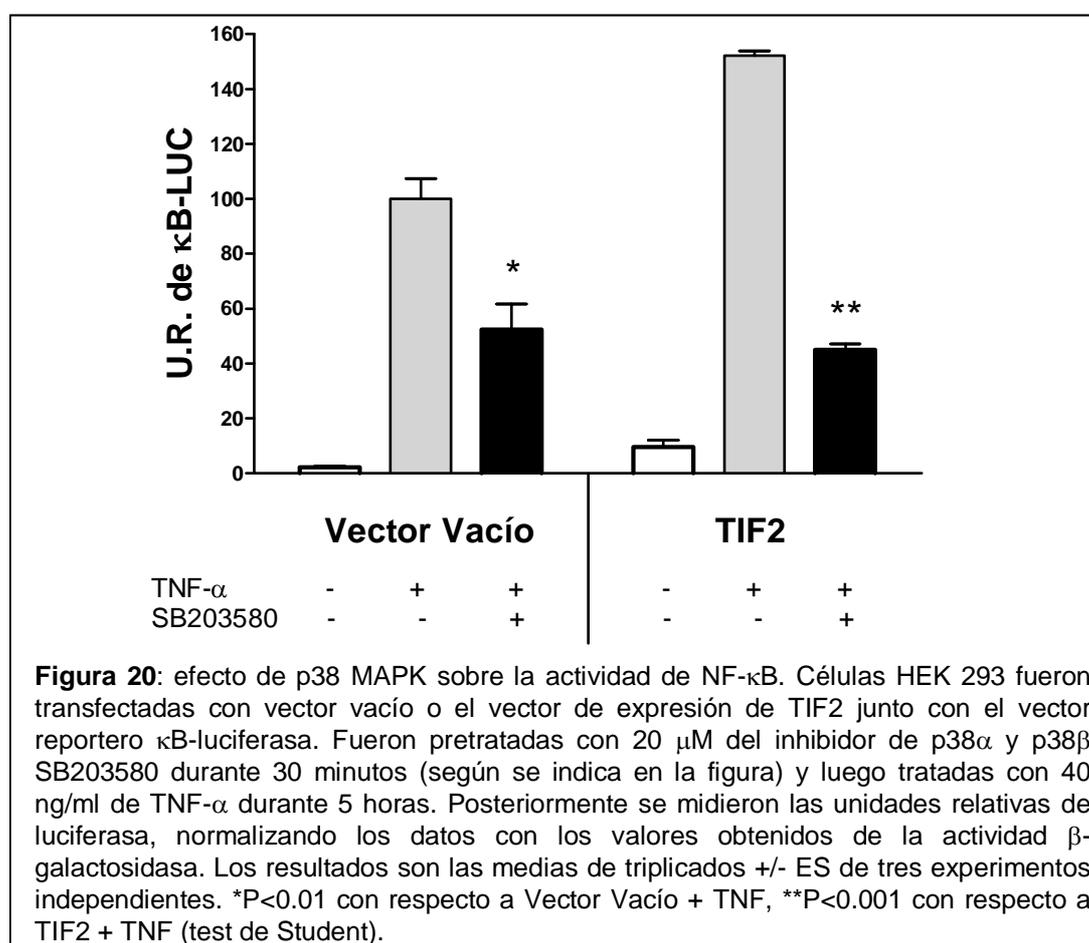
Aquellas células transfectadas con el vector vacío y estimuladas con TNF- α disminuyen su actividad NF- κ B un 45% cuando son pretratadas con el inhibidor de p38 con respecto a aquellas células que no fueron pretratadas (figura 20). Estos resultados demuestran que las isoformas α y β de p38 en su forma activa son necesarias para actividad de NF- κ B.



Con estos resultados se abría un vínculo entre p38 α , p38 β y el coactivador TIF2, ya que estas tres proteínas son necesarias para que NF- κ B actúe al 100% de su actividad.

Nos preguntamos qué rol tendría el coactivador TIF2 en la transactivación de NF- κ B, y en particular qué relación tendría con la quinasa p38 para aumentar la actividad de este factor de transcripción. Para responder esta pregunta, inicialmente se determinó si la actividad de NF- κ B que se ve aumentada por la sobreexpresión de TIF2, era capaz de ser revertida con el pretratamiento de SB203580.

Se realizaron ensayos de actividad reportera con el vector de expresión del gen luciferasa, estimulando las células con 20 ng/ml de TNF- α y sobreexpresando a TIF2 a través de transfecciones transitorias con el vector de expresión para TIF2. Luego de la recolección de extractos proteicos se procedió a la medición de luciferasa para medir los niveles de activación de NF- κ B (figura 20).



Como puede observarse en la figura 20, el pretratamiento de HEK 293 con el inhibidor SB203580 disminuye aproximadamente un 70% el efecto de transactivación de TIF2 en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α , con respecto a aquellas células que no fueron pretratadas.

Dado que la sobreexpresión de TIF2 es incapaz de revertir la acción inhibitoria del bloqueo de p38 sobre la actividad de NF- κ B, se demostró que la actividad transactivadora de TIF2 sobre NF- κ B requiere de la actividad de p38 α o p38 β .

Sabiendo que NF- κ B no es sustrato de p38 (197) se quiso saber entonces si TIF2 era sustrato de p38.

3.3 TIF2 es fosforilado por p38 MAPK

¿Requiere TIF2 de la actividad quinasa de p38 para su actividad de transactivación sobre NF- κ B? Mediante programas bioinformáticos como el *ScanSite* y la consulta de *The Protein Kinase Resource* (381) se observó que TIF2 contenía al menos dos potenciales sitios de fosforilación por p38 en el dominio carboxilo-terminal. Las serinas involucradas serían las Ser 895 y la Ser 1323 de la secuencia aminoacídica de TIF2.

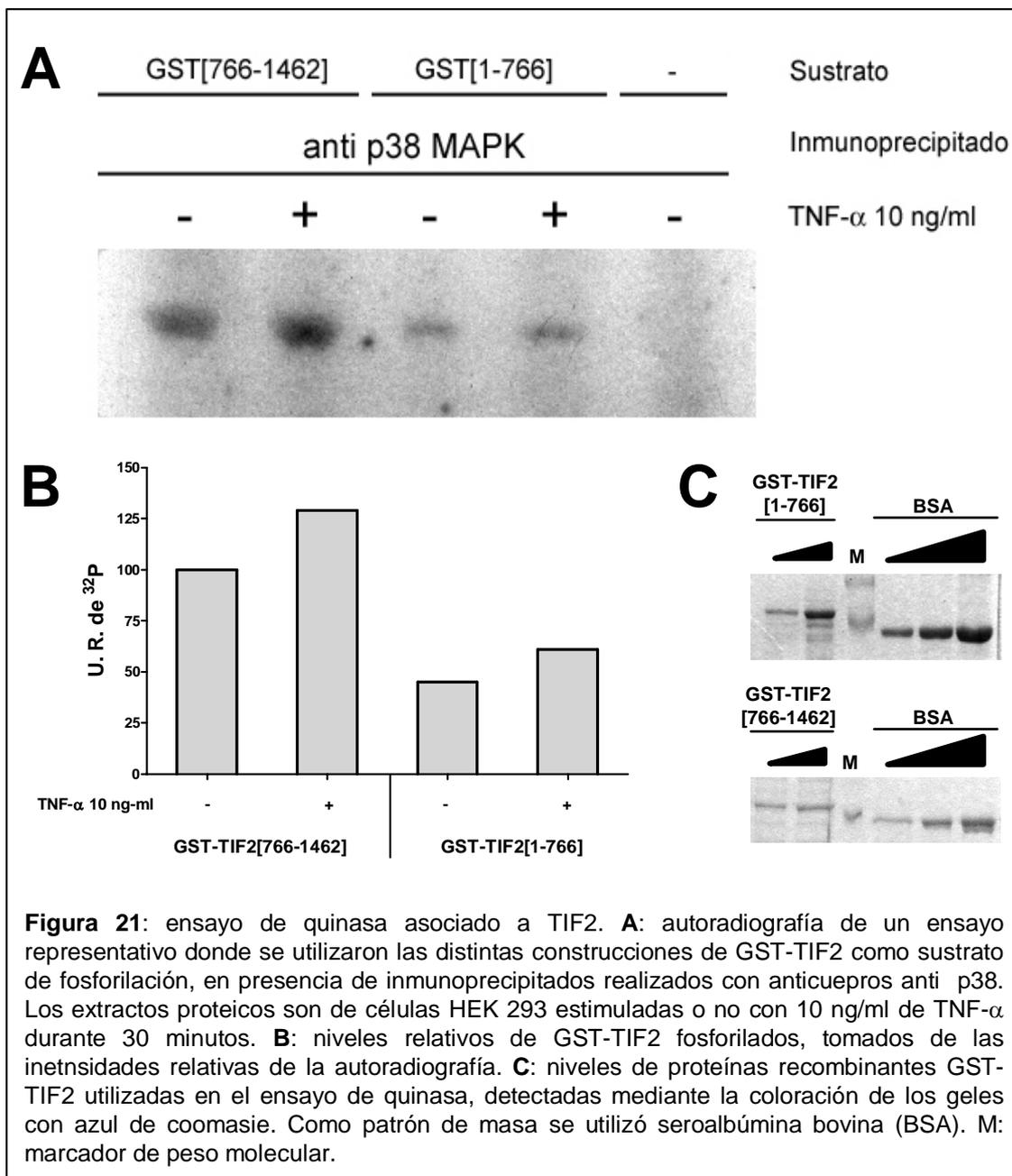
Para determinar si estos sitios podían ser fosforilados por p38, se realizaron experimentos de fosforilación de TIF2 en presencia de complejos que contuvieran a la quinasa p38 MAPK. Para ello se utilizaron los dos dominios de TIF2 recombinantes fusionados a GST en ensayos de quinasa (figura 21C).

En particular, GST-TIF2[1-766] y GST-TIF2[766-1462] fueron utilizados como sustratos en ensayos de quinasa, donde se incubó en forma conjunta ATP marcado radioactivamente con un isótopo de fósforo en el fosfato γ , e inmunoprecipitados de extractos proteicos de HEK 293 bajo diferentes estímulos, utilizando anticuerpos específicos para p38.

En concordancia con lo observado a través de los programas bioinformáticos, se observó que TIF2 era capaz de ser fosforilado por inmunoprecipitados de p38 MAPK (figura 21A).

En la figura 21A puede observarse que el dominio carboxilo-terminal de TIF2, que contiene las etiquetas blanco de p38, es capaz de fosforilarse y que en respuesta a TNF- α se produce un aumento en los niveles de fosforilación de alrededor del 25% con respecto a aquellas células que no fueron tratadas con la citoquina (figura 21). Por otro lado, al utilizar como control el dominio amino-terminal, que no contiene etiquetas blanco de p38, se observó una banda tenue, no modulada en respuesta a TNF- α ,

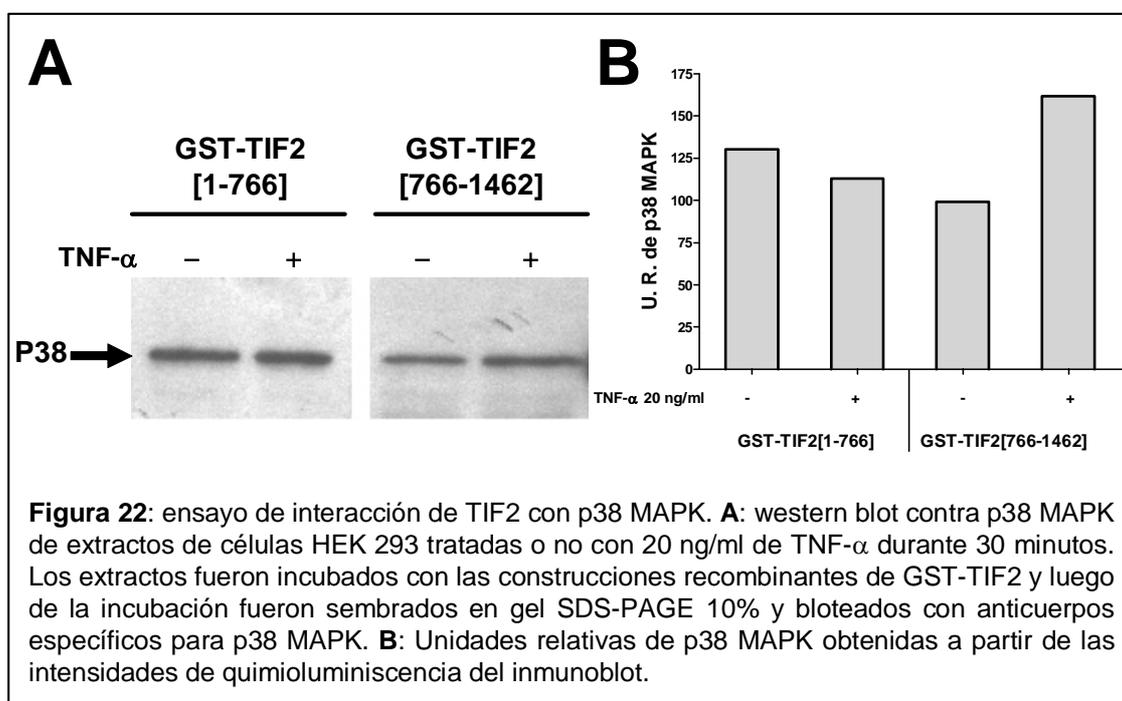
correspondiente muy probablemente a una señal inespecífica, como es habitual observar en este tipo de ensayos (figura 21).



Con estos resultados se demostró por primera vez que un coactivador de NF- κ B puede ser fosforilado por p38 MAPK, y que los niveles de fosforilación dependen de los niveles de p38 MAPK activos a través del estímulo con TNF- α .

3.4 TIF2 interacta físicamente con p38 MAPK

Dado que la actividad de p38 es requerida para la actividad de NF- κ B, y TIF2 es un blanco de fosforilación de p38, se realizaron ensayos de co-precipitación de proteínas para determinar si p38 era capaz de interactuar físicamente con TIF2. Para ello se utilizaron los dominios recombinantes de TIF2 conjugados con GST como “carnada” en extractos proteicos de HEK 293, y luego se separó por gradiente electroforético las proteínas que co-precipitaron. Mediante ensayos de *western blot*, se determinó que TIF2 es capaz de interactuar con p38 MAPK (figura 22A).

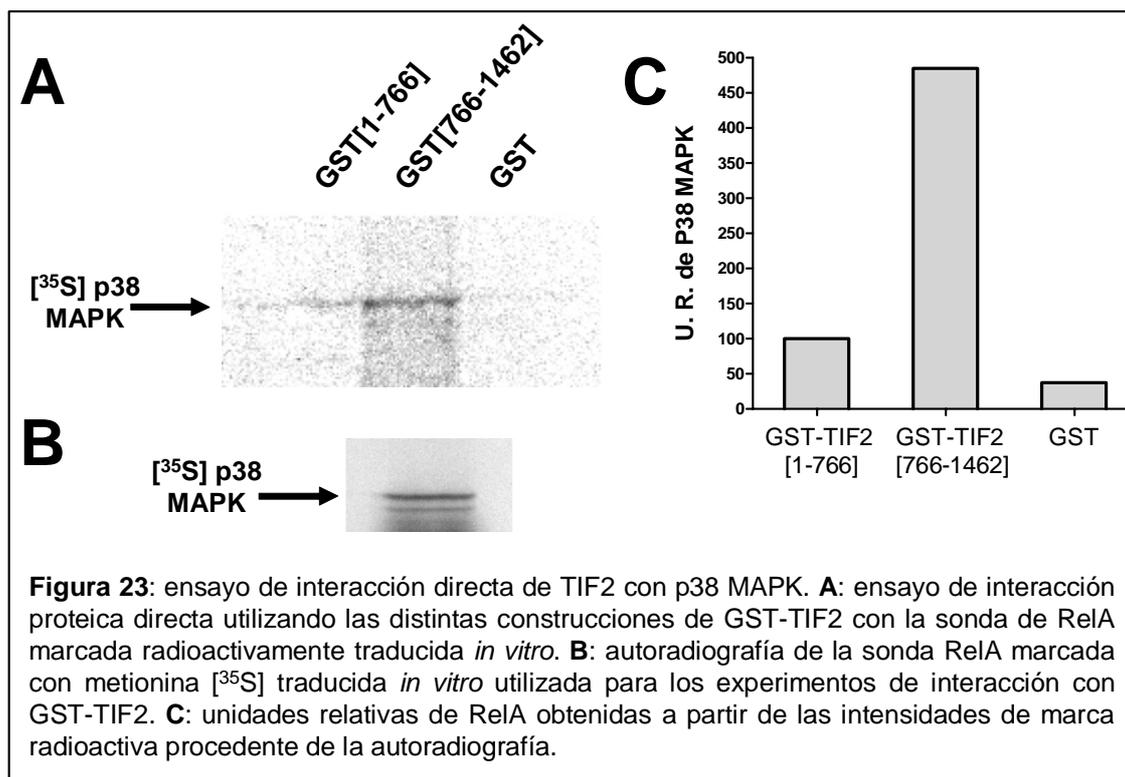


Como se observa en la figura 22, y al igual que en el ensayo de quinasas (figura 21), ambos dominios de TIF2 son capaces de interactuar físicamente con p38 MAPK. Puede observarse que existe una leve preponderancia del dominio carboxiterminal de TIF2 con p38 MAPK. En respuesta a TNF- α , hay mayor interacción de p38 con GST-TIF2[766-1462] que la p38 proveniente de células sin estimular (figura 22B).

Con el objeto de determinar si esta interacción se daba en forma directa o indirecta, se realizaron ensayos de interacción entre los dos dominios recombinantes de TIF2 (aminoácidos 1-766 y aminoácidos 766-1462), y p38 MAPK traducida *in vitro*, marcada con un isótopo radioactivo de azufre en metionina (figura 23A).

Luego de la incubación de ambas proteínas recombinantes y separación por gradiente electroforético se observó que p38 era capaz de interactuar con ambos dominios de TIF2. En particular, se puede observar que existe mayor interacción física de p38 MAPK con el dominio carboxilo-terminal de TIF2 que con el amino-terminal (figura 23).

Si bien el dominio carboxi-terminal (766-1462) posee mayor capacidad de reclutar a p38 MAPK, el dominio amino-terminal de TIF2 también es capaz de interactuar con p38, corroborando todas las observaciones anteriores. Estos resultados demuestran que la interacción entre TIF2 y p38 es directa, y que se formaría un complejo conteniendo a TIF2 y p38 MAPK en condiciones basales, posiblemente en el citoplasma de la célula. Luego de la activación de la vía de NF- κ B por TNF- α , este complejo se asociaría a RelA y migraría al núcleo luego de la fosforilación de TIF2 por p38 MAPK.



¿Qué ocurre con I κ B e IKK con respecto a este complejo multiproteico? ¿Serían capaces de interactuar con TIF2, RelA y p38, para formar un complejo más grande y más regulado? Para determinar si estas interacciones eran posibles se realizaron diversos ensayos de co-precipitación proteica y diversos ensayos enzimáticos.

4. TIF2 FORMA PARTE DE UN COMPLEJO MULTIPROTEICO QUE ACTIVA A NF- κ B

Tal como se describió en la parte introductoria de este trabajo, el modelo clásico de activación de NF- κ B en respuesta a TNF- α sostiene que este factor de transcripción está presente en el citoplasma celular en su forma inactiva, unido a I κ B (17). La activación de NF- κ B se logra a través de la degradación de I κ B a través de la activación de la quinasa de I κ B (39, 40). Luego de su fosforilación, I κ B α es degradado por el proteosoma 26S (25), y este proceso permite que NF- κ B transloque al núcleo, y luego se una a secuencias promotoras de determinados genes para inducir su transcripción (22). Para que esta inducción ocurra debe formarse un complejo multiproteico activo de NF- κ B, el cual debe ser orquestado y sumamente preciso en cuanto a los componentes que lo forman y los tiempos de interacción entre cada uno de sus componentes.

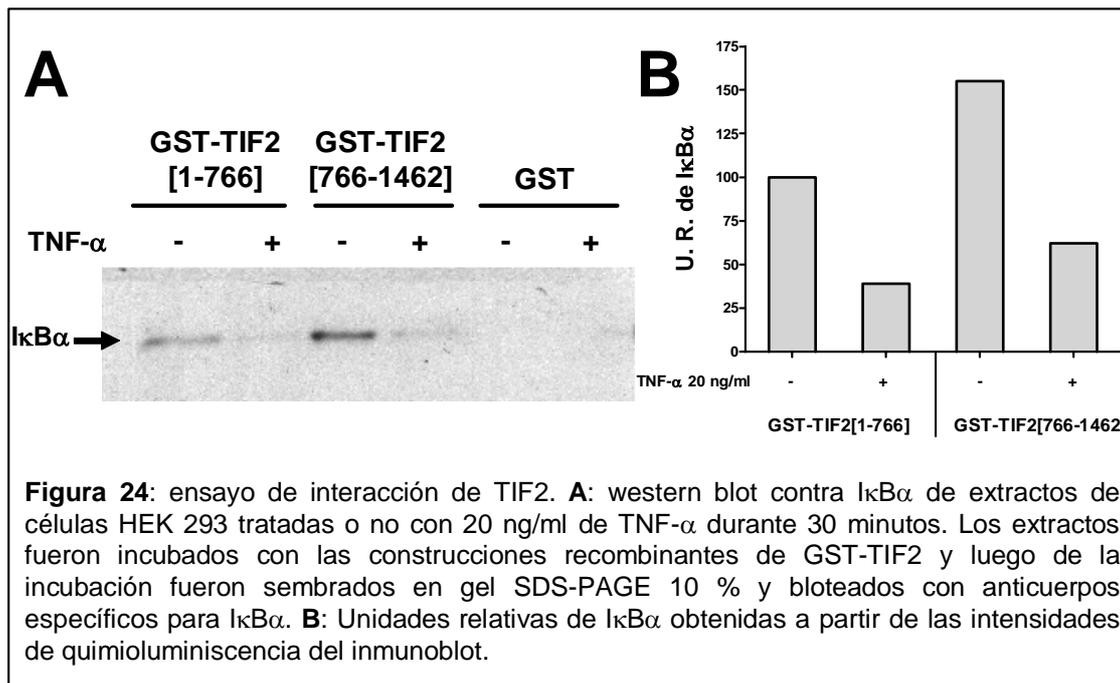
Además de RelA y p38, ¿estarían los otros miembros de la cascada de activación de NF- κ B presentes en el complejo multiproteico formado alrededor de TIF2? En otras palabras: se determinó si TIF2 estaba presente en complejos de NF- κ B activos o inactivos. Por este motivo se analizó su capacidad de interacción con I κ B α e IKK.

4.1 TIF2 Interacciona físicamente con I κ B α

Con el objeto de determinar si I κ B era capaz de interaccionar físicamente con TIF2 y formar parte del complejo multiproteico de TIF2/ NF- κ B/p38 MAPK se realizaron ensayos de co-precipitación proteica en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α . Estos ensayos se realizaron con extractos proteicos de HEK estimuladas o no con TNF- α junto con los dos dominios recombinantes de GST-TIF2.

La figura 24A muestra el resultado del ensayo de co-precipitación de TIF2 con I κ B α , donde se observa que existe mayor interacción de I κ B α con el extremo carboxilo-terminal de TIF2 con respecto al extremo amino-terminal de TIF2 (aproximadamente un 50% más). También puede observarse que en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α la interacción de I κ B α con ambos dominios de TIF2 disminuye aproximadamente a la mitad (figura 24B).

Estos resultados demuestran que ambos dominios de TIF2 son capaces de interactuar físicamente con I κ B α y que en respuesta a TNF- α el factor inhibitorio se desprende parcialmente del complejo. Además, la liberación de I κ B α del complejo de TIF2 demuestra que el coactivador es capaz de interactuar con la forma activa de NF- κ B, en concordancia con la capacidad de inducir los genes que responden a NF- κ B en respuesta a TNF- α , como se demuestra a través de los resultados mostrados en la figura 17.

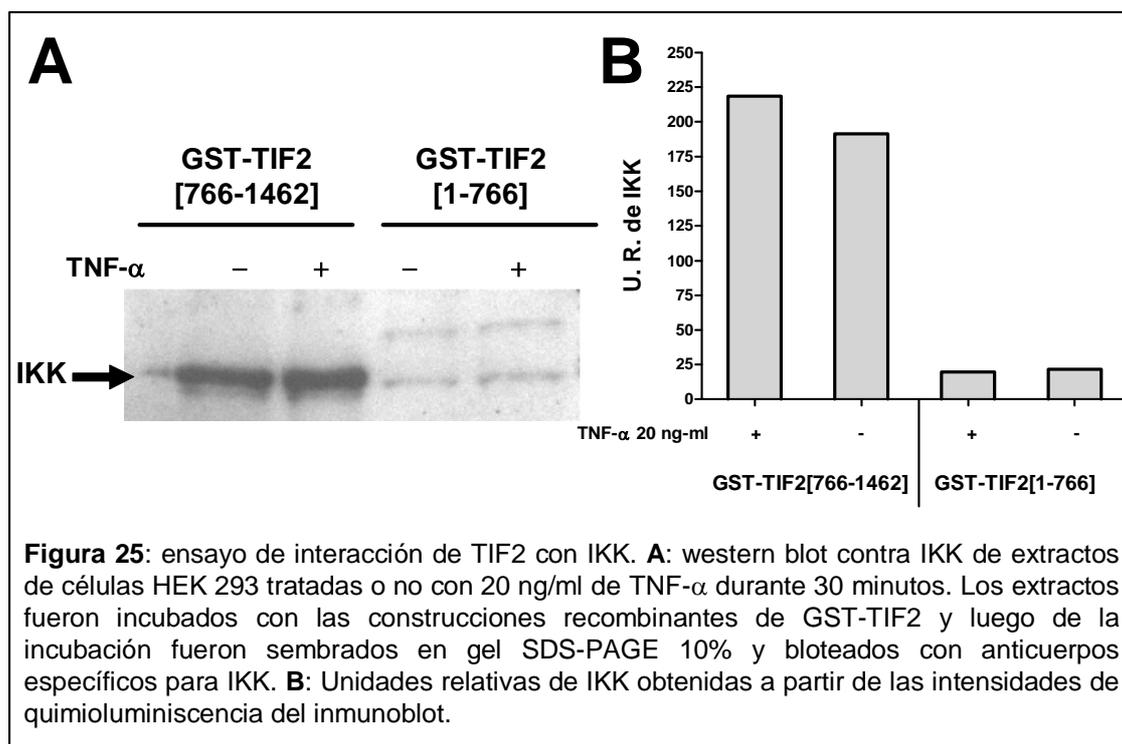


Hasta el momento nuestros resultados muestran que en condiciones basales TIF2 permanece unido a RelA y p38 MAPK en forma directa (figura 18 y 23) y con I κ B (figura 24). En respuesta a 20 ng/ml de TNF- α I κ B se libera del complejo, y luego se induce la transcripción de los genes que responden a NF- κ B. En el caso de la liberación de I κ B, se sabe que requiere de señales que terminan fosforilándolo en al menos dos serinas sumamente conservadas. Una de las quinasas involucradas en este proceso enzimático es la IKK, la cual fue blanco de los siguientes ensayos.

4.2 TIF2 Interacciona físicamente con IKK

Dado que I κ B α permanece unido al complejo hasta que se produce la activación de la vía de NF- κ B, y que se sabe que IKK es la responsable de la fosforilación de I κ B α , se quiso determinar si IKK estaba presente en el complejo de TIF2.

A través de ensayos de interacción proteica se observó la presencia de esta quinasa en el complejo multiproteico de TIF2 (figura 25). Como puede observarse en la figura 25, a través de ensayos de *western blot* se revela una banda correspondiente a IKK β , que es la subunidad regulatoria de esta quinasa. Además, la figura 25 muestra que la interacción de esta quinasa con el dominio carboxilo-terminal de TIF2 (766-1462) resulta unas 20 veces mayor que la interacción que se produce con el dominio amino-terminal de TIF2 (1-766) (figura 25B). Junto con estos resultados, se puede observar que esta interacción no depende de TNF- α , dado que el dominio carboxilo-terminal de TIF2 es capaz de interactuar con IKK β aún en condiciones basales (figura 25A).



Estos resultados demuestran que la IKK es capaz de interactuar físicamente con TIF2, y permanecer unida al complejo multiproteico de TIF2 tanto en condiciones basales como en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α .

Finalmente, estos resultados terminan por demostrar que NF- κ B es capaz de formar un complejo multiproteico dinámico en cuanto a la presencia de diferentes componentes cruciales para su activación. En particular, se demostró que inicialmente TIF2 está asociado a complejos inactivos (conteniendo a IKK e I κ B α) y en respuesta a TNF- α este complejo se vuelve activo.

De acuerdo con nuestros estudios, TIF2 interacciona físicamente con miembros de la cascada de activación de NF- κ B, de clásica ubicación citoplasmática, aún en condiciones basales. Por otro lado, TIF2 ha sido descrito como una molécula de ubicación nuclear (359-362) y de acuerdo con trabajos recientes la activación de NF- κ B también podría ocurrir en el núcleo (32-38), dado que existen complejos de I κ B- α , IKK y componentes del proteosoma en este compartimento celular.

Básicamente, se toma en cuenta que 1) el modelo clásico de activación de NF- κ B está en discusión, y que existe la posibilidad de que complejos de NF- κ B:I κ B localicen dentro del núcleo, y que 2) en condiciones basales TIF2 esté asociado a complejos inactivos conteniendo a I κ B α y que 3) a TIF2 se lo asocie clásicamente al núcleo, era de suponer que TIF2 debería asociarse tempranamente a complejos inactivos de NF- κ B de localización nuclear.

Con el objeto de determinar cuál es el modelo correcto y dónde ocurre la interacción entre los miembros de la familia de NF- κ B y TIF2, se hicieron los siguientes experimentos.

5. LOCALIZACIÓN CELULAR DE I κ B α E IKK

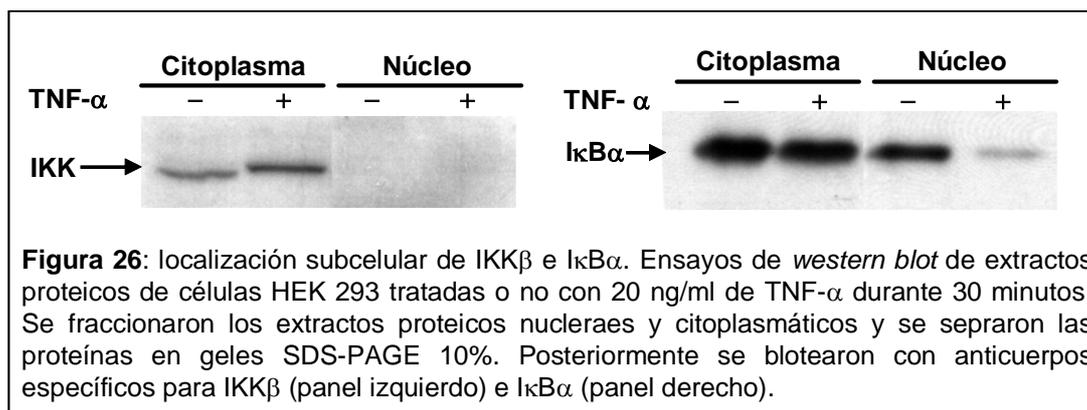
Dado que TIF2 es considerado de localización nuclear y dado que demostramos que interacciona con I κ B α e IKK, se quiso ver la localización de estas moléculas en condiciones basales o en respuesta a TNF- α .

Como se mencionó en la parte introductoria, las bases de la localización citoplasmática del complejo NF- κ B:I κ B se centran en la idea del enmascaramiento de la señal de localización nuclear (NLS) de las subunidades de NF- κ B por las proteínas I κ B. Sin embargo, el modelo clásico de activación de NF- κ B está en discusión dado que existen trabajos donde sugieren que el complejo NF- κ B:I κ B es capaz de moverse del citoplasma al núcleo y *vice versa* (32-38).

Con el objeto de determinar la localización celular de I κ B α en HEK 293 en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α , se realizaron ensayos de *western blot* contra I κ B α de extractos proteicos nucleares y citoplasmáticos.

Los ensayos de *western blot* de extractos nucleares y citoplasmáticos revelaron que I κ B α está predominantemente ubicado en el citoplasma, aunque también hay presencia de I κ B α en el núcleo (figura 26). Se observó también que la cantidad de I κ B α disminuye en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α (figura 26).

Estos ensayos revelan que si bien existe localización de I κ B α dentro del citoplasma, una buena proporción del mismo se encuentra en el núcleo de estas células. Estos datos sostienen la posibilidad de la formación de un complejo multiproteico citoplasmático (dado que IKK se encuentra fundamentalmente en este compartimiento) que contenga a las proteínas regulatorias de la actividad de NF- κ B, donde TIF2 funcionaría como puente vinculante de todas ellas.

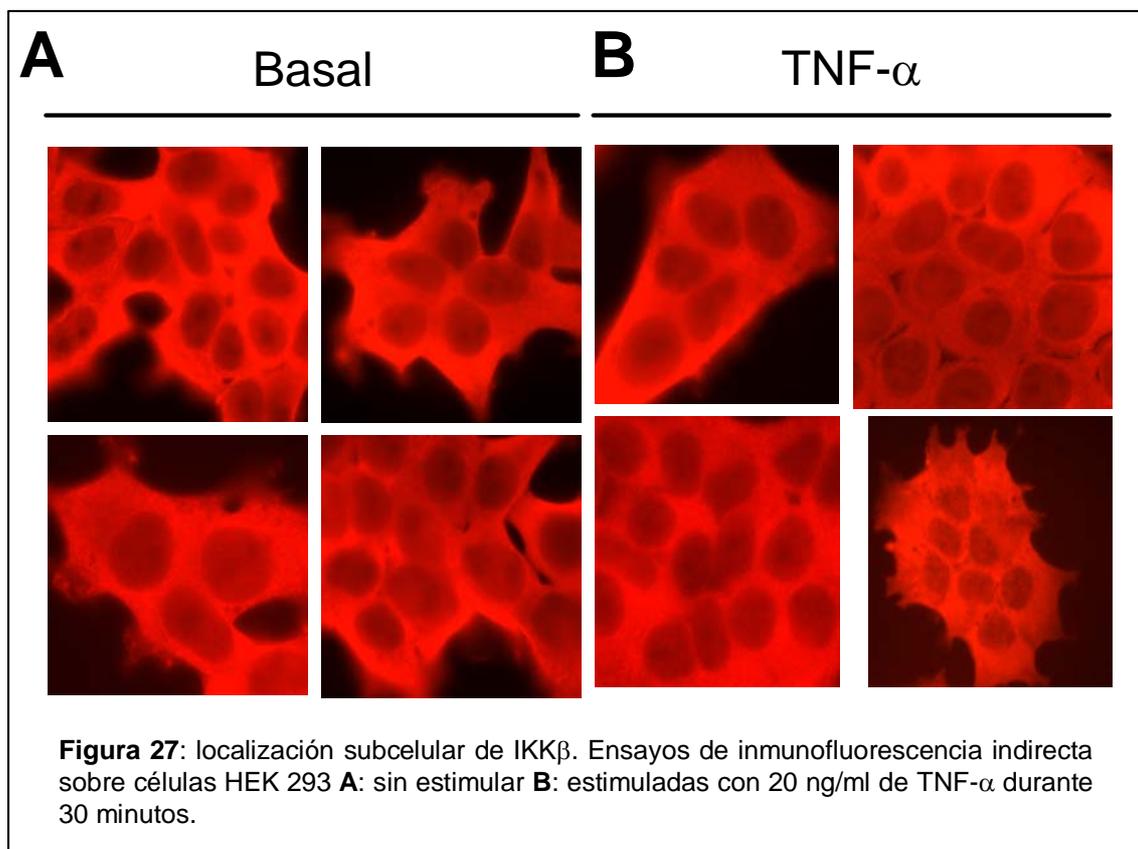


Como se mencionó en la parte introductoria de este trabajo, en la vía clásica de activación de NF- κ B, la IKK es capaz de fosforilar a I κ B α en respuesta al TNF en el citoplasma. Esta señal lleva a la ubiquitinación de I κ B α , la cual es degradada a través de la vía del proteosoma 26S (382).

Para determinar la localización celular de IKK en HEK 293 se realizaron ensayos de *western blot* a partir de extractos nucleares y citoplasmáticos, revelando con anticuerpos específicos contra IKK β . Los resultados muestran que IKK β está presente únicamente en el citoplasma (figura 26). El estímulo con TNF- α no afecta la distribución subcelular, ya que por medio de esta técnica no se detecta presencia de IKK dentro del núcleo. Sin embargo, es de notar que el tratamiento de 30 minutos con 20

ng/ml de TNF- α afecta levemente la corrida electroforética de la proteína, como puede observarse en el retraso que sufre la misma en la figura 26.

Estos resultados se corroboraron con ensayos de inmunofluorescencia indirecta realizados para detectar la localización subcelular de IKK *in situ* sobre células HEK 293. Los ensayos inmunohistoquímicos de la figura 27 muestran claramente que no se altera la distribución subcelular de IKK en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α . Como puede observarse en la figura 27, en condiciones basales y en respuesta a TNF- α la IKK permanece retenida en el citoplasma.



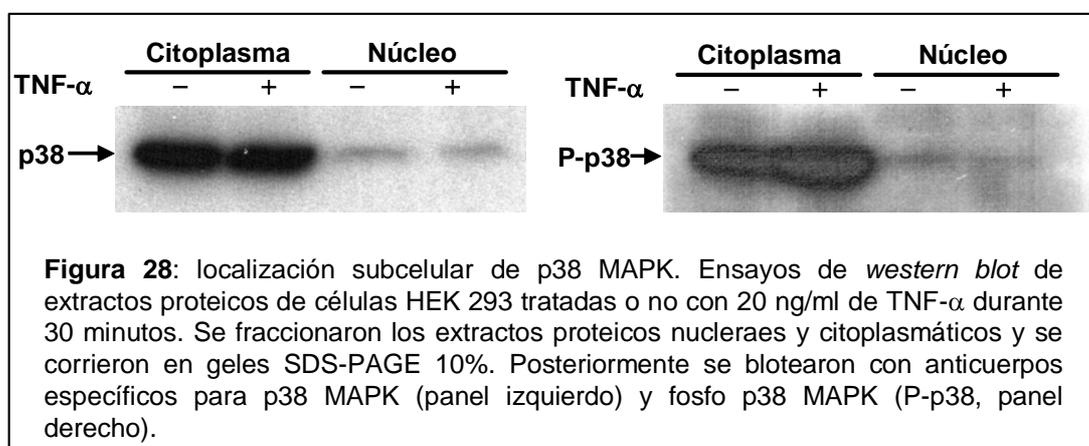
6. LOCALIZACIÓN CELULAR DE p38 Y RelA

Con respecto a la localización celular de p38 MAPK también existen controversias. La mayoría de los trabajos aseguran que p38 está localizado en el citoplasma en su forma inactiva, y luego de su activación por estímulo es capaz de translocar al núcleo en su forma activa (68, 167, 383). Sin embargo, existen otros

trabajos donde muestran que la localización primordial de p38 es nuclear y p38 activada localiza en el citoplasma (168).

Para determinar la localización celular de p38 se realizaron ensayos de *western blot* contra p38 total y contra fosfo-p38, a partir de extractos nucleares de HEK 293 y ensayos de inmunofluorescencia indirecta contra fosfo-p38 MAPK.

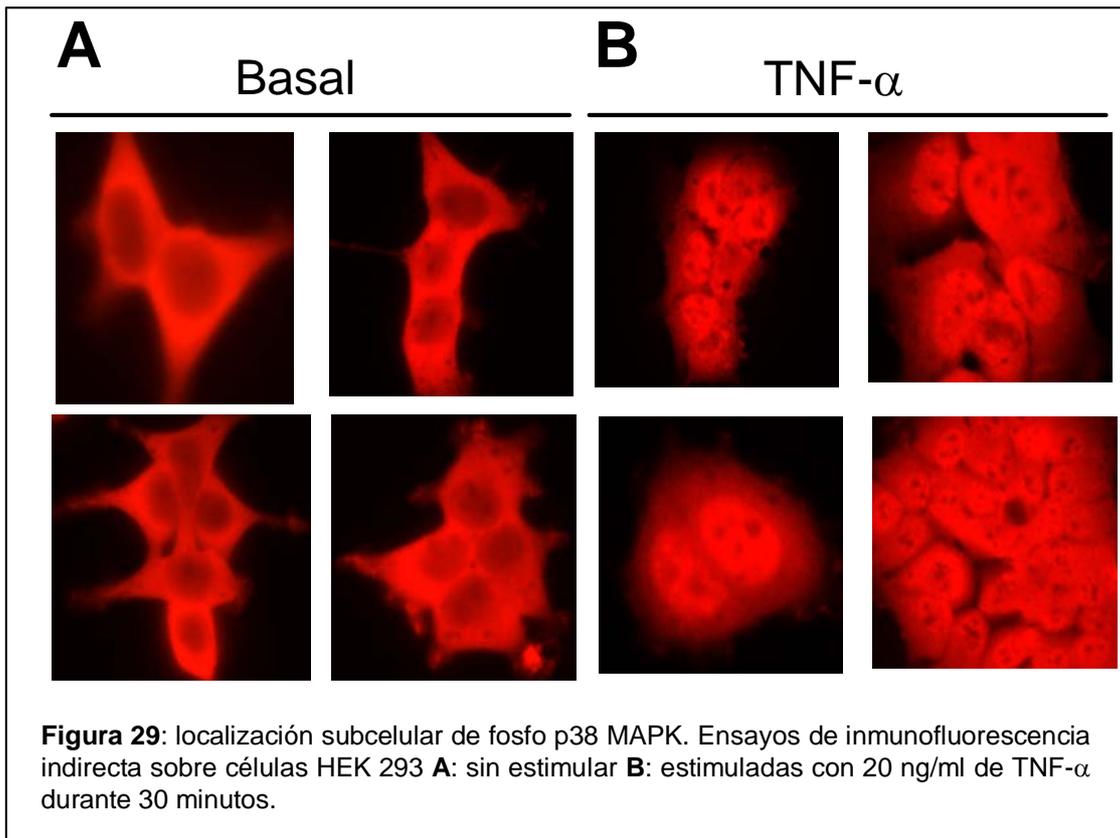
Como demuestran los ensayos de *western blot* de la figura 28A, p38 en HEK 293 está localizado primordialmente en el citoplasma, aunque se observa una banda correspondiente a esta quinasa en los extractos nucleares. A través de esta técnica no se pudo determinar si los niveles de p38 nucleares aumentan en respuesta a TNF- α .



De la misma manera, se realizaron ensayos de *western blot* contra la forma activa de la p38 MAPK. Los resultados de la figura 28B demuestran que hay un aumento de la forma activa de p38 en respuesta a TNF- α en el citoplasma, y también se observa presencia de la misma en el núcleo, aunque no se pudo determinar por medio de esta técnica si los niveles de esta quinasa en el núcleo eran modulados en respuesta a la citoquina.

Con el objeto de determinar con mayor precisión los niveles nucleares de p38 MAPK se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta sobre HEK 293 en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α .

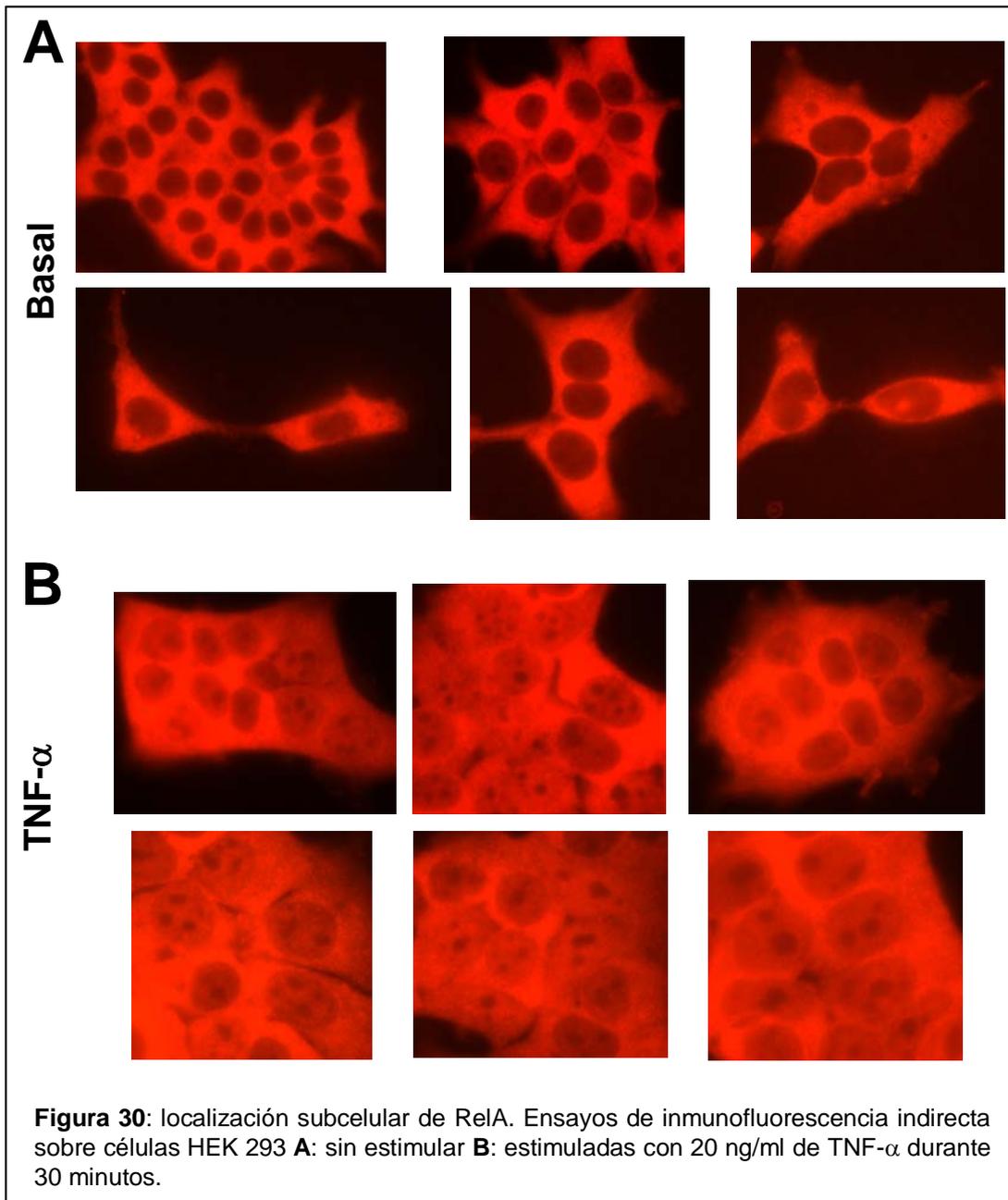
Los ensayos de inmunofluorescencia revelan que en condiciones basales p38 MAPK activa está localizado primordialmente en el citoplasma celular (figura 29A). En respuesta a 20 ng/ml de TNF- α existe una migración de p38 MAPK hacia el núcleo. Resultados similares se obtuvieron en fibroblastos de ratón L-929 (384).



De esta manera, se demostró que en esta línea celular p38 MAPK se encuentra en el citoplasma, y en respuesta a TNF- α migra hacia el núcleo donde podría asociarse al coactivador.

Para corroborar la presencia de RelA en el citoplasma cuando las células no están estimuladas, y la migración al núcleo luego del tratamiento con TNF, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta contra RelA/p65 en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α . Como muestra la figura 30A, en condiciones basales RelA/p65 permanece recluido en el citoplasma celular, y en respuesta a la citoquina gran parte de la proteína migra al núcleo (figura 30B).

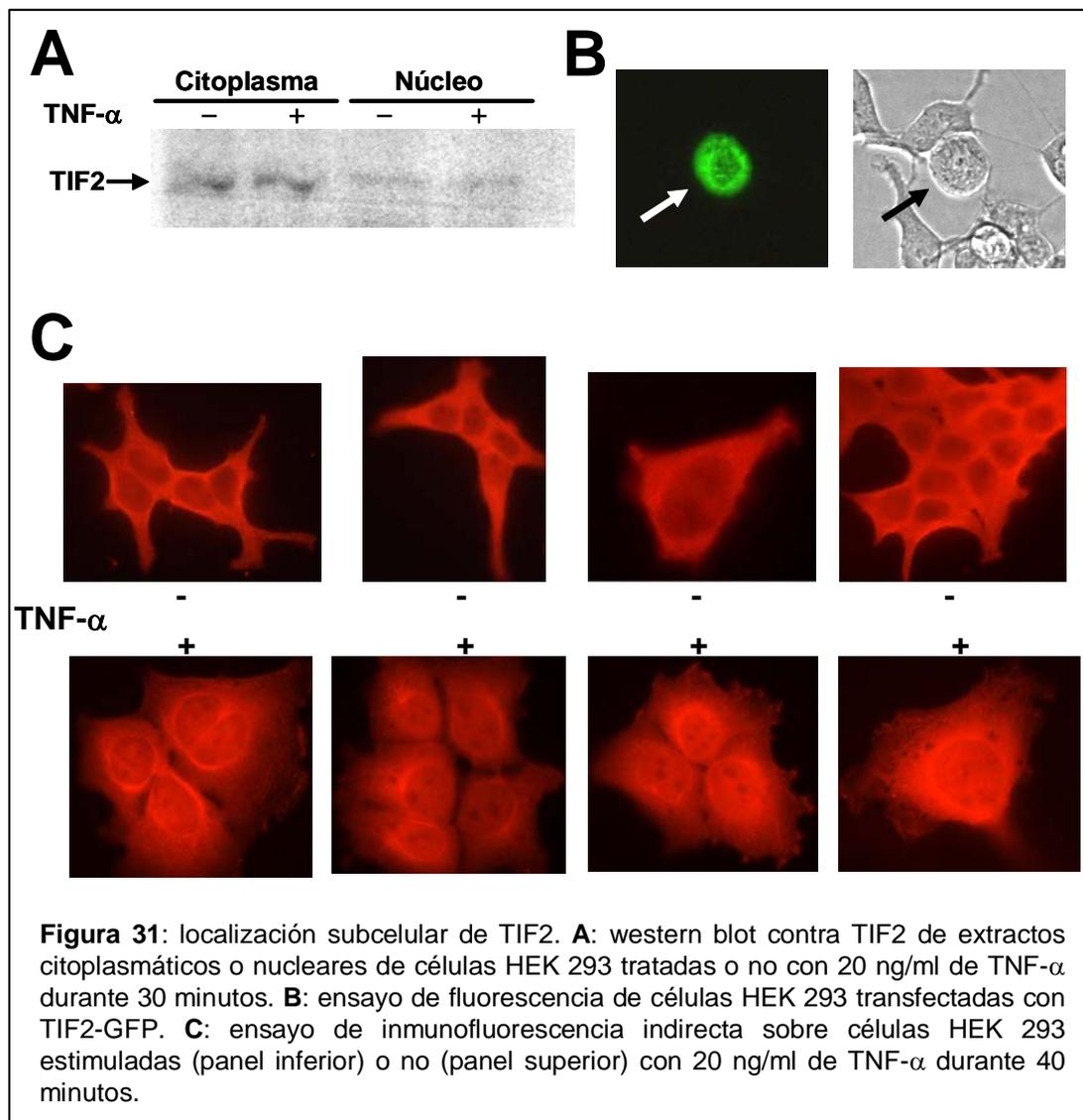
Al igual que p38 MAPK, RelA/p65 migra hacia el núcleo una vez que se encienden los mecanismos de activación de la vía NF- κ B.



7. TIF2 LOCALIZA EN EL CITOPLASMA

En cuanto a la localización celular de TIF2, y como se mencionó en la parte introductoria de este trabajo, la mayoría de los trabajos aseguran que TIF2 está presente únicamente en el núcleo interaccionando con la maquinaria transcripcional de diferentes factores de transcripción (366, 385).

Con el objeto de comprobar la factibilidad de la formación de complejos citoplasmáticos, se decidió determinar la localización celular de TIF2. Para ello se realizaron ensayos de fluorescencia transfectando en forma transitoria HEK 293 con el vector de expresión de TIF2 acoplado a la proteína verde de fluorescencia (GFP). Los resultados de microscopía fluorescente muestran que TIF2-GFP se encuentra localizado en el núcleo, y más aún, localizado focos discretos dentro del mismo (figura 31B). Estos resultados concuerdan con lo observado anteriormente por los grupos de Hager y de Paschal (359, 386).



Se propuso determinar qué ocurría con la localización de la proteína TIF2 endógena, dado que la expresión ectópica de una proteína como GFP puede llevar a

patrones de expresión diferentes a las encontradas en la forma salvaje. Para ello se realizaron ensayos de *western blot* a partir de extractos nucleares de HEK 293. Como muestran estos resultados (figura 31A), se puede afirmar que hay presencia de TIF2 endógeno dentro del núcleo, al igual que los ensayos de fluorescencia de TIF2-GFP. Sin embargo, y sorprendentemente, los ensayos de *western blot* también muestran a TIF2 en el citoplasma (figura 31B).

Con el fin de reconocer la localización de la forma endógena de TIF2, se realizaron ensayos indirectos de inmunofluorescencia en células HEK 293 utilizando anticuerpos específicos para TIF2.

Los resultados demuestran que la localización de TIF2 en HEK 293 es citoplasmática (figura 31C) cuando las células no son tratadas con TNF- α , y un pequeño porcentaje de TIF2 está localizado dentro del núcleo. En respuesta a TNF- α la localización de TIF2 cambia. Se puede observar que luego del estímulo se ubica en el espacio perinuclear, es decir alrededor del núcleo (figura 31C).

Estos resultados de localización celular son coherentes con la idea de la formación del complejo multiproteico citoplasmático, ya que la presencia de TIF2 en el citoplasma permitiría la interacción con los diferentes factores regulatorios de la actividad NF- κ B, y el transporte de estas moléculas hacia el núcleo, donde se encuentran las zonas regulatorias que responden a NF- κ B.

Basándonos en los resultados obtenidos con los ensayos de co-precipitación entre IKK y TIF2 (figura 25), los resultados obtenidos mediante ensayos de *western blot* de extractos citoplasmáticos y nucleares (figura 29) y los ensayos de inmunofluorescencia de IKK (figura 26), podemos suponer que esta proteína tiene la posibilidad de interactuar con el extremo carboxilo-terminal de TIF2 dentro del citoplasma, y si bien el tratamiento de las células con TNF- α no afecta la interacción física entre IKK y TIF2, es probable que se desprenda del complejo antes de que el complejo transloque al núcleo, ya que no se observa presencia de IKK en el núcleo en respuesta a la citoquina.

Con estos resultados se concluye que TIF2 podría asociarse a los complejos inactivos de NF- κ B en el citoplasma, y fosforilarse allí, y más tarde, en respuesta a TNF- α translocar al núcleo. Sin embargo aún quedaba por determinar el mecanismo molecular por el cual p38 contribuía a promover la actividad de NF- κ B, y hasta qué

punto la fosforilación de TIF2 era relevante para la actividad de este factor de transcripción.

8. p38 PROMUEVE LA DEGRADACIÓN DE I κ B α

Si bien se sabe que la actividad de p38 aumenta luego del estímulo con TNF- α , y que su actividad es requerida para que NF- κ B sea activado, aún no se conocen los mecanismos exactos por lo cuales esta quinasa provoca el aumento en la actividad de este factor de transcripción. Está demostrado que la acción de esta quinasa no es a través de la fosforilación de RelA (197), y nuestros resultados indicarían que, en su lugar, podría tratarse de la fosforilación de TIF2.

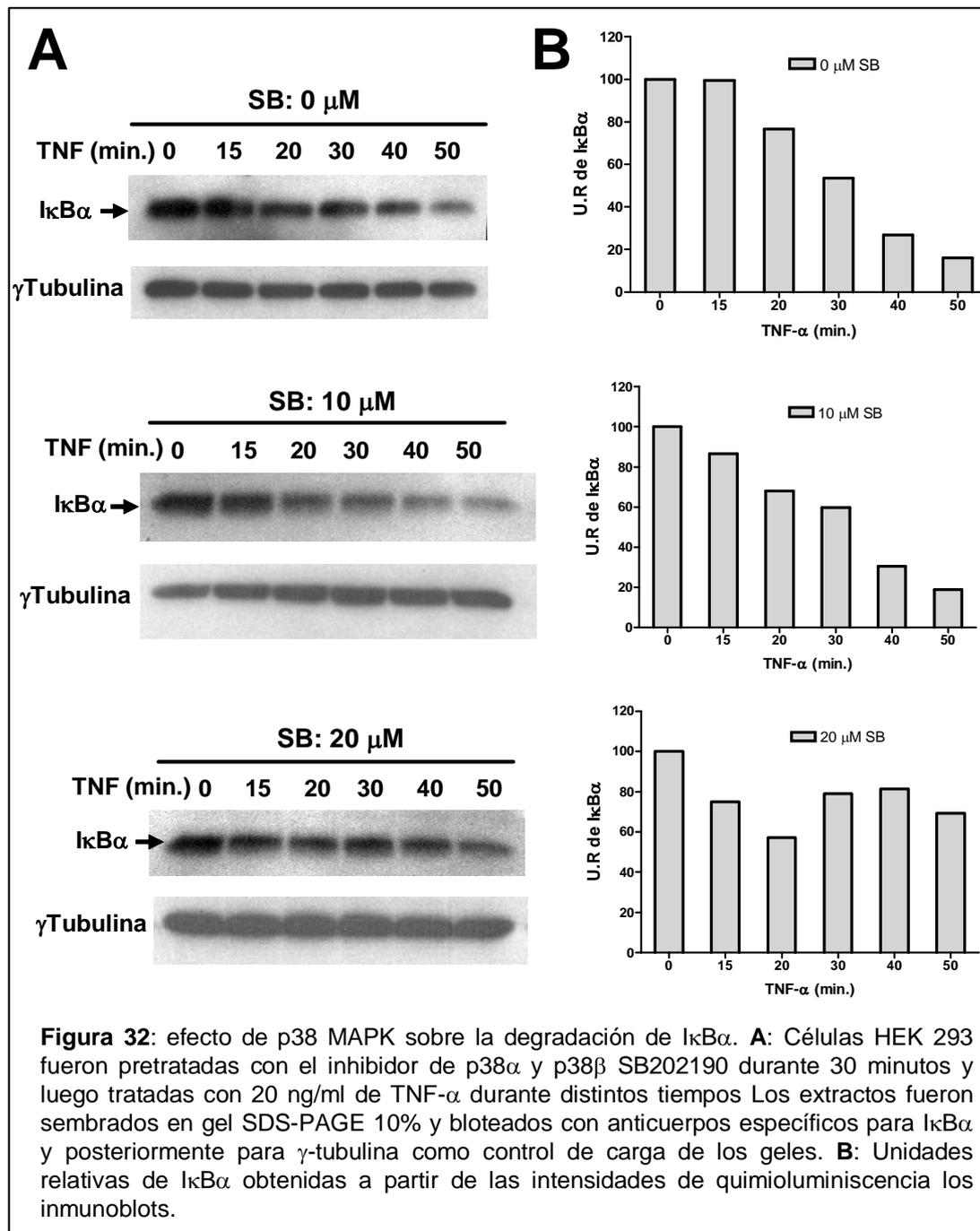
Dada la presencia de p38 MAPK e I κ B en el complejo multiproteico, se planteó que podría llegar a existir un vínculo entre estos dos componentes. Para determinar el rol de la quinasa en la activación de NF- κ B se determinó la cantidad de I κ B α que permanecía sin degradar cuando las isoformas de p38 eran bloqueadas,

Para determinar el rol de p38 MAPK en la cinética de degradación de I κ B α se realizaron ensayos de *western blot* con anticuerpos contra I κ B α a partir de extractos proteicos de HEK 293 estimuladas o no con 20 ng/ml de TNF- α en presencia del inhibidor de p38 SB202190 (figura 32). Para ello se pretrataron a las células con diferentes concentraciones del inhibidor SB202190 (0-20 μ M) durante 30 minutos, luego de lo cual fueron estimuladas con 20 ng/ml de TNF- α durante 0 a 50 minutos (figura 32).

Los ensayos de *western blot* de la figura 32 muestran que en respuesta a la citoquina se produce una disminución de I κ B α en las células a lo largo del tiempo. Sin embargo, cuando se pretrató a las HEK 293 con 20 μ M del inhibidor de p38 α y p38 β , el efecto de degradación de I κ B α se revierte.

En particular, con una dosis de SB202190 de 20 μ M y a los 30 minutos luego de la estimulación con TNF- α puede observarse que queda remanente un 80% de I κ B α con respecto a aquellas células que no fueron tratadas con TNF. A los 40 minutos post-tratamiento con TNF- α un 80% de I κ B α permanece todavía activo en las células cuando se inhibe a p38 con 20 μ M de SB202190, en comparación con el 30% que queda si las células no fueron pretratadas con este inhibidor (figura 32). El efecto más notorio

se observó a los 50 minutos post-tratamiento con TNF- α : en estas células sólo quedó un 20% del I κ B α respecto al observado en condiciones basales, a diferencia de las células que fueron pretratadas con 20 μ M de SB202190 donde se observó aproximadamente un 70% de remanencia de I κ B α (figura 32).



Estos resultados indican que la actividad de p38 MAPK regula en forma negativa los niveles de I κ B α presentes en la célula, promoviendo su degradación

cuando existe un estímulo proinflamatorio como es la liberación de TNF- α . Cuando la actividad de esta quinasa está disminuida, hay mayores niveles de I κ B α presentes en la célula, aún en respuesta a TNF- α . Nuevamente, esta inhibición de la degradación de I κ B α concuerda con la disminución de la actividad de NF- κ B observada en los ensayos reporteros donde se pretrató a las células con el inhibidor de p38 (figura 20). Sin embargo restaba por determinar hasta qué punto la fosforilación de TIF2 era relevante para la activación de NF- κ B.

9. LA SERINA 1323 DE TIF2 ES UN BLANCO DE FOSFORILACIÓN PARA p38 MAPK

Dado que la actividad de p38 es requerida para una óptima actividad de NF- κ B, capaz de promover la degradación de I κ B α , y capaz de fosforilar a TIF2 en las etiquetas identificadas, se quiso determinar si la fosforilación de TIF2 por p38 en las etiquetas identificadas podría desempeñar algún rol en la regulación de la actividad de NF- κ B.

Nos preguntamos entonces qué sucedería con la actividad de NF- κ B si realizábamos mutaciones puntuales sobre TIF2 en aquellos residuos propuestos por el *ScanSite* y *The Protein Kinase Resource* (381). La hipótesis sugería que si anulábamos los sitios de fosforilación por p38 MAPK la actividad de NF- κ B se vería reducida con respecto a aquellas células que expresaran la forma salvaje de TIF2. Dado que ambas herramientas bioinformáticas coincidían en la serina 1323 de TIF2, se realizaron mutaciones puntuales sobre este residuo y analizó qué ocurría con la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a TNF- α .

Tal como se describe en la sección de materiales y métodos, se realizaron dos mutantes puntuales de TIF2: en primer lugar una mutante al que le fue anulado el sitio de blanco de fosforilación por p38 MAPK. A esta mutante se le cambió el residuo de serina 1323 por un residuo de alanina (S1323A, figura 33C). En segundo lugar, y con el objeto de mimificar la carga negativa del grupo fosfato en esa zona de TIF2, se construyó una mutante a la cual se le cambió el residuo de serina 1323 por un residuo de ácido aspártico (S1323D, figura 33C).

Para analizar qué ocurría con la actividad de NF- κ B se realizaron ensayos reporteros sobreexpresando ambas construcciones por separado. Se co-transfectó en

forma transitoria HEK 293 con las dos mutantes puntuales, el vector reportero para actividad luciferasa controlado por elementos κ B y beta-galactosidasa para normalizar los valores obtenidos.

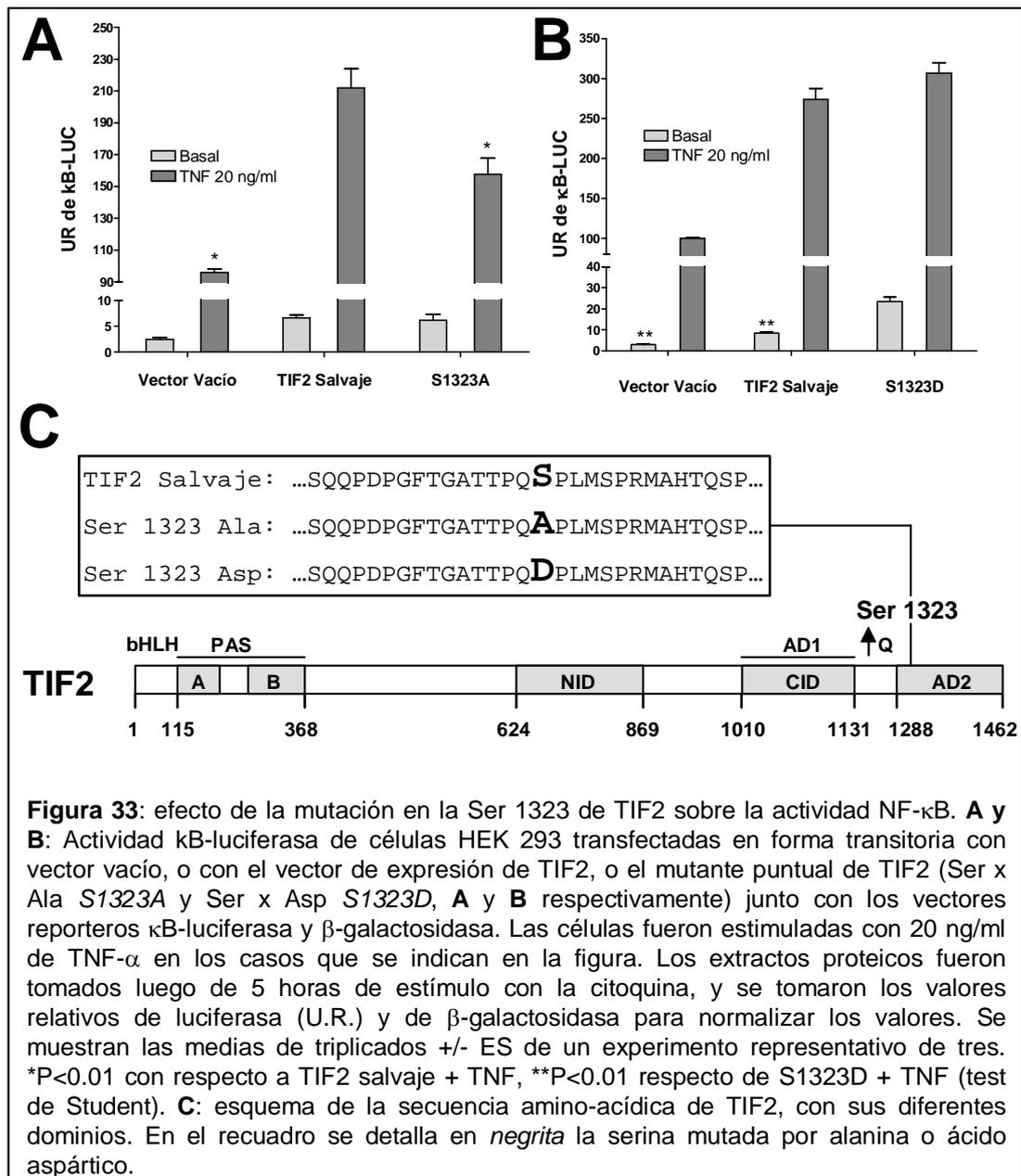


Figura 33: efecto de la mutación en la Ser 1323 de TIF2 sobre la actividad NF- κ B. **A y B:** Actividad κ B-luciferasa de células HEK 293 transfectadas en forma transitoria con vector vacío, o con el vector de expresión de TIF2, o el mutante puntual de TIF2 (Ser x Ala S1323A y Ser x Asp S1323D, **A** y **B** respectivamente) junto con los vectores reporteros κ B-luciferasa y β -galactosidasa. Las células fueron estimuladas con 20 ng/ml de TNF- α en los casos que se indican en la figura. Los extractos proteicos fueron tomados luego de 5 horas de estímulo con la citoquina, y se tomaron los valores relativos de luciferasa (U.R.) y de β -galactosidasa para normalizar los valores. Se muestran las medias de triplicados \pm ES de un experimento representativo de tres. * $P < 0.01$ con respecto a TIF2 salvaje + TNF, ** $P < 0.01$ respecto de S1323D + TNF (test de Student). **C:** esquema de la secuencia amino-ácida de TIF2, con sus diferentes dominios. En el recuadro se detalla en *negrita* la serina mutada por alanina o ácido aspártico.

Los resultados de la figura 33A muestran que la mutación de la serina 1323 por una alanina produce una significativa disminución de la actividad de NF- κ B en respuesta a 20 ng/ml de TNF- α , con respecto a aquellas células transfectadas con la versión salvaje de TIF2. Esta disminución de actividad representa aproximadamente el 20% de la actividad que presentan las células que sobreexpresan la versión salvaje de

TIF2. Este resultado demuestra que la fosforilación de TIF2 por p38 en el residuo 1323 es necesaria para la óptima coactivación de TIF2.

Estos resultados se condicen con los observados cuando las células son tratadas con el inhibidor específico de p38 MAPK (figura 20), y demuestran que la actividad transcripcional de NF- κ B depende de la actividad quinasa de p38 MAPK sobre el coactivador TIF2.

A diferencia de aquellas que expresan la mutante S1323A, las células que son transfectadas en forma transitoria con la mutante S1323D y se las estimulan con 20 ng/ml de TNF- α no presentaron diferencias significativas con respecto a aquellas células que sobreexpresan la construcción salvaje de TIF2.

De esta manera, si se mimifican las cargas negativas del grupo fosfato en TIF2 a través del cambio del residuo de serina por un residuo de ácido aspártico (el cual ya contiene las cargas negativas), no se observa el efecto negativo que produce la ausencia del sitio de fosforilación por p38 sobre la actividad de NF- κ B (figura 33B). Si bien no hay diferencias significativas entre el grupo transfectado con la forma salvaje de TIF2 y las transfectadas con la mutante S1323D, los resultados obtenidos luego de las transfecciones con esta mutante muestran que existe una tendencia positiva sobre la actividad de NF- κ B en respuesta a TNF- α .

En la figura 33B se ve que la mutante S1323D en condiciones basales tiene diferencias significativas de actividad NF- κ B con respecto a las actividades basales de NF- κ B de células transfectadas con la versión salvaje de TIF2, o las que fueron transfectadas con vector vacío. La actividad basal de la mutante S1323D de TIF2 corresponde aproximadamente al doble de actividad basal de la construcción de TIF2 salvaje, y alrededor de cuatro veces la actividad basal obtenida luego de la transfección con vector vacío (figura 33B).

Por otro lado, como puede observarse en la figura 33B, hay una diferencia significativa entre las condiciones basales y en respuesta a TNF- α cuando son transfectadas con la mutante S1323D.

Estos resultados demuestran que la actividad transactivadora óptima de TIF2 depende en gran medida de la actividad quinasa de p38 sobre la serina 1323, dado que la ausencia del sitio de fosforilación reduce el efecto de TIF2 sobre la actividad de NF- κ B. Además, los resultados obtenidos demuestran que la fosforilación en la serina 1323

de TIF2 por p38 no es la única señal necesaria para una óptima actividad de NF- κ B en respuesta a TNF- α .

Finalmente se demostró la importancia de la formación del complejo multiproteico donde la actividad de p38 sobre el mismo es clave para el óptimo funcionamiento de TIF2 en la actividad transactivadora de NF- κ B.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir los siguientes puntos:

1. TIF2 interacciona físicamente y en forma directa con RelA, el componente más estudiado del dímero NF- κ B.
2. La actividad coactivadora de TIF2 es necesaria para una óptima actividad de NF- κ B, y no es redundante con la actividad de los otros miembros de la familia p160.
3. La actividad de p38 MAPK α y β no es imprescindible para la actividad de NF- κ B, pero sí promueve el aumento de su actividad transcripcional.
4. TIF2 posee etiquetas de fosforilación para p38 MAPK.
5. El dominio carboxilo-terminal de TIF2 es sustrato de p38 MAPK, y su actividad sobre el mismo es modulada en respuesta a TNF- α .
6. TIF2 interacciona físicamente y en forma directa con p38 MAPK.
7. TIF2 es capaz de asociarse a complejos inactivos de NF- κ B, dado que interacciona físicamente con I κ B α e IKK γ , y en respuesta a TNF- α este complejo se vuelve activo.
8. TIF2 está localizado en el citoplasma y en respuesta a TNF migra al núcleo.
9. p38 MAPK α y β promueven la degradación de I κ B α en respuesta a TNF- α .
10. La fosforilación por p38 en la serina 1323 de TIF2 es fundamental para la actividad óptima de TIF2 en la transactivación de NF- κ B.

DISCUSIÓN

“Nothing shocks me. I'm a scientist”.

Indiana Jones

1. MODELO DE ACCIÓN DE TIF2

Los resultados obtenidos están sintetizados en la figura 34, donde describimos un modelo molecular de acción de TIF2 con los componentes más importantes de la vía de activación de NF- κ B: el coactivador TIF2, primeramente descrito en la literatura como coactivador de receptores nucleares, es capaz de interactuar en forma directa con uno de los componentes del complejo NF- κ B, tal como RelA, además de la quinasa p38, utilizando dominios diferentes de los utilizados por receptores nucleares.

Si bien es sabido que la actividad de p38 regula la actividad de NF- κ B (197, 199, 200) como hemos descrito previamente en esta tesis, por primera vez se propone un modelo del mecanismo molecular por el cual la quinasa p38, a través del coactivador TIF2, puede contribuir a la activación de NF- κ B y a la regulación de la respuesta inflamatoria, proliferativa y anti-apoptótica.

Nuestros resultados permiten concluir que TIF2 es una proteína adaptadora y bastante promiscua en cuanto a su interacción con diversos factores de transcripción. Podrían existir complejos de TIF2/IKK/p38 prearmados que preceden a la activación de NF- κ B y a la asociación del factor de transcripción con secuencias específicas del ADN (figura 34).

Los resultados obtenidos demuestran que TIF2 es capaz de interactuar físicamente y en forma directa con RelA, el componente más estudiado de NF- κ B, tanto por su dominio amino-terminal como por su dominio carboxilo-terminal. Por otro lado, y en condiciones basales, TIF2 es capaz de interactuar físicamente con I κ B, el cual es liberado en respuesta a TNF- α .

TIF2 interactúa físicamente con IKK a través de su dominio amino-terminal como también a través de su carboxilo-terminal, y esta unión permanece tanto en condiciones basales como en respuesta a TNF- α .

Demostramos que p38 MAPK también posee capacidad de unión con el complejo multiproteico TIF2:RelA:I κ B:IKK, ya que esta quinasa es capaz de interactuar físicamente y en forma directa con TIF2. Demostramos por primera vez que p38 MAPK promueve la degradación de I κ B en respuesta a TNF- α , dado que la inhibición de su actividad disminuye los niveles de degradación de I κ B. Asimismo demostramos que TIF2 es sustrato de p38, el cual modula la fosforilación en la serina 1323 de TIF2 en respuesta a TNF- α . Teniendo en cuenta ambas observaciones, la

fosforilación de p38 sobre TIF2 de algún modo estaría cooperando con la degradación de I κ B α y promoviendo la actividad transcripcional de NF- κ B.

Podemos suponer que este complejo multiproteico podría armarse en el citoplasma, dado que TIF2 antes de la estimulación con TNF- α posee localización citoplasmática (al igual que p38, I κ B α , IKK β y RelA), y en respuesta a TNF- α el complejo multiproteico migra hacia el núcleo donde se induciría la actividad transcripcional de los genes que responden a NF- κ B (figura 34).

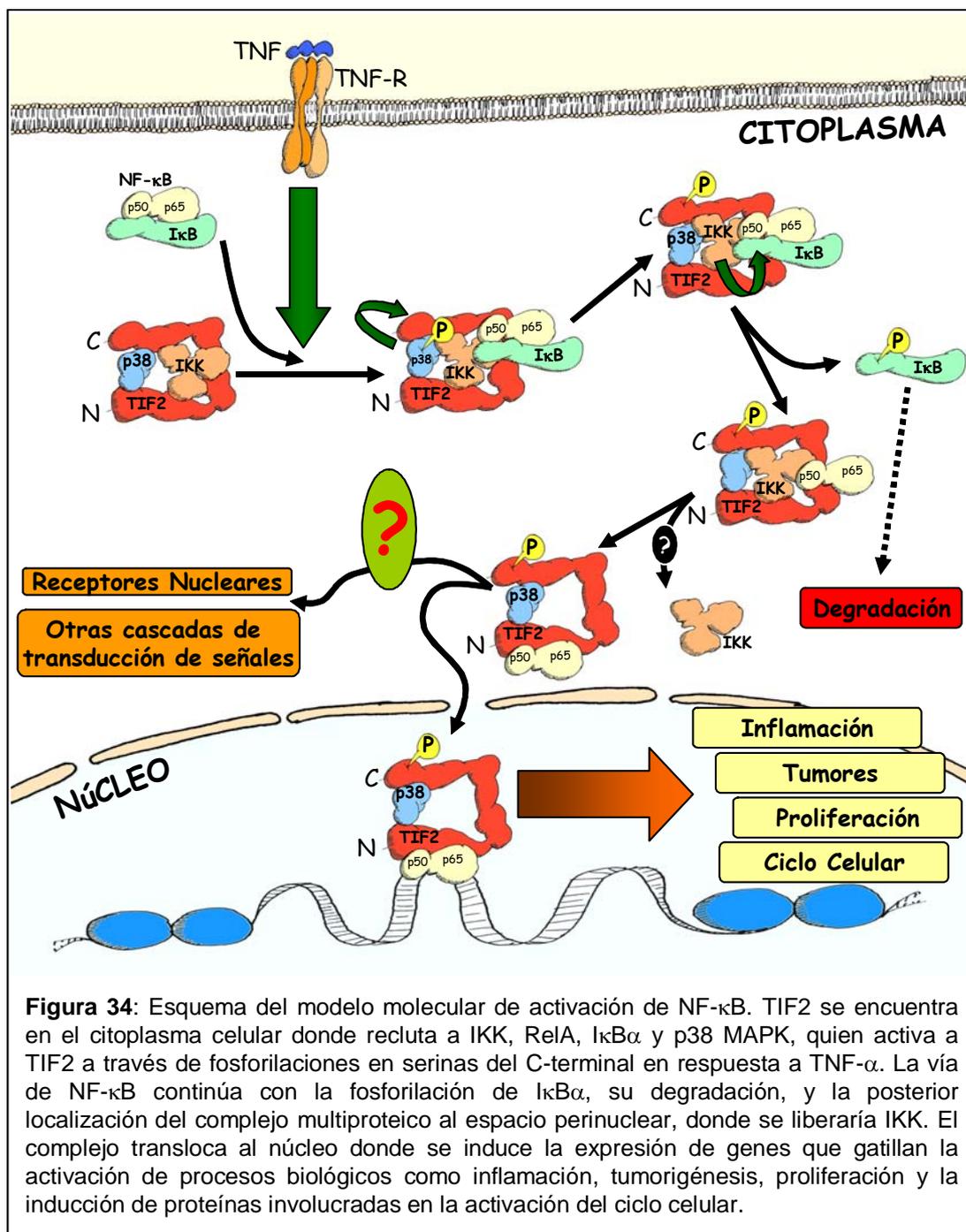


Figura 34: Esquema del modelo molecular de activación de NF- κ B. TIF2 se encuentra en el citoplasma celular donde recluta a IKK, RelA, I κ B α y p38 MAPK, quien activa a TIF2 a través de fosforilaciones en serinas del C-terminal en respuesta a TNF- α . La vía de NF- κ B continúa con la fosforilación de I κ B α , su degradación, y la posterior localización del complejo multiproteico al espacio perinuclear, donde se liberaría IKK. El complejo transloca al núcleo donde se induce la expresión de genes que gatillan la activación de procesos biológicos como inflamación, tumorigénesis, proliferación y la inducción de proteínas involucradas en la activación del ciclo celular.

Al regular la actividad de NF- κ B, TIF2 tendría un rol importante en la regulación de los procesos biológicos controlados por NF- κ B tales como la activación del sistema inmune, los procesos inflamatorios, la regulación de la proliferación y del ciclo celular y finalmente la oncogénesis (figura 34).

2. TIF2: ¿UN NUEVO MECANISMO TRANSACTIVADOR, DIFERENTE AL CLÁSICO?

Si bien se sabe que NF- κ B requiere de coactivadores generales para su transactivación (264-266, 285, 335, 378, 379), aún no se conocen los mecanismos exactos por los cuales se produce el fenómeno de transactivación a través de la interacción con los mismos. Está demostrado que este factor requiere de múltiples actividades enzimáticas que actúen a nivel de la cromatina para crear un ambiente permisivo para su transcripción (387-389). Por otro lado también se requiere de proteínas regulatorias que interactúan con NF- κ B, y que no se encuentran dentro del núcleo. Por ejemplo, está demostrado que se requiere de actividad enzimática en el citoplasma para que NF- κ B se libere de su factor inhibitorio a través de la fosforilación en residuos de serina específicos (390). Otro ejemplo sería que la fosforilación de RelA es requerida para aumentar su capacidad de unión a secuencias específicas en el ADN y para su activación transcripcional (391, 392). Estos antecedentes demuestran que la actividad de NF- κ B en respuesta a TNF- α está regulada por diferentes moléculas que se encuentran dentro y fuera del citoplasma.

Como se describió en la introducción, la regulación de la transcripción es dependiente de la presencia de coactivadores o correpresores (241, 242). El mecanismo clásico de transactivación de coactivadores postula que los mismos son reclutados en los promotores blancos a través de interacciones con los factores de transcripción blanco, y funcionan como moléculas vinculantes entre las proteínas de unión al ADN y las enzimas modificadoras que alteran la estructura local de la cromatina, para crear un ambiente permisivo para la transcripción.

Este trabajo demuestra que TIF2, una molécula que clásicamente está asociada con la regulación de la transcripción a través de la interacción con factores remodeladores de la cromatina, contribuye a la activación de un factor de transcripción

por un mecanismo diferente al previamente descrito para coactivadores, a través de la interacción con proteínas claves de la vía NF- κ B.

3. TIF2 TIENE UNA ALTA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN PROTEICA

NF- κ B y los receptores nucleares muestran requerimientos similares de coactivadores y funciones de transferencia de grupos acetilos, a pesar de que son moléculas completamente diferentes. En particular NF- κ B, al igual que los receptores nucleares, requiere de coactivadores de la familia p160, los cuales contienen motivos consenso que contienen etiquetas de LXXLL (donde L es residuo de leucina y X cualquier otro aminoácido) que son importantes para la interacción con receptores nucleares y CBP (241, 278, 281, 304-306, 320-322). Por ejemplo, NF- κ B requiere del motivo LXD2 de SRC-1 y del motivo LXD4 dentro del dominio de interacción con CBP (379), aunque no se demostró que hubiera una interacción directa entre miembros de la familia de NF- κ B y SRC-1. Por otro lado, mediante ensayos de delección del extremo carboxilo-terminal de TIF2 (del aminoácido 1121 hasta el 1462) se observó que la actividad transcripcional del factor de transcripción AP-1 disminuye en comparación con la versión salvaje de TIF2 (393). Estos resultados muestran que si bien hay dominios dentro de los coactivadores que son comunes para diferentes factores de transcripción, también hay otros dominios que no son tan comunes, y si bien se ha determinado la interacción física con receptores nucleares, en este trabajo se demuestra por primera vez que existe una interacción directa entre un factor de transcripción no relacionado con los receptores nucleares y un coactivador de la familia p160, aunque aún no hemos determinado las etiquetas involucradas. Profundizar estos estudios sería de suma importancia para el desarrollo futuro de inhibidores/antagonistas específicos de la interacción TIF2/NF- κ B y aplicaciones terapéuticas, sin afectar la función de los receptores nucleares.

La primera molécula de NF- κ B descrita fue el heterodímero formado por las subunidades p50 y p65/RelA (7). Este dímero es el que hoy en día se conoce como NF- κ B, aunque ya se sabe que existe una gran diversidad de miembros que pertenecen a la familia de NF- κ B. Como se mencionó en la parte introductoria de este trabajo, las combinaciones p50/p65, p50/c-rel, p65/p65, y p65/c-rel son transcripcionalmente

activas, mientras que los homodímeros p50/p50 y p52/p52 son transcripcionalmente represivas (10-14). Sería interesante determinar qué ocurre con respecto a la interacción física entre TIF2 y otros miembros de la familia de NF- κ B, en particular la interacción de TIF2 con los homodímeros represivos, y también determinar si esta combinación fuera posible, determinar si TIF2 podría resultar un regulador negativo de la transcripción de NF- κ B.

La unión de CBP a NF- κ B es esencial para la activación de este factor de transcripción. Como se mencionó en la parte introductoria de este trabajo, tanto CBP como p300 poseen dominios de transferencia de grupos acetilos, y también ambos son capaces de asociarse con proteínas de transferencia de grupos metilos a histonas (394), las cuales provocan cambios estructurales sobre la cromatina. Estos cambios en la cromatina proveen códigos para el correcto funcionamiento de la maquinaria regulatoria de la expresión génica. En particular, tanto la metilación como la acetilación de residuos específicos dentro de la cromatina provocan cambios estructurales que generan ambientes permisivos para la iniciación de la transcripción. Por otro lado, se vio que CBP es capaz de acetilar a RelA en residuos de lisina promoviendo su capacidad de unión al ADN y la liberación de I κ B (395, 396) y además se sabe que TIF2 es capaz de asociarse con CBP y p300 funcionando de manera sinérgica y promoviendo la actividad transcripcional de numerosos factores de transcripción (306). Sin embargo, la asociación entre CBP y TIF2 se inhibe cuando la región carboxilo-terminal de CBP y p300 se encuentra metilada (397). Dado que TIF2 es el único coactivador de la familia p160 que no posee actividad de transferencia de grupos acetilos, sería probable que TIF2 ejerza funciones de remodelación de la cromatina en asociación con otros factores que sí posean tales funciones. Tal sería el caso de asociación con CBP, PCAF o posiblemente a través de la interacción con los otros miembros de la familia p160.

De acuerdo con estas observaciones, se podría pensar entonces que el aumento en la transactivación de NF- κ B por TIF2 podría estar mediado por otras moléculas involucradas en el remodelado de la cromatina. Sin embargo, independientemente de esto, y de acuerdo a nuestros resultados, TIF2 podría contribuir a la actividad de NF- κ B por otro mecanismo no clásico, tal como se ha mencionado previamente, a través de acciones enzimáticas muy probablemente citoplasmáticas.

4. ¿LA p38 MAPK ACTIVA A TIF2?

Se demostró que TIF2 es capaz de ser fosforilado por p38 MAPK en respuesta a TNF α (figura 21) y que *in vivo* los niveles de I κ B α dependen de la actividad de p38 (figura 32). Los mecanismos por los cuales se produce la degradación de I κ B α luego de la activación de p38 MAPK no están del todo esclarecidos. Según resultados obtenidos por otros grupos de investigación, la inhibición de p38 disminuye los niveles de fosforilación de I κ B α *in vitro* (199). La formación de un complejo que contiene a TIF2, p38, RelA, I κ B α e IKK β podría explicar la regulación de I κ B α por p38, dada la proximidad física de todas estas moléculas y su potencial para interactuar entre sí.

Al igual que p38, MSK1 es una quinasa esencial para la activación de NF- κ B en respuesta a TNF (201). MSK1 es capaz de fosforilar a RelA/p65 en la serina 276 en respuesta a TNF- α y actúa río abajo de p38 y ERK MAPKs (201). Según estas observaciones, éste podría ser un mecanismo adicional por el cual p38 induce la activación de NF- κ B. Sería interesante determinar si esta quinasa forma parte del complejo TIF2/RelA dentro del núcleo, y si juega algún rol adicional en la transactivación de TIF2 sobre NF- κ B.

En este trabajo demostramos que TIF2 interactúa físicamente y en forma directa con p38 MAPK (figuras 22 y 23). La interacción directa entre TIF2 y p38 es importante para la transactivación de NF- κ B, dado que un cambio en la serina 1323 de TIF2 disminuye la actividad de NF- κ B con respecto a la forma salvaje de TIF2 (figura 33). Esta interacción también podría ser relevante en otras acciones clásicas del coactivador, tomando en cuenta lo discutido en el ítem anterior, en el reclutamiento de factores involucrados en la acetilación de histonas (como CBP y PCAF). No está del todo claro el papel que juega p38 con CBP, aunque algunos trabajos muestran que CBP puede ser fosforilado *in vitro* por p38 (398). Sería interesante determinar si p38 juega algún rol en la asociación entre TIF2 y CBP, y si de alguna manera es capaz de modular la actividad HAT de CBP en los genes blanco de NF- κ B.

Además, la asociación directa entre TIF2 y p38 podría estar relacionada en la modulación de la actividad de otros factores de transcripción, especialmente receptores nucleares. Según resultados recientes, p38 aumenta la actividad transcripcional del GR, y también es capaz de aumentar la localización nuclear del mismo y provocar un aumento en la unión a sus secuencias blanco presentes en el ADN (384, 399). Dado que

TIF2 es un coactivador del GR (276), sería interesante determinar si el efecto transactivador de TIF2 sobre GR está modulado por p38 MAPK, o si un cambio en la secuencia blanco de fosforilación por p38 cambia la localización del receptor nuclear, o si hay una diferencia en cuanto a la unión del GR a sus secuencias blanco en presencia del antisentido de TIF2 o de diferentes mutantes de TIF2.

5. ACCIONES CONCERTADAS DE TIF2 Y p38 MAPK

Como se mencionó en la parte introductoria de esta tesis, es sabido que p38 está involucrada en muchas de las respuestas celulares a estrés y a inflamación (400-405). En este trabajo demostramos que TIF2 es sustrato de la p38 MAPK (figura 21) y además esencial para promover la actividad de NF- κ B, uno de los factores más importantes relacionado con la activación del sistema inmune e inflamatorio. Dada la asociación tan íntima entre estos tres componentes (RelA, TIF2 y p38) es factible suponer que la respuesta a estrés e inflamación podría depender de los niveles de TIF2 intracelulares, sobre todo si se toma en cuenta que la proteína TIF2 está ampliamente distribuida en diferentes tejidos. El ARNm de TIF2 fue detectado en placenta, testículos, cerebro, hígado, corazón y útero (272, 277, 315). La proteína TIF2 fue detectada en testículos, pulmón, cerebro, hígado, corazón y en células epiteliales de varios tejidos, entre ellos el tracto gastrointestinal, el páncreas, el riñón, el útero, la glándula mamaria, los testículos, la próstata, el pulmón y la glándula adrenal. La proteína TIF2 también se expresa en células del estroma del colon, del útero y en la glándula mamaria (278, 345). En resumen, todas aquellas acciones y patologías hasta el presente conocidas como dependientes de NF- κ B y p38 MAPK, también serían dependientes de TIF2. Esto sería de suma importancia y abriría un nuevo enfoque en terapias futuras.

6. SEÑALES QUE ACTIVAN A TIF2

Para la activación de NF- κ B en respuesta a TNF se requiere de la actividad quinasa de p38 (380), y este trabajo de tesis demuestra que TIF2 requiere de la misma

actividad quinasa para su correcto funcionamiento en la transactivación de NF- κ B (figura 33). Mediante programas bioinformáticos descubrimos dos serinas de TIF2 que podrían ser blanco de la actividad quinasa de p38: las serinas 895 y 1323. Como se demostró en este trabajo mediante ensayos de actividad reportera con mutantes puntuales para TIF2, la serina 1323 es clave para la actividad de NF- κ B en respuesta al TNF α (figura 33). La falta del sitio fosforilable por p38 promueve una disminución de alrededor de un 20% en la actividad de NF- κ B en comparación con la forma salvaje de TIF2 (figura 33). Si bien esta diferencia es significativa, la disminución no es del 100%, lo que revela que podrían existir otros mecanismos responsables de la transactivación de NF- κ B por TIF2, o bien la presencia de TIF2 salvaje endógeno podría estar compensando la mutación. Sería interesante determinar a través de ensayos reporteros qué ocurriría con la mutación de la segunda serina encontrada, y el efecto de la doble mutante.

Existen varios reportes donde se demuestra que los miembros de la familia p160 son capaces de ser fosforilados. Entre ellos hay trabajos que demuestran que SRC-1 puede ser fosforilado hasta en siete residuos diferentes, y RAC3 en seis (344, 406). Otro aspecto interesante es que para el efecto coactivador de RAC3 sobre el receptor de estrógenos se requiere de los seis sitios fosforilados, mientras que para la transactivación sobre NF- κ B se requiere que cinco de ellos estén fosforilados (344). Estos datos indicarían que los diferentes patrones de fosforilación sobre estas moléculas estarían generando distintos niveles de regulación sobre los diferentes factores de transcripción que estarían modulando. Un efecto similar podría estar ocurriendo sobre la actividad de TIF2 y la fosforilación provocada por p38 en la serina 1323 de TIF2, dado que existen trabajos que demuestran que la serina 736 de TIF2 es capaz de ser fosforilada por la ERK en respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (407). Estas señales que recaen sobre la serina 736 de TIF2 podrían aumentar la actividad de Elk-1, ER, y el PR, mientras que la fosforilación de la serina 1323 sería un patrón requerido para la activación de NF- κ B, y por ende la inducción de expresión de genes sumamente diferentes a los inducidos por receptores nucleares, aunque podría no ser exclusiva de este factor. Sería interesante, entonces, determinar qué ocurre con la cascada de señalización de estos receptores nucleares en presencia de la mutante S1323A de TIF2.

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos con las mutantes puntuales de TIF2 es que la mutante S1323D, la cual contiene la nueva carga negativa proveniente del ácido aspártico, modula la actividad de NF- κ B en respuesta a TNF- α (figura 33B). Esta diferencia de actividad (entre la actividad basal y la desatada en respuesta a TNF) significa que además de la fosforilación en el residuo de serina 1323 debe existir otro mecanismo que sería regulado en respuesta a la citoquina, y que aportaría al aumento de la actividad de NF- κ B. Podría tratarse de una etiqueta ubicada en otros sitios de TIF2 fosforilables por p38 y no detectados por los programas bioinformáticos, o bien por diferentes quinasas activadas en respuesta a TNF- α , como la misma IKK, que según resultados preliminares no mostrados en este trabajo, también sería capaz de fosforilar a TIF2, o bien algún otro mecanismo no determinado. Estos planteos no estarían muy lejos de la realidad, si tomamos en cuenta que existen trabajos que demuestran que RAC3 es modulado por la actividad de la IKK (343), o que RAC3 podría fosforilarse en cuatro sitios diferentes posiblemente involucrados en la transactivación del ER, como lo demuestran los estudios *in vitro* realizados por el grupo de O'Malley (344). Más allá de las fosforilaciones, tampoco puede descartarse la posibilidad de cambios conformacionales post-traduccionales para el correcto funcionamiento de TIF2, ocasionados por la interacción con otras proteínas regulatorias. Como ejemplo puede citarse el trabajo del grupo de Mellgren, quien demuestra que TIF2 está sujeto a ubiquitinación luego de la activación de la vía de PKA (408).

Está reportado que la inhibición de p38 promueve la muerte celular de células derivadas de melanomas tratadas con radiación UV, de células mielomonocíticas tratadas con TNF- α , y de células de cáncer de colon, a través de la inducción de genes antiapoptóticos (409-411). En particular, el trabajo de Nishihara y colaboradores sugiere que p38, a través de MSK1 interactúa con CBP para inducir la expresión de genes antiapoptóticos (411). Dado que TIF2 interactúa con p38, y dado que además está reportado que también interactúa con CBP (379), sería interesante determinar el rol de TIF2 en la protección de apoptosis de células de cáncer de colon.

Por otro lado, y tal como se describió en la parte introductoria de este trabajo, se vio que TIF2 participa en la progresión de leucemias, dado que se lo encontró fusionado a proteínas claves del desarrollo de leucemias mieloides agudas (351-353, 355-357). Dado que p38 es capaz de activar a TIF2 a través de su fosforilación, sería interesante determinar el rol de esta quinasa en este tipo particular de patologías, aunque algunos

trabajos asocian a p38 como proteína antitumoral en ciertas líneas derivadas de leucemias (412-415).

7. LA IMPORTANCIA DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE TIF2

Como se mencionó en la parte introductoria de este trabajo, y como se muestra en la figura 30, la activación de NF- κ B en respuesta a TNF- α termina resultando en la translocación de NF- κ B al núcleo. En este trabajo se mostró que TIF2 es capaz de potenciar la actividad de NF- κ B en respuesta a TNF- α (figura 14 y 20). Sorprendentemente, y acorde con observaciones previas hechas sobre la localización celular de RAC3 (317, 343), los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia demuestran que TIF2 está presente en el citoplasma previo al tratamiento con TNF- α (figura 31C, panel superior), alejado de su sitio funcional de transcripción nuclear. En respuesta a TNF- α TIF2 es capaz de translocar al núcleo donde ejerce su clásico rol de coactivador (figura 31C, panel inferior). El hecho de que TIF2 se encuentre localizado en el citoplasma e interaccione con proteínas citoplasmáticas, sugiere que esta molécula podría desempeñar alguna otra función en citoplasma, además de su clásica acción coactivadora, acorde a lo que se demostró en este trabajo.

En trabajos anteriores propusimos un modelo por el cual receptores nucleares y NF- κ B podrían competir por diversos coactivadores (285, 378). Esta competencia nuclear por determinados coactivadores podría resultar en la activación de otras vías con respuestas biológicas sumamente diferentes o incluso antagónicas, como la del GR y NF- κ B. Dado que TIF2 es capaz de promover la actividad de diversos receptores nucleares y, también la de NF- κ B, la concentración o incluso la localización celular de TIF2 podría llevar a la activación de una u otra (o ambas) vías, con la consecuente inducción de respuestas celulares diversas. La sobreexpresión o una localización anormal de este coactivador podría llevar a una situación potencialmente peligrosa para el organismo, como ejemplifica el trabajo de Anzick y colaboradores para RAC3 (279).

8. ¿QUEDA TODO EN FAMILIA?

El hecho de que los coactivadores de la familia p160 puedan regular en forma positiva la actividad de diferentes receptores nucleares con tanta promiscuidad en células transfectadas, y el hecho de que los defectos fueron observados solamente en un pequeño número de tejidos de animales mutantes para SRC-1, TIF2 o RAC3, sugiere que la familia de SRCs podría tener funciones solapadas. Asimismo el hecho de que ratones que carecen de SRC-1, TIF2 o RAC3 funcionales, apoya la idea de que los miembros de la familia de SRCs podrían compensar parcialmente las funciones de cada uno (315, 316, 318). En general se observa que TIF2 y SRC-1 comparten funciones y se diferenciarían de RAC3, como lo ejemplifica la acción de este coactivador sobre la actividad de RAR (278). La posibilidad de que TIF2 y SRC-1 compartan funciones se hace más notoria si se comparan ratones TIF2^{-/-} y ratones que son TIF2^{-/-}/SRC-1^{+/-}. En estos últimos tipos de ratones, los efectos producidos en células de Sertoli por la falta de TIF2 se hacen aún más notorios que en ratones TIF2^{-/-} (416).

En cuanto a la transcripción dependiente de NF-κB se observó muy recientemente que los tres miembros de la familia p160 presentan un patrón de unión al promotor de IκBα muy definido (y diferente) en respuesta a TNF. En la unión al promotor de IκBα se une en primer lugar TIF2, en segundo lugar se une SCR-1 y la señal de TIF2 unido a este promotor disminuye. Por su lado, RAC3 presenta un patrón de unión oscilatorio (417). Aunque *a priori* estos datos sugieran que los tres miembros de esta familia podrían sustituirse en la transcripción mediada por NF-κB, está demostrado que existe un orden determinado de acción de cada uno de ellos en la activación transcripcional de NF-κB, y además apoyan la idea de la formación de diferentes complejos regulatorios que funcionan en forma orquestada. El hecho de que los tres miembros puedan actuar de manera coordinada en la transactivación, explicaría porqué no existe una deficiencia general en la función de NF-κB en ratones *knock out* para TIF2, RAC3 o SRC-1 (315, 317, 318, 333, 416). Sin embargo, la expresión diferencial y tejido-específica de los SRCs podría ser responsable de funciones específicas para cada tejido. Si bien los SRCs presentan expresión en un amplio rango de tejidos, los niveles de expresión son dependientes del tipo celular y del tejido, como por ejemplo las diferencias en cuanto a la expresión de los SRCs en testículos y epidídimo (418).

Las diferencias temporales y espaciales de expresión de los SRCs podría explicar las discrepancias entre los experimentos de expresión en líneas celulares (donde todos los miembros promueven la transcripción de la mayoría de los receptores nucleares) y los experimentos donde se utilizan ratones *knock out*. Por otro lado, es importante tomar en cuenta el tipo de línea celular, si se expresan (en qué niveles) todos los miembros de la familia p160. En este trabajo de tesis demostramos que la correcta actividad de NF- κ B depende de TIF2, como puede observarse en los resultados obtenidos con el antisentido de TIF2 (figura 15). Cuando estas células son privadas de TIF2 la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a TNF α disminuye aproximadamente a la mitad de la actividad normal (figura 15). Estos datos demuestran que la actividad transcripcional de NF- κ B en respuesta a TNF α no es puenteada por los otros miembros de la familia de TIF2, y que efectivamente TIF2 es necesario para la actividad transcripcional. Según Gao *et al.*, TIF2 funcionaría como un coactivador que mantendría la transcripción basal (417), y luego sería reemplazado por SRC-1 y RAC3. Los resultados de esta tesis apoyan estas observaciones, dado que la actividad transcripcional de NF- κ B si bien disminuye en presencia del antisentido de TIF2, no es bloqueada al 100% (figura 15). Esto significaría que algún otro coactivador estaría suplementando en forma parcial la actividad de TIF2, y bien podría ser alguno de los otros dos miembros de la familia de SRCs.

BIBLIOGRAFÍA

“Now this is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning”.

Sir Winston Churchill (1874-1965)

- 1- **Sen, R and Baltimore, D** (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. (46)5:705-16.
- 2- **Baeuerle, PA and Baltimore, D** (1988) Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*. (53)2:211-7.
- 3- **Baeuerle, PA and Baltimore, D** (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. (242)4878:540-6.
- 4- **Baeuerle, PA and Henkel, T** (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. (12)141-79.
- 5- **Baldwin, AS, Jr.** (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. (14)649-83.
- 6- **Muller, CW, Rey, FA, Sodeoka, M, Verdine, GL and Harrison, SC** (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*. (373)6512:311-7.
- 7- **Kopp, EB and Ghosh, S** (1995) NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*. (58)1-27.
- 8- **May, MJ and Ghosh, S** (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today*. (19)2:80-8.
- 9- **Kunsch, C, Ruben, SM and Rosen, CA** (1992) Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. (12)10:4412-21.
- 10- **Brown, AM, Linhoff, MW, Stein, B, Wright, KL, Baldwin, AS, Jr., Basta, PV and Ting, JP** (1994) Function of NF-kappa B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF-kappa B/Rel subunits. *Mol Cell Biol*. (14)5:2926-35.
- 11- **Hansen, SK, Baeuerle, PA and Blasi, F** (1994) Purification, reconstitution, and I kappa B association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol Cell Biol*. (14)4:2593-603.
- 12- **Hansen, SK, Guerrini, L and Blasi, F** (1994) Differential DNA sequence specificity and regulation of HIV-1 enhancer activity by cRel-RelA transcription factor. *J Biol Chem*. (269)35:22230-7.
- 13- **Kang, SM, Tran, AC, Grilli, M and Lenardo, MJ** (1992) NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science*. (256)5062:1452-6.
- 14- **Plaksin, D, Baeuerle, PA and Eisenbach, L** (1993) KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med*. (177)6:1651-62.
- 15- **Ghosh, G, van Duyn, G, Ghosh, S and Sigler, PB** (1995) Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature*. (373)6512:303-10.
- 16- **Baltimore, D and Beg, AA** (1995) DNA-binding proteins. A butterfly flutters by. *Nature*. (373)6512:287-8.
- 17- **Ghosh, S, May, MJ and Kopp, EB** (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. (16)225-60.
- 18- **Davis, N, Ghosh, S, Simmons, DL, Tempst, P, Liou, HC, Baltimore, D and Bose, HR, Jr.** (1991) Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science*. (253)5025:1268-71.
- 19- **Haskill, S, Beg, AA, Tompkins, SM, Morris, JS, Yurochko, AD, Sampson-Johannes, A, Mondal, K, Ralph, P and Baldwin, AS, Jr.** (1991) Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell*. (65)7:1281-9.
- 20- **Jaffray, E, Wood, KM and Hay, RT** (1995) Domain organization of I kappa B alpha and sites of interaction with NF-kappa B p65. *Mol Cell Biol*. (15)4:2166-72.
- 21- **Chen, Z, Hagler, J, Palombella, VJ, Melandri, F, Scherer, D, Ballard, D and Maniatis, T** (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*. (9)13:1586-97.
- 22- **Alkalay, I, Yaron, A, Hatzubai, A, Orián, A, Ciechanover, A and Ben-Neriah, Y** (1995) Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (92)23:10599-603.
- 23- **Perkins, ND** (1997) Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol*. (29)12:1433-48.
- 24- **Brown, K, Park, S, Kanno, T, Franzoso, G and Siebenlist, U** (1993) Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (90)6:2532-6.
- 25- **de Martin, R, Vanhove, B, Cheng, Q, Hofer, E, Cszimadia, V, Winkler, H and Bach, FH** (1993) Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B. *Embo J*. (12)7:2773-9.
- 26- **Arenzana-Seisdedos, F, Thompson, J, Rodriguez, MS, Bachelierie, F, Thomas, D and Hay, RT** (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. (15)5:2689-96.
- 27- **Arenzana-Seisdedos, F, Turpin, P, Rodriguez, M, Thomas, D, Hay, RT, Virelizier, JL and Dargemont, C** (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*. (110 (Pt 3))369-78.
- 28- **Fornerod, M, Ohno, M, Yoshida, M and Mattaj, IW** (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. (90)6:1051-60.
- 29- **Fukuda, M, Asano, S, Nakamura, T, Adachi, M, Yoshida, M, Yanagida, M and Nishida, E** (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*. (390)6657:308-11.
- 30- **Ossareh-Nazari, B, Bachelierie, F and Dargemont, C** (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*. (278)5335:141-4.
- 31- **Stade, K, Ford, CS, Guthrie, C and Weis, K** (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*. (90)6:1041-50.
- 32- **Sachdev, S, Hoffmann, A and Hannink, M** (1998) Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol*. (18)5:2524-34.
- 33- **Turpin, P, Hay, RT and Dargemont, C** (1999) Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway. *J Biol Chem*. (274)10:6804-12.
- 34- **Malek, S, Chen, Y, Huxford, T and Ghosh, G** (2001) IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*. (276)48:45225-35.
- 35- **Huang, TT, Kudo, N, Yoshida, M and Miyamoto, S** (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (97)3:1014-9.
- 36- **Johnson, C, Van Antwerp, D and Hope, TJ** (1999) An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J*. (18)23:6682-93.
- 37- **Tam, WF, Lee, LH, Davis, L and Sen, R** (2000) Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol*. (20)6:2269-84.

- 38- **Rodriguez, MS, Thompson, J, Hay, RT and Dargemont, C** (1999) Nuclear retention of I κ B protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor κ B transcriptional activation. *J Biol Chem.* (274)13:9108-15.
- 39- **DiDonato, JA, Hayakawa, M, Rothwarf, DM, Zandi, E and Karin, M** (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature.* (388)6642:548-54.
- 40- **Mercurio, F, Zhu, H, Murray, BW, Shevchenko, A, Bennett, BL, Li, J, Young, DB, Barbosa, M, Mann, M, Manning, A and Rao, A** (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science.* (278)5339:860-6.
- 41- **Karin, M and Ben-Neriah, Y** (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* (18)621-63.
- 42- **Ghosh, S and Karin, M** (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell.* (109 Suppl)S81-96.
- 43- **Zandi, E, Rothwarf, DM, Delhase, M, Hayakawa, M and Karin, M** (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell.* (91)2:243-52.
- 44- **Csermely, P, Schnaider, T, Soti, C, Prohászka, Z and Nardai, G** (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* (79)2:129-68.
- 45- **Pratt, WB, Silverstein, AM and Galigniana, MD** (1999) A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal.* (11)12:839-51.
- 46- **Chen, G, Cao, P and Goeddel, DV** (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell.* (9)2:401-10.
- 47- **Baeuerle, PA and Baichwal, VR** (1997) NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol.* (65)111-37.
- 48- **Imbert, V, Rupec, RA, Livolsi, A, Pahl, HL, Traenckner, EB, Mueller-Dieckmann, C, Farahifar, D, Rossi, B, Auberger, P, Baeuerle, PA and Peyron, JF** (1996) Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell.* (86)5:787-98.
- 49- **Bender, K, Gottlicher, M, Whiteside, S, Rahmsdorf, HJ and Herrlich, P** (1998) Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *Embo J.* (17)17:5170-81.
- 50- **Kishimoto, T, Taga, T and Akira, S** (1994) Cytokine signal transduction. *Cell.* (76)2:253-62.
- 51- **Kaltschmidt, B, Uherek, M, Volk, B, Baeuerle, PA and Kaltschmidt, C** (1997) Transcription factor NF- κ B is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (94)6:2642-7.
- 52- **Gilmore, TD, Koedood, M, Piffat, KA and White, DW** (1996) Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene.* (13)7:1367-78.
- 53- **Luque, I and Gelinas, C** (1997) Rel/NF- κ B and I κ B factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* (8)2:103-11.
- 54- **Rayet, B and Gelinas, C** (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* (18)49:6938-47.
- 55- **McKeithan, TW, Takimoto, GS, Ohno, H, Bjorling, VS, Morgan, R, Hecht, BK, Dube, I, Sandberg, AA and Rowley, JD** (1997) BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer.* (20)1:64-72.
- 56- **Nakshatri, H, Bhat-Nakshatri, P, Martin, DA, Goulet, RJ, Jr. and Sledge, GW, Jr.** (1997) Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol.* (17)7:3629-39.
- 57- **Sovak, MA, Bellas, RE, Kim, DW, Zanieski, GJ, Rogers, AE, Traish, AM and Sonenshein, GE** (1997) Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest.* (100)12:2952-60.
- 58- **Mukhopadhyay, T, Roth, JA and Maxwell, SA** (1995) Altered expression of the p50 subunit of the NF- κ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene.* (11)5:999-1003.
- 59- **Bargou, RC, Leng, C, Krappmann, D, Emmerich, F, Mapara, MY, Bommert, K, Royer, HD, Scheiderei, C and Dorken, B** (1996) High-level nuclear NF- κ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood.* (87)10:4340-7.
- 60- **Devalaraja, MN, Wang, DZ, Ballard, DW and Richmond, A** (1999) Elevated constitutive I κ B kinase activity and I κ B- α phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO- α transcription. *Cancer Res.* (59)6:1372-7.
- 61- **Dejardin, E, Derogowski, V, Chapelier, M, Jacobs, N, Gielen, J, Merville, MP and Bours, V** (1999) Regulation of NF- κ B activity by I κ B-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene.* (18)16:2567-77.
- 62- **Sumitomo, M, Tachibana, M, Ozu, C, Asakura, H, Murai, M, Hayakawa, M, Nakamura, H, Takayanagi, A and Shimizu, N** (1999) Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated I κ B α overexpression. *Hum Gene Ther.* (10)1:37-47.
- 63- **Miwa, M, Kushida, S, Maeda, N, Fang, J, Kawamura, T, Kameyama, T and Uchida, K** (1997) Pathogenesis and prevention of HTLV-1-associated diseases. *Leukemia.* (11 Suppl 3)65-6.
- 64- **Berger, C, Brousset, P, McQuain, C and Knecht, H** (1997) Deletion variants within the NF- κ B activation domain of the LMP1 oncogene in acquired immunodeficiency syndrome-related large cell lymphomas, in prelymphomas and atypical lymphoproliferations. *Leuk Lymphoma.* (26)3-4:239-50.
- 65- **Nasti, G, Vaccher, E, Errante, D and Tirelli, U** (1997) Malignant tumors and AIDS. *Biomed Pharmacother.* (51)6-7:243-51.
- 66- **Biswas, DK, Cruz, AP, Gansberger, E and Pardee, AB** (2000) Epidermal growth factor-induced nuclear factor κ B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (97)15:8542-7.
- 67- **Biswas, DK, Dai, SC, Cruz, A, Weiser, B, Graner, E and Pardee, AB** (2001) The nuclear factor κ B (NF- κ B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (98)18:10386-91.
- 68- **Pratt, PF, Bokemeyer, D, Foschi, M, Sorokin, A and Dunn, MJ** (2003) Alterations in subcellular localization of p38 MAPK potentiates endothelin-stimulated COX-2 expression in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem.* (278)51:51928-36.
- 69- **Cogswell, PC, Guttridge, DC, Funkhouser, WK and Baldwin, AS, Jr.** (2000) Selective activation of NF- κ B subunits in human breast cancer: potential roles for NF- κ B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene.* (19)9:1123-31.
- 70- **Pahl, HL** (1999) Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* (18)49:6853-66.
- 71- **Guttridge, DC, Albanese, C, Reuther, JY, Pestell, RG and Baldwin, AS, Jr.** (1999) NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* (19)8:5785-99.
- 72- **Pikarsky, E, Porat, RM, Stein, I, Abramovitch, R, Amit, S, Kasem, S, Gutkovich-Pyest, E, Urieli-Shoval, S, Galun, E and Ben-Neriah, Y** (2004) NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* (431)7007:461-6.
- 73- **Tracey, KJ and Cerami, A** (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol.* (9)317-43.
- 74- **Fiers, W** (1991) Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* (285)2:199-212.

- 75- Lewit-Bentley, A, Fourme, R, Kahn, R, Prange, T, Vachette, P, Tavernier, J, Hauquier, G and Niers, W (1988) Structure of tumour necrosis factor by X-ray solution scattering and preliminary studies by single crystal X-ray diffraction. *J Mol Biol.* (199)2:389-92.
- 76- Simms, HH and D'Amico, R (1997) Studies on polymorphonuclear leukocyte bactericidal function: the role of exogenous cytokines. *Shock.* (7)2:84-9.
- 77- Dinarello, CA, Cannon, JG, Wolff, SM, Bernheim, HA, Beutler, B, Cerami, A, Figari, IS, Palladino, MA, Jr. and O'Connor, JV (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.* (163)6:1433-50.
- 78- Collins, T, Lapiere, LA, Fiers, W, Strominger, JL and Pober, JS (1986) Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (83)2:446-50.
- 79- Chang, RJ and Lee, SH (1986) Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. *J Immunol.* (137)9:2853-6.
- 80- Mackay, CR and Imhof, BA (1993) Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today.* (14)3:99-102.
- 81- Wride, MA and Sanders, EJ (1995) Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol (Berl).* (191)1:1-10.
- 82- Liew, FY, Li, Y and Millott, S (1990) Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* (145)12:4306-10.
- 83- Wirth, JJ and Kierszenbaum, F (1988) Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *J Immunol.* (141)1:286-8.
- 84- Vandenabeele, P, Declercq, W, Beyaert, R and Fiers, W (1995) Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.* (5)10:392-9.
- 85- Tartaglia, LA and Goeddel, DV (1992) Two TNF receptors. *Immunol Today.* (13)5:151-3.
- 86- Brenner, DA, O'Hara, M, Angel, P, Chojkier, M and Karin, M (1989) Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* (337)6208:661-3.
- 87- Osborn, L, Kunkel, S and Nabel, GJ (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (86)7:2336-40.
- 88- Schutze, S, Potthoff, K, Machleidt, T, Berkovic, D, Wiegmann, K and Kronke, M (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell.* (71)5:765-76.
- 89- Hsu, H, Shu, HB, Pan, MG and Goeddel, DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* (84)2:299-308.
- 90- Hsu, H, Xiong, J and Goeddel, DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* (81)4:495-504.
- 91- Rothe, M, Wong, SC, Henzel, WJ and Goeddel, DV (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* (78)4:681-92.
- 92- Carswell, EA, Old, LJ, Kassel, RL, Green, S, Fiore, N and Williamson, B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (72)9:3666-70.
- 93- Reid, T, Louie, P and Heller, RA (1994) Mechanisms of tumor necrosis factor cytotoxicity and the cytotoxic signals transduced by the p75-tumor necrosis factor receptor. *Circ Shock.* (44)2:84-90.
- 94- Liu, ZG, Hsu, H, Goeddel, DV and Karin, M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* (87)3:565-76.
- 95- Natoli, G, Costanzo, A, Guido, F, Moretti, F, Bernardo, A, Burgio, VL, Agresti, C and Levrero, M (1998) Nuclear factor kappaB-independent cytoprotective pathways originating at tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem.* (273)47:31262-72.
- 96- Beg, AA and Baltimore, D (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science.* (274)5288:782-4.
- 97- Chu, ZL, McKinsey, TA, Liu, L, Gentry, JJ, Malim, MH and Ballard, DW (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (94)19:10057-62.
- 98- Wang, CY, Mayo, MW and Baldwin, AS, Jr. (1996) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* (274)5288:784-7.
- 99- Costas, MA, Muller Igaz, L, Holsboer, F and Arzt, E (2000) Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* (1499)1-2:122-129.
- 100- Wang, CY, Mayo, MW, Korneluk, RG, Goeddel, DV and Baldwin, AS, Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* (281)5383:1680-3.
- 101- Van Antwerp, DJ, Martin, SJ, Kafri, T, Green, DR and Verma, IM (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science.* (274)5288:787-9.
- 102- Larrick, JW and Wright, SC (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *Faseb J.* (4)14:3215-23.
- 103- Franco, DL, Nojek, IM, Molinero, L, Coso, OA and Costas, MA (2002) Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* (9)10:1090-8.
- 104- Denecker, G, Vercammen, D, Steemans, M, Vanden Berghe, T, Brouckaert, G, Van Loo, G, Zhivotovsky, B, Fiers, W, Grooten, J, Declercq, W and Vandenabeele, P (2001) Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ.* (8)8:829-40.
- 105- Vercammen, D, Beyaert, R, Denecker, G, Goossens, V, Van Loo, G, Declercq, W, Grooten, J, Fiers, W and Vandenabeele, P (1998) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* (187)9:1477-85.
- 106- Vercammen, D, Brouckaert, G, Denecker, G, Van de Craen, M, Declercq, W, Fiers, W and Vandenabeele, P (1998) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med.* (188)5:919-30.
- 107- Ventura, JJ, Cogswell, P, Flavell, RA, Baldwin, AS, Jr. and Davis, RJ (2004) JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev.* (18)23:2905-15.
- 108- Vanden Berghe, T, Kalai, M, van Loo, G, Declercq, W and Vandenabeele, P (2003) Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J Biol Chem.* (278)8:5622-9.
- 109- Reed, JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* (157)5:1415-30.
- 110- Deveraux, QL and Reed, JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* (13)3:239-52.
- 111- Fesik, SW (2000) Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell.* (103)2:273-82.
- 112- Kasof, GM and Gomes, BC (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem.* (276)5:3238-46.

- 113- **Vucic, D, Stennicke, HR, Pisabarro, MT, Salvesen, GS and Dixit, VM** (2000) ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol.* (10)21:1359-66.
- 114- **Hengartner, MO** (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* (407)6805:770-6.
- 115- **Salvesen, GS and Dixit, VM** (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* (91)4:443-6.
- 116- **Wallach, D, Varfolomeev, EE, Malinin, NL, Goltsev, YV, Kovalenko, AV and Boldin, MP** (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* (17)331-67.
- 117- **Yuan, J** (1997) Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol.* (9)2:247-51.
- 118- **Green, DR and Reed, JC** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* (281)5381:1309-12.
- 119- **Antonsson, B and Martinou, JC** (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* (256)1:50-7.
- 120- **Zou, H, Henzel, WJ, Liu, X, Lutschg, A and Wang, X** (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* (90)3:405-13.
- 121- **Rodriguez, A, Oliver, H, Zou, H, Chen, P, Wang, X and Abrams, JM** (1999) Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *Nat Cell Biol.* (1)5:272-9.
- 122- **Saleh, A, Srinivasula, SM, Acharya, S, Fishel, R and Alnemri, ES** (1999) Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* (274)25:17941-5.
- 123- **Cande, C, Ceconi, F, Dessen, P and Kroemer, G** (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci.* (115)Pt 24:4727-34.
- 124- **Reed, JC** (1997) Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell.* (91)5:559-62.
- 125- **Cande, C, Cohen, I, Daugas, E, Ravagnan, L, Larochette, N, Zamzami, N and Kroemer, G** (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie.* (84)2-3:215-22.
- 126- **Lee, H, Arsur, M, Wu, M, Duyao, M, Buckler, AJ and Sonenshein, GE** (1995) Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line. *J Exp Med.* (181)3:1169-77.
- 127- **Abbadie, C, Kabrun, N, Bouali, F, Smardova, J, Stehelin, D, Vandenbunder, B and Enrietto, PJ** (1993) High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell.* (75)5:899-912.
- 128- **Bash, J, Zong, WX and Gelin, C** (1997) c-Rel arrests the proliferation of HeLa cells and affects critical regulators of the G1/S-phase transition. *Mol Cell Biol.* (17)11:6526-36.
- 129- **Kitajima, I, Soejima, Y, Takasaki, I, Beppu, H, Tokioka, T and Maruyama, I** (1996) Ceramide-induced nuclear translocation of NF-kappa B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF-alpha in murine clonal osteoblasts. *Bone.* (19)3:263-70.
- 130- **Lin, KI, Lee, SH, Narayanan, R, Baraban, JM, Hardwick, JM and Ratan, RR** (1995) Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Cell Biol.* (131)5:1149-61.
- 131- **Li, Q, Estepa, G, Memet, S, Israel, A and Verma, IM** (2000) Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* (14)14:1729-33.
- 132- **Grossmann, M, Metcalf, D, Merryfull, J, Beg, A, Baltimore, D and Gerondakis, S** (1999) The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (96)21:11848-53.
- 133- **Jeremias, I, Kupatt, C, Baumann, B, Herr, I, Wirth, T and Debatin, KM** (1998) Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood.* (91)12:4624-31.
- 134- **Wu, M, Lee, H, Bellas, RE, Schauer, SL, Arsur, M, Katz, D, FitzGerald, MJ, Rothstein, TL, Sherr, DH and Sonenshein, GE** (1996) Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *Embo J.* (15)17:4682-90.
- 135- **Grigoriadis, G, Zhan, Y, Grumont, RJ, Metcalf, D, Handman, E, Cheers, C and Gerondakis, S** (1996) The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *Embo J.* (15)24:7099-107.
- 136- **Kucharczak, J, Simmons, MJ, Fan, Y and Gelin, C** (2003) To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* (22)56:8961-82.
- 137- **Barkett, M and Gilmore, TD** (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* (18)49:6910-24.
- 138- **Lanoix, J, Lacoste, J, Pepin, N, Rice, N and Hiscott, J** (1994) Overproduction of NFkB2 (I κ B) and c-Rel: a mechanism for HTLV-I Tax-mediated trans-activation via the NF-kappa B signalling pathway. *Oncogene.* (9)3:841-52.
- 139- **Thakur, S, Lin, HC, Tseng, WT, Kumar, S, Bravo, R, Foss, F, Gelin, C and Rabson, AB** (1994) Rearrangement and altered expression of the NFkB-2 gene in human cutaneous T-lymphoma cells. *Oncogene.* (9)8:2335-44.
- 140- **Carrasco, D, Rizzo, CA, Dorfman, K and Bravo, R** (1996) The v-rel oncogene promotes malignant T-cell leukemia/lymphoma in transgenic mice. *Embo J.* (15)14:3640-50.
- 141- **Perkins, ND** (2000) The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci.* (25)9:434-40.
- 142- **Beg, AA, Sha, WC, Bronson, RT, Ghosh, S and Baltimore, D** (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature.* (376)6536:167-70.
- 143- **Costas, M, Trapp, T, Pereda, MP, Sauer, J, Rupprecht, R, Nahmod, VE, Reul, JM, Holsboer, F and Arzt, E** (1996) Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis. *J Clin Invest.* (98)6:1409-16.
- 144- **Wu, MX, Ao, Z, Prasad, KV, Wu, R and Schlossman, SF** (1998) IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science.* (281)5379:998-1001.
- 145- **Spender, LC, Cannell, EJ, Hollyoake, M, Wensing, B, Gawn, JM, Brimmell, M, Packham, G and Farrell, PJ** (1999) Control of cell cycle entry and apoptosis in B lymphocytes infected by Epstein-Barr virus. *J Virol.* (73)6:4678-88.
- 146- **Baldwin, AS** (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* (107)3:241-6.
- 147- **Bentires-Alj, M, Dejardin, E, Viatour, P, Van Lint, C, Froesch, B, Reed, JC, Merville, MP and Bours, V** (2001) Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene.* (20)22:2805-13.
- 148- **Ravi, R, Bedi, GC, Engstrom, LW, Zeng, Q, Mookerjee, B, Gelin, C, Fuchs, EJ and Bedi, A** (2001) Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol.* (3)4:409-16.
- 149- **Denk, A, Wirth, T and Baumann, B** (2000) NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev.* (11)4:303-20.
- 150- **Ryan, KM, Ernst, MK, Rice, NR and Vousden, KH** (2000) Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature.* (404)6780:892-7.
- 151- **Rocha, S, Campbell, KJ and Perkins, ND** (2003) p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Mol Cell.* (12)1:15-25.

- 152- **Bernard, D, Monte, D, Vandenbunder, B and Abbadie, C** (2002) The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. *Oncogene*. (21)28:4392-402.
- 153- **Widmann, C, Gibson, S, Jarpe, MB and Johnson, GL** (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*. (79)1:143-80.
- 154- **Chang, L and Karin, M** (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. (410)6824:37-40.
- 155- **Xia, Z, Dickens, M, Raingeaud, J, Davis, RJ and Greenberg, ME** (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. (270)5240:1326-31.
- 156- **Galcheva-Gargova, Z, Derijard, B, Wu, IH and Davis, RJ** (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*. (265)5173:806-8.
- 157- **Roux, PP and Blenis, J** (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. (68)2:320-44.
- 158- **Lee, JC, Laydon, JT, McDonnell, PC, Gallagher, TF, Kumar, S, Green, D, McNulty, D, Blumenthal, MJ, Heys, JR, Landvatter, SW and et al.** (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. (372)6508:739-46.
- 159- **Enslin, H, Raingeaud, J and Davis, RJ** (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*. (273)3:1741-8.
- 160- **Eckert, RL, Efimova, T, Balasubramanian, S, Crish, JF, Bone, F and Dashti, S** (2003) p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J Invest Dermatol*. (120)5:823-8.
- 161- **Zhang, F, Strand, A, Robbins, D, Cobb, MH and Goldsmith, EJ** (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature*. (367)6465:704-11.
- 162- **Wilson, KP, Fitzgibbon, MJ, Caron, PR, Griffith, JP, Chen, W, McCaffrey, PG, Chambers, SP and Su, MS** (1996) Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. (271)44:27696-700.
- 163- **Enslin, H, Brancho, DM and Davis, RJ** (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo J*. (19)6:1301-11.
- 164- **Barancik, M, Htun, P and Schaper, W** (1999) Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. (34)2:182-90.
- 165- **Lee, T, Kim, SJ and Sumpio, BE** (2003) Role of PP2A in the regulation of p38 MAPK activation in bovine aortic endothelial cells exposed to cyclic strain. *J Cell Physiol*. (194)3:349-55.
- 166- **Levy-Nissenbaum, O, Sagi-Assif, O, Raanani, P, Avigdor, A, Ben-Bassat, I and Witz, IP** (2003) Overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Cancer Lett*. (199)2:185-92.
- 167- **Raingeaud, J, Gupta, S, Rogers, JS, Dickens, M, Han, J, Ulevitch, RJ and Davis, RJ** (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. (270)13:7420-6.
- 168- **Ben-Levy, R, Hooper, S, Wilson, R, Paterson, HF and Marshall, CJ** (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*. (8)19:1049-57.
- 169- **Ono, K and Han, J** (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. (12)1:1-13.
- 170- **Ridley, SH, Sarsfield, SJ, Lee, JC, Bigg, HF, Cawston, TE, Taylor, DJ, DeWitt, DL and Saklatvala, J** (1997) Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J Immunol*. (158)7:3165-73.
- 171- **Ridley, SH, Dean, JL, Sarsfield, SJ, Brook, M, Clark, AR and Saklatvala, J** (1998) A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA. *FEBS Lett*. (439)1-2:75-80.
- 172- **Wang, SW, Pawlowski, J, Wathen, ST, Kinney, SD, Lichenstein, HS and Manthey, CL** (1999) Cytokine mRNA decay is accelerated by an inhibitor of p38-mitogen-activated protein kinase. *Inflamm Res*. (48)10:533-8.
- 173- **Rutault, K, Hazzalin, CA and Mahadevan, LC** (2001) Combinations of ERK and p38 MAPK inhibitors ablate tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA induction. Evidence for selective destabilization of TNF-alpha transcripts. *J Biol Chem*. (276)9:6666-74.
- 174- **Tebo, J, Der, S, Frevel, M, Khabar, KS, Williams, BR and Hamilton, TA** (2003) Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements. *J Biol Chem*. (278)14:12085-93.
- 175- **Pages, G, Berra, E, Milanini, J, Levy, AP and Pouyssegur, J** (2000) Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem*. (275)34:26484-91.
- 176- **Reunanen, N, Li, SP, Ahonen, M, Foschi, M, Han, J and Kahari, VM** (2002) Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J Biol Chem*. (277)35:32360-8.
- 177- **Dean, JL, Sully, G, Clark, AR and Saklatvala, J** (2004) The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal*. (16)10:1113-21.
- 178- **Kyriakis, JM and Avruch, J** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. (81)2:807-69.
- 179- **Maher, P** (1999) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J Biol Chem*. (274)25:17491-8.
- 180- **Rausch, O and Marshall, CJ** (1999) Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. *J Biol Chem*. (274)7:4096-105.
- 181- **Nagata, Y, Takahashi, N, Davis, RJ and Todokoro, K** (1998) Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*. (92)6:1859-69.
- 182- **Lavoie, JN, L'Allemain, G, Brunet, A, Muller, R and Pouyssegur, J** (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*. (271)34:20608-16.
- 183- **Molnar, A, Theodoras, AM, Zon, LI and Kyriakis, JM** (1997) Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J Biol Chem*. (272)20:13229-35.
- 184- **Le-Niculescu, H, Bonfoco, E, Kasuya, Y, Claret, FX, Green, DR and Karin, M** (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol*. (19)1:751-63.
- 185- **Zechner, D, Craig, R, Hanford, DS, McDonough, PM, Sabbadini, RA and Glembotski, CC** (1998) MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem*. (273)14:8232-9.
- 186- **Engelman, JA, Lisanti, MP and Scherer, PE** (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*. (273)48:32111-20.

- 187- **Engelman, JA, Berg, AH, Lewis, RY, Lin, A, Lisanti, MP and Scherer, PE** (1999) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem.* (274)50:35630-8.
- 188- **Wang, XZ and Ron, D** (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science.* (272)5266:1347-9.
- 189- **Cuenda, A and Cohen, P** (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem.* (274)7:4341-6.
- 190- **Galbiati, F, Volonte, D, Engelman, JA, Scherer, PE and Lisanti, MP** (1999) Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J Biol Chem.* (274)42:30315-21.
- 191- **Zetser, A, Gredinger, E and Bengal, E** (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem.* (274)8:5193-200.
- 192- **Morooka, T and Nishida, E** (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem.* (273)38:24285-8.
- 193- **Nakamura, K, Shirai, T, Morishita, S, Uchida, S, Saeki-Miura, K and Makishima, F** (1999) p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res.* (250)2:351-63.
- 194- **McKinsey, TA and Olson, EN** (1999) Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev.* (9)3:267-74.
- 195- **Kolodziejczyk, SM, Wang, L, Balazsi, K, DeRepentigny, Y, Kothary, R and Megeney, LA** (1999) MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol.* (9)20:1203-6.
- 196- **Lee, JC and Young, PR** (1996) Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol.* (59)2:152-7.
- 197- **Carter, AB, Knudtson, KL, Monick, MM and Hunninghake, GW** (1999) The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem.* (274)43:30858-63.
- 198- **Shapiro, L and Dinarello, CA** (1995) Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (92)26:12230-4.
- 199- **Craig, R, Larkin, A, Mingo, AM, Thuerauf, DJ, Andrews, C, McDonough, PM and Glembotski, CC** (2000) p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem.* (275)31:23814-24.
- 200- **Read, MA, Whitley, MZ, Gupta, S, Pierce, JW, Best, J, Davis, RJ and Collins, T** (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* (272)5:2753-61.
- 201- **Vermeulen, L, De Wilde, G, Van Damme, P, Vanden Berghe, W and Haegeman, G** (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J.* (22)6:1313-24.
- 202- **Struhl, K** (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell.* (98)1:1-4.
- 203- **Grunstein, M** (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* (389)6649:349-52.
- 204- **Pazin, MJ and Kadonaga, JT** (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell.* (89)3:325-8.
- 205- **Brown, CE, Lechner, T, Howe, L and Workman, JL** (2000) The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci.* (25)1:15-9.
- 206- **Ito, M, Yuan, CX, Okano, HJ, Darnell, RB and Roeder, RG** (2000) Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell.* (5)4:683-93.
- 207- **Zhu, Y, Qi, C, Jia, Y, Nye, JS, Rao, MS and Reddy, JK** (2000) Deletion of PBP/PPARBP, the gene for nuclear receptor coactivator peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein, results in embryonic lethality. *J Biol Chem.* (275)20:14779-82.
- 208- **Zhu, Y, Qi, C, Jain, S, Le Beau, MM, Espinosa, R, 3rd, Atkins, GB, Lazar, MA, Yeldandi, AV, Rao, MS and Reddy, JK** (1999) Amplification and overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor binding protein (PBP/PPARBP) gene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (96)19:10848-53.
- 209- **Abraham, S and Solomon, WB** (2000) A novel glutamine-rich putative transcriptional adaptor protein (TIG-1), preferentially expressed in placental and bone-marrow tissues. *Gene.* (255)2:389-400.
- 210- **Sawadogo, M and Roeder, RG** (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell.* (43)1:165-75.
- 211- **Horikoshi, M, Hai, T, Lin, YS, Green, MR and Roeder, RG** (1988) Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell.* (54)7:1033-42.
- 212- **Nakajima, N, Horikoshi, M and Roeder, RG** (1988) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol.* (8)10:4028-40.
- 213- **Horikoshi, M, Wang, CK, Fujii, H, Cromlish, JA, Weil, PA and Roeder, RG** (1989) Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. *Nature.* (341)6240:299-303.
- 214- **Hahn, S, Buratowski, S, Sharp, PA and Guarente, L** (1989) Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions. *Cell.* (58)6:1173-81.
- 215- **Pugh, BF and Tjian, R** (1990) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell.* (61)7:1187-97.
- 216- **Dynlacht, BD, Hoey, T and Tjian, R** (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell.* (66)3:563-76.
- 217- **Albright, SR and Tjian, R** (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene.* (242)1-2:1-13.
- 218- **Hoey, T, Weinzierl, RO, Gill, G, Chen, JL, Dynlacht, BD and Tjian, R** (1993) Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell.* (72)2:247-60.
- 219- **Goodrich, JA, Hoey, T, Thut, CJ, Admon, A and Tjian, R** (1993) Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell.* (75)3:519-30.
- 220- **Gill, G, Pascal, E, Tseng, ZH and Tjian, R** (1994) A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (91)1:192-6.
- 221- **Chen, JL, Attardi, LD, Verrijzer, CP, Yokomori, K and Tjian, R** (1994) Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell.* (79)1:93-105.
- 222- **Thut, CJ, Chen, JL, Klemm, R and Tjian, R** (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science.* (267)5194:100-4.
- 223- **Lu, H and Levine, AJ** (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (92)11:5154-8.

- 224- **Smale, ST and Baltimore, D** (1989) The "initiator" as a transcription control element. *Cell*. (57)1:103-13.
- 225- **Smale, ST, Schmidt, MC, Berk, AJ and Baltimore, D** (1990) Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (87)12:4509-13.
- 226- **Verrijzer, CP, Chen, JL, Yokomori, K and Tjian, R** (1995) Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell*. (81)7:1115-25.
- 227- **Hansen, SK and Tjian, R** (1995) TAFs and TFIIA mediate differential utilization of the tandem Adh promoters. *Cell*. (82)4:565-75.
- 228- **Burke, TW and Kadonaga, JT** (1996) Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*. (10)6:711-24.
- 229- **Dikstein, R, Ruppert, S and Tjian, R** (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell*. (84)5:781-90.
- 230- **Mizzen, CA, Yang, XJ, Kokubo, T, Brownell, JE, Bannister, AJ, Owen-Hughes, T, Workman, J, Wang, L, Berger, SL, Kouzarides, T, Nakatani, Y and Allis, CD** (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. (87)7:1261-70.
- 231- **Imhof, A, Yang, XJ, Ogryzko, VV, Nakatani, Y, Wolffe, AP and Ge, H** (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol*. (7)9:689-92.
- 232- **Orphanides, G, Lagrange, T and Reinberg, D** (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*. (10)21:2657-83.
- 233- **Roeder, RG** (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*. (21)9:327-35.
- 234- **Naar, AM, Lemon, BD and Tjian, R** (2001) Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*. (70)475-501.
- 235- **Bjorklund, S and Kim, YJ** (1996) Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*. (21)9:335-7.
- 236- **Malik, S and Roeder, RG** (2000) Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci*. (25)6:277-83.
- 237- **Fondell, JD, Ge, H and Roeder, RG** (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (93)16:8329-33.
- 238- **Rachez, C, Lemon, BD, Suldan, Z, Bromleigh, V, Gamble, M, Naar, AM, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P and Freedman, LP** (1999) Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature*. (398)6730:824-8.
- 239- **Taatjes, DJ, Naar, AM, Andel, F, 3rd, Nogales, E and Tjian, R** (2002) Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science*. (295)5557:1058-62.
- 240- **Rosenfeld, MG and Glass, CK** (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*. (276)40:36865-8.
- 241- **McKenna, NJ, Lanz, RB and O'Malley, BW** (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. (20)3:321-44.
- 242- **Glass, CK, Rose, DW and Rosenfeld, MG** (1997) Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol*. (9)2:222-32.
- 243- **Ito, M, Yuan, CX, Malik, S, Gu, W, Fondell, JD, Yamamura, S, Fu, ZY, Zhang, X, Qin, J and Roeder, RG** (1999) Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*. (3)3:361-70.
- 244- **Freedman, LP** (1999) Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*. (97)1:5-8.
- 245- **Yoshinaga, SK, Peterson, CL, Herskowitz, I and Yamamoto, KR** (1992) Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science*. (258)5088:1598-604.
- 246- **Goo, YH, Sohn, YC, Kim, DH, Kim, SW, Kang, MJ, Jung, DJ, Kwak, E, Barlev, NA, Berger, SL, Chow, VT, Roeder, RG, Azorsa, DO, Meltzer, PS, Suh, PG, Song, EJ, Lee, KJ, Lee, YC and Lee, JW** (2003) Activating signal cointegrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. *Mol Cell Biol*. (23)1:140-9.
- 247- **McKenna, NJ and O'Malley, BW** (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. (108)4:465-74.
- 248- **Xu, J and O'Malley, BW** (2002) Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord*. (3)3:185-92.
- 249- **Giles, RH, Petrij, F, Dauwerse, HG, den Hollander, AI, Lushnikova, T, van Ommen, GJ, Goodman, RH, Deaven, LL, Doggett, NA, Peters, DJ and Breuning, MH** (1997) Construction of a 1.2-Mb contig surrounding, and molecular analysis of, the human CREB-binding protein (CBP/CREBBP) gene on chromosome 16p13.3. *Genomics*. (42)1:96-114.
- 250- **Arany, Z, Newsome, D, Oldread, E, Livingston, DM and Eckner, R** (1995) A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature*. (374)6517:81-4.
- 251- **Janknecht, R and Hunter, T** (1996) Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr Biol*. (6)8:951-4.
- 252- **Chrivia, JC, Kwok, RP, Lamb, N, Hagiwara, M, Montminy, MR and Goodman, RH** (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*. (365)6449:855-9.
- 253- **Xu, L, Glass, CK and Rosenfeld, MG** (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*. (9)2:140-7.
- 254- **Carey, M** (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*. (92)1:5-8.
- 255- **Kim, HJ, Kim, JH and Lee, JW** (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations. *J Biol Chem*. (273)44:28564-7.
- 256- **Bannister, AJ and Kouzarides, T** (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*. (384)6610:641-3.
- 257- **Ogryzko, VV, Schiltz, RL, Russanova, V, Howard, BH and Nakatani, Y** (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. (87)5:953-9.
- 258- **Gu, W and Roeder, RG** (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. (90)4:595-606.
- 259- **Yao, TP, Oh, SP, Fuchs, M, Zhou, ND, Ch'ng, LE, Newsome, D, Bronson, RT, Li, E, Livingston, DM and Eckner, R** (1998) Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*. (93)3:361-72.
- 260- **Kung, AL, Rebel, VI, Bronson, RT, Ch'ng, LE, Sieff, CA, Livingston, DM and Yao, TP** (2000) Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*. (14)3:272-7.
- 261- **Lundblad, JR, Kwok, RP, Lurance, ME, Harter, ML and Goodman, RH** (1995) Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature*. (374)6517:85-8.
- 262- **Arany, Z, Sellers, WR, Livingston, DM and Eckner, R** (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell*. (77)6:799-800.

- 263- **Jacobson, RH, Ladurner, AG, King, DS and Tjian, R** (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*. (288)5470:1422-5.
- 264- **Gerritsen, ME, Williams, AJ, Neish, AS, Moore, S, Shi, Y and Collins, T** (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (94)7:2927-32.
- 265- **Perkins, ND, Felzien, LK, Betts, JC, Leung, K, Beach, DH and Nabel, GJ** (1997) Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*. (275)5299:523-7.
- 266- **Zhong, H, Voll, RE and Ghosh, S** (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. (1)5:661-71.
- 267- **Torchia, J, Glass, C and Rosenfeld, MG** (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol*. (10)3:373-83.
- 268- **Misiti, S, Schomburg, L, Yen, PM and Chin, WW** (1998) Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*. (139)5:2493-500.
- 269- **Lauritsen, KJ, List, HJ, Reiter, R, Wellstein, A and Riegel, AT** (2002) A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene*. (21)47:7147-55.
- 270- **Thenot, S, Charpin, M, Bonnet, S and Cavaillès, V** (1999) Estrogen receptor cofactors expression in breast and endometrial human cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. (156)1-2:85-93.
- 271- **Borud, B, Hoang, T, Bakke, M, Jacob, AL, Lund, J and Mellgren, G** (2002) The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol*. (16)4:757-73.
- 272- **Li, H and Chen, JD** (1998) The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *J Biol Chem*. (273)10:5948-54.
- 273- **Onate, SA, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW** (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*. (270)5240:1354-7.
- 274- **Takehita, A, Yen, PM, Misiti, S, Cardona, GR, Liu, Y and Chin, WW** (1996) Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*. (137)8:3594-7.
- 275- **Kamei, Y, Xu, L, Heinzel, T, Torchia, J, Kurokawa, R, Glass, B, Lin, SC, Heyman, RA, Rose, DW, Glass, CK and Rosenfeld, MG** (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*. (85)3:403-14.
- 276- **Hong, H, Kohli, K, Trivedi, A, Johnson, DL and Stallcup, MR** (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (93)10:4948-52.
- 277- **Voegel, JJ, Heine, MJ, Zechel, C, Chambon, P and Gronemeyer, H** (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J*. (15)14:3667-75.
- 278- **Torchia, J, Rose, DW, Inostroza, J, Kamei, Y, Westin, S, Glass, CK and Rosenfeld, MG** (1997) The transcriptional coactivator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*. (387)6634:677-84.
- 279- **Anzick, SL, Kononen, J, Walker, RL, Azorsa, DO, Tanner, MM, Guan, XY, Sauter, G, Kallioniemi, OP, Trent, JM and Meltzer, PS** (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. (277)5328:965-8.
- 280- **Li, H, Gomes, PJ and Chen, JD** (1997) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (94)16:8479-84.
- 281- **Chen, H, Lin, RJ, Schiltz, RL, Chakravarti, D, Nash, A, Nagy, L, Privalsky, ML, Nakatani, Y and Evans, RM** (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. (90)3:569-80.
- 282- **Takehita, A, Cardona, GR, Koibuchi, N, Suen, CS and Chin, WW** (1997) TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*. (272)44:27629-34.
- 283- **Suen, CS, Berrodin, TJ, Mastroeni, R, Cheskis, BJ, Lyttle, CR and Frail, DE** (1998) A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*. (273)42:27645-53.
- 284-
- 285- **Werbajh, S, Nojek, I, Lanz, R and Costas, MA** (2000) RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett*. (485)2-3:195-9.
- 286- **Giguere, V** (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*. (20)5:689-725.
- 287- **Mangelsdorf, DJ and Evans, RM** (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. (83)6:841-50.
- 288- **Tremblay, A, Tremblay, GB, Labrie, F and Giguere, V** (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell*. (3)4:513-9.
- 289- **Lavinsky, RM, Jepsen, K, Heinzel, T, Torchia, J, Mullen, TM, Schiff, R, Del-Rio, AL, Ricote, M, Ngo, S, Gemsch, J, Hilsenbeck, SG, Osborne, CK, Glass, CK, Rosenfeld, MG and Rose, DW** (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (95)6:2920-5.
- 290- **Webb, P, Nguyen, P, Shinsako, J, Anderson, C, Feng, W, Nguyen, MP, Chen, D, Huang, SM, Subramanian, S, McKinerney, E, Katzenellenbogen, BS, Stallcup, MR and Kushner, PJ** (1998) Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol*. (12)10:1605-18.
- 291- **Onate, SA, Boonyaratanakornkit, V, Spencer, TE, Tsai, SY, Tsai, MJ, Edwards, DP and O'Malley, BW** (1998) The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*. (273)20:12101-8.
- 292- **Glass, CK** (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev*. (15)3:391-407.
- 293- **Umesono, K and Evans, RM** (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*. (57)7:1139-46.
- 294- **Kurokawa, R, DiRenzo, J, Boehm, M, Sugarman, J, Gloss, B, Rosenfeld, MG, Heyman, RA and Glass, CK** (1994) Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature*. (371)6497:528-31.
- 295- **Horlein, AJ, Naar, AM, Heinzel, T, Torchia, J, Gloss, B, Kurokawa, R, Ryan, A, Kamei, Y, Soderstrom, M, Glass, CK and et al.** (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. (377)6548:397-404.
- 296- **Chen, JD and Evans, RM** (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. (377)6548:454-7.
- 297- **Tsai, MJ and O'Malley, BW** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. (63)451-86.
- 298- **Damm, K, Thompson, CC and Evans, RM** (1989) Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature*. (339)6226:593-7.

- 299- Sap, J, Munoz, A, Schmitt, J, Stunnenberg, H and Vennstrom, B (1989) Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature*. (340)6230:242-4.
- 300- Graupner, G, Wills, KN, Tzukerman, M, Zhang, XK and Pfahl, M (1989) Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor activity. *Nature*. (340)6235:653-6.
- 301- Baniahmad, A, Kohne, AC and Renkawitz, R (1992) A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *Embo J*. (11)3:1015-23.
- 302- Renaud, JP, Rochel, N, Ruff, M, Vivat, V, Chambon, P, Gronemeyer, H and Moras, D (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*. (378)6558:681-9.
- 303- Baek, SH and Rosenfeld, MG (2004) Nuclear receptor coregulators: their modification codes and regulatory mechanism by translocation. *Biochem Biophys Res Commun*. (319)3:707-14.
- 304- Westin, S, Kurokawa, R, Nolte, RT, Wisely, GB, McInerney, EM, Rose, DW, Milburn, MV, Rosenfeld, MG and Glass, CK (1998) Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature*. (395)6698:199-202.
- 305- Heery, DM, Kalkhoven, E, Hoare, S and Parker, MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. (387)6634:733-6.
- 306- Voegel, JJ, Heine, MJ, Tini, M, Vivat, V, Chambon, P and Gronemeyer, H (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J*. (17)2:507-19.
- 307- Chen, D, Ma, H, Hong, H, Koh, SS, Huang, SM, Schurter, BT, Aswad, DW and Stallcup, MR (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. (284)5423:2174-7.
- 308- Koh, SS, Chen, D, Lee, YH and Stallcup, MR (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*. (276)2:1089-98.
- 309- Shiau, AK, Barstad, D, Loria, PM, Cheng, L, Kushner, PJ, Agard, DA and Greene, GL (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. (95)7:927-37.
- 310- Leo, C and Chen, JD (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*. (245)1:1-11.
- 311- Spencer, TE, Jenster, G, Burcin, MM, Allis, CD, Zhou, J, Mizzen, CA, McKenna, NJ, Onate, SA, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*. (389)6647:194-8.
- 312- Liu, Z, Wong, J, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW (2001) Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (98)22:12426-31.
- 313- Chakravarti, D, LaMorte, VJ, Nelson, MC, Nakajima, T, Schulman, IG, Juguilon, H, Montminy, M and Evans, RM (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*. (383)6595:99-103.
- 314- Chen, D, Huang, SM and Stallcup, MR (2000) Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem*. (275)52:40810-6.
- 315- Xu, J, Qiu, Y, DeMayo, FJ, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*. (279)5358:1922-5.
- 316- Gehin, M, Mark, M, Dennefeld, C, Dierich, A, Gronemeyer, H and Chambon, P (2002) The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol*. (22)16:5923-37.
- 317- Wang, Z, Rose, DW, Hermanson, O, Liu, F, Herman, T, Wu, W, Szeto, D, Gleiberman, A, Kronen, A, Pratt, K, Rosenfeld, R, Glass, CK and Rosenfeld, MG (2000) Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (97)25:13549-54.
- 318- Xu, J, Liao, L, Ning, G, Yoshida-Komiya, H, Deng, C and O'Malley, BW (2000) The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (97)12:6379-84.
- 319- Ding, XF, Anderson, CM, Ma, H, Hong, H, Uht, RM, Kushner, PJ and Stallcup, MR (1998) Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol*. (12)2:302-13.
- 320- Darimont, BD, Wagner, RL, Apriletti, JW, Stallcup, MR, Kushner, PJ, Baxter, JD, Fletterick, RJ and Yamamoto, KR (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*. (12)21:3343-56.
- 321- McInerney, EM, Rose, DW, Flynn, SE, Westin, S, Mullen, TM, Kronen, A, Inostroza, J, Torchia, J, Nolte, RT, Assamunt, N, Milburn, MV, Glass, CK and Rosenfeld, MG (1998) Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev*. (12)21:3357-68.
- 322- Nolte, RT, Wisely, GB, Westin, S, Cobb, JE, Lambert, MH, Kurokawa, R, Rosenfeld, MG, Willson, TM, Glass, CK and Milburn, MV (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. (395)6698:137-43.
- 323- Leo, C, Li, H and Chen, JD (2000) Differential mechanisms of nuclear receptor regulation by receptor-associated coactivator 3. *J Biol Chem*. (275)8:5976-82.
- 324- Li, X, Wong, J, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol*. (23)11:3763-73.
- 325- Carapeti, M, Aguiar, RC, Chase, A, Goldman, JM and Cross, NC (1998) Assignment of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene to human chromosome band 2p23. *Genomics*. (52)2:242-4.
- 326- Ning, G, Jurecic, V, Baldini, A and Xu, J (1999) Structure and chromosomal locations of mouse steroid receptor coactivator gene family. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. (35)8:481-6.
- 327- Auger, AP, Tetel, MJ and McCarthy, MM (2000) Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (97)13:7551-5.
- 328- Wang, JC, Stafford, JM and Granner, DK (1998) SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*. (273)47:30847-50.
- 329- Zhu, Y, Qi, C, Calandra, C, Rao, MS and Reddy, JK (1996) Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr*. (6)3:185-95.
- 330- Weiss, RE, Xu, J, Ning, G, Pohlenz, J, O'Malley, BW and Refetoff, S (1999) Mice deficient in the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J*. (18)7:1900-4.
- 331- Qi, C, Zhu, Y, Pan, J, Yeldandi, AV, Rao, MS, Maeda, N, Subbarao, V, Pulikuri, S, Hashimoto, T and Reddy, JK (1999) Mouse steroid receptor coactivator-1 is not essential for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (96)4:1585-90.
- 332- Puigserver, P, Adelmant, G, Wu, Z, Fan, M, Xu, J, O'Malley, B and Spiegelman, BM (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*. (286)5443:1368-71.

- 333- Picard, F, Gehin, M, Annicotte, J, Rocchi, S, Champy, MF, O'Malley, BW, Chambon, P and Auwerx, J (2002) SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*. (111)7:931-41.
- 334- Lee, SK, Kim, HJ, Na, SY, Kim, TS, Choi, HS, Im, SY and Lee, JW (1998) Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*. (273)27:16651-4.
- 335- Na, SY, Lee, SK, Han, SJ, Choi, HS, Im, SY and Lee, JW (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*. (273)18:10831-4.
- 336- Sheppard, KA, Phelps, KM, Williams, AJ, Thanos, D, Glass, CK, Rosenfeld, MG, Gerritsen, ME and Collins, T (1998) Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*. (273)45:29291-4.
- 337- Bautista, S, Valles, H, Walker, RL, Anzick, S, Zeillinger, R, Meltzer, P and Theillet, C (1998) In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res*. (4)12:2925-9.
- 338- Bouras, T, Southey, MC and Venter, DJ (2001) Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res*. (61)3:903-7.
- 339- List, HJ, Reiter, R, Singh, B, Wellstein, A and Riegel, AT (2001) Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. (68)1:21-8.
- 340- Osborne, CK, Bardou, V, Hopp, TA, Chamness, GC, Hilsenbeck, SG, Fuqua, SA, Wong, J, Allred, DC, Clark, GM and Schiff, R (2003) Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. (95)5:353-61.
- 341- Planas-Silva, MD, Shang, Y, Donaher, JL, Brown, M and Weinberg, RA (2001) AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res*. (61)10:3858-62.
- 342- Liao, L, Kuang, SQ, Yuan, Y, Gonzalez, SM, O'Malley, BW and Xu, J (2002) Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. (83)1-5:3-14.
- 343- Wu, RC, Qin, J, Hashimoto, Y, Wong, J, Xu, J, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW (2002) Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol*. (22)10:3549-61.
- 344- Wu, RC, Qin, J, Yi, P, Wong, J, Tsai, SY, Tsai, MJ and O'Malley, BW (2004) Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell*. (15)6:937-49.
- 345- Puustinen, R, Sarvilinna, N, Manninen, T, Tuohimaa, P and Ylikomi, T (2001) Localization of glucocorticoid receptor interacting protein 1 in murine tissues using two novel polyclonal antibodies. *Eur J Endocrinol*. (145)3:323-33.
- 346- Apostolakis, EM, Ramamurphy, M, Zhou, D, Onate, S and O'Malley, BW (2002) Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol Endocrinol*. (16)7:1511-23.
- 347- Hong, H, Kohli, K, Garabedian, MJ and Stallcup, MR (1997) GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol*. (17)5:2735-44.
- 348- Atkins, GB, Hu, X, Guenther, MG, Rachez, C, Freedman, LP and Lazar, MA (1999) Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol*. (13)9:1550-7.
- 349- Goodman, RH and Smolik, S (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*. (14)13:1553-77.
- 350- Liang, J, Prouty, L, Williams, BJ, Dayton, MA and Blanchard, KL (1998) Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2. *Blood*. (92)6:2118-22.
- 351- Murati, A, Adelaide, J, Popovici, C, Mozziconacci, MJ, Arnoulet, C, Lafage-Pochitaloff, M, Sainy, D, Birnbaum, D and Chaffanet, M (2003) A further case of acute myelomonocytic leukemia with inv(8) chromosomal rearrangement and MOZ-NCOA2 gene fusion. *Int J Mol Med*. (12)4:423-8.
- 352- Panagopoulos, I, Fioretos, T, Isaksson, M, Mitelman, F, Johansson, B, Theorin, N and Juliusson, G (2002) RT-PCR analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13): identification of a novel MOZ/CBP transcript and absence of CBP/MOZ expression. *Genes Chromosomes Cancer*. (35)4:372-4.
- 353- Panagopoulos, I, Isaksson, M, Lindvall, C, Hagemeijer, A, Mitelman, F and Johansson, B (2003) Genomic characterization of MOZ/CBP and CBP/MOZ chimeras in acute myeloid leukemia suggests the involvement of a damage-repair mechanism in the origin of the t(8;16)(p11;p13). *Genes Chromosomes Cancer*. (36)1:90-8.
- 354- Carapeti, M, Aguiar, RC, Goldman, JM and Cross, NC (1998) A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood*. (91)9:3127-33.
- 355- Kindle, KB, Troke, PJ, Collins, HM, Matsuda, S, Bossi, D, Bellodi, C, Kalkhoven, E, Salomoni, P, Pelicci, PG, Minucci, S and Heery, DM (2005) MOZ-TIF2 inhibits transcription by nuclear receptors and p53 by impairment of CBP function. *Mol Cell Biol*. (25)3:988-1002.
- 356- Weiss, RE, Gehin, M, Xu, J, Sadow, PM, O'Malley, BW, Chambon, P and Refetoff, S (2002) Thyroid function in mice with compound heterozygous and homozygous disruptions of SRC-1 and TIF-2 coactivators: evidence for haploinsufficiency. *Endocrinology*. (143)4:1554-7.
- 357- Deguchi, K, Ayton, PM, Carapeti, M, Kutok, JL, Snyder, CS, Williams, IR, Cross, NC, Glass, CK, Cleary, ML and Gilliland, DG (2003) MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell*. (3)3:259-71.
- 358- Kurebayashi, J, Otsuki, T, Kunisue, H, Tanaka, K, Yamamoto, S and Sonoo, H (2000) Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res*. (6)2:512-8.
- 359- Baumann, CT, Ma, H, Wolford, R, Reyes, JC, Maruvada, P, Lim, C, Yen, PM, Stallcup, MR and Hager, GL (2001) The glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) localizes in discrete nuclear foci that associate with ND10 bodies and are enriched in components of the 26S proteasome. *Mol Endocrinol*. (15)4:485-500.
- 360- Yao, TP, Ku, G, Zhou, N, Scully, R and Livingston, DM (1996) The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (93)20:10626-31.
- 361- Anton, LC, Schubert, U, Bacik, I, Princiotta, MF, Wearsch, PA, Gibbs, J, Day, PM, Realini, C, Rechsteiner, MC, Bannink, JR and Yewdell, JW (1999) Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol*. (146)1:113-24.
- 362- Zhu, J, Gianni, M, Kopf, E, Honore, N, Chelbi-Alix, M, Koken, M, Quignon, F, Rochette-Egly, C and de The, H (1999) Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (96)26:14807-12.
- 363- Boudjelal, M, Wang, Z, Voorhees, JJ and Fisher, GJ (2000) Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha in human keratinocytes. *Cancer Res*. (60)8:2247-52.

- 364- Hauser, S, Adelmant, G, Sarraf, P, Wright, HM, Mueller, E and Spiegelman, BM (2000) Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem.* (275)24:18527-33.
- 365- Syvala, H, Vienonen, A, Zhuang, YH, Kivineva, M, Ylikomi, T and Tuohimaa, P (1998) Evidence for enhanced ubiquitin-mediated proteolysis of the chicken progesterone receptor by progesterone. *Life Sci.* (63)17:1505-12.
- 366- Chen, SL, Wang, SC, Hosking, B and Muscat, GE (2001) Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells. *Mol Endocrinol.* (15)5:783-96.
- 367- Luger, K, Mader, AW, Richmond, RK, Sargent, DF and Richmond, TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* (389)6648:251-60.
- 368- Kornberg, RD and Lorch, Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* (98)3:285-94.
- 369- Hecht, A, Laroche, T, Strahl-Bolsinger, S, Gasser, SM and Grunstein, M (1995) Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell.* (80)4:583-92.
- 370- Ding, HF, Bustin, M and Hansen, U (1997) Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14. *Mol Cell Biol.* (17)10:5843-55.
- 371- Grunstein, M (1998) Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell.* (93)3:325-8.
- 372- Workman, JL and Kingston, RE (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.* (67)545-79.
- 373- Kingston, RE and Narlikar, GJ (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* (13)18:2339-52.
- 374- Roth, SY, Denu, JM and Allis, CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem.* (70)81-120.
- 375- Glass, CK and Rosenfeld, MG (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* (14)2:121-41.
- 376- Kuo, MH, Brownell, JE, Sobel, RE, Ranalli, TA, Cook, RG, Edmondson, DG, Roth, SY and Allis, CD (1996) Transcription-linked acetylation by Gen5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature.* (383)6597:269-72.
- 377- Wu, JT and Kral, JG (2005) The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res.* (123)1:158-69.
- 378- Nojek, I (2001) Rol de coactivadores del receptor de glucocorticoides en la actividad transcripcional de NF-kB. *Tesis de Licenciatura.* Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- 379- Sheppard, KA, Rose, DW, Haque, ZK, Kurokawa, R, McInerney, E, Westin, S, Thanos, D, Rosenfeld, MG, Glass, CK and Collins, T (1999) Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol.* (19)9:6367-78.
- 380- Vanden Berghe, W, Plaisance, S, Boone, E, De Bosscher, K, Schmitz, ML, Fiers, W and Haegeman, G (1998) p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* (273)6:3285-90.
- 381- Smith, CM, Shindyalov, IN, Veretnik, S, Gribskov, M, Taylor, SS, Ten Eyck, LF and Bourne, PE (1997) The protein kinase resource. *Trends Biochem Sci.* (22)11:444-6.
- 382- Ducut Sigala, JL, Bottero, V, Young, DB, Shevchenko, A, Mercurio, F and Verma, IM (2004) Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science.* (304)5679:1963-7.
- 383- Chen, RH, Sarnecki, C and Blenis, J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* (12)3:915-27.
- 384- Franco, DL (2003) Mecanismos moleculares de sensibilización y protección de la apoptosis inducida por TNF-alfa. *Tesis Doctoral.* Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- 385- Karvonen, U, Janne, OA and Palvimo, JJ (2002) Pure antiandrogens disrupt the recruitment of coactivator GRIP1 to colocalize with androgen receptor in nuclei. *FEBS Lett.* (523)1-3:43-7.
- 386- Black, BE, Vitto, MJ, Gioeli, D, Spencer, A, Afshar, N, Conaway, MR, Weber, MJ and Paschal, BM (2004) Transient, ligand-dependent arrest of the androgen receptor in subnuclear foci alters phosphorylation and coactivator interactions. *Mol Endocrinol.* (18)4:834-50.
- 387- Peterson, CL (2002) HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol Cell.* (9)5:921-2.
- 388- Gray, SG and Teh, BT (2001) Histone acetylation/deacetylation and cancer: an "open" and "shut" case? *Curr Mol Med.* (1)4:401-29.
- 389- Rosato, RR and Grant, S (2004) Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* (13)1:21-38.
- 390- Maniatis, T (1997) Catalysis by a multiprotein IkappaB kinase complex. *Science.* (278)5339:818-9.
- 391- Naumann, M and Scheidereit, C (1994) Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *Embo J.* (13)19:4597-607.
- 392- Schmitz, ML, dos Santos Silva, MA and Baeuerle, PA (1995) Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem.* (270)26:15576-84.
- 393- Webb, P, Nguyen, P, Valentine, C, Lopez, GN, Kwok, GR, McInerney, E, Katzenellenbogen, BS, Enmark, E, Gustafsson, JA, Nilsson, S and Kushner, PJ (1999) The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol.* (13)10:1672-85.
- 394- Vandell, L and Trouche, D (2001) Physical association between the histone acetyl transferase CBP and a histone methyl transferase. *EMBO Rep.* (2)1:21-6.
- 395- Chen, LF, Mu, Y and Greene, WC (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *Embo J.* (21)23:6539-48.
- 396- Ashburner, BP, Westerheide, SD and Baldwin, AS, Jr. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol.* (21)20:7065-77.
- 397- Lee, YH, Coonrod, SA, Kraus, WL, Jelinek, MA and Stallcup, MR (2005) Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (102)10:3611-6.
- 398- Poizat, C, Puri, PL, Bai, Y and Kedes, L (2005) Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol.* (25)7:2673-87.
- 399- Miller, AL, Webb, MS, Copik, AJ, Wang, Y, Johnson, BH, Kumar, R and Thompson, EB (2005) p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol.* (19)6:1569-83.
- 400- Perreiaux, DG, Dean, D, Cronan, M, Connelly, P and Gabel, CA (1995) Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. *Mol Pharmacol.* (48)3:433-42.

- 401- Guan, Z, Buckman, SY, Pentland, AP, Templeton, DJ and Morrison, AR (1998) Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* (273)21:12901-8.
- 402- Badger, AM, Cook, MN, Lark, MW, Newman-Tarr, TM, Swift, BA, Nelson, AH, Barone, FC and Kumar, S (1998) SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol.* (161)1:467-73.
- 403- Da Silva, J, Pierrat, B, Mary, JL and Lesslauer, W (1997) Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem.* (272)45:28373-80.
- 404- Pietersma, A, Tilly, BC, Gaestel, M, de Jong, N, Lee, JC, Koster, JF and Sluiter, W (1997) p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun.* (230)1:44-8.
- 405- Jackson, JR, Bolognese, B, Hillegass, L, Kassis, S, Adams, J, Griswold, DE and Winkler, JD (1998) Pharmacological effects of SB 220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. *J Pharmacol Exp Ther.* (284)2:687-92.
- 406- Rowan, BG, Weigel, NL and O'Malley, BW (2000) Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* (275)6:4475-83.
- 407- Lopez, GN, Turck, CW, Schaufele, F, Stallcup, MR and Kushner, PJ (2001) Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem.* (276)25:22177-82.
- 408- Hoang, T, Fenne, IS, Cook, C, Borud, B, Bakke, M, Lien, EA and Mellgren, G (2004) cAMP-dependent protein kinase regulates ubiquitin-proteasome-mediated degradation and subcellular localization of the nuclear receptor coactivator GRIP1. *J Biol Chem.* (279)47:49120-30.
- 409- Ivanov, VN and Ronai, Z (2000) p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. *Oncogene.* (19)26:3003-12.
- 410- Varghese, J, Chattopadhyaya, S and Sarin, A (2001) Inhibition of p38 kinase reveals a TNF-alpha-mediated, caspase-dependent, apoptotic death pathway in a human myelomonocyte cell line. *J Immunol.* (166)11:6570-7.
- 411- Nishihara, H, Hwang, M, Kizaka-Kondoh, S, Eckmann, L and Insel, PA (2004) Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK. *J Biol Chem.* (279)25:26176-83.
- 412- Herrera, B, Carracedo, A, Diez-Zaera, M, Guzman, M and Velasco, G (2005) p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett.* (579)22:5084-8.
- 413- Konopleva, M, Contractor, R, Kurinna, SM, Chen, W, Andreeff, M and Ruvolo, PP (2005) The novel triterpenoid CDDO-Me suppresses MAPK pathways and promotes p38 activation in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* (19)8:1350-4.
- 414- Kutuk, O, Pedrech, A, Harrison, P and Basaga, H (2005) Pramoxin induces apoptosis in Jurkat leukemia cells: a role for JNK, p38 and caspase activation. *Apoptosis.* (10)3:597-609.
- 415- Wang, Q, Harrison, JS, Uskokovic, M, Kutner, A and Studzinski, GP (2005) Translational study of vitamin D differentiation therapy of myeloid leukemia: effects of the combination with a p38 MAPK inhibitor and an antioxidant. *Leukemia.* (19)10:1812-7.
- 416- Mark, M, Yoshida-Komiya, H, Gehin, M, Liao, L, Tsai, MJ, O'Malley, BW, Chambon, P and Xu, J (2004) Partially redundant functions of SRC-1 and TIF2 in postnatal survival and male reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (101)13:4453-8.
- 417- Gao, Z, Chiao, P, Zhang, X, Lazar, MA, Seto, E, Young, HA and Ye, J (2005) Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter. *J Biol Chem.* (280)22:21091-8.
- 418- Igarashi-Migitaka, J, Takeshita, A, Koibuchi, N, Yamada, S, Ohtani-Kaneko, R and Hirata, K (2005) Differential expression of p160 steroid receptor coactivators in the rat testis and epididymis. *Eur J Endocrinol.* (153)4:595-604.