



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y BIOLÓGÍA MOLECULAR Y CELULAR

“Eventos regulatorios mediados por MAPKs sobre el gen de respuesta temprana c-Fos.”

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD
DE BUENOS AIRES

Lic. Tamara Tanos

Director: Dr. Omar A. Coso

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, IFIBYNE-Conicet-, FCEyN-
UBA- Departamento de Fisiología Molecular y Neurociencias.

2007

*Gracias a mi Mamá –Marta- y a mi papá –Elöd-
por acompañarme y apoyarme siempre.*

Agradezco a todas la personas que me acompañaron a lo largo de todos estos años y que de una manera u otra me ayudaron a que este momento sea posible.

En especial a Omar Coso, mi director de Tesis, que no solo fue una guía a nivel científico sino también a nivel humano, nunca voy a poder agradecer todo lo que me brindaste, el sentirme en el labo como en casa, el acompañarme en mi crecimiento científico y personal en todos estos años, el ayudarme en todos mis desafíos y sobre todo, el sentir que te alegras con mis logros. Es invaluable. GRACIAS!

También a María Julia Marinissen, otra gran persona que tuve la suerte de conocer en estos años que también me enseñó de ciencia y de la vida, con ella compartí momentos que nunca voy a olvidar, trabajar como locas, aprender, divertirnos. Gracias por siempre estar para ayudarme!.

A los directores sucesivos del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular y del IFIByNE, en especial a Alberto Kornblihtt, quien es un gran ejemplo de persona, que combina excelencia a nivel laboral y personal sin resentir ninguna de las dos.

A la gente del Labo y alrededores que ayuda en tareas que no son netamente científicas como Ramona, Myriam, y especialmente a Ana Bondía, que sin su perseverancia todavía estaría sin presentar los papeles de inscripción al doctorado.

A todos los compañeros que tuve durante estos años en el laboratorio, con los que compartí días y días de trabajo y buenos momentos.

Agradezco que a lo largo de los años en el laboratorio encontré además de buenos compañeros, muy buenos amigos como Hoch, Lore y Sol. Además a Nati, Popi, Lu y de nuevo Sol, que hicieron que mis últimos años en el labo sean buenísimos. También a Anita y a Albi. A todo el grupo PeKoCo, a Edith, a Adalí, a Esteban, a Diego, a Caro, a Leo. Gracias porque logramos formar un equipo de trabajo en donde uno se siente cómodo y se divierte a la par de lo que se aprende y aprovecha.

A la gente del LFBM, especialmente a Nacho, a Mati, a Itatí, a Ana, a Jime, a Manu, a Juan, a Fede, a Mariano, a Juan G, a Nacho Nojek, a Lore Rela, a Anabella, a Silvana Nudler, a Pagani, a todos los que me acompañaron y me enseñaron a lo largo de estos años. A Vale que siempre esta dispuesta a ayudar y por su casita y sus charlas.

A mis amigas de siempre, Patricia y Marina que me acompañan desde chiquita.

A mis amigos de afuera del labo, Rodrigo, Georgina, Gaspar, Lucas, Marcelo, Jime, Laura, LauK, Ceci, Male, Vale B, Nico, que hacen que la vida sea mas linda.

A Alma, que tanto esfuerzo hizo para que todos estemos bien en este momento. A Brownie!

A mi familia, que sin ellos no hubiera llegado nunca hasta este lugar, a mi mamá y mi papá, que son los mejores padres del mundo, tambien a Nico, a Iaia, a Sil, a Juli y a Maxi. Gracias. Los quiero mucho!

Y especialmente a Pablo, que me acompaña todos los días, me aguanta, me escucha y me alienta. Te amo. Gracias por hacerme muy feliz.

Gracias a todos!.

ABREVIATURAS

FL: Full Length o forma completa

WT: Wild Type o forma salvaje

MUT: Mutante

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

SAPKs: Stress Activated Protein Kinases

TRE: TPA Responsive Element"

TCF: Ternary Complex Factor

SRE: Serum Response Element

SIE: c-Sis Inducible Element

CRE: Calcium Response Element

GPCR: G Protein Coupled Receptor

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

EGF: Epherdermal Growth Factor (Factor de crecimiento epidérmico)

PKA: Protein Kinase A (Proteína quinasa dependiente de AMPc

PKC: Protein Kinase C (Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina)

RSK: Ribosomal S6 Kinase

STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription

TFII: Transcription Factor II

ARE: AU-rich element (secuencias ricas en Adeninas y Uracilos)

AMPc: Adenosina mono fosfato cíclico

GDP: Guanosina di fosfato

GTP: Guanosina tri fosfato

WB: Western Blot

NB: Northern Blot

LPA: 1-oleoyl-lyso-phosphatidic acid

TNF: Tumor Necrosis Factor

SOS: Son of sevenless

JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase

ERK: Extracellular regulated kinase

cDNA: ADN Copia

RESUMEN ESPAÑOL

“Eventos regulatorios mediados por MAPKs sobre el gen
de respuesta temprana c-Fos.”

La inducción de la expresión génica involucra procesos bioquímicos en los que participan múltiples caminos de transducción de señales. Dependiendo del tipo de estímulo distintas proteínas quinasas se activan provocando en última instancia la fosforilación de factores de transcripción y por lo tanto la regulación de la expresión génica.

Las MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) son importantes propagadoras de las señales que van desde la membrana celular al núcleo. Son un grupo amplio de enzimas quinasas entre las cuales se destacan, por ser las más estudiadas hasta el momento, ERK1/2, JNK y p38. Las quinasas JNK y p38 forman una subfamilia dentro de las MAPKs y se las denomina SAPKs (Stress Activated Protein Kinases) ya que son generalmente activadas por estrés. Por otro lado, las quinasas ERK1/2 responden principalmente a señales mitogénicas.

Los miembros de las familias de factores de transcripción que forman AP-1 son codificados por genes de respuesta temprana. El nivel de expresión de estos genes aumenta rápida y transitoriamente en respuesta tanto a estímulos mitogénicos como a estímulos que producen estrés celular. Ejemplos típicos de miembros de AP-1 son los productos de los proto-oncogenes c-Jun y c-Fos, cuya actividad prolongada o descontrolada desencadena proliferación desmedida que puede dar lugar a una neoplasia.

Las MAPK cumplen un papel importante tanto en la activación de promotores de genes tempranos como en la modificación post-traducciona de las proteínas codificadas por estos genes al agregarle grupos fosfato, tal como en el caso ampliamente estudiado de la fosforilación de c-Jun por JNK.

El factor de transcripción c-Fos heterodimeriza con proteínas de la familia Jun para formar el factor de transcripción AP-1. Su actividad está finamente regulada a nivel transcripcional, a nivel de la vida media del mensajero transcrito, a nivel de la vida media de la proteína y a nivel de modificaciones post-traduccionales que se adicionan sobre la proteína.

A lo largo de este trabajo de tesis nos hemos propuesto investigar la regulación de c-Fos por MAPKs en respuesta a dos tipos de estímulos diferentes.

Estudiamos la interacción de c-Fos con las p38 SAPKs, su efecto sobre la fosforilación del producto de este proto-oncogén ante un estímulo de estrés, radiación UV y la regulación de la actividad transcripcional de c-Fos por SAPKs. Por otra parte, estudiamos la regulación de c-Fos desencadenada por un estímulo mitogénico, haciendo hincapié tanto en la regulación de la transcripción de esta proteína como en modificaciones post traduccionales en respuesta al agonista del receptor muscarínico 1, Carbacol.

Observamos que la exposición de células HEK 293 a radiación UV produce la activación de las cuatro isoformas de las p38 SAPKs las cuales, como consecuencia de dicha activación, fosforilan a c-Fos en su dominio de transactivación, de modo análogo a lo ampliamente descrito para JNK y c-Jun, produciendo un aumento en su capacidad de transactivar genes con sitios de unión AP-1.

Además, observamos que el agonista del receptor muscarínico1, Carbacol, induce la activación del promotor de *c-fos* actuando a través de la activación de la MAPK ERK2. Esto produce un aumento en la cantidad de proteína c-Fos presente en las células que sería fosforilada por múltiples MAPKs en su dominio de transactivación activando su función como factor de transcripción. Estos resultados proveen nueva información acerca de la complejidad de las respuestas de los productos de genes de respuesta temprana, a estímulos externos actuando a través de la activación de MAPKs.

RESUMEN INGLÉS

“MAPKs mediated regulatory events acting upon the c-Fos early response gene”

Regulation of gene expression involves biochemical processes exerted through signal transduction pathways. Depending on the sources of stimuli, a variety of protein kinase cascades activate and finally phosphorylate distinct transcription factors that ultimately regulate the transcription of several genes.

The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a family of serine/threonine kinases that play an essential role in signal transduction by modulating gene transcription in the nucleus in response to changes in the cellular environment. They include the extracellular signal-regulated protein kinases ERK1/2, JNKs and p38s. While the former responds mostly to mitogenic signals, JNK and p38 are generally ignited by sources of stress and have been named SAPKs (Stress Activated Protein Kinases).

Transcription factors belonging to the AP-1 family are coded by early responsive genes (ERGs). Its expression levels rise quickly and transiently in response to both mitogenic stimuli and stress. Typical examples of AP-1 family members are the products of the proto-oncogenes *c-jun* and *c-fos*. Its prolonged expression or activation has been linked to cellular transformation.

MAPKs play an important role both as activators of ERG promoters or in the post-translational modification of its protein products, adding phosphate groups to key residues, as is the case for c-Jun and JNK.

The product of the proto-oncogene *c-fos* forms heterodimers with members of the Jun family to form the transcription factor AP-1. Its activity is tightly regulated at different levels, promoter activity, stability of the transcript, and posttranslational modification or half-life of the protein product.

During this thesis work, we have characterized the regulation of the transcription factor c-Fos at different levels by MAPKs in response to stress and mitogenic stimuli.

Our findings indicate that as a consequence of the activation of stress pathways induced by UV light, endogenous c-Fos becomes a substrate of p38 MAPKs and, for the first time, provide evidence that support a critical role for p38 MAPKs in mediating stress-induced c-Fos phosphorylation and gene transcription activation, acting concomitantly with the activation of c-Jun by JNK/ MAPKs and thereby contributing to the complexity of AP1-driven gene transcription regulation.

We also demonstrate that the G-Protein Coupled Receptor M1 regulates c-fos at multiple levels, activating the *c-fos* promoter through ERK2 MAPK and modulating the expression and activation of the c-Fos protein through several MAPKs.

INTRODUCCIÓN

Las células responden a las señales de su ambiente externo transduciendo los estímulos que reciben al interior celular mediante activaciones secuenciales de moléculas. Estas activaciones secuenciales se conocen como “vías de señalización”.

La transducción de señales generalmente comienza con la unión de ligandos químicos a receptores extracelulares o intracelulares que desencadenan eventos dentro de la célula. Alternativamente se pueden iniciar con la activación de receptores por estímulos físicos (distintas longitudes de onda, temperatura, etc) o mecánicos (estiramiento, etc.). Desde el inicio del estímulo están implicadas un número variable de enzimas y/o segundos mensajeros que participan de la amplificación de la señal, pudiendo así, un pequeño estímulo provocar una compleja respuesta celular.

Actualmente gran parte de la biología celular se centra en el estudio de las vías de señalización de la membrana celular hasta el núcleo u otros compartimentos de la célula, intentando entender cómo las vías de señalización activadas determinan la respuesta celular.

Una célula puede permanecer quiescente, dividirse, diferenciarse e incluso morir de acuerdo a lo que ella misma es capaz de “interpretar” que está ocurriendo en el medio externo. Este fenómeno de adaptación de las células a las señales que recibe del exterior es fundamental en el desarrollo normal de un organismo. Estudiar los mecanismos que lo regulan, es de gran importancia debido a que errores en estos sistemas de señalización ocasionan, como consecuencia, severas patologías.

Sea cual fuere el destino de la célula que recibe la señal, este destino está determinado generalmente por un cambio en el patrón de expresión de sus genes. Esto ocurre porque las señales que se transducen llegan hasta el núcleo, donde la actividad de factores de transcripción es modificada, en general aumentando o disminuyendo la tasa de transcripción de diversos genes blanco. Las respuestas desencadenadas por las señales de transducción también actúan en la regulación de vías metabólicas, cambios en el citoesqueleto, etc., de manera directa, sin que intervengan necesariamente modificaciones en la expresión de genes.

Entonces, las distintas señales extracelulares regulan los niveles de expresión de determinados genes, por medio de un conjunto de mecanismos que comprenden:

1. La captación de las señales externas, mediante los receptores celulares que generalmente se activan por unión de ligandos específicos.
2. La generación y la transmisión intracelular de las señales por medio de interacciones proteína-proteína.
3. La ejecución de la respuesta a través de modificaciones conformacionales o por adición o sustracción de residuos químicos sobre ciertas proteínas que generalmente conducen a cambios en el patrón de expresión de ciertos genes.

El factor de transcripción AP-1

El factor de transcripción AP-1 fue uno de los primeros factores de transcripción descubiertos en mamíferos, 20 años atrás (16,189). Actualmente mucho de lo que se conoce acerca de las características de los factores de transcripción proviene del descubrimiento y del estudio del mismo.

AP-1 fue identificado en primera instancia como una actividad presentada por ciertas moléculas capaces de unirse al ADN en sitios específicos de las regiones promotoras de algunos genes como el gen de la metalotioneína humana, el gen E3 de adenovirus, genes de SV-40 y regiones de control de genes cuya expresión es estimulada por tratamientos con ésteres de forbol como el TPA (16,189). Por esta última razón, la zona de ADN a la cual se unen los factores AP-1 se ha denominado elemento de respuesta a TPA ("TPA responsive element" o TRE). Por análisis de secuencias nucleotídicas de varios TRE se estableció la secuencia de consenso TGA(G/C)TCA o TGA(G/C)TAA como el sitio de unión de los factores AP-1.

Los niveles de actividad de AP-1 aumentan luego del tratamiento de células en cultivo con una variedad de agentes estimulatorios como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), agonistas de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR) y suero. Sin embargo, a diferencia de otros sitios de unión para factores de transcripción, los sitios que unen AP-1 tienen una actividad basal detectable en varios tipos celulares, aun en ausencia de factores estimulatorios (18,135).

Las proteínas AP-1 fueron aisladas mediante columnas de afinidad para oligonucleótidos que contienen la secuencia consenso TRE: 5'TGA(G/C)TCA 3'(223). Estas, en lugar de presentarse como una entidad molecular única y definida, resultaron ser un complejo proteico formado por varios polipéptidos distintos. Estos ensayos permitieron identificar al producto del proto-oncogen *c-fos* y a una proteína asociada de peso molecular 39 kDa (p39) como los componentes principales de AP-1.

Una combinación de estudios estructurales e inmunológicos llevó finalmente a identificar a c-Jun como p39 (250). El extremo carboxilo terminal de esta proteína (codificada por otro proto-oncogen llamado *c-jun*) presenta una alta identidad de secuencia con el activador transcripcional Gcn4 que es responsable de inducir la expresión de varios genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos en levaduras (319). Además, este último es capaz de unirse en forma de dímero a secuencias de reconocimiento, íntimamente relacionadas con un sitio AP-1. Esos dos hechos permitieron que se especulara con la idea de que la proteína c-Jun actuara como un activador de la transcripción, lo que posteriormente conllevó a examinar su presencia en complejos AP-1.

Previamente se habían identificado las variantes virales de c-Fos y c-Jun, las oncoproteínas virales v-Fos y v-Jun en el retrovirus "Finkel-Biskis-Jenkins osteosarcoma virus" y en el retrovirus aviar "avian sarcoma virus 17" respectivamente (38,75,76). Una amplia variedad de estudios

muestran que existe un alto grado de conservación evolutiva entre especies con respecto a la estructura génica y funcionamiento de los factores de transcripción miembros de la familia AP-1.

El factor de transcripción AP-1 es un complejo dimérico compuesto principalmente por proteínas de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) y proteínas de la familia Jun (c-Jun, Jun B y Jun D) (2). Las proteínas de la familia Jun pueden formar homo u heterodímeros con proteínas de la familia Fos, pero estas, solo puede formar heterodímeros con miembros de la familia Jun. Además algunos miembros de la familia ATF (ATFa, ATF-2 y ATF-3) y JDP (JDP-1 y JDP-2) pueden unirse a secuencias muy similares a las TRE formando complejos heterodiméricos con proteínas de las familias Fos y Jun. Cabe destacar que cada una de estas proteínas es expresada y regulada diferencialmente, por lo que en cada tipo celular y en cada momento del ciclo celular, la célula tiene un mezcla compleja y diferente de dímeros AP-1 (322).

En la figura I.1 se representan los miembros de las familias Jun y Fos.

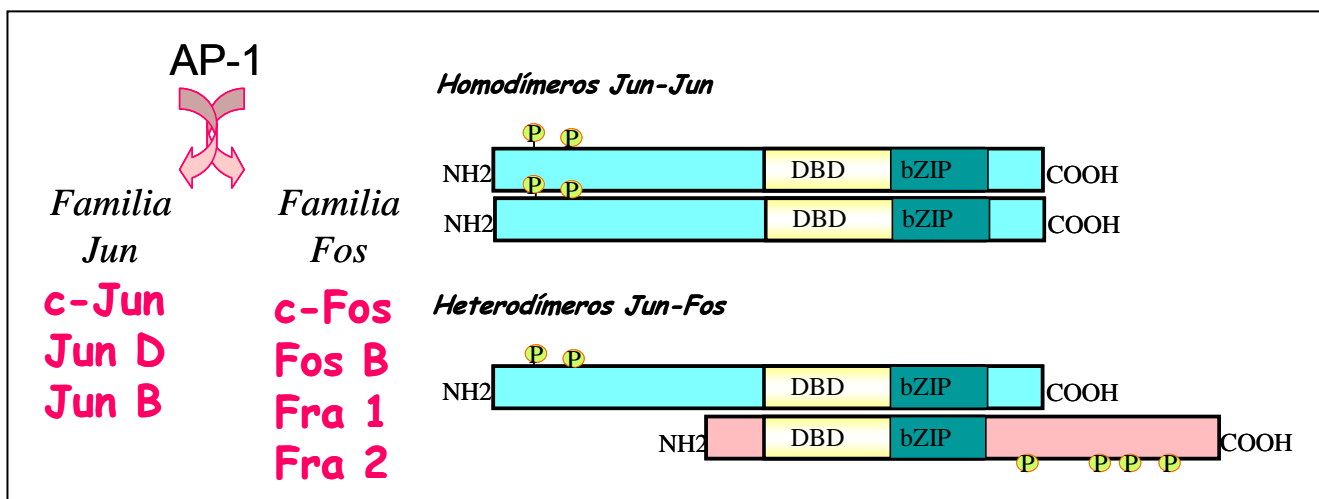


Figura I.1.:

Componentes del factor de transcripción AP-1.

A la izquierda del esquema se mencionan los componentes de las familias de factores de transcripción Jun y Fos que forman AP-1. A la derecha se esquematiza un homodímero entre proteínas de la familia Jun y un heterodímero entre un miembro de la familia Fos y un miembro de la familia Jun.

Los resultados de experimentos de mutagénesis dirigida muestran que la dimerización ocurre gracias a interacciones hidrofóbicas entre sus regiones de cierres de leucinas o "leucine zippers" (bZip). Estas estructuras presentan 7 leucinas que se repiten en forma periódica de modo tal de quedar expuestas siempre hacia el mismo lado de la hélice α en la estructura secundaria de las proteínas. El enfrentamiento de dos de estas hélices con sus respectivas leucinas intercaladas permite una serie de interacciones de tipo hidrofóbico entre los restantes aminoácidos de la cadena que estabiliza el dímero, siendo la formación del dímero un pre-requisito para que AP-1 pueda unirse al DNA (184). La composición del cierre de Leucinas es responsable de la especificidad y estabilidad de los dímeros formados (317). Existen evidencias experimentales

obtenidas en ensayos *in vitro* que indican que el complejo Jun-Fos se forma extremadamente rápido y que presenta una mayor afinidad por el ADN que el homodímero Jun-Jun (180). Como resultado de la dimerización, cada uno de sus dos componentes deja expuestas las zonas de unión al ADN y las zonas de interacción con otros componentes de la maquinaria transcripcional.

La gran cantidad de combinaciones de diferentes heterodímeros Jun/Fos o Jun/Jun, resultante de la multiplicidad de sus familias, sugiere la posibilidad de que se pueda generar un amplio número de complejos proteicos capaces de regular la expresión génica mediada por AP-1, partiendo solamente de un pequeño número de genes. Este fenómeno se conoce como “control combinatorio”. Cada una de esas posibles combinaciones puede o no estar presente en una célula en diferentes fases de su desarrollo dependiendo de como el entorno celular estimula el nivel de expresión de los genes que codifican para los distintos factores de transcripción. O simplemente, dependiendo del tipo celular en estudio.

Tanto Jun como Fos son proteínas codificadas por lo que han dado en llamarse “genes de respuesta temprana”. Se llama así a aquellos genes cuya síntesis es rápida y transitoriamente estimulada como consecuencia de la estimulación de las células con agentes que promueven el crecimiento o la diferenciación celular (135). Sus mensajeros tienden a acumularse rápidamente luego de la aparición del estímulo pero tienen una vida media relativamente corta. Existe una gran variedad de genes de respuesta temprana, pero la mayoría de ellos codifican para factores de transcripción. Los efectos que se producen como consecuencia de la transcripción y activación de los genes de respuesta temprana son cruciales para el funcionamiento apropiado de las células ya que finalmente determinan la respuesta celular a un estímulo dado.

La actividad AP-1 es inducida por factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, hormonas, interacciones célula-matriz, infecciones bacterianas y virales, estímulos físicos y de estrés. Estos estímulos activan vías de señalización que involucran MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) y estas cascadas de señales activadas actúan sobre AP-1 fosforilándolo. De esta manera, los factores de transcripción AP-1 interpretan la información del ambiente y la convierten en un patrón de expresión génica determinado que está generalmente relacionado con proliferación, formación de tumores o apoptosis. En ciertos casos, componentes de este factor de transcripción pueden actuar como supresores de tumores. Como ejemplo, el factor de transcripción JunB puede antagonizar los efectos de c-Jun (280). Por lo tanto, AP-1 tiene un rol central en la decisión de la célula ante determinados estímulos: se divide, queda quiescente o muere. Finalmente estas “decisiones” individuales a nivel celular tienen su consecuencia en el organismo como un todo.

Cabe destacar, que la regulación mediada por AP-1 en procesos como diferenciación, proliferación, apoptosis y transformación debe ser considerada en el contexto de una red compleja y dinámica de vías de señalización junto a otros factores de transcripción actuando simultáneamente.

En resumen:

-AP-1 es un factor de transcripción dimérico formado principalmente por proteínas de la familia Jun y de la familia Fos. Pueden formarse homodímeros Jun-Jun y heterodímeros Jun-Fos pero no Fos- Fos.

-La actividad de AP-1 puede ser regulada a múltiples niveles como: la constitución de cada dímero, la transcripción de cada uno de los genes que lo componen, estabilidad del RNA mensajero correspondiente, modificaciones post traduccionales de cada componente y también mediante la interacción con otras proteínas.

-Tanto Fos como Jun fueron descubiertos primero como oncoproteínas virales, por lo cual está bien establecido su rol en tumorigénesis.

-AP-1 puede ejercer efectos oncogénicos o anti oncogénicos dependiendo del tipo celular, del estadio de diferenciación, del ambiente en que se encuentra la célula, etc.

El factor de transcripción c-Fos

La versión viral de c-Fos, v-Fos, fue aislada de un retrovirus murino y es responsable de la patología denominada osteosarcoma murino. (38,75,76).

Durante el transcurso del año 1983 se logró clonar el gen de *c-fos* tanto de células humanas como de ratón (75,318). La diferencia principal entre *c-fos* y *v-fos*, es la delección de 104 pares de bases en la versión viral que corresponden a los aminoácidos del extremo carboxilo terminal. En esta delección, se pierde una región desestabilizante de c-Fos (PEST3, véase más adelante) que incluye dos sitios de fosforilación, la Serina 362 y la Serina 374; la proteína resultante tiene mayor estabilidad (237) y mayor actividad transformante que c-Fos (74).

El gen *c-fos* está localizado en el cromosoma 12q24.3-31. Tiene 4 exones altamente conservados entre especies que codifican para una proteína de 380 aminoácidos con un peso molecular aparente de entre 55 y 65 KDa (1).

Desde un punto de vista estructural c-Fos presenta tres dominios funcionales, del amino al carboxilo terminal presenta el dominio de unión al DNA (DBD, "DNA Binding Domain"), el dominio de dimerización (bZip) y el dominio de transactivación, como se esquematiza en la figura I.2.

El factor de transcripción c-Fos es expresado a muy bajos o indetectables niveles en casi todos los tipos celulares estudiados pero su transcripción aumenta abruptamente cuando es inducido por una gran variedad de estímulos (73,74,237). Además, si bien sus niveles de expresión son muy bajos, varían durante los distintos estadios del ciclo celular (46) y se observó que se requiere de la expresión de c-Fos para la progresión del ciclo ya que utilizando una

secuencia antisentido inducible de *c-fos* se inhibe la progresión del ciclo celular en células Swiss 3T3 (144).

Los ratones “knock out” para *c-fos* son viables y fértiles pero no forman osteoclastos y desarrollan osteopetrosis (163,327). Además estos muestran anomalías en el sistema hematopoyético (225).

Como la inducción de *c-fos* se produce como respuesta a diversos estímulos asociados con diferenciación, proliferación, muerte celular, etc, se cree que regula distintos genes blanco dependiendo del tipo celular y de la circunstancia particular en que se encuentra la célula en ese momento (212).

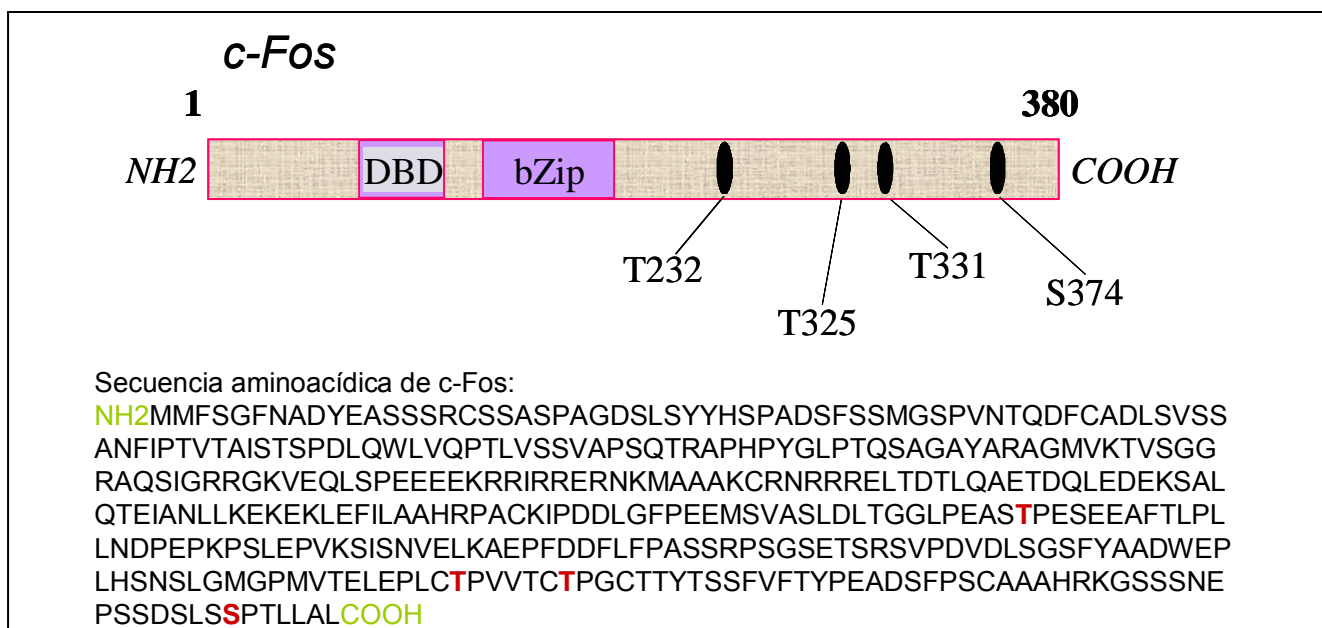


Figura 1.2.:

Esquema del factor de transcripción *c-Fos*.

Se representa la proteína *c-Fos*. Desde el extremo amino terminal al carboxilo terminal se observan el dominio de unión al DNA (DBD), el dominio de dimerización (bZip) y luego hacia el carboxilo terminal se encuentra el dominio de transactivación en el que se resaltan los residuos Serina o Treonina seguidos de Prolina que podrían ser fosforilados por MAPKs. En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia aminoacídica de *c-Fos* de ratón y en rojo los aminoácidos que son posibles blanco para MAPKs.

En cualquier evento en que *c-Fos* forme parte de AP-1 como factor de transcripción, actúa como heterodímero con proteínas de la familia Jun (73,106), por lo tanto los efectos inducidos por *c-Fos* son una consecuencia de efectos combinados sobre los factores *c-Fos* y Jun que forman AP-1. Un trabajo reciente muestra también que la heterodimerización de *c-Fos* con proteínas de la familia Jun regula el tráfico de *c-Fos* entre el núcleo y el citoplasma (195) donde la presencia de *c-Jun* inhibe la exportación de *c-Fos* del núcleo.

Cabe destacar que además de interactuar con Jun puede también interactuar con factores de transcripción como CREB y receptores nucleares formando heterodímeros, estos dímeros

entre distintas familias de factores de transcripción se unen a secuencias consenso diferentes a la secuencia TRE o AP-1 (122,192,315) regulando la transcripción de otros genes blanco.

Regulación de la expresión de c-Fos a nivel de la activación transcripcional.

El promotor de *c-fos* contiene un elemento SRE (“serum response factor”), un elemento SIE (c-Sis “Inducible Element”), un elemento TCF (“Ternary Complex Factor”) un elemento CRE (“Calcium Response Element”) y un sitio AP-1/CRE (303) (Figura I.3). Este promotor se induce en respuesta a una gran variedad de estímulos, por ejemplo, a través de la activación del receptor de EGF (EGFR) un receptor de tipo tirosina quinasa, que activa el promotor de c-Fos actuando a través de ERK2 (55).

El elemento SRE está involucrado en la inducción de c-Fos en respuesta a factores de crecimiento y a ésteres de forbol; el SRE une a la proteína SRF (“Serum Response Factor”) en asociación con TCF (“Ternary Complex Factor”), un complejo proteico que contiene a la proteína ELK-1 o a SAP-1, ambos blancos de fosforilación mediada por ERK2 o PKC (139,140,308,309) en respuesta a factores de crecimiento. También se observó que ELK-1 es fosforilada por JNK en respuesta a UV, induciendo también la transcripción de c-Fos independientemente de ERK2 (53) o fosforilada por p38 en respuesta a LPA en células de la glía (285). Además SRE es activado por el receptor muscarínico M1 (108), un receptor acoplado a proteína G actuando a través de Rho (108). SIE es un elemento que une STATs (signal transducers and activators of transcription) y TFII (Transcription Factor II) (339) y contribuiría a la inducción de c-Fos en respuesta a PDGF y a interferón gamma (255,321). El sitio CRE responde a aumentos en los niveles de AMPc activándose a través de la fosforilación de la proteína CREB mediada por PKA (115) o de CaM Kinasa que fosforila a CREB en respuesta a cambios en el Ca^{++} intracelular (35,81). El sitio AP-1 adyacente al SRE uniría heterodímeros AP-1 y también factores de transcripción CREB/ATF2, y actuaría regulando negativamente la transcripción de c-Fos por retroalimentación negativa (271,272).

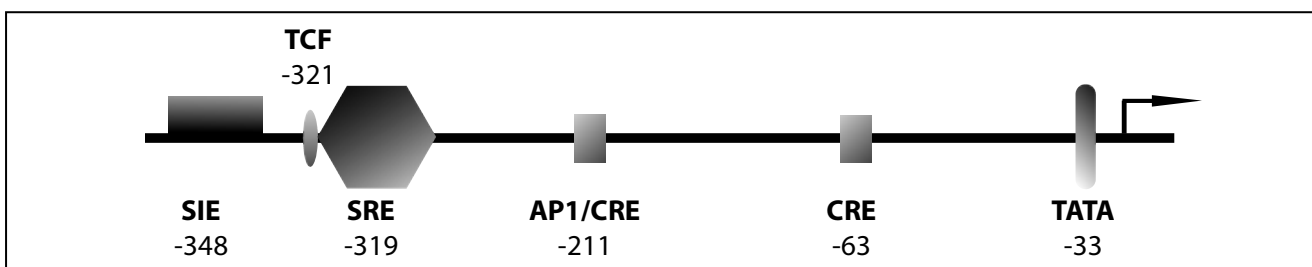


Figura I.3.:

Esquema del promotor de c-Fos.

En este esquema se muestran los distintos elementos de unión a factores de transcripción del promotor de c-Fos y la ubicación de los mismos; de 5' a 3' el elemento SIE (-348), un elemento TCF (-321), un elemento SRE (-319), un elemento AP-1/CRE (-211) y el elemento CRE (-63).

Los factores de transcripción que activan al promotor de *c-fos* deben estar fosforilados para inducir la transcripción del mismo. La desfosforilación de los factores de transcripción intervinientes en la expresión de *c-fos* podría actuar como un importante paso regulatorio en la persistencia de la expresión de *c-fos*. Como ejemplos, la fosfatasa PP1 desfosforila a CREB (121) y PP2A desfosforila a TCF ELK-1 (156), estos factores de transcripción desfosforilados no son capaces de activar la transcripción de sus genes blanco.

Regulación de la expresión de c-Fos a nivel del RNA mensajero.

El transcripto *c-fos* es sumamente transitorio. Se degrada rápidamente debido a que contiene secuencias ARE ("AU-rich element" o secuencias ricas en Adeninas y Uracilos, generalmente AUUUA) que confieren inestabilidad a los mensajeros que las portan. El transcripto de *c-fos* contiene dos secuencias ARE, una se encuentra en la región 3' no codificante y la otra en la zona codificante (134). Dichos motivos determinan que la vida media del ARN mensajero (mRNA) de este proto-oncogén sea de aproximadamente 15 minutos. Se ha propuesto que durante los momentos de máxima inducción del mRNA *c-fos*, la maquinaria responsable de la eliminación del mismo se satura y no es capaz de degradar todo el mRNA presente. En esta instancia la vida media del mismo se puede prolongar llegando hasta aproximadamente 90 minutos (6).

Regulación de la vida media de c-Fos.

La proteína c-Fos es muy inestable. Se sabe que este factor de transcripción es degradado por el proteasoma aunque la necesidad de ubiquitinación directa de c-Fos aún no está bien establecida (7,8,269). El proto-oncogén c-Fos contiene tres dominios PEST, (PEST1, PEST2 y PEST3) los cuales son regiones ricas en Prolina, Ac. Glutámico, Ac. Aspártico, Serina y Treonina que serían dominios desestabilizantes de proteínas (252,257). Particularmente el dominio PEST3 que comprende los veinte aminoácidos del extremo carboxilo terminal de esta proteína sería el dominio desestabilizante más fuerte ya que cuando se deleciona la región PEST3, c-Fos es dramáticamente estabilizada en células NIH y en células HeLa (226,310). Además existirían otros factores determinantes de la estabilidad de la proteína ya que, por ejemplo, en células asincrónicas Balb/c 3T3 la degradación de c-Fos estaría gobernada por el extremo carboxilo terminal, PEST3, mientras que en las mismas células pero sincronizadas estaría actuando una región del extremo amino terminal como factor desestabilizante. Fue hipotetizado que las condiciones que inducen la expresión de c-Fos, determinan los elementos desestabilizantes que tendrán mayor relevancia en la degradación de este factor de transcripción(104).

Además se ha descrito que otros elementos contribuyen a la degradación de c-Fos, por ejemplo se ha publicado que la formación de dímeros Fos-Jun promueve su degradación (231,240).

Regulación de la actividad de c-Fos. Modificaciones post traduccionales.

El factor de transcripción c-Fos está regulado finalmente a varios niveles; como mencionamos previamente es regulado a nivel de la activación transcripcional de su promotor, a nivel de la estabilidad del mRNA y a nivel de la estabilidad de la proteína. Además sus funciones son también reguladas por modificaciones post traduccionales. Una de las más estudiadas es la fosforilación, en parte debido a hallazgos previos que describen que la actividad como factor de transcripción de c-Jun es regulada por fosforilación (151). Esto llevó a estudiar si c-Fos es también fosforilado, y a investigar en que residuos y cuales son las enzimas involucradas en su fosforilación.

Uno de los primeros reportes en los que se estudió la fosforilación de c-Fos, muestra que esta proteína es fosforilada *in vitro* por PKA, PKC y p34cdc2 (2).

Se observó también, que la fosforilación de c-Fos en sitios ubicados entre los últimos 20 aminoácidos de c-Fos sería necesaria para que c-Fos pueda actuar como trans-represor de su propia expresión (224). Luego se determinó que c-Fos puede ser fosforilado *in vitro* en Serinas 362 por RSK y en Serina 374 por MAPK (56).

También se observó que c-Fos es fosforilado por la quinasa MOS (una quinasa producto del proto oncogén *c-Mos*) en Serina 362 y en Serina 374 y que esta fosforilación lleva a la estabilización de la proteína (226).

En 1994, Nel y colaboradores observaron que c-Fos es fosforilado por una quinasa de 65 KDa entre los residuos 359 y 370 en Linfocitos T y B (220), posteriormente en 1999 el mismo grupo identificó a RSK como la quinasa de 65 KDa que fosforila a c-Fos en el la Serina 362 (294).

Varios reportes postulan que la fosforilación de c-Fos en el extremo carboxilo terminal lleva a aumento en su actividad como factor de transcripción. Por ejemplo, la fosforilación de c-Fos en la Treonina 232 por una quinasa aún no caracterizada de aproximadamente 85 KDa llamada FRK por "Fos Related Kinase" conlleva un aumento en la capacidad transcripcional de c-Fos (86).

En el año 1996 se ha reportado que la fosforilación del extremo carboxilo terminal de c-Fos activa su capacidad transformante (58) y luego se encontró que este efecto sería dependiente de la fosforilación *in vivo* de las Serinas 362 y 374, por RSK y ERK1/2 respectivamente.

Además se ha estudiado que la fosforilación de c-Fos en Serina 362 y Serina 374, permite la posterior fosforilación de las Treoninas 331 y 325 por ERK2 modulando la transformación inducida por c-Fos (217). Otro trabajo muestra la fosforilación en el extremo carboxilo terminal de c-Fos por ERK2 en las Treoninas 232, 325, 331 y en la Serina 374 en respuesta al factor de

crecimiento derivado de plaquetas, PDGF, estas fosforilaciones aumentan la actividad transcripcional de c-Fos y aumentan su capacidad transformante (211).

Otra MAPK, JNK, puede fosforilar a c-Fos en respuesta a H₂O₂, inhibiendo su degradación por el proteasoma (64). El factor de transcripción c-Fos puede también ser fosforilado por ERK5 y ensayos de actividad de genes reporteros muestran que lleva a un aumento en su capacidad transcripcional (301).

Además c-Fos puede ser fosforilado en el extremo amino terminal en Tirosinas. Particularmente la fosforilación en las Tirosinas 10 y 30 está involucrada en una función de c-Fos no relacionada con su actividad como factor de transcripción sino con su capacidad de asociarse a las membranas del retículo endoplasmático activando la síntesis de fosfolípidos (242).

Todos estos estudios muestran que c-Fos es una proteína que puede ser fosforilada en múltiples residuos por distintas quinasas, probablemente en función del contexto celular que induce su fosforilación. Sin embargo, aún no se comprenden claramente los mecanismos que llevan a la fosforilación de c-Fos en respuesta a distintos estímulos ni cuales son las consecuencias fisiológicas de dichas fosforilaciones.

Existen otras modificaciones post traduccionales que se adicionan sobre c-Fos, aunque el estudio de cada una de ellas es todavía mas limitado que el estudio de la fosforilación. Por ejemplo c-Fos puede ser isomerizado mediante la isoprolil isomerasa PIN1, una cis-trans isomerasa que interacciona con proteínas fosforiladas en Serinas o Treoninas seguidas de Prolina (pS/T-P) que puede unirse a c-Fos fosforilado en el extremo carboxilo terminal aumentando la capacidad transcripcional de c-Fos en respuesta a PDGF (210). Otro tipo de modificaciones post traduccionales observada, es la o-glicosilación de c-Fos la cual fue determinada en nuestro laboratorio con colaboración del grupo de Dr. Julio Caramelo. También se ha estudiado que c-Fos puede ser sumoilado *in vivo* y que esta sumoilación lleva al la disminución de la actividad de c-Fos como factor de transcripción (41). Y por último se ha estudiado que c-Fos puede ser ubiquitinado *in vivo* aunque esta ubiquitinación no estaría relacionada con su degradación (40) ya que no se requiere que esté ubiquitinada para ser degradada por el proteasoma.

Rol de c-Fos en la transformación celular.

Análisis estructurales y funcionales revelaron que para que pueda actuar en transformación celular son necesarios los dominios de dimerización, de unión al DNA y de transactivación (110,157,222,275,342).

Se han realizado numerosos estudios en los cuales se induce o se sobreexpresa c-Fos para encontrar cual es el efecto fisiológico resultante de la expresión de esta proteína. Se observó que la acumulación de c-Fos por encima de sus niveles fisiológicos es suficiente para inducir transformación celular (208) y para inducir tumores de hueso en ratones transgénicos. La

sobreexpresión de este factor de transcripción (41,261) produce la transformación de condreoblastos y osteoblastos formando osteosarcomas (116), y establece a esos dos tipos celulares como blancos de la tumorigénesis inducida por c-Fos.

En los osteosarcomas inducidos por c-Fos se observan niveles elevados de ciclina D1 sugiriendo que contribuye a la regulación de genes responsables de la progresión del ciclo celular *in vivo* (291). Además se ha observado que en líneas celulares de osteoblastos que expresan c-Fos de manera inducible, se acelera la proliferación celular y aumentan los niveles de expresión de ciclina E y ciclina A en función de la expresión de c-Fos (292).

El impedimento de la expresión de este gen de respuesta temprana utilizando un antisentido inducible de *c-fos* inhibe la progresión del ciclo celular en fibroblastos de ratón e inhibe la formación de tumores de mama en ratones "nude" (23,49,144). En la misma línea de resultados la microinyección de anticuerpos anti c-Fos perjudica la entrada en el ciclo celular estimulada por suero (175). Además c-Fos coopera con c-Jun en la transformación de fibroblastos de ratón (276) y se requiere para la formación de tumores de piel (267).

También se ha estudiado que c-Fos aumenta la expresión de genes relacionados con invasión celular y angiogénesis como metaloproteasas y colagenasas (MMP-1, MMP-9, MMP-13, colagenasa tipo I y colagenasa tipo V) (13,17,31,183), sugiriendo para esta proteína un fuerte rol en la invasividad de tumores (146). Consistentemente, la sobreexpresión de c-Fos promueve el crecimiento invasivo de células sobre geles de colágeno (253).

Sin embargo, otros reportes muestran que Stem cells y fibroblastos que no expresan c-Fos pueden proliferar normalmente en cultivo (49) o que se necesita microinyectar un conjunto de anticuerpos anti cada uno de los miembros de la familia c-Fos juntos para que se pueda detener la progresión del ciclo celular (175).

Rol de c-Fos en Apoptosis.

Diversos estudios postulan a c-Fos como un agente pro-apoptótico. Por ejemplo, se ha observado que se induce la expresión de c-Fos en la involución del tejido mamario y durante la regresión de la próstata inducida por castración (51,202). Otros trabajos muestran que la expresión ectópica de c-Fos induce la muerte celular de linfocitos B inmaduros y en una línea celular mieloide (147).

Sin embargo, la apoptosis ocurre normalmente en células del sistema nervioso de ratones neonatos deficientes de c-Fos, y en el timo y ovarios de ratones adultos *c-fos* *-/-* (256).

Algunos reportes que postulan a c-Fos como anti-apoptótico muestran por ejemplo que la expresión de c-Fos correlaciona negativamente con muerte neuronal en hipocampo (347). Otro grupo observa que timocitos *c-Fos* *-/-* son hipersensibles a la apoptosis inducida por agentes diversos (154).

La transcripción de c-Fos es inducida por UV y además se ha observado que el mRNA de c-fos es estabilizado en respuesta a luz UV (36). La ausencia de c-Fos (fibroblastos c-Fos -/-) en células expuestas a agentes que dañan el DNA muestra que estas células son hipersensibles a la apoptosis y a daños en el DNA, proponiendo nuevamente a c-Fos como una agente anti-apoptótico (164).

Las controversias del rol de c-Fos tanto en apoptosis como en transformación celular podrían explicarse teniendo en cuenta los múltiples mecanismos que regulan su función, los diferentes contextos celulares en los que se estudia a c-Fos y la variedad de heterodímeros en los que puede formar parte, regulando de esa manera la expresión de grupos de genes diferentes que determinen el destino final de la célula.

En resumen:

-c-Fos Forma parte de AP-1

-La expresión de c-Fos es regulada a múltiples niveles que incluyen la activación del promotor, la estabilidad del mensajero y la estabilidad de la proteína.

-c-Fos es una proteína que se hiperfosforila en respuesta a una amplia variedad de estímulos y que también puede sufrir otras modificaciones post-traduccionales como isomerización, sumoilación, etc. Todas las modificaciones post traduccionales estudiadas le confieren a la proteína diferentes propiedades que tienen una implicancia directa en su actividad.

-La actividad de c-Fos también está regulada a nivel de la dimerización con otros factores de transcripción. Si bien la heterodimerización c-Fos/c-Jun es la mas estudiada puede dimerizar con otros miembros de la familia de factores de transcripción Jun e inclusive con otros factores de transcripción como CREB.

-c-Fos está relacionada con transformación celular, con proliferación y en ciertos casos con efectos anti o pro-apoptóticos.

Otros componentes de la familia Fos.

Fra

Utilizando anticuerpos anti-Fos se identificaron entre los polipéptidos de AP-1 purificados por cromatografía de afinidad, otras proteínas diferentes a c-Fos. Dado su parentesco a nivel antigénico, estas fueron bautizadas Fra (por "Fos Related Antigens") (61) Fra-1 y Fra-2, que son

inducidas en circunstancias similares a las que inducen c-Fos. Como es lógico de esperar a partir de los datos de reactividad inmunológica cruzada, todas ellas presentan numerosas regiones de homología pero carecen del dominio de transactivación. Sin embargo la sobreexpresión de Fra1 y Fra2 en ratones transgénicos lleva a la formación de tumores de pulmón y epiteliales respectivamente, y a un aumento de la masa ósea en estos ratones (160). Se postula que la dimerización con un miembro de la familia Jun con su dominio de transactivación intacto es suficiente para que el dímero pueda activar su capacidad transcripcional sobre promotores que unen AP-1. Los ratones “Knock out” para Fra1 son letales en el estado embrionario E 9.5 y los “Knock out” para Fra2 son letales al nacimiento, afectándose la placenta y tejidos extraembrionarios en el caso de Fra1 y hueso, corazón y estómago en el caso de Fra2 (94).

Fos B

Por medio de un rastreo de ADN copia (cDNAs) a baja rigurosidad utilizando como sonda un fragmento de *c-fos*, Zerial y colaboradores (346) identificaron un nuevo miembro de la familia de genes relacionados con *fos*. Este gen llamado *fosB*, codifica para una proteína que presenta un 70 % de homología con c-Fos y Fra1 cuyo mensajero se induce fuertemente tras la activación de la proliferación de células estacionarias en cultivo. La existencia de una zona de clara divergencia con la secuencia de c-Fos permite anticipar que FosB posee características únicas que la diferenciarían funcionalmente de los otros miembros de la familia Fos. Además por “splicing” alternativo se puede expresar una variante llamada Δ FosB con características propias. A pesar de tener un alto potencial oncogénico *in vitro* la sobreexpresión de FosB en ratones transgénicos no conlleva al desarrollo de tumores (116).

Proteínas de la familia JUN.

c-Jun

Como mencionamos previamente el oncogén *v-jun* fue descubierto como parte del genoma del virus del sarcoma aviar 17 el cual fue encontrado en un sarcoma espontáneo de pollo adulto.

Su homólogo en mamíferos, c-Jun, contiene en su secuencia aminoacídica varias zonas características. Desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal existen en este orden: una zona o dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN y un dominio de dimerización (Esquema en la figura I.1.).

La proteína c-Jun es fosforilada en 5 sitios principalmente (151). Dos de esos sitios están situados en el extremo amino-terminal y corresponden a las serinas 63 y 73. A principios de la década del ‘90 fue postulado que las MAPKs dependientes de Ras (ERK1/2) serían responsables de estas fosforilaciones. Sin embargo, una serie de elegantes estudios permitieron descubrir y

caracterizar a JNK como la quinasa que fosforilaba a c-Jun. La zona de c-Jun ubicada inmediatamente hacia el extremo amino terminal de las Serinas 63 y 73 es necesaria para la unión con la proteína quinasa JNK, la cual cuando es activada por los componentes de su cascada de transducción fosforila dichas Serinas liberando un factor transcripcional c-Jun activo.

Otros tres sitios de fosforilación, están localizados en el dominio de unión a ADN y son Treonina-231, Serina-243 y Serina-249. Estos sitios son desfosforilados por expresión de varios oncogenes aumentando la actividad de unión al ADN de c-Jun. La fosforilación en estos tres sitios presenta un efecto negativo o inhibitorio sobre la actividad transcripcional.

El factor de transcripción c-Jun puede homodimerizarse, dimerizarse con miembros de su propia familia o heterodimerizarse con miembros de la familia Fos u otros factores de transcripción como CREB. La regulación de su actividad es ampliamente estudiada. Al igual que sucede con c-Fos, la actividad de c-Jun está relacionada con formación de tumores y con apoptosis dependiendo del contexto celular (137). Los ratones “knock out” para c-Jun son letales en el período embrionario E 12.5, afectándose principalmente el desarrollo del hígado, corazón y cresta neural (94).

Jun B y Jun D.

Preparaciones de AP-1 realizadas por cromatografía de afinidad contienen numerosos polipéptidos en el rango de peso molecular de 35 a 50 KDa. Además de las que ya hemos mencionado, otras proteínas han sido identificadas en esas preparaciones, tal es el caso de los componentes de la familia multigénica de c-Jun llamados JunB y JunD de 42 y 43 kDa respectivamente (262,263). Estas dos proteínas comparten entre sí y con c-Jun regiones de homología en el extremo carboxilo terminal (dominio de unión al ADN y dominio de formación del cierre de leucinas) y en el extremo amino terminal (dominio de activación génica). Se ha comprobado que todas las proteínas Jun pueden formar homo y heterodímeros.

Los ARN mensajeros que codifican para estas tres proteínas están presentes en una gran variedad de tejidos de ratón y en diferentes líneas celulares. Al contrario de lo que ocurre con la transcripción de *c-jun* y de *junB* que son fuertemente estimulados por tratamiento con suero o con TPA de fibroblastos NIH3T3 en reposo, la transcripción de *junD* no es estimulada significativamente en esas condiciones y sus niveles de expresión son más bien altos y constantes. De ese modo *junD* parece estar regulado en forma diferente de los otros dos genes. También existe una notable diferencia en la distribución en tejidos de los ARN mensajeros de *junD* con respecto a los de *c-jun* y *junB*. Todo esto sugiere que cada uno de estos productos génicos relacionados a Jun podrían tener un rol diferencial en el control de la actividad génica y en el crecimiento de los organismos (332).

Tanto c-Jun como JunB y JunD muestran similares especificidades de unión al ADN. También presentan similitud en su capacidad de interactuar con Fos. Los sitios de ADN que

reconocen AP-1 (TRE) son también reconocidos por dímeros de JunB y JunD, pero mientras que c-Jun es un eficiente inductor de la actividad transcripcional, JunB y JunD no parecen serlo (87). Por el contrario, un exceso de cuatro veces JunB sobre c-Jun inhibe la transactivación de genes reporteros bajo el control de elementos TRE. Este efecto se debe a la sustitución de cuatro residuos aminoacídicos clave en los dominios de unión al ADN y de dimerización. Cuando por mutagénesis puntual, esos aminoácidos en Jun B son reemplazados por los correspondientes en c-Jun, el Jun B mutante que resulta de dicha manipulación se convierte en un fuerte transactivador. Aún así, se ha reportado que la forma salvaje de JunB podría actuar como activador en ciertas condiciones particulares, como es el caso en los que en un promotor hay varios sitios AP- 1 juntos ubicados en tandem (137). Los ratones “Knock out” para JunB son letales en el estado embrionario E10 y se ven principalmente afectados los órganos extraembrionarios como la placenta (94).

La proteína JunD regula negativamente la proliferación celular y su rol anti-oncogénico está bien establecido (236), sin embargo, ratones “knock out” para JunD son viables y no desarrollan tumores espontáneamente (302). Por otra parte los ratones “Knock out” para JunD machos son infértiles (94).

MAPKs

Que son las MAPKs?:

Se conocen como cascadas de proteínas quinasas a los eventos secuenciales de fosforilación en los cuales una serie de proteínas quinasas fosforila y regula la actividad de la siguiente.

Un ejemplo clásico de este fenómeno esta dado por la cascada de proteínas quinasas activada por mitógenos (“Mitogen Activated Protein Kinases” o MAPKs), la cual es activada como respuesta celular a una gran variedad de estímulos. Filogenéticamente las MAPKs pertenecen al grupo de proteínas quinasas CMGC (“Coeliac Mesenteric Ganglion Complex”), que también incluye a las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), a las quinasas de la familia de Glicógeno sintetasa y a las quinasas CDKs-“Like” (166,196). Las MAPKs son enzimas ubicuas que se encuentran muy conservadas en Hongos, Plantas y animales. Cada MAPK encontrada posee con ERK1 (la primera MAPK descubierta), aproximadamente un 40% de identidad en la secuencia aminoacídica del dominio con actividad quinasa.

Definimos a las MAPKs como proteínas quinasas que son activadas por fosforilación dual de los aminoácidos Treonina y Tirosina, los cuales se encuentran separados por un residuo, conformando el motivo TXY, donde la letra X puede representar varios aminoácidos distintos. La identidad del aminoácido presente en la posición indicada por “X” define a las distintas subfamilias

de MAPKs. Actualmente están siendo descritas un número creciente de enzimas relacionadas y estas presentan, al menos, tres tipos distintos de aminoácidos entre Treonina y Tirosina, lo cual implica que, por lo conocido hasta el momento, se pueden definir tres subgrupos o subfamilias (subfamilia ERK, subfamilia p38 y subfamilia JNK) (figura I.4.).

No obstante, no todas las MAPKs son reguladas de esta manera, ya que este motivo TXY está ausente en ERK3 y en ERK4 en donde una Glicina o un ácido Glutámico reemplaza a la Tirosina. ERK7 contiene el motivo TXY, que no sería fosforilado por una MAPKK, sino por autofosforilación (68).

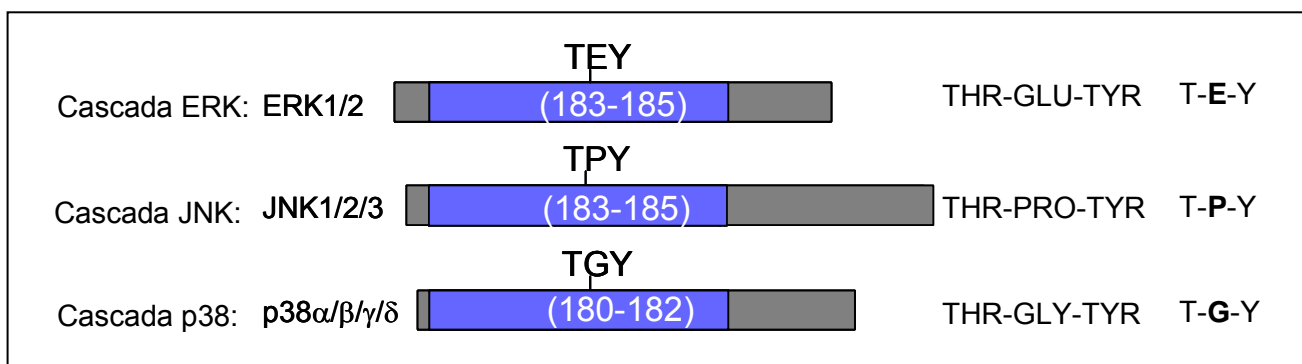


Figura I.4.:

Sitios consenso de fosforilación por MAPKKs (quinasas de fosforilación dual) sobre MAPKs. Se indican las tres cascadas más estudiadas de MAPKs, junto con los miembros más representativos de cada una. Las MAPKs son reguladas por la fosforilación dual de residuos treonina y tirosina en los aminoácidos que se muestran en blanco en los esquemas. La pertenencia a una dada familia de MAPKs es determinada por el residuo que se encuentra entre los sitios de fosforilación.

Las MAPKs son de localización predominantemente citoplasmática en células quiescentes. Sin embargo activación de las células con suero resulta en un aumento considerable de la cantidad de enzima presente en el núcleo. Las MAPKs pueden traslocar la membrana nuclear y esa traslocación estaría relacionada con su estado de activación (167). De hecho, algunos autores muestran como índice inequívoco de activación la presencia de una mayor cantidad de enzima localizada en el núcleo. Esta característica es compatible con el hecho de que la mayoría de los sustratos de MAPKs son proteínas que se unen en forma directa al ADN y regulan la síntesis de ARN mensajeros (factores de transcripción).

Cascadas de activación de MAPKs.

En mamíferos se conocen 14 genes para MAPKs y 7 vías de señalización (68).

Las cascadas que involucran MAPKs están clásicamente organizadas en pasos secuenciales que involucran distintas proteínas quinasas. La primera quinasa que debe activarse

para iniciar la cascada es la MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa, o sea, una quinasa que fosforila a la quinasa de la MAPK), luego una MAPKK (MAP quinasa quinasa, una quinasa que fosforila a la MAPK) y por último la MAPK propiamente dicha. Una vez activadas por fosforilación, las MAPKs puede fosforilar a una gran variedad de sustratos presentes en diferentes compartimentos intracelulares.

Se postula que la diferencia en el aminoácido que define las subfamilias sería importante en el reconocimiento de la MAPK por su MAPKK activadora, dando especificidad a las vías de activación.

Las MAPKs han sido llamadas frecuentemente "enzimas dirigidas por prolina" dado que fosforilan Serinas o Treoninas presentes en motivos Ser-Pro o Thr-Pro (277). Estos pares pueden estar dentro de una mas compleja secuencia consenso que es ampliamente aceptada como la secuencia de reconocimiento para sus sustratos [(Pro/residuo no polar)-Leu-(Ser/Thr)-Pro]. La figura 1.5. muestra una lista de sustratos para miembros de distintas MAPKs junto con sus secuencias de fosforilación consenso.

Cada subgrupo presenta una especificidad de sustrato restringida, sin embargo, tanto proteínas del núcleo como del citoplasma son blanco de la acción de las MAPKs. Como ejemplo se pueden mencionar: factores de transcripción, enzimas metabólicas, proteínas del citoesqueleto, reguladores del ciclo celular, y también, otras quinasas.

Núcleo	ELK-1	PRO-ARG- <u>SER</u> -PRO
	c-Jun	PRO-LEU- <u>SER</u> -PRO
	c-MYC	PRO-LEU- <u>SER</u> -PRO
Superficie Celular	EGF-r	PRO-LEU- <u>THR</u> -PRO
	PLA-2	PRO-LEU- <u>THR</u> -PRO
Quinasas	MAPKAP2	PRO-GLN- <u>THR</u> -PRO

Figura 1.5.:

Secuencias consenso de reconocimiento y fosforilación por proteínas quinasas.

Se incluyen una variedad de sustratos para las distintas MAP quinasas indicando si son proteínas nucleares, de membrana o quinasas solubles y se detalla la secuencia aminoacídica que rodea a la Serina o Treonina blanco.

Comienzo de la activación.

La manera clásica en que se inicia la activación de las vías de MAPKs es a través de la activación de distintos tipos de receptores, por ejemplo, receptores acoplados a proteínas G o receptores del tipo Tirosina quinasa.

Los receptores Tirosina quinasa, experimentan una secuencia de activación que incluye cambios conformacionales y fosforilaciones (autofosforilaciones) de residuos de Tirosina localizados en la porción citoplasmática del receptor. Esto da como resultado la activación de la actividad Tirosina quinasa del receptor, que ahora es capaz de fosforilar proteínas citoplasmáticas que pueden transmitir la señal en el interior de la célula (204). Las proteínas fosforiladas por el receptor pueden ser de dos tipos: proteínas adaptadoras que pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o bien factores o enzimas directamente transductores/as que tras unirse al receptor son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo como las proteínas G pequeñas (Ras, Rac, Rho, cdc42) que luego llevan a la activación de las MAPKKKs.

Inclusive señales ambientales como luz UV o H_2O_2 podrían actuar activando esta clase de receptores. Por ejemplo, Huang y colaboradores muestran la activación del receptor de EGF ("Epidermal Growth Factor Receptor") por UV y por H_2O_2 , y sugieren que la formación de radicales libres de oxígeno que se produce en la célula como consecuencia de estos estímulos sería el factor activador del EGFR (150) en estos casos.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen una gran superfamilia de proteínas que actúan como transductores de señales a través de la membrana celular: en el exterior reciben un ligando (o un foton), y en el interior celular activan proteínas G heterotriméricas. El receptor presenta una estructura característica con siete pasos de membrana, su extremo amino terminal proyectado hacia el exterior y su extremo carboxilo terminal hacia el lado citoplásmico en donde se acopla una proteína G heterotrimérica. Estas, compuestas por las subunidades α , β y γ se encuentran acopladas al receptor cargadas con GDP mediante la subunidad α del complejo. Cuando el receptor se activa, la subunidad α intercambia el GDP por GTP y el complejo se disocia en la subunidad α y el dímero β - γ . Tanto la subunidad α como la β - γ pueden activar vías de señalización pero el camino clásico o mas estudiado es el que involucra la activación a través de la subunidad α (113).

De esta manera, estos receptores controlan la actividad de las distintas MAPKs llevando a la activación de la MAPKKK que a su vez activa a la MAPKK y esta a la MAPK (119,201).

Un ejemplo de receptores acoplados a proteínas G efectoras es el receptor muscarínico M1. Este receptor se ha utilizado como modelo en el estudio de señales proliferativas activadas por receptores acoplados a proteínas G (120) ya que induce la transformación celular cuando es

estimulado con el agonista Carbacol. Se ha observado que la activación de M1 induce la activación de JNK actuando a través de las proteínas G pequeñas Rac y Ras (67).

Suele ocurrir que un mismo estímulo active varias vías de señalización por MAPKs. El destino celular final sería el resultado del balance de la activación de las diferentes vías. En la figura I.6. se esquematizan las cascadas clásicas de MAPKs.

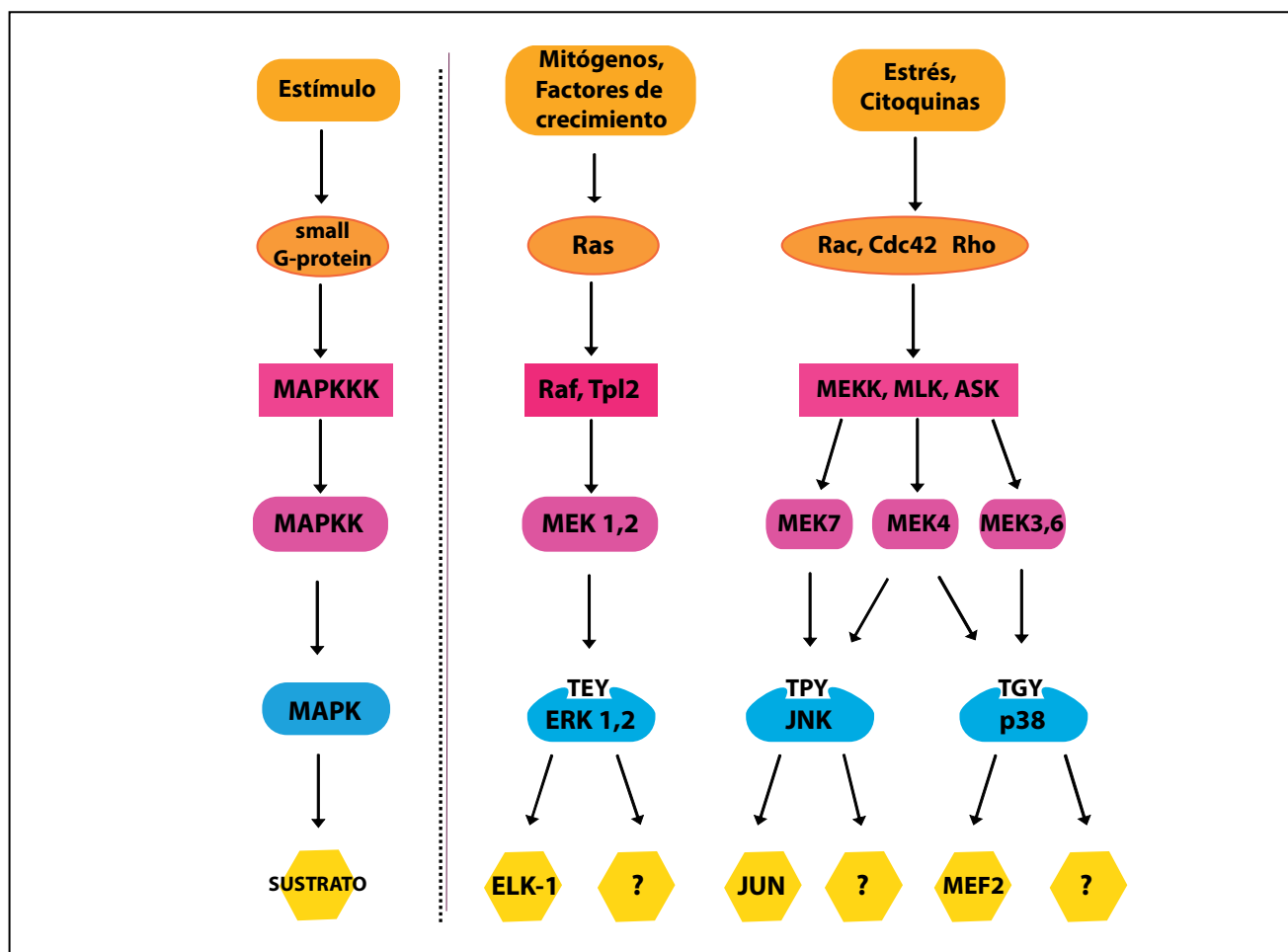


Figura I.6.:

Cascadas de MAPKs. Diversos estímulos activan factores intercambiadores (GEFs), los cuales cargan GTP sobre pequeñas proteínas G (activación). Estas a su vez, son capaces de activar una cascada de fosforilación, finalizando en la fosforilación y activación de MAPKs. Las MAPKs activas, son capaces de fosforilar diversos sustratos, en su mayoría factores de transcripción.

Apagado de las vías de señalización.

El apagado de la señal se debe, al menos en parte, a la acción de fosfatasa sobre las quinasas intervinientes (228). Las enzimas de las cascadas que involucran MAPKs (MAPKKK,

MAPKK y MAPK) se activan por fosforilación y es por ello que diversas fosfatasas tienen un rol fundamental en la regulación de la actividad de estas quinasas.

Participan en la defosforilación de las MAPKs las fosfatasas de especificidad dual, DSP (“dual specificity phosphatases”), que defosforilan tanto a las Tirosinas como a las Treoninas del sitio de activación. Las fosfatasas duales que actúan sobre MAPKs se llaman MKPs, por “MAPK Phosphatases”.

Un poco de historia.

A comienzos de los años noventa se dedicó un gran esfuerzo al estudio de varios oncogenes tal como la Tirosina quinasa v-Src, la Serina-Treonina quinasa como v-Raf y la pequeña proteína G (que une GTP) codificada por el oncogén v-ras. En conjunto, estos estudios permitieron determinar la gran importancia del proceso por el cual los receptores para factores de crecimiento de tipo Tirosina quinasa transmiten señales hacia el interior de la célula.

Por autofosforilación de residuos de Tirosina en el receptor mismo, se promueve la unión de proteínas adaptadoras con sitios de unión a fosfo-Tirosina, SH2 (Src “Homology” 2). Una de estas proteínas (Grb2) es capaz de unirse a través de su dominio SH2 al receptor fosforilado y por medio de sus dominios SH3 (Src “Homology” 3) a la proteína SOS, quien es a su vez un intercambiador de nucleótidos para Ras. Esta unión produce una aceleración del intercambio de GDP por GTP, lo cual resulta en una proteína Ras (Ras-GTP) activada, la cual es capaz de transducir la señal a sus moléculas efectoras (60).

Durante la búsqueda inicial de proteínas quinasas que fueran activadas por factores de crecimiento que estimulan receptores del tipo Tirosina quinasa, Cobb y colaboradores (62,63) encontraron una nueva proteína quinasa de 42 KDa activada por Insulina, a la que llamaron ERK1, Extracellular Regulated Kinase 1 o p42MAPK. Luego otros grupos observaron que requiere de la fosforilación dual en Treonina y Tirosina para su completa activación (251,258) y que una vez activada fosforila residuos Serina o Treonina. En los años siguientes lograron clonar y caracterizar otras dos ERKs activadas por factores de crecimiento, ERK2 y ERK3, describiendo que estas quinasas podrían servir de intermediarias entre la activación de receptores y la fosforilación en Serinas y Treoninas de ciertas proteínas intracelulares (43).

Las quinasas ERK1 y ERK2 han sido ampliamente estudiadas y se encontró que su función es importante en proliferación celular, supervivencia, diferenciación, etc (97,98).

En pocos años, otras MAPKs fueron rápidamente identificadas, se clonaron las MAPKs de la subfamilia de SAPKs (“Stress activated proteína Kinases”) como JNK y p38 MAPKs (88,124).

Además han sido clonadas y estudiadas otras MAPKs como ERK 5, 7, 8; y los otros miembros de la familia de p38 (p38 β , p38 γ , p38 δ). En algunos reportes a las p38 γ y p38 δ se las llama ERK6 y SAPK4 respectivamente.

Una gran variedad de trabajos se han enfocado al estudio de las características estructurales de las MAPKs y se han cristalizado ERK1/2, p38 y JNK (188). Estos estudios mostraron que estructuralmente estas enzimas están compuestas por dos dominios, un dominio amino terminal compuesto por laminas β y dos hélices α y un dominio carboxilo terminal con varias hélices, cuatro hojas β cortas y varios residuos involucrados en la catálisis (312). El sitio catalítico, en donde se une el ATP y dos iones de Magnesio, está ubicado entre el carboxilo y el amino terminal. Lo que distingue a las MAPKs de otras quinasas es una inserción de aproximadamente 50 aminoácidos “the MAPK insertion” en el extremo carboxilo terminal de la proteína (60).

Proteínas de andamiaje.

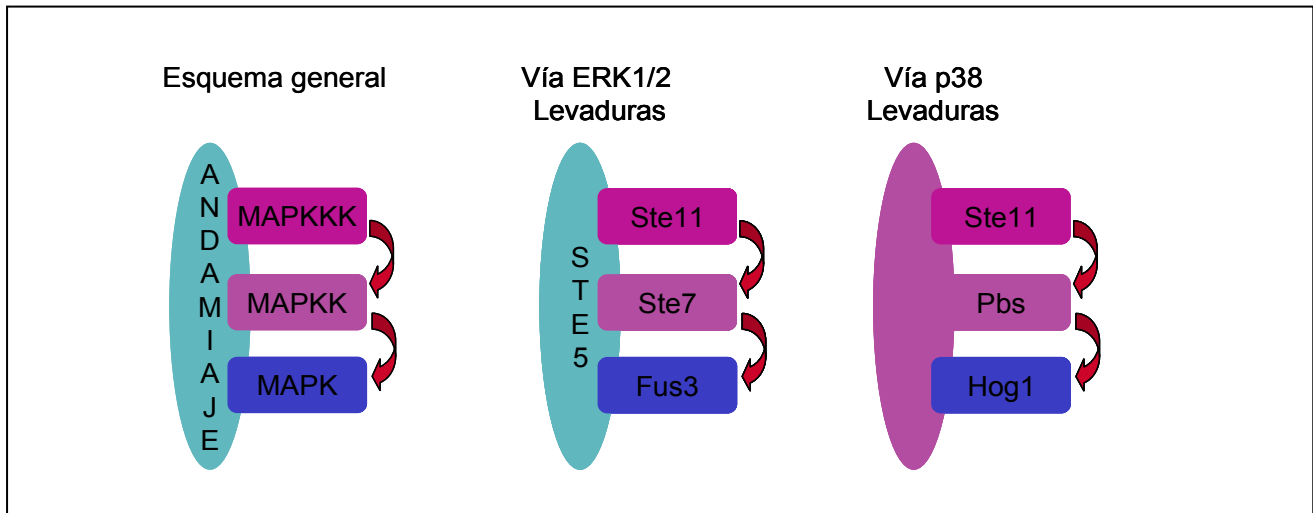
La eficiencia y especificidad de cada vía de MAPKs esta dada entre otras cosas por proteínas que logran reunir los diferentes módulos de MAPKKK-MAPKK-MAPK. Reciben el nombre de proteínas “scaffold” o de andamiaje y fueron descritas por primera vez en levaduras (214).

Las proteínas de andamiaje organizan a la cascada y permiten que los distintos componentes se encuentren e interaccionen, formando un módulo funcional. Por ejemplo, la fosforilación dual de ERK por MEK (su MAPKK) no se realiza en solución pero si en presencia de su proteína de andamiaje (172).

Se conocen diferentes tipos de proteínas de andamiaje. El ejemplo mas conocido es el de Ste5, la proteína de andamiaje que en levaduras permite la interacción de Fus3 (homólogo de ERK) con Ste7 (homólogo de MEK) permitiendo que funcione la cascada que involucra a Ste11 (MAPKKK), Ste 7 (MKK) y Fus3 (MAPK) (Figura I.7.).

En el caso de Hog1 (homólogo de p38 en levaduras) no participa una de andamiaje propiamente dicha, sino que el activador río arriba de Hog1 funciona como tal, en donde además de permitir la interacción con p38 y fosforilarlo, sirve de plataforma para su propia quinasa activadora, Ste11 (Figura I.7.). Esto ejemplifica como una misma MAPKKK, Ste11, puede activar distintas MAPKs en función de cuál sea la proteína de andamiaje a la que se une.

Otro ejemplo conocido es el que involucra al factor de transcripción de levaduras Ste12, que es activado por las quinasas Fus3 y Kss1, que activa diferentes grupos de genes dependiendo del estímulo y de que quinasa lo activa (345).

**Figura 1.7.:****Proteínas de andamiaje.**

Esquema que muestra como las proteínas intervinientes en las cascadas de MAPKs pueden activarse por fosforilación al anclarse a las proteínas de andamiaje correspondiente. De izquierda a derecha: esquema general, esquema que muestra la vía de ERK1/2 en Levaduras y por último la vía de p38 en Levaduras.

ERK1/2

Durante la búsqueda inicial de moléculas mediadoras de la respuesta mitogénica a factores de crecimiento se identificó una proteína fosforilada en Tirosina de 42 Kd (62,63). El clonado de esta molécula y una altamente relacionada, p44MAPK, reveló que pertenecían a una gran familia de Serinas-Treoninas quinasas relacionadas a las quinasas Fus3 (una MAPK de levadura relacionada a respuesta de feromonas) y Kss1 (quinasa supresora de SST2, una MAPK de levadura involucrada en el crecimiento filamentoso) de la levadura *Sacchomyces cerevisiae*. Estas enzimas de levaduras actúan en el último paso de una cascada de quinasas (43,44) que participan en la respuesta de maduración inducida por feromonas (136). Las versiones de mamíferos, p44MAPK y p42MAPK, también conocidas como ERK1 (“Extracellular Regulated Kinase” 1) y ERK2 respectivamente, son componentes centrales de los caminos de proliferación, se expresan en todos los tejidos estudiados y comparten un 83% de identidad.

Activación de ERK1/2.

Como mencionamos previamente, distintos receptores de membrana como los receptores de factores de crecimiento de la clase Tirosina quinasa o los receptores acoplados a proteínas G son capaces de activar MAPKs. Cuando los ligandos se unen a sus receptores específicos se

desencadenan eventos de activación secuencial de proteínas quinasas que llevan a la activación de MAPKs.

Las quinasas ERK1 y ERK2 son activadas por la fosforilación dual de los residuos Treonina 183 y la Tirosina 185 por la MAPKK MEK1 o MEK2 que a su vez se activa por la MAPKK Raf en respuesta a factores de crecimiento, suero, etc.

La primera cascada en ser caracterizada desde la membrana celular a la MAPK involucra: al receptor para factores de crecimiento activado, a Ras y la vía de señalización Raf-MEK-Erk, junto con las proteínas scaffold o de andamiaje que permiten que se complete la cascada. El ejemplo más estudiado de activación de ERK2 por receptores de tipo Tirosina quinasa es el que involucra al receptor de EGF (EGFR). Cuando el EGF se une a su receptor produce la fosforilación de diversas moléculas, incluidas el mismo receptor (314). Esta auto-fosforilación, sirve como sitio de anclaje para proteínas adaptadoras que incluyen, entre otras, a Grb2 (274). Por lo tanto, la activación del EGFR, permite la unión de Grb2, lo que resulta en el reclutamiento de la proteína SOS ("Son of Sevenless"). Esta proteína estimula el intercambio de GDP por GTP en la pequeña proteína Ras (una pequeña proteína G que une GTP) (92). Ras unido a GTP inicia la cascada de proteínas quinasas que incluyen, secuencialmente, a la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) "Raf", que fosforila y activa a la MAPK quinasa (MAPKK) "MEK", que a su vez fosforila y activa a la MAPK, "ERK1/2" (233,270,316). La MAPK luego fosforila y regula la actividad de distintas enzimas y de proteínas nucleares que finalmente regulan la expresión de genes esenciales para la proliferación celular (79).

Las enzimas MAPKKK y MAPKK se encuentran en el citoplasma y ERK transloca al núcleo después de ser activada. De esta manera se completa el circuito capaz de transducir mensajes desde la membrana plasmática hasta factores nucleares que activan la transcripción génica.

Regulación por fosfatasas.

La desfosforilación de la fosfo-Tirosina o de la fosfo-Treonina del sitio de activación de ERK1/2 causa el decaimiento de su actividad. La MAPK fosfatasa, MKP3 defosforila a ERK2 (348) tanto en la Treonina como en la Tirosina del sitio de activación de ERK2. Además actúan defosforilando a ERK1/2 las MKS-X y MKP-4 (228). Se postula que las mismas vías que actúan activando a ERK1/2 inducirían la expresión de estas fosfatasas (93,287)

Otro importante regulador de ERK1/2 es la fosfatasa PP2A ("Protein phosphatase" 2A), pero en este caso actúa de manera activadora, ya que defosforila sitios inhibitorios de la MAPKKK Raf, permitiendo de esta manera que se active la vía (91).

Inhibidores químicos de la vía ERK1/2.

Actualmente se utilizan varios inhibidores para esta vía como por ejemplo el U0126 o el PD98059 (12,101). Son inhibidores no competitivos, es decir que no compiten por el sitio de unión de ATP. Estos inhibidores actúan sobre MEK1. Se cree que se unirían a MEK1 y estabilizarían las conformaciones que no son activas impidiendo que esta quinasa fosforile, y por lo tanto active, a ERK1 y a ERK2. Por lo tanto no permiten discriminar cuales son los efectos de estas dos quinasas en los estudios en que se utilizan.

Ratones “Knock outs” para ERK1/2.

Los ratones “Knock out” para ERK1, ERK1^{-/-}, resultaron viables, fértiles y de tamaño normal, aunque tienen defectos en el desarrollo de los timocitos (229). La ausencia de expresión de ERK1 afectaría también la formación de adipocitos ya que los ratones “Knock out” tienen disminuidos los niveles de estas células y no aumentan de peso a pesar de ser alimentados con dietas ricas en grasas (42). Otros grupos observaron que los ratones ERK1^{-/-} tienen capacidades de aprendizaje mejoradas y mayor memoria de largo término que los ratones salvajes (203), se hipoteiza que estas “mejoras” se deberían a un aumento en la actividad de ERK2 y a la falta de inhibición de ERK2 por ERK1 que se piensa podría ocurrir en los ratones salvajes.

Los ratones “Knock out” para ERK2, ERK2^{-/-}, mueren en estado embrionario al día E6.5. (264), y no pueden ser rescatados por la activación de ERK1, por lo tanto si bien ERK1 y ERK2 son generalmente estudiadas en conjunto y hay pocos reportes en donde se logra demostrar que cada una tiene funciones específicas, los estudios en ratones Knock outs sugieren que cada una de estas enzimas cumplirían roles diferentes.

Efectos de la activación de ERK1/2.

Las vías de transducción de señales que involucran a ERK1/2 están implicadas en múltiples procesos fisiológicos como proliferación celular, diferenciación y supervivencia celular. Las quinasas ERK1/2 fosforilan una variedad de sustratos que incluyen quinasas, receptores, proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción (234,341).

Algunos factores de transcripción fosforilados por ERK1/2 son c-Myc, c-Fos y p62/TCF (312). Este último es uno de los principales componentes que se une al elemento de respuesta a suero (SRE) en el promotor de *c-fos*, y de esta manera se puede activar la transcripción de este gen.

La influencia de ERK1/2 sobre el metabolismo celular se evidencia por ejemplo, en la capacidad de ERK1/2 de fosforilar a la proteína reguladora de la traducción llamada PHAS-1, de esta manera PHAS-1 se libera del CAP del RNA mensajero y así se puede traducir (21).

También se ha observado que componentes del citoesqueleto, como la proteína asociada a microtúbulos MAP-2, son susceptibles a la fosforilación por MAPKs. Se especula con que estas enzimas contribuyen a regular la dinámica de los microtúbulos. En particular este fenómeno se hace evidente durante el rearrreglo de la red microtubular que ocurre en la transición entre las fases G2 y M del ciclo celular (277).

La activación de ERK1/2 induce señales proliferativas que contribuyen tanto al crecimiento celular normal como al canceroso (70,197). Su actividad enzimática crece con la estimulación de mitógenos y el impedimento de su función previene la proliferación celular en respuesta a diversos factores de crecimiento (230). Consistente con esto, es el hecho de que moléculas que activan la vía de ERK1/2 como por ejemplo Ras, se encuentran generalmente mutadas en distintos tipos de cáncer (145) y que la activación constitutiva de moléculas que actúan río arriba de éstas es suficiente para producir tumorigénesis (197,274).

La vía de ERK1/2 ha emergido como un regulador central de la proliferación celular controlando la progresión del ciclo celular y actualmente se sigue realizando una amplia variedad de estudios para entender los mecanismos de acción de esta vía de señalización.

JNK

Las proteínas de la familia JNK son proteínas quinasas activadas principalmente por estrés y citoquinas (80). Distintos grupos clonaron a las proteínas quinasas llamadas actualmente JNKs (c-Jun NH₂-terminal "Kinase") (88,138,181,182). Las proteínas JNKs son codificadas por tres genes. Los genes *Jnk1* y *Jnk2* son expresados en todos los tejidos. En contraste, el gen *Jnk3*, tiene un patrón de expresión muy restringido a cerebro, pero también a corazón y testículos. Estos genes pueden sufrir "splicing" alternativo para generar las 10 isoformas conocidas de JNK (118). Los transcritos derivados de estos tres genes codifican proteínas que incluyen o no una extensión en el carboxilo terminal para crear isoformas que van de 46 a 55 Kd. Una segunda forma de "splicing" es restringido a los genes *Jnk1* y *Jnk2* e involucra la selección de uno de dos exones alternativos que codifican parte del dominio quinasa. Este "splicing" alternativo influencia en el reconocimiento del sustrato de las isoformas de JNK por alterar la habilidad de JNK de interactuar con sitios de "docking" en sustratos (118).

En el año 1991, se demostró que el factor de transcripción c-Jun es fosforilado por MAPKs en las Serinas 63 y 73 en respuesta al estímulo con esteres de forbol (TPA) (246). Como ambas serinas de c-Jun, poseían una Prolina, a continuación se buscaron 2 proteínas quinasas, cuya

fosforilación fuese dirigida por prolinas: las candidatas eran las proteínas JNK recientemente aislada (88,138) y p42/p44 (ERK2/ERK1). Estas MAPKs fueron capaces de fosforilar a c-Jun, pero fue JNK, la MAPK que mayormente fosforilaba a este factor de transcripción. Esta fosforilación se produce en la región amino terminal de c-Jun, que corresponde al dominio de trans-activación, y por ello la fosforilación induce la activación de c-Jun (246).

La fosforilación de c-Jun en los sitios que son fosforilados por JNK causa un incremento en la actividad transcripcional (246,286). Además, se encontró que JNK es capaz de fosforilar a otras proteínas de la familia AP1, incluidas JunB, JunD y ATF2 (153). En cada caso la fosforilación corresponde a motivos Ser/Thr-Pro presentes en los dominios de activación de los factores de transcripción.

En el año 1994, se descubre la proteína SEK1 (SAPK/ERK kinase-1), una MAPKK que resultó ser específica para JNK (79). Junto al descubrimiento de que SEK1 se demuestra que MEKK1 es una MAPKKK que fosforila SEK1, constituyendo MEKK, SEK1 y JNK una cascada de fosforilación análoga a la de Raf, MEK y ERK1/2.

Activación de JNK.

Las proteínas JNKs, son activadas por la fosforilación dual en Treonina y Tirosina por SEK1 (también llamada MKK4) y MKK7 (SEK2) (10).

La proteína quinasa MKK7 es principalmente activada por citoquinas (Ej.: TNF e IL-1) y MKK4 es principalmente activada por estrés ambiental. La comparación de las propiedades bioquímicas de MKK4 y MKK7 demuestra que mientras ambas pueden activar a JNK por fosforilación dual en Treonina y Tirosina, hay diferencias en la especificidad del sustrato. Primero, MKK4 pero no MKK7, puede también activar la MAPK p38 (80). Segundo, a pesar de que MKK4 y MKK7 son quinasas duales y fosforilan a JNK en ambos residuos (Treonina y Tirosina), MKK4 fosforilaría preferentemente a JNK en Tirosina y MKK7 preferencialmente en Treonina (185). Esta última diferencia, sugiere que MKK4 y MKK7 podrían cooperar para activar a JNK bajo algunas circunstancias, evidenciando una forma de complementación (185).

Análisis de inmunofluorescencia demuestran que ambas MKK4 y MKK7 están presentes en el citoplasma y en el núcleo (307). Es mas, MKK7 se acumularía en el núcleo luego de la exposición de las células a estrés (207). La localización nuclear de MKK4 y MKK7 contrasta con la localización citoplasmática de los activadores de ERKs, MEK1 y MEK2. JNK entonces, podría ser activada tanto en citoplasma como en el núcleo.

Diversas MAPKKKs que activan a JNK han sido reportadas. Estas incluyen miembros del grupo de MEKK (MEKK1 a MEKK4), el grupo de proteínas quinasa mixed-lineage (MLK1, MLK2,

MLK3, DLK y LZK) (300), el grupo ASK (ASK1 y ASK2), TAK1 y TPL2. No obstante, aún no pueden determinarse con precisión cuales son los reguladores fisiológicos de cada una de ellas o el contexto fisiológico en el cual actúan (100).

Apagado de la señal.

Se reportaron distintas MKPs que pueden actuar sobre JNK, entre ellas, MKP-7 y VH5, las cuales pueden también actuar sobre p38 α y p38 β . Otras MKPs como MKP6, MKP2, MKP4 y MKP5 también podrían actuar sobre JNK (15). Se necesitan aún muchos estudios para determinar la especificidad y en que circunstancias actúan cada una de estas MKPs.

Inhibidores específicos

El inhibidor SP600125 es actualmente el inhibidor de JNK más utilizado. Inhibe a las tres isoformas de JNK, compite con el ATP por el sitio de unión de ATP de la enzima y por lo tanto impide la fosforilación de los sustratos de JNK. Actualmente se están ensayando otros inhibidores de la vía como por ejemplo inhibidores de las MAPKKK como la familia de las MLKs que llevan a la activación de JNK (98).

Ratones “Knock out” para JNKs.

Se han obtenido ratones Knock out para cada una de las JNKs. Los ratones Knock out para JNK1, JNK1 $^{-/-}$, presentan problemas en el desarrollo del sistema inmune (89,90), tolerancia a las dietas ricas en grasas sin volverse obesos y mayor sensibilidad a la insulina (142). Por otro lado, los ratones JNK2 $^{-/-}$, tienen la característica de convertirse en obesos cuando se les suministra una dieta rica en grasas (273).

La proteína JNK3 se expresa predominantemente en cerebro, sin embargo no se observan diferencias entre los ratones JNK3 $^{+/+}$ y los JNK3 $^{-/-}$ y los animales “Knock out” se comportan como los salvajes. Sin embargo se observó que JNK3 tendría cierto rol en la prevención de la apoptosis de células neuronales (338).

Cruzando animales “Knock out” para cada uno de estos genes lograron obtener ratones doble “Knock out”. Tanto los ratones JNK1/JNK3 doble KO como los ratones JNK2/JNK3 doble KO

sobrevivieron normalmente. Sin embargo los ratones JNK1/JNK2 doble KO fueron letales en el estado embrionario, en el día E11.5 y presentaban una fuerte desregulación de la apoptosis en el cerebro (176,265). Además, estudiando otro tipo celular del mismo organismo, células T dobles KO para JNK1/JNK2, se observó que tienen mayor tasa de proliferación que las células provenientes de ratones Salvajes (89). Se ha descrito también que fibroblastos dobles KO para estos genes son más resistentes a la apoptosis inducida por UV (306). Estos estudios muestran la gran importancia de JNK1 y JNK2 en la muerte celular programada.

Efectos de la activación de JNK.

Diversos estímulos activan JNK, por ejemplo, radicales libres de oxígenos (ROS), TNF, H₂O₂, sorbitol, etc (305). JNK está involucrada en producción de citoquinas, en la función del sistema inmune, en respuesta inflamatoria, en apoptosis inducida por estrés y durante el desarrollo, en la reorganización de actina y en transformación celular. Puede fosforilar sustratos en el citoplasma, en el núcleo y en membranas (329). Los estudios de activación de JNK la señalan como un factor clave en la decisión entre supervivencia o muerte celular (153).

JNK mediaría algunos efectos que causa el estrés en la célula. Aunque aún no está claro el mecanismo de activación de JNK por estrés, la activación de JNK podría representar una respuesta protectora que es iniciada frente a la exposición al estrés.

Los estudios iniciales del rol de la señalización de JNK en apoptosis/supervivencia fueron investigados por muerte de células neuronales en respuesta a la abstinencia de factores neurotróficos (336). Usando componentes de la vía de JNK dominantes negativos y constitutivamente activos en transfecciones de células en cultivo, fue demostrado que la vía de JNK contribuye a la respuesta apoptótica y que esta era suprimida por la activación de vías de salvataje (Ej.: ERK MAPK y Akt/PKB) (77).

Por otro lado, diversos estímulos que activan JNK no causan apoptosis. Por ejemplo, la mayoría de los tipos de estrés ambiental no causan apoptosis en condiciones en que son suficientes para la activación de JNK. Esto es en parte porque la vía de apoptosis dependiente de JNK sería bloqueada por vías de señalización de supervivencia (336). Ejemplos de estas vías de supervivencia incluyen NF- κ B, Akt/PKB y ERK. Por lo tanto, la vía de JNK funcionaría dentro del contexto del estado de activación de otras vías de señalización. La ausencia de una respuesta apoptótica ante una activación de JNK también correlaciona con la curva de tiempo de activación de JNK: una sostenida activación de JNK, no transiente, es asociada a la apoptosis (59). Muchas citoquinas (Ej.:TNF) causan solo una activación transiente de JNK, que no contribuye a la respuesta apoptótica (191).

JNK también ha sido involucrada en la formación de tumores. Está establecido que la transformación inducida por Ras requiere la activación del factor de transcripción c-Jun (162) y que Ras induce la fosforilación de c-Jun en sitios que son fosforilados por JNK (246,286). Es más, la tumorigénesis que induce Ras es revertida por la mutagénesis de c-Jun en los sitios de fosforilación por JNK (29). Ha sido reportado que JNK está constitutivamente activa en varias líneas tumorales y que las acciones transformantes de varios oncogenes han sido dependientes de la activación de JNK (153).

p38

La primera isoforma de p38 que se aisló corresponde a p38 α , y es a la que habitualmente la comunidad científica se refiere cuando habla acerca de "p38". Fue encontrada como una proteína de 38 KDa que se fosforila rápidamente en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS) (124,125).

Posteriormente, el clonado de p38 α , permitió la identificación de otras tres isoformas; p38 β (158), p38 γ (ERK6, SAPK3) (186,190) y p38 δ (SAPK4) (159,178). Las cuatro isoformas comparten entre sí un 60-70% de identidad en sus secuencias aminoacídicas. p38 α y p38 β son ubicuas, mientras que p38 γ y p38 δ se expresan solo en algunos tejidos (190).

Se ha reportado la activación de p38 MAPKs en respuesta a una gran variedad de estímulos y en organismos diferentes. Fueron clonados homólogos de p38 en levaduras (Hog1 & Spc/Sty1) (47) gusano (pmk-2) (32), mosca (124) y sapo (p38) (259).

En levaduras, las vías de señalización que involucran a Hog1 y Spc/Sty1 están implicadas en osmorregulación, respuestas a estrés y ciclo celular (47,282,283). En mamíferos, también están involucradas en la respuesta a una gran variedad de estímulos como radiación UV, cambios de temperatura, shock osmótico, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (105,105,107,239,248,278,279).

La activación de las p38 MAPKs por cualquiera de los estímulos mencionados producen ya sea respuestas inflamatorias, apoptosis, ciclo celular y transformación dependiendo del estímulo y del tipo celular en estudio (219,227,344). Sin embargo, al igual que ocurre con JNK, están generalmente involucradas en la respuesta a agentes que causan estrés.

Activación de p38 MAPKs.

Las cuatro isoformas de las p38 MAPKs son activadas predominantemente por las MAPKKs MKK3 y MKK6. (99), mientras que MKK4 sólo activa a p38 α (45,88,159) y MKK7 activaría a p38 δ (148). La activación de estas MAPKKs lleva a la fosforilación de la Treonina 180 y

la Tirosina 182 en un dominio Treonina-Glicina-Tirosina (TGY) de las p38 que una vez fosforilado determina la activación de estas quinasas (127).

El hecho de que p38 pueda responder a una cantidad de estímulos tan amplia podría deberse en parte a la variedad de MAPKKs que participan en la activación de p38. Estas incluyen TAK1 (213) ASK1/MAPKK5 (152) DLK/MUK/ZPK (141,313) y MEKK4 (296). La sobreexpresión de cualquiera de estas quinasas lleva a la activación de las p38 MAPKs y generalmente también a la activación de JNK, lo que explicaría porque estas dos vías de señalización generalmente son co-activadas.

También contribuyen a la activación de p38 pequeñas proteínas G de la familia de Rho, como Rac1 y Cdc 42 (26,349), que inducen la activación de MAPKKs en las cascadas de señalización.

Además existen formas de activación de p38 que son independientes de las MAPKK. Por ejemplo, p38 α puede activarse por autofosforilación cuando interacciona con la proteína TAB1 (TAB-“activated protein kinase 1-binding protein”) (112), otro ejemplo es la activación por fosforilación independiente de MAPKKs en la Tirosina 323 inducida por el receptor TCR (T cell receptor) (268).

Apagado de la señal.

En condiciones fisiológicas, la activación de MAPKs es generalmente transitoria. Esto se debe a la desfosforilación de las MAPKs por fosfatasa duales de Tirosinas y Treoninas, MKPs (MAP” kinase phosphatase (MKP) family”) (289).

Varios miembros de las MKPs pueden desfosforilar p38 α y p38 β (52,215). Mientras que p38 γ y p38 δ son resistentes a todas las MKPs conocidas.

Además se conocen otros tipos de fosfatasa como la fosfatasa de Serinas/Treoninas PP2C (protein phosphatase 2C). Esta fosfatasa actúa sobre la MAPK HOG1 (homólogo de p38 en levaduras) y también sobre las MAPKKs humanas MKK6 y MKK4 tanto *in vitro* como *in vivo* (193,243,295,335). Esto sugiere que las diferentes isoformas de p38 son diferencialmente reguladas dependiendo de los niveles de expresión y de la especificidad de las distintas de fosfatasa.

Inhibidores de p38 MAPKs.

Las p38 SAPKs son activadas por diversos estímulos como estrés, radiación UV, calor, cambios osmóticos, citoquinas y factores de crecimiento (178). La isoforma p38 α es la más estudiada y tal vez sea la de mayor relevancia fisiológica. Se estudió ampliamente su rol en

procesos inflamatorios y actualmente es la MAPK en la cual se están invirtiendo mayores esfuerzos para el descubrimiento de un inhibidor específico que permita tratar enfermedades inflamatorias (241). Es un blanco aceptado de distintas enfermedades como psoriasis, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, y actualmente también se postula su relevancia en cancer, mal de Alzheimer y enfermedades cardiovasculares.

En el laboratorio, el estudio de p38 MAPKs ha sido facilitado por el uso de inhibidores derivados de imidazoles bicíclicos como el SB 203580 (343). Este inhibidor es el que mayormente se utiliza en la actualidad (98) y es específico para las isoformas α y β de p38 pero no tiene efecto sobre las isoformas γ o δ . Impide el funcionamiento de p38 porque se une al sitio en el que se uniría el ATP, entonces no puede fosforilar a sus sustratos.

Recientemente se ha descrito una nueva clase de inhibidores de p38 SAPKs, son compuestos derivados de diaryl, con poca similitud con los derivados de pyridinyl-imidazoles como el SB203580 (232). Entre estos compuestos, el BIRB 796 es el que comienza a ser más utilizado porque además de inhibir fuertemente a las isoformas p38 α y p38 β puede también inhibir a las isoformas p38 γ y p38 δ . Este inhibidor en comparación con SB 203580 puede servir para encontrar sustratos específicos para p38 γ y p38 δ (177). Sin embargo todavía es necesario encontrar inhibidores específicos para cada una de las isoformas de p38 SAPKs.

Ratones "Knock out" de p38 MAPKs.

Estudios en ratones KO para p38 α demostraron que tiene un importante rol en desarrollo y diferenciación y en este sentido, se ha observado que los ratones p38 α -/- mueren durante la embriogénesis (9,14,216,298). Mudgett y colaboradores (216) encontraron que además de defectos en el desarrollo de la placenta, desarrollan alteraciones en la angiogénesis del saco embrionario y del embrión mismo.

Se sabe que las células madre embrionarias en cultivo pueden diferenciar hacia cardiomiocitos o neuronas y se observó que las células p38 α -/- diferencian espontáneamente a neuronas y son defectuosas para diferenciarse a cardiomiocitos, sugiriendo que la actividad de p38 sería clave en los estadios tempranos de diferenciación celular. Así en células en donde p38 es activa diferenciarían hacia cardiomiocitos y células en que p38 es inactiva, hacia neuronas (19). Además se observó que células madre embrionarias p38 α -/- expresan marcadores de adipogénesis sugiriendo que la actividad de p38 inhibe la adipogénesis en estas células (20). La proteína p38 α MAPK también está involucrada en el desarrollo del músculo regulando a la proteína MEF2C, un factor de transcripción que promueve la actividad de varios genes que codifican para proteínas estructurales de músculo (82).

Sin embargo se observó que ratones KO para p38 β y los doble KO para p38 γ y δ permiten el desarrollo de ratones normales sin fenotipos alterados visibles (28,266). Esto sugiere, que entre las cuatro isoformas de p38 MAPKs solo p38 α sería importante en el desarrollo embrionario, y que la falta de cualquiera de las otras isoformas, β , γ y δ , podría ser compensada por p38 α .

Efecto de la activación de p38s.

Gracias al uso de inhibidores de p38 y de mutantes inactivas o constitutivamente activas de MKK3 y MKK6, se pudieron identificar una gran variedad de genes regulados por p38. Entre los genes regulados por p38 se encuentran citoquinas, factores de transcripción, receptores de membrana, etc.

El primer sustrato de p38 identificado fue MAPKAPK2 o MK2, (MAP “kinase- activated protein kinase” 2) (107,205,259). MAPKAPK2 y otro miembro de esta familia de proteínas quinasa, MK3, activan varias proteínas incluyendo HSP27 (small heat shock protein 27) (288) y LSP1 (“lymphocyte-specific protein”) (149).

Resulta evidente que las p38 MAPKs tienen un rol importante en la regulación de la expresión de varios genes a nivel transcripcional ya que aproximadamente la mitad de los sustratos conocidos para p38 son factores de transcripción. Algunos ejemplos son ATF-1/2/6 (“activating transcription factor” 1, 2 & 6), SAP1 (SRF “accessory protein”), CHOP (“growth arrest and DNA damage inducible gene” 153, or GADD153), p53, C/EBP β , MEF2C (“myocyte enhance factor” 2C), MEF2A, MITF1 (“microphthalmia-associated transcription Factor”), ELK1 (ETS-“domain transcription factor”), NFAT (“nuclear factor of activated T cells”), HBP1 (“high mobility group-box protein” 1) (114,123,132,156,248,299,325,331,350). También se observó que fosforilan a CREB (cAMP “response element-binding protein”) (299) y a SRF (“serum response factor”) (133).

A partir del trabajo de esta Tesis podemos agregar un nuevo sustrato para p38, c-Fos, un factor de transcripción miembro de la familia de factores de transcripción AP-1.

Otra proteína activada al ser fosforilada por p38 es MSK1, “Mitogen-and stress-activated protein kinase”-1, de esta manera p38 también influye en la activación transcripcional de diversos genes ya que MSK1 puede activar al factor de transcripción CREB (83,238).

La MAPK p38 también fosforila a otras quinasas, como por ejemplo a MNK1 (MAPK-“interacting protein kinases”) que está involucrada en la iniciación traduccional debido a que es una quinasa que fosforila al factor de iniciación eIF-4E (“eukaryotic initiation factor”-4e) (109,328).

Por otra parte, fosforila sustratos que no son ni quinasas ni factores de transcripción. Algunos ejemplos de este tipo de sustratos son: cPLA2 (“phospholipase A2 family”), un grupo de enzimas intracelulares conocidas como fosfolipasas A que median la producción de productos lipídicos en respuesta a estímulos extracelulares; NHE-1 (Na⁺/H⁺ “exchanger isoform”-1) una

proteína integral de membrana involucrada en la regulación del pH intracelular; tau (Microtubule-associated protein tau) cuya función principal está en el ensamblaje y estabilización de la red microtubular de las células y keratina 8 (intermediate filament protein keratin 8), una proteína de los filamentos intermedios, uno de los tres sistemas filamentosos del citoesqueleto (103,179,254).

Adicionalmente, las p38 SAPKs estarían involucradas en la regulación del nivel de RNA mensajero de ciertos transcritos como el mRNA de TNF (Tumor necrosis factor) (173,174) en donde la delección del sitio ARE (AU rich element) conservado en el transcrito primario de TNF lleva a la sobreproducción de TNF y en concordancia con estos resultados se encontró recientemente que MAPKAPK2, una proteína quinasa activada por p38, fosforila a TTP, tristetraprolin, una proteína que desestabiliza el RNA mensajero (194).

Esta gran diversidad de sustratos sugiere que p38 tiene una amplia variedad de funciones. En este aspecto, es muy probable que la respuesta celular a la activación de p38 (y cuales son los sustratos que finalmente fosforile ante un estímulo dado) dependa por un lado del estímulo en si mismo (ya que seguramente activa varias vías y es el balance de todas las vías lo que determina la respuesta), pero también del tipo celular y momento en la vida de la célula en que recibe el estímulo.

Rol de p38 en distintos procesos fisiológicos.

Como mencionamos, las p38 MAPKs están involucradas en una amplia variedad de procesos fisiológicos.

La relación entre las vías de señalización de p38 e inflamación está bien establecida. Enfermedades como Artritis Reumatoidea, Mal de Alzheimer y enfermedad de Bowel están reguladas al menos en parte por la vía de p38 (143,161,235). En concordancia se ha reportado su accionar en la proliferación y diferenciación de células del sistema inmune (157,166). Además, la activación de las vías que involucran a esta quinasa llevan a la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF (117); a la inducción de enzimas como COX-2, que controla el remodelado de tejido conectivo durante condiciones patológicas (25); a la expresión de enzimas intracelulares como iNOS, un regulador de estados de oxidación intracelular (71,78); a la inducción de VCAM-1 y otras proteínas de adherencia (239), etc.

También existe una gran cantidad de trabajos que adjudican a p38 un importante rol en apoptosis dependiendo del estímulo y del tipo celular. La señalización por p38 induce muerte celular en ciertos tipos celulares mientras que en otros su activación está relacionada con un aumento de la supervivencia, el crecimiento celular y diferenciación (320).

Las p38 MAPKs están también involucradas en la regulación del ciclo celular. La participación de p38 α ha sido observada tanto en levaduras como en mamíferos (297). Las p38s

están involucradas en la regulación de las fases G1 y G2/M del ciclo, por ejemplo, el arresto en G2 de células HeLa causada por radiación γ es dependiente de p38 γ . Otros ejemplos muestran que la sobreexpresión de p38 en levaduras lleva a que la proliferación sea mas lenta (209,324,340). También se sabe que p38 α se activa en células arrestadas en fase M (209). Y se ha demostrado que p38 α y p38 γ son necesarias para el arresto en G2 inducido por UV (326). Estos efectos podrían atribuirse a la fosforilación de proteínas reguladoras del ciclo celular por las p38 MAPKs. Se observó que la quinasa p38 α fosforila proteínas directamente involucradas en el ciclo celular, como p21, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que previene la progresión de G1 a S bloqueando la actividad de CDKs.

En algunos tipos celulares se ha descrito que p38 α (en concordancia con los resultados de los ratones KO) y p38 β están involucradas en diferenciación. Por ejemplo, están involucradas en la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 en adipocitos, o en la diferenciación de células PC12 en neuronas (96,218). Recientemente se ha propuesto un modelo de “cross talk” entre la vías de transducción de p38 y la vía de PI3 kinase/Akt, en la diferenciación a mioblastos (155). Por otra parte, se demostró que la MAPK p38 δ sería necesaria para la diferenciación de keratinocitos (95).

La MAPK p38 está también involucrada en senescencia y supresión tumoral, ya que varios trabajos muestran que estaría involucrada en la senescencia inducida por el acortamiento de telómeros, exposición a H₂O₂, activación permanente de la vía de RAS y activación de MKK3 o MKK6 (50,128,323).

Si bien se han descrito una gran variedad de efectos producidos por la activación de las distintas isoformas de p38, aún no está claro cual es el rol fisiológico de cada una de las p38 MAPKs y en general se les atribuyen las mismas características a las distintas isoformas (102,227), sin embargo, algunos trabajos postulan que existe un importante antagonismo entre las isoformas p38 α , p38 β y p38 γ , p38 δ en donde las isoformas de p38 α y p38 β activarían la transcripción de genes con sitios de respuesta a AP-1 mientras que p38 γ y p38 δ la inhibirían (24,244,247). También se ha reportado un antagonismo ente las isoformas p38 α y p38 β en células HeLa y en cardiomiocitos en donde p38 α induce apoptosis y p38 β supervivencia celular (221,326).

Por lo tanto, la respuesta fisiológica observada ante la activación por las vías que involucran a las p38 dependerá de que p38 MAPK se active, del tipo celular en el que se produce la activación y del contexto celular (que proteínas se expresan, en que cantidad y que vías de señalización se activan en ese momento).

Otras MAPKs

ERK5

ERK5, también conocida como BMK1 o big MAPK 1, tiene el doble de tamaño que las otras MAPKs (131,337,351). La porción amino terminal contiene el dominio quinasa que es similar al de ERK1/2 y tiene el motivo TEY para su activación. El dominio carboxilo terminal tiene características únicas.

Luego de un estímulo los miembros de la MAPKKK MEKK2 y MEKK3 activan a la MAPKK específica de ERK5, MEK5 (54,170,290). Subsecuentemente MEK5 fosforila y activa ERK5, la cual activada puede fosforilar distintos sustratos como por ejemplo MEF2 (171). La regulación y función de ERK5 ha sido hasta el momento menos estudiada que la de otras MAPKs. Los ratones Knock out para ERK5 mueren en estado embrionario entre los días 9.5 y 10.5 debido a fuertes defectos en el desarrollo cardiovascular y en la vasculogénesis (130).

Además de fosforilar diversos sustratos ERK5 tiene una característica que la hace única entre las MAPKs, su porción carboxilo terminal tiene actividad transcripcional y puede inducir por si misma la expresión de varios genes (11,169,301).

ERK 7

ERK7 es una proteína de 546 aminoácidos y esta secuencia es 40% idéntica a la de ERK1/2. (4). El extremo c-terminal de ERK7 no tiene similitud con el de ninguna otra MAPK. El loop de activación de ERK7 contiene el motivo TEY pero sus mecanismos de activación aún no se conocen aunque se sabe que puede autofosforilarse ya que cuando es expresada y purificada de bacterias se autofosforila (3), Es una proteína con una vida media muy corta ya que es rápidamente degradada por el proteasoma luego de ser ubiquitinada (4). Tampoco está muy claro aún que estímulos producen su activación ni cuales son las funciones fisiológicas de esta quinasa (68).

ERK8

Erk8 es una proteína de 60 KDa con un dominio característico TEY. Tiene un 69% de identidad con ERK7. Es principalmente expresada en pulmón y riñón y hasta el momento se sabe que es activada por suero (5). El rol fisiológico de ERK8 aún necesita ser estudiado (68).

ERK3

Se identificó como una proteína de 62 KDa en rata y de aproximadamente 100 KDa en humanos y ratón. Es una proteína con un vida media muy corta, de 30-40 minutos (69). Se expresa en mamíferos de manera ubicua pero aún no se ha observado su expresión en otros

organismos como *c. elegans* (43). La expresión de ERK3 coincide con la organogénesis temprana en los embriones y luego decae (311). Tanto su función como su activación aún necesitan muchos estudios para ser comprendidas.

ERK4

Es una proteína de 45 KDa. Está predominantemente distribuida en el citoplasma. (68). Y aún no se conoce su modo de activación ni como está regulada ni cual es su rol fisiológico.

En resumen (MAPKs):

Las MAPKs son proteínas quinasas que se activan en respuesta a una gran variedad de estímulos.

Se ha descrito un amplio número de MAPKs, siendo las MAPKs de la familia ERK1/2, de la familia p38 y JNK las mejor caracterizadas.

Las MAPKs ERK1 y ERK2 suelen estar asociadas a procesos que involucran proliferación celular.

Las MAPKs de la familia p38 y JNK se activan generalmente en respuesta a agentes que producen estrés y se las denomina SAPKs por Stress Activated Protein Kinases.

Las MAPKs se activan por fosforilación dual de aminoácidos Treonina y Tirosina en un contexto TXY muy conservado por una MAPKK que a su vez es activada por una MAPKKK.

Las MAPKs fosforilan una gran variedad de sustratos en residuos Serina o Treonina seguidos de Prolina.

Las MAPKs están relacionadas con diferenciación celular, proliferación, apoptosis, etc por fosforilación de proteínas directamente involucradas en estos procesos o actuando a través de la fosforilación de factores de transcripción que determinan cambios en el patrón de expresión génica de la célula en que las MAPKs se activan.

OBJETIVOS

Como se expuso previamente, el oncogén c-Fos forma parte del factor de transcripción AP-1. Este factor de transcripción está compuesto por proteínas que son generalmente reguladas a nivel de su expresión y actividad por proteínas quinasas de la familia de las MAPKs, tal como ocurre con la regulación de c-Jun por JNK. Hasta el momento, la regulación de c-Fos por MAPKs ha sido menos estudiada.

Sobre la base de las consideraciones mencionadas anteriormente, el objetivo global de esta tesis es analizar la relación funcional entre el factor de transcripción c-Fos y diversas MAPKs.

Los objetivos específicos son:

- Estudiar aspectos generales de los distintos niveles de interacción (física y funcionalmente) entre c-Fos y MAPKs
- Estudiar la regulación de c-Fos por SAPKs a nivel post traduccional en respuesta a un estímulo que produce estrés celular como la radiación UV.
- Estudiar la regulación de c-Fos por MAPKs en respuesta a un estímulo proliferativo como el agonista de receptores acoplados a proteínas G, Carbacol, tanto a nivel de la expresión del mRNA de *c-fos* y del producto proteico correspondiente como a nivel post traduccional de la proteína.

RESULTADOS

Explorando la identidad de proteínas capaces de interactuar físicamente con MAPKs encontramos que el factor de transcripción c-Fos y la MAPK p38 γ interactúan físicamente en un sistema de doble híbrido en levaduras (figura R.1).

Este resultado abrió en nuestro laboratorio una nueva línea de investigación enfocada en la regulación de c-Fos por MAPKs.

El estudio fue dividido en tres partes:

- 1- Estudiar si la interacción entre p38 γ y c-Fos se produce también en células de mamífero y si esta interacción contribuye a la propagación de la señal que p38 γ transduce.

- 2- Estudiar la regulación de c-Fos que ocurre luego de exponer a las células a un agente que produce estrés.

- 3- Estudiar la regulación a la que es sujeto c-Fos luego de exponer a las células a un estímulo mitogénico.

1- Búsqueda de proteínas que interactúen físicamente con p38 γ . Estudio de la interacción entre p38 y c-Fos.

Rastreo de proteínas que interaccionen con p38 γ en un ensayo de doble híbrido

Con el propósito de encontrar nuevas proteínas que interactúen con p38 γ realizamos un ensayo de Doble Híbrido no tradicional o Sistema de Recrutamiento de SOS (22). En este sistema de Doble Híbrido se utiliza una cepa de levaduras que es termosensible (cdc25s). Esta cepa de levaduras no prolifera a 37°C, ya que tiene una mutación en el intercambiador de GTP de Ras de levaduras, cdc25, que impide la carga de GTP sobre Ras a la temperatura restrictiva (puede crecer a temperaturas inferiores, por ejemplo su crecimiento es normal a 28°C). Esta mutación puede ser complementada utilizando el intercambiador de GTP de Ras Humano, hSOS si este es anclado a la membrana. De esta manera solo proteínas que permitan que hSOS se acerque a la membrana y posibiliten la carga de GTP sobre Ras reestablecerán un camino de transducción de señales que permite proliferar a 37°C (figura R.1A).

El Dr. Aronheim nos proporcionó el cDNA de una librería de células HeLa fusionado a una señal de miristoilación (permite que las proteínas que poseen esta señal se anclen a membrana) y el Dr. Omar Coso fusionó la carnada, en este caso p38 γ , a la secuencia codificante para el factor intercambiador de GTP de Ras, hSOS. Las proteínas codificadas por los plásmidos de la librería que interactúan con SOS γ , acercan a hSOS a la membrana y reestablecen el crecimiento de la levadura a 37°C. Utilizando este sistema de Doble Híbrido en nuestro laboratorio, Federico Coluccio identificó varias proteínas que interaccionarían con p38 γ .

En la figura R.1B se observa que las levaduras conteniendo el clon que codifica para c-Fos junto con la carnada pueden crecer a 37°C, mientras que las levaduras que fueron co-transfectadas con la carnada (Fusionada a hSOS) y un plásmido vacío (que codifica solamente para la señal de miristoilación) no logran crecer a la temperatura restrictiva. Además, se muestran los controles positivos y negativos del ensayo (control positivo, c-Jun como carnada y c-Fos fusionado a la señal de miristoilación, ya que son dos proteínas que se sabe que interaccionan entre si, y como control negativo c-Jun como carnada más un plásmido vacío).

El clon de c-Fos aislado contiene la secuencia que codifica para los aminoácidos 137 al 239; esta porción involucra parte del dominio de unión al ADN de c-Fos y parte de su dominio de transactivación, además cuenta con un sitio consenso de fosforilación por MAPKs, la Treonina 232.

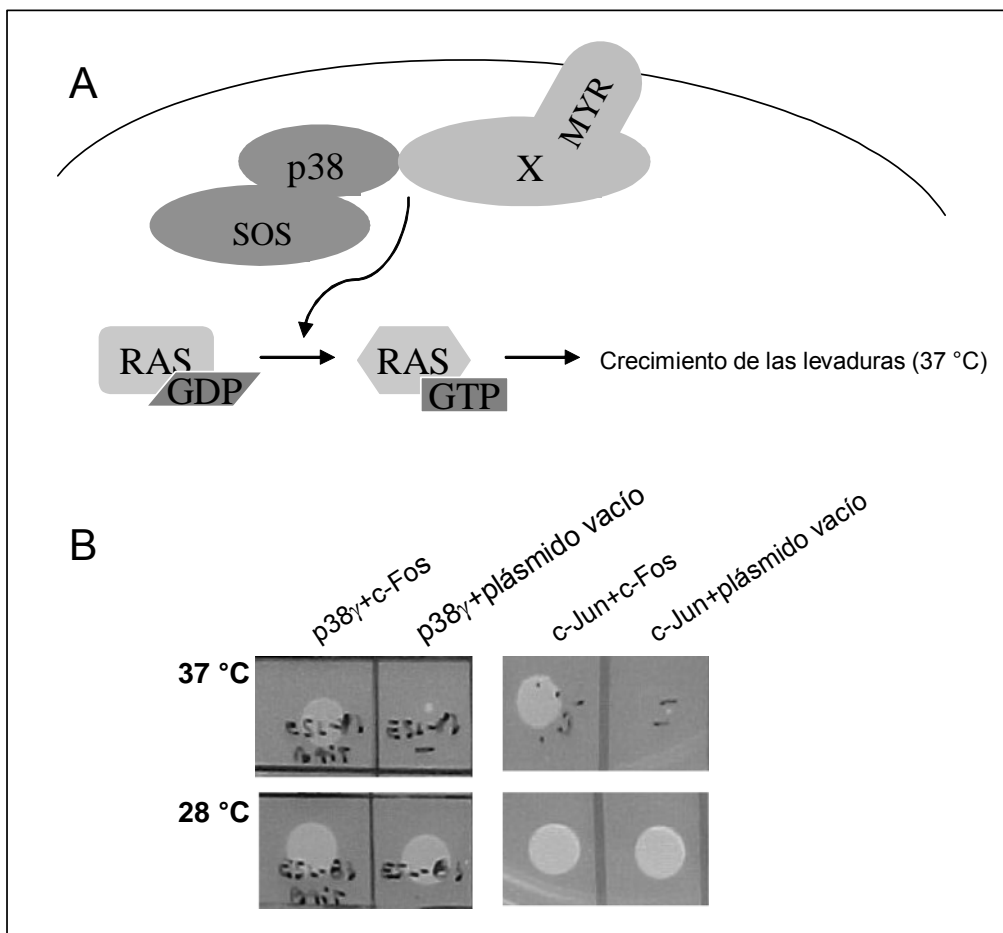


Figura 1:

El factor de transcripción c-Fos interacciona con p38 γ en un ensayo de doble híbrido.

A. Esquema del ensayo de Doble Híbrido. La MAPK p38 γ fue subclonada en un vector que permite expresarla como una proteína de fusión con hSOS. Además una librería de ADN copia es subclonada en un vector que permite expresar a las proteínas con una señal de miristoilación para que puedan ser ancladas en la membrana. Solo las levaduras en que se exprese una proteína de la librería que pueda interaccionar con p38 γ , acercará a SOS a la membrana y se restituirá la capacidad de la levadura de crecer a 37°C (temperatura restrictiva).

B. Se observa que todas las levaduras pueden crecer a 28°C mientras que a 37°C solo pueden crecer aquellos clones en los cuales se este expresando una proteína de la librería que interaccione con la carnada. En la foto se muestra que el clon que expresa a p38 γ y a una porción de c-Fos (aminoácidos 137 al 239) restituye el crecimiento a 37°C, mientras que p38 γ sola no puede restituirlo. También se muestra como control positivo un clon que expresa a c-Jun como carnada y a c-Fos fusionado a una señal de miristoilación y como control negativo un clon en el que se transformó al plásmido que expresa a c-Jun y un plásmido vacío.

Estos resultados indican que c-Fos puede interactuar con p38 γ en un ensayo de doble híbrido de levaduras.

Para continuar el estudio clonamos la porción del cDNA de c-Fos codificante para los aminoácidos 220 al 335, estos aminoácidos forman parte del dominio de transactivación de c-Fos y se superponen en parte con la región expresada por el clon que se aisló en el ensayo de doble híbrido.

Brevemente, realizamos una PCR utilizando como molde cDNA de células NIH 3T3, el producto de la PCR fue purificado y digerido con las enzimas de restricción BamHI y NotI, (cada primer fue diseñado con la secuencia de corte para uno de estos sitios). En paralelo se digirieron con las mismas enzimas los vectores elegidos y se purificaron. El fragmento y el vector purificados (en este caso pGEX4T3) fueron ligados y el producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias. Se aislaron colonias de transformación y se realizaron minipreparaciones de DNA plasmídico para realizar chequeos por restricción. Como el vector pGEX4T3 permite inducir la expresión de la proteína clonada al agregar al cultivo bacteriano IPTG pudimos seleccionar insertos que expresen la proteína de fusión del tamaño apropiado, a la cual denominamos GST c-Fos sh. Estos clones se secuenciaron y se eligió uno de ellos para continuar el estudio.

Luego subclonamos c-Fos sh en otros vectores como el pCEFL-HA y pCEFL-AU5, estos vectores permiten expresar a c-Fos sh en células de mamífero. Así pudimos obtener los plásmidos pCEFL-HA c-Fos sh, pCEFL-AU5 c-Fos sh y pGEX4T3 c-Fos sh que expresan al fragmento de c-Fos "Fos sh", los dos primeros en células eucariotas y el último en bacterias.

Estudios de interacción *in vivo* entre p38 γ y c-Fos. Ensayos de co-inmunoprecipitación.

El resultado de la interacción entre c-Fos y p38 γ en levaduras nos llevó a preguntarnos si esta interacción se produce también en células de mamíferos.

Para investigar si c-Fos y p38 γ pueden interactuar *in vivo* realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación, sobreexpresando estas proteínas en células HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) en cultivo. Elegimos trabajar con células HEK 293 porque son células que se transfectan con muy alta eficiencia y que tienen gran capacidad de expresión.

Plaquemamos $3 \cdot 10^6$ células en placas de cultivo celular de 10 cm. Al día siguiente estas células fueron co-transfectadas con $1 \mu\text{g}$ de pCEFL-AU5 c-Fos sh y $1 \mu\text{g}$ pCEFL-HA p38 γ utilizando el método de Fosfato de Calcio. 48 hs después de la transfección las células fueron colectadas y

lisadas para realizar las inmunoprecipitaciones. Una vez lisadas se centrifugaron y los sobrenadantes se incubaron con anticuerpos anti epítotope HA o AU5. El inmunoprecipitado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS PAGE), se transfirió a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF y se realizó un Western Blot revelando con el anticuerpo HA o AU5 según corresponda; esto es: si se inmunoprecipitó con anticuerpo anti AU5, se reveló con anticuerpo anti HA y si se inmunoprecipitó con anticuerpo anti HA se reveló con anticuerpo anti AU5.

Como se muestra en los Western Blots de la figura R.2, al inmunoprecipitar AU5 c-Fos sh con el anticuerpo anti AU5 coinmunoprecipita HA p38 γ y viceversa.

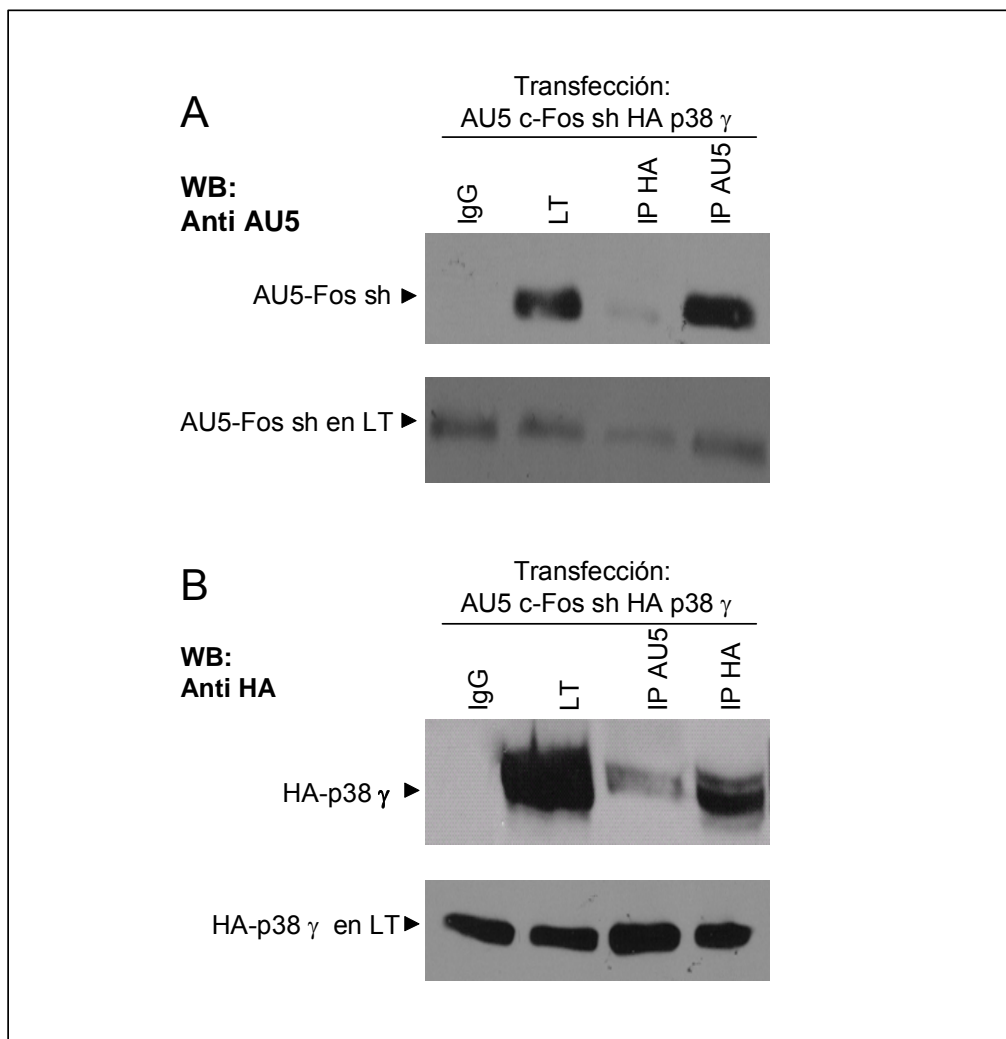
Estos resultados indican que c-Fos sh y p38 γ pueden interactuar in vivo en células humanas en cultivo.

Análisis de la fosforilación de c-Fos sh por p38 γ . Ensayos de fosforilación *in vitro*.

Como mencionamos, las MAPK son proteínas mediadoras del pasaje de señales extracelulares al núcleo y su acción sobre factores de transcripción determina cambios en la expresión génica en las células. Sabemos que un paso clave en los procesos de transactivación es la fosforilación por proteínas quinasas específicas, como ocurre en el caso de c-Jun y JNK.

Sabiendo que p38 γ y c-Fos interactúan en células de mamífero *in vivo* nos propusimos explorar si dicha interacción tiene algún efecto en el estado de fosforilación de c-Fos. Para ello realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* en los que se incubaba a la proteína quinasa con el posible sustrato en presencia de γ ATP P³² y luego se analiza si el sustrato incorporó el ATP radioactivo.

En estos ensayos se transfectaron células HEK 293 con el plásmido pCEFL-HA p38 γ . A las 48 horas de la transfección las células se incubaron durante 2 a 4 horas en medio 1% suero (para disminuir los niveles de activación de las cascadas celulares). Luego se estimularon por 20 minutos con NaCl 100 μ M o con anisomicina 5 μ M (para activar a p38 γ) (206) y transcurridos 20 minutos desde el estímulo, las células se lisaron y los extractos celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti HA. De esta manera obtuvimos a la quinasa p38 γ activada en el inmunoprecipitado. Luego la incubamos con ATP radioactivo (γ ATP P³²) y con la proteína GST c-Fos sh purificada de bacterias durante 30 minutos a 30°C o con GST vacío o GST ATF2 -sustrato conocido de p38- como controles negativo y positivo respectivamente.

**Figura 2:****Las proteínas c-Fos y p38 γ co-inmunoprecipitan *in vivo*.**

Se observan Western Blots de Inmunoprecipitaciones de lisados de células HEK 293 transfectadas con plásmidos de expresión para las proteínas de fusión HA p38 γ y AU5 c-Fos Sh.

A: Las inmunoprecipitaciones realizadas se indican en la figura, de izquierda a derecha: inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo IgG, Lisado total (LT) sin inmunoprecipitar, IP con anticuerpo anti HA, IP con anticuerpo anti AU5. El WB fue revelado con anticuerpo anti AU5.

B: Las inmunoprecipitaciones realizadas se indican en la figura de izquierda a derecha: IP con anticuerpo IgG, Lisado total sin inmunoprecipitar, IP con anticuerpo anti AU5, IP con anticuerpo anti HA. El WB fue revelado con anticuerpo anti HA.

En los paneles inferiores de las figuras A y B se observan los WB de los Lisados Totales antes de inmunoprecipitar.

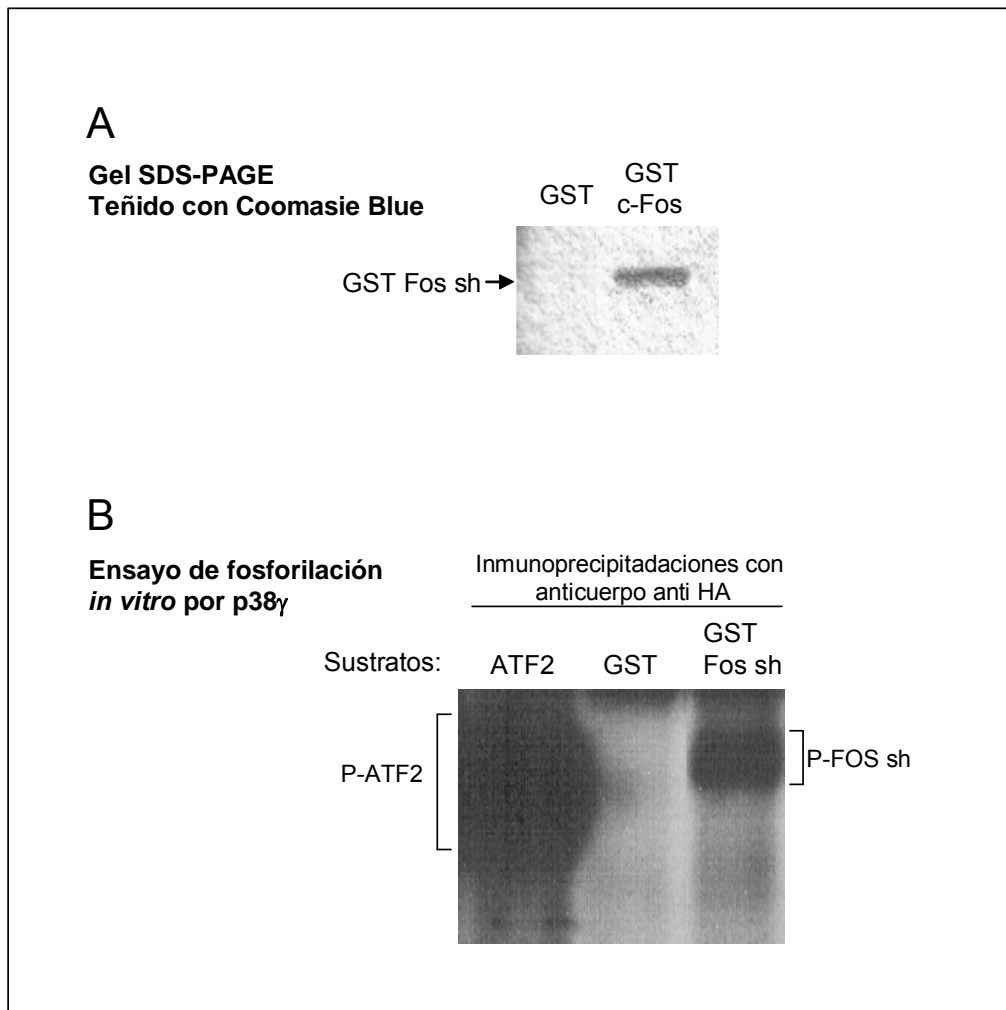


Figura 3:

El factor de transcripción c- Fos es sustrato de p38 γ *in vitro*.

A: Gel de poliacrilamida desnaturalizante teñido con *coomassie blue* en el que se corrieron las purificaciones de las proteínas GST ATF2, GST y GST Fos Sh. Estas proteínas fueron purificadas a partir de cultivos de bacterias transformadas inducidos con IPTG.

B: Autorradiografía de un ensayo de fosforilación *in vitro* realizado utilizando el inmunoprecipitado con anticuerpo anti HA células transfectadas con pCEFL HA p38 γ , ^{32}P γ ATP, y las distintas proteínas purificadas de extractos de bacterias (GST ATF2, GST y GST Fos sh) como sustrato. En la figura se indican a las proteínas fosforiladas como P-proteína (P-ATF2 o P-Fos sh).

En la figura R.3A se observa la proteína de fusión GST c-Fos sh purificada y teñida con *coomasie blue*. Las proteínas fusionadas a GST utilizadas como sustrato en este tipo de ensayos fueron purificadas de cultivos bacterianos utilizando columnas de Glutación Sefarosa (explotando la afinidad del dominio GST por el Glutación). Las proteínas de fusión a GST se eluyeron de la columna, se cuantificaron, y se analizaron para evaluar que no estuvieran degradadas mediante electroforesis en SDS PAGE y tinción con *coomasie blue*.

En la autorradiografía de la figura R.3B se observa que la proteína GST no es fosforilada por p38 γ , que fosforila a GST ATF2 tal como fue previamente reportado (187,259), y que puede fosforilar a GST Fos sh *in vitro*.

Estos resultados muestran que c-Fos sh es sustrato de p38 γ in vitro.

Análisis de la fosforilación de la Treonina 232 de c-Fos sh por p38 γ . Ensayos de fosforilación in vitro.

Las proteínas de la familia de las MAPKs fosforilan a sus sustratos en Serinas o Treoninas seguidas de Prolinas presentes dentro de una secuencia consenso (tal como se describe en la introducción de este trabajo). Analizando la secuencia de c-Fos sh, pudimos observar que contiene una Treonina (T232) seguida de Prolina con potencialidad de ser fosforilada por MAPKs.

Para investigar si este residuo es fosforilado por p38 γ en un ensayo de quinasas *in vitro* construimos una versión de la proteína c-Fos sh, que tiene mutada la Treonina 232, c-Fos sh MUT. Para ello diseñamos primers que permitieron sustituir esta Treonina por una Alanina, (residuo incapaz de ser fosforilado). Amplificamos el fragmento con los primers específicos para introducir la mutación puntual y lo clonamos en el vector pGEX4T3. Seleccionamos varios clones que fueron luego secuenciados para confirmar la presencia de la mutación. En la figura R.4 se observa una autorradiografía de la secuenciación realizada, en donde se observa el cambio de bases introducido (ACU a GCU, mutación puntual de A a G).

Una vez confirmada la mutación en la proteína c-Fos sh MUT, la misma se purificó de bacterias y se corrió en geles SDS-PAGE junto con la proteína GST c-Fos para corroborar la utilización de cantidades equivalentes de cada una de las proteínas en los ensayos de quinasas (figura R.5A).

Se transfectaron células en cultivo, luego se incubaron en medio 1% suero y a las 4 horas se estimularon con NaCl o Anisomicina, tal como se mencionó previamente. se colectó a los 20 minutos post estimulación, se inmunoprecipitó la quinasa transfectada con anticuerpo anti epitope

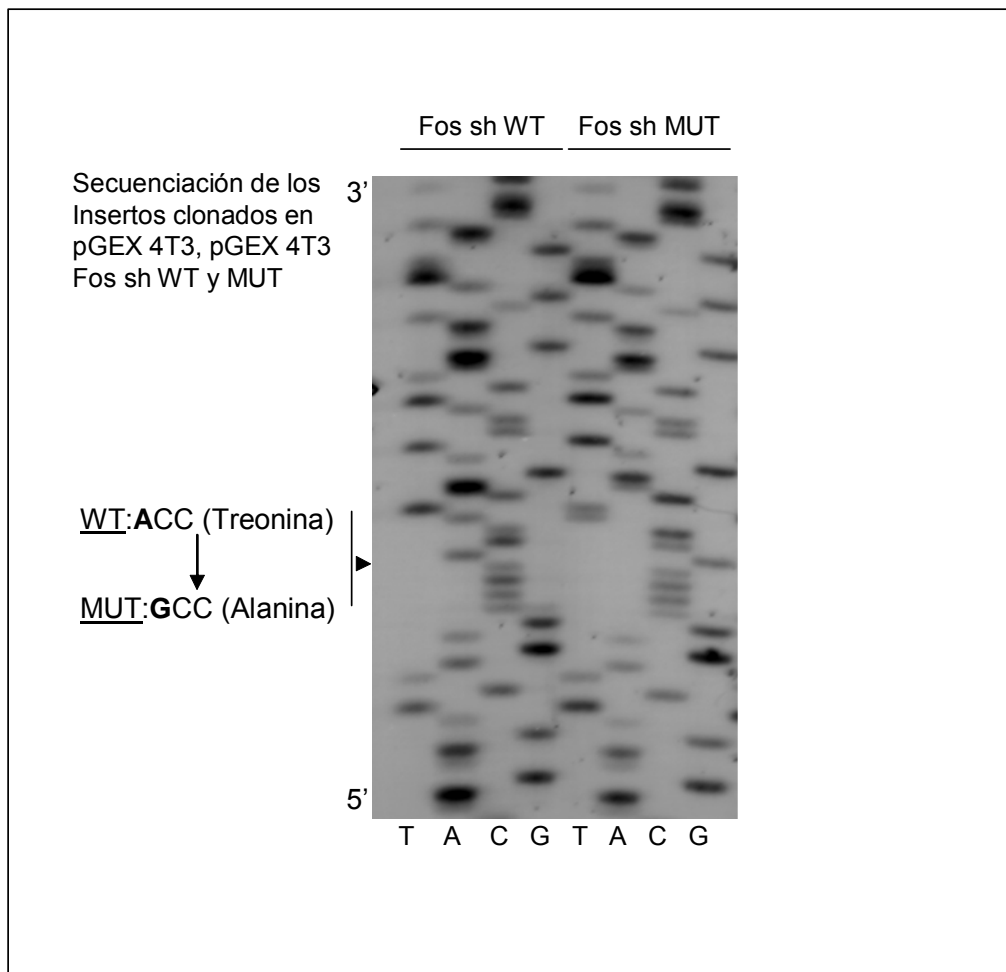
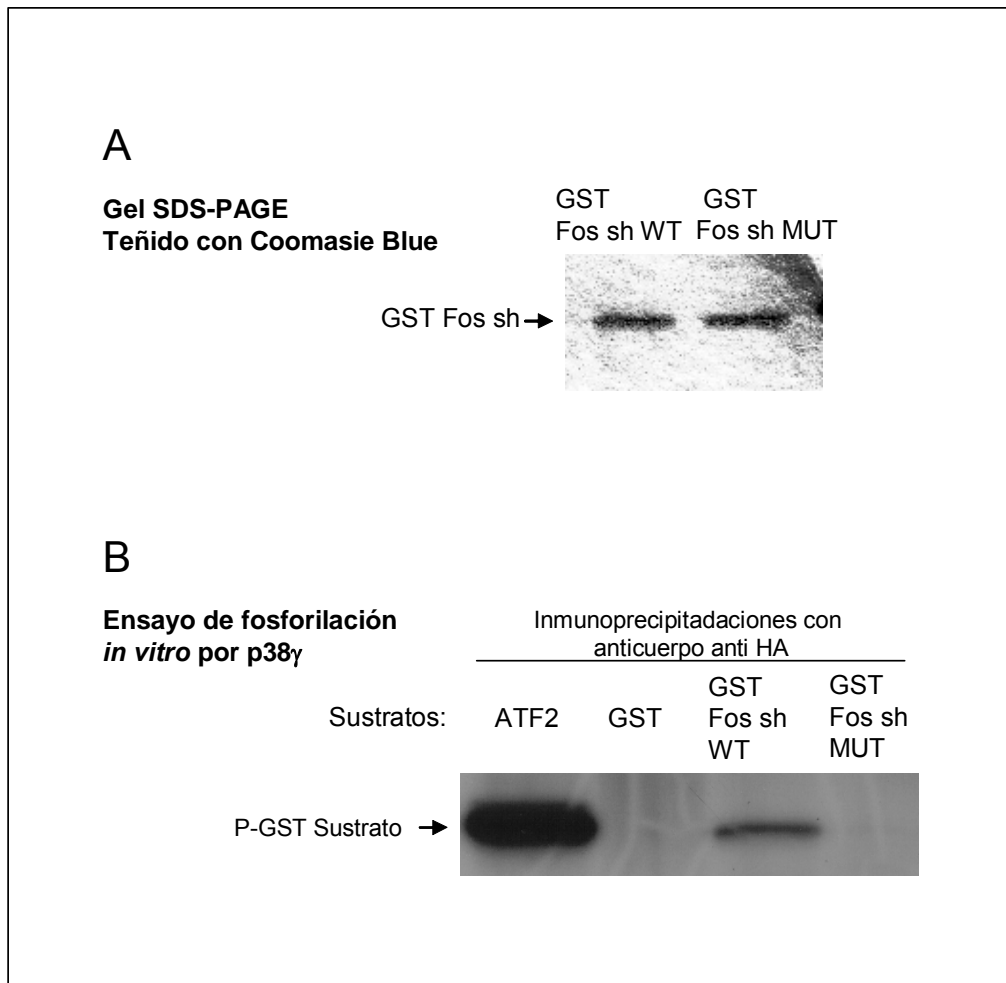


Figura 4:
Secuenciación de los insertos de c-Fos sh y c-Fos sh Mutante (MUT) clonados en pGEX4T3.

Se muestra una autorradiografía de una secuenciación realizada con el método de Sanger en donde se observa una parte de la secuencia de nucleótidos de los insertos Fos sh y de Fos sh Mutado en la Treonina 232. Se indica en la figura el cambio de bases que lleva al cambio de aminoácidos de Treonina a Alanina en el mutante.

**Figura 5:****El factor de transcripción c-Fos es fosforilado *in vitro* en la Treonina 232.**

A: Gel SDS-PAGE teñido con *coomassie blue* en el que se corrieron las proteínas purificadas de bacterias que expresan a las construcciones GST Fos sh WT y GST Fos Sh MUT utilizadas para el ensayo de fosforilación *in vitro*.

B: Autorradiografía de un ensayo de fosforilación *in vitro* realizado utilizando a la quinasa HA p38 γ inmunoprecipitada con anticuerpo anti HA de células transfectadas con pCEFL HA p38 γ , 32P γ ATP, y las distintas proteínas purificadas de extractos de bacterias (GST ATF2, GST, GST Fos sh WT y GST Fos sh MUT) como sustrato. En la figura se indican a las proteínas fosforiladas como P-GST Sustrato.

y la HA p38 γ inmunoprecipitada se incubó esta vez con γ ATP P³² y GST c-Fos sh o GST c-Fos sh MUT.

Como se observa en la figura R.5B, cuando la Treonina 232 fue reemplazada por Alanina c-Fos sh no puede ser fosforilado por p38 γ .

Estos resultados señalan que la T232 de c-Fos sh es un residuo fosforilado por p38 γ in vitro.

El estudio se amplía a todos los miembros de las SAPKs.

La proteína p38 γ es una quinasa activable por estrés, existen otras MAPKs activables por estrés como p38 α , p38 β , p38 δ y JNK. En base a los resultados obtenidos anteriormente decidimos ampliar el análisis y estudiar la regulación de c-Fos por todas las MAPKs activadas por estrés o SAPKs (“Stress Activated Protein Kinases”).

Para ello realizamos nuevas construcciones de c-Fos, por un lado clonamos el cDNA de c-Fos completo y por otro lado el dominio de transactivación (TAD). Utilizamos distintos vectores: un vector de expresión en bacterias como fusión con GST, pGEX4T3, y vectores de expresión eucariota como pCEFL-GFP, HA o AU5 o vectores que permiten realizar análisis de genes reporteros como pGAL4DBD (que porta el dominio de unión al DNA de GAL4 para obtener proteínas de fusión con c-Fos entero o su dominio de transactivación). Otras construcciones necesarias para este estudio fueron cedidas gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind y miembros de su grupo.

Análisis de la fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos por SAPKs. Ensayos de fosforilación in vitro.

Se sabe que la fosforilación en el dominio de transactivación (TAD) de los factores de transcripción lleva a la activación de los mismos aumentando su capacidad de transactivar a la RNA polimerasa y por lo tanto, inducir la síntesis de RNA (167). En c-Fos, el dominio de transactivación se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la proteína (33). Esta región contiene al menos cuatro residuos dentro de un consenso de fosforilación por MAPKs, Serina/Prolina o Treonina/Prolina. Estos sitios son la T232 (como se mencionó previamente), T325, T331 y S374, los cuales se encuentran conservados tanto en la secuencia de c-Fos humano como de ratón.

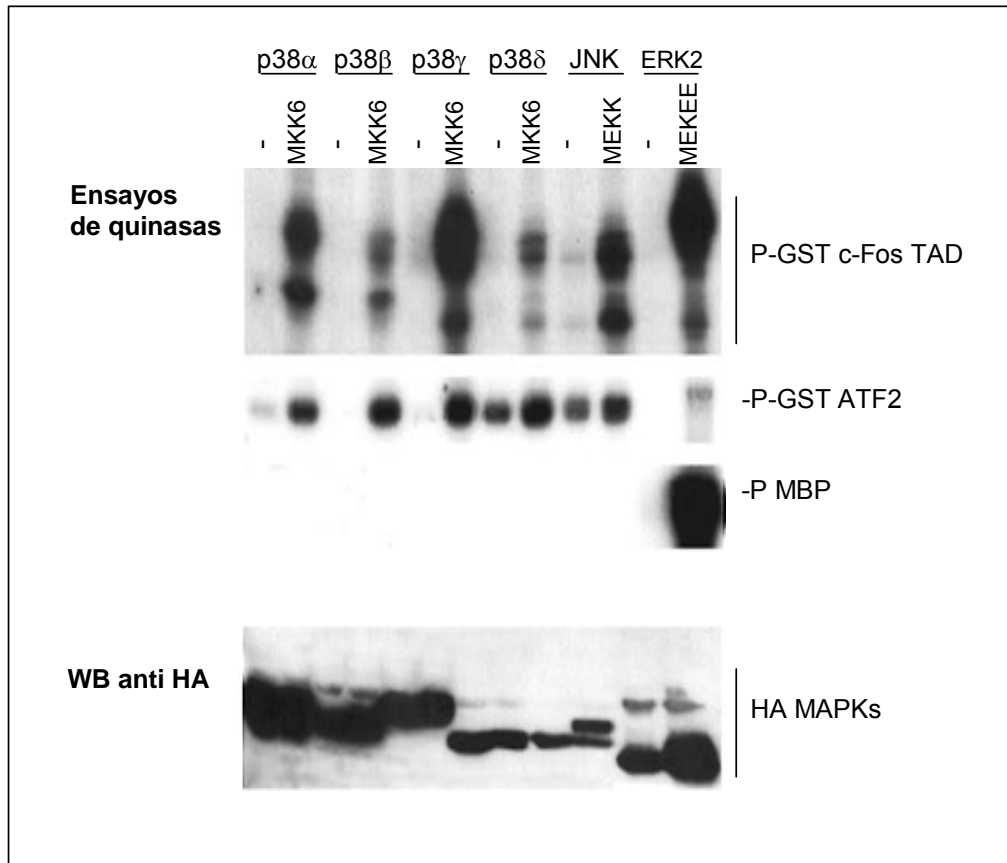


Figura 6:

La proteína c-Fos es sustrato de todas las SAPKs *in vitro*.

Se transfectaron células HEK 293 con vectores de expresión para HA p38α, HA p38β, HA p38γ, HA p38δ, HA JNK o HA ERK2 conjuntamente con los plásmidos que expresan a los activadores de estas quinasas, MKK6, MEKK o MEKEE según corresponda.

Los lisados celulares obtenidos fueron divididos en dos alícuotas iguales e inmunoprecipitados con anticuerpo anti HA. Cada inmunoprecipitado fue utilizado para realizar un ensayo de quinasas con GST c-Fos TAD como sustrato (panel superior) o con un sustrato que se sepa es fosforilado por estas quinasas como control positivo (paneles del medio). En paralelo se realizaron Western blots de los lisados totales para confirmar la expresión de las quinasas transfectadas (panel inferior).

Para estudiar si otra quinasa miembro de las SAPKs era capaz de fosforilar a c-Fos *in vitro* realizamos ensayos de fosforilación sobre la proteína de fusión GST-FOS TAD (el dominio de transactivación del factor de transcripción en estudio como quimera con GST) purificada de bacterias.

Se transfectaron células HEK 293 con vectores conteniendo las secuencias de las distintas SAPKs, pCEFL-HA p38 α , p38 β , p38 γ o p38 δ o pCEFL-HA JNK. Para activarlas fueron co-transfectadas con la MAPKK activadora río arriba, o sea MKK6 o MKK3 para las p38 MAPKs o la MAPKKK MEKK para JNK. Se colectaron las células 48 horas después de la transfección y los lisados celulares se dividieron en dos alícuotas. Se inmunoprecipitó la quinasa en estudio de cada fracción y luego se la incubó con el sustrato y γ ATP P³². Los sustratos utilizados fueron GST c-Fos TAD (figura R.6 panel superior) o como control de la actividad de las kinasas transfectadas, GST ATF2 o MBP (figura R.6 paneles del medio). La transfección de pCEFL-HA ERK2 con su MAPKK activadora MEKEE se realizó como control positivo del ensayo de fosforilación ya que está reportado que puede fosforilar al dominio de transactivación de c-Fos (211).

El Western Blot del panel inferior de la figura R.6 fue revelado con un anticuerpo anti HA y muestra la expresión de las MAPKs transfectadas en los lisados celulares antes de inmunoprecipitar.

Como se muestra en el panel superior de la figura R.6, todas las SAPKs pueden fosforilar a c-Fos TAD *in vitro*.

Estos resultados sugieren que c-Fos podría ser un blanco de fosforilación para las SAPKs in vivo.

Análisis de la fosforilación de c-Fos por SAPKs *in vivo*.

Para estudiar si c-Fos es también fosforilado *in vivo*, analizamos la movilidad electroforética de c-Fos en geles SDS-PAGE seguidos de Western Blots, ya que la presencia de bandas de menor migración -o mayor peso molecular aparente- está relacionada con el estado de fosforilación de este factor de transcripción (57,211). Vale aclarar que c-Fos es una proteína hiperfosforilable y que al momento de realizar estos estudios no existían anticuerpos anti residuo específico fosforilado. La manera aceptada de estudiar fosforilación era (y continúa siendo) a través de la observación del retardo en la migración de las proteínas en una corrida electroforética seguida de Western Blot.

Entonces, para evaluar si c-Fos es fosforilado *in vivo* por SAPKs, co-transfectamos células HEK 293 con pCEFL-AU5 c-Fos FL (cDNA completa de c-Fos) y pCEFL-HA p38 α o p38 β o p38 γ o p38 δ o pCEFL-HA JNK y sus correspondientes activadores río arriba.

En el Western Blot de la figura R.7 (panel superior) se observa que las cuatro isoformas de las p38 inducen un retraso en la movilidad electroforética de c-Fos. Este cambio en la movilidad electroforética es dependiente de la activación de las SAPKs ya que en ausencia de MKK6 el retardo en la migración no se produce. Cabe destacar que el retardo no se produce cuando c-Fos es co-transfectado con JNK aunque la quinasa se encuentre activada por la co-transfección con MEKK. En el panel inferior de la figura R.7 se observa un Western Blot de los mismos lisados celulares revelado con anticuerpo anti HA en el que se corrobora la expresión de las quinasas transfectadas.

Se sabe que la fosforilación de los dominios de transactivación de los factores de transcripción tienen un rol determinante en la activación del mismo (167). El dominio de Transactivación de c-Fos, tal como mencionamos anteriormente, posee cuatro residuos dentro del consenso de Fosforilación por MAPKs. Esto nos llevó a investigar si el retardo observado en la movilidad electroforética de la proteína c-Fos full length se debía a la fosforilación por las p38s en el extremo c-terminal (c-Fos-TAD).

Para ello realizamos experimentos similares al descrito anteriormente pero co-transfectando con pCEFL-GFP-c-Fos-TAD, o sea, la porción carboxilo terminal de c-Fos, su dominio de transactivación, fusionado a GFP y las distintas SAPKs con sus activadores río arriba.

Observamos que el retardo en la movilidad electroforética solo ocurre en presencia de cualquiera de las cuatro isoformas de p38 activadas, y no en presencia de JNK activada (figura R.8).

Estos resultados sugieren que c-Fos es un sustrato *in vivo* de todas las isoformas de p38 SAPKS pero no de JNK SAPK y que las fosforilaciones que ocurren en el extremo carboxilo terminal son suficientes para producir una menor movilidad electroforética de c-Fos en una corrida electroforética en geles SDS PAGE.

Análisis de la actividad transcripcional de c-Fos en respuesta a la activación de las p38 SAPKs.

Sabiendo que las p38 SAPKs podían fosforilar a c-Fos *in vivo* y en particular, que pueden fosforilarlo en residuos de su dominio de transactivación, decidimos estudiar si esta fosforilación tiene algún efecto en la capacidad de transactivar de c-Fos.

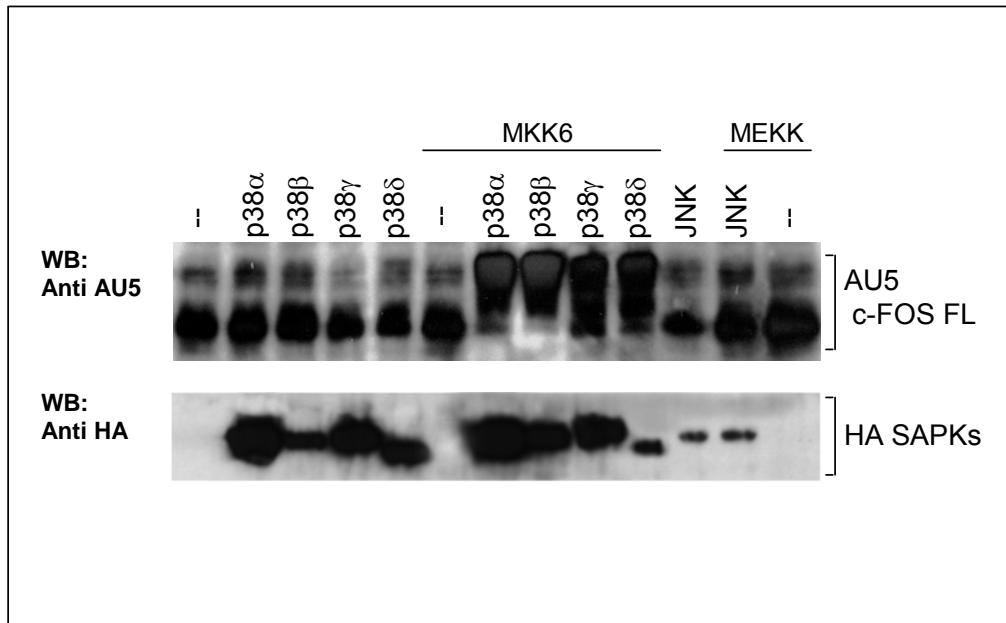


Figura 7:

La proteína c-Fos es fosforilada *in vivo* por las 4 isoformas de p38.

Células HEK 293 fueron co-transfectadas con pCEFL-AU5-c-Fos (FL: Full length o secuencia completa) y las distintas pCEFL-HA-SAPKs conjuntamente con MKK6 o MEKK, los activadores río arriba de p38s y JNK respectivamente.

Los lisados celulares fueron analizados por Western Blot utilizando anticuerpos anti AU5 (panel superior) –para evaluar la migración electroforética de c-Fos- o anti HA (panel inferior) –para corroborar que las quinasas transfectadas se estén expresando-.

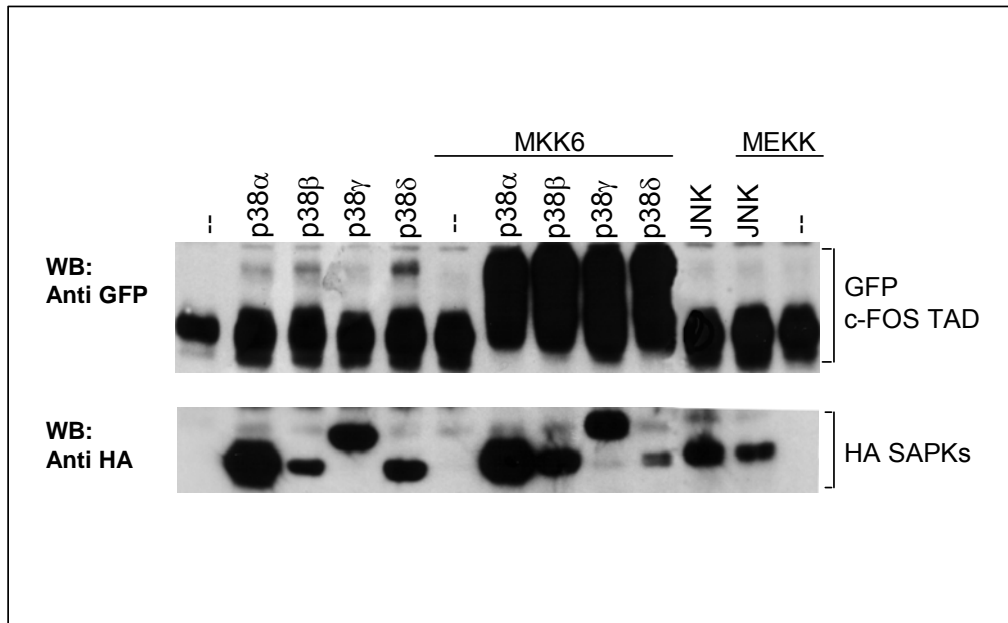


Figura 8:

El dominio de transactivación de c-Fos es fosforilado *in vivo* por las distintas p38 SAPKs.

Células HEK 293 fueron co-transfectadas con pCEFL-GFP-c-Fos TAD (TAD: dominio de transactivación) y las distintas pCEFL-HA-SAPKs conjuntamente con MKK6 o MEKK, los activadores río arriba de p38s y JNK respectivamente.

Los lisados celulares fueron analizados por Western Blot utilizando anticuerpos anti GFP (panel superior) –para evaluar la migración electroforética del dominio de transactivación de c-Fos- o anti HA (panel inferior) –para corroborar que las quinasas transfectadas se estén expresando-.

Realizamos ensayos con el sistema de expresión génica de GAL4, un sistema heterólogo en el cual el dominio de transactivación de c-Fos es expresado como proteína de fusión con el dominio de unión al DNA del factor de transcripción de levaduras GAL4 (pGAL4-c-Fos-TAD). Esta proteína quimera, cuando esta activada, puede activar la transcripción del gen de Luciferasa clonado río abajo de un promotor mínimo conteniendo la secuencia del DNA a la que se une GAL4 (pGAL4 LUC).

Los plásmidos pGAL4 LUC y pGAL4-c-FOS-TAD se co-transfectaron en células NIH 3T3 junto con los plásmidos que expresan a las distintas isoformas de p38 y a MKK6.

Como se observa en la figura R.9 la co-transfección con las distintas p38s y MKK6 activa la capacidad de c-Fos de activar la transcripción del gen de Luciferasa, siendo especialmente fuerte el efecto de transactivación cuando p38 α y p38 β están activadas. También observamos que la actividad transactivadora de c-Fos TAD es leve cuando se expresa con p38 δ especialmente al comparar los resultados obtenidos con el efecto transactivador de las otras p38s sobre c-Fos. Además no se observa un aumento o cambio en la capacidad de c-Fos TAD de activar la transcripción al cotransfectar con JNK.

Estos resultados sugieren que la fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos por las p38 α , β y γ activadas es suficiente para activar la capacidad transcripcional de c-Fos.

Alternativamente, para estudiar cual isoforma de p38 endógena es la responsable de la capacidad transcripcional de c-Fos-TAD, utilizamos variantes dominantes negativas de las p38 SAPKs. Estas variantes no pueden activarse debido a que los residuos Treonina y Tirosina del dominio T X Y, que permiten su activación, se encuentran mutados (la Treonina 183 fue reemplazada por una Alanina y la Tirosina 185 por Fenilalanina).

Transfectamos células NIH3T3 con pGAL4 LUC, pGAL4-c-Fos-TAD y pCDNA3-MEK3EE (una forma constitutivamente activa de MKK3, una MAPKK que activa fuertemente a las p38s) (198) conjuntamente con alguno de los dominantes negativos para las p38, p38 α AF, p38 β AF, p38 γ AF o p38 δ AF (244).

Como se muestra en la figura R.10, cuando MEK3EE es co-expresada junto a las versiones de p38s que actúan como dominantes negativos para las p38s endógenas, la capacidad transcripcional de c-Fos TAD disminuye. Se observa que todas las formas dominantes negativas de las isoformas de p38 inhiben la capacidad transactivacional de c-Fos, especialmente las isoformas α y β .

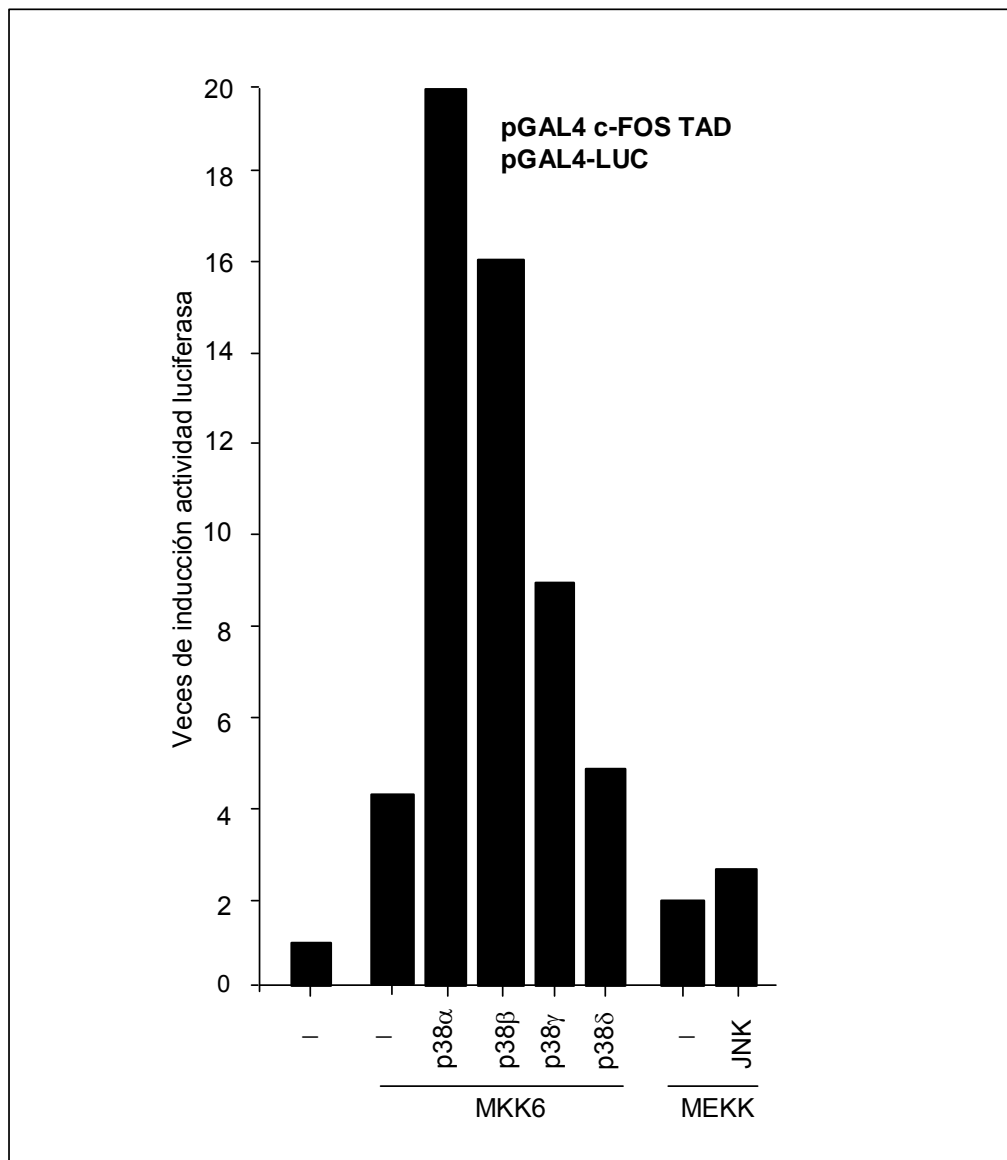


Figura 9:

Las SAPKs activan la transcripción mediada por c-Fos (1).

Se transfectaron células NIH 3T3 con el plásmido reportero pGAL4 LUC, el plásmido que expresa la proteína de fusión GAL4 c-Fos TAD (pCDNA3 GBDX-c-Fos) y pRNull, junto con pCEFL HA-p38 α , HA-p38 β , HA-p38 γ , HA-p38 δ , o HA-JNK, junto con los activadores río arriba de p38 or JNK (MKK6 o MEKK, respectivamente). 24 horas después de la transfección las células fueron cosechadas. Se determinó la actividad de Luciferasa y de Renilla como control de transfección, para normalizar.

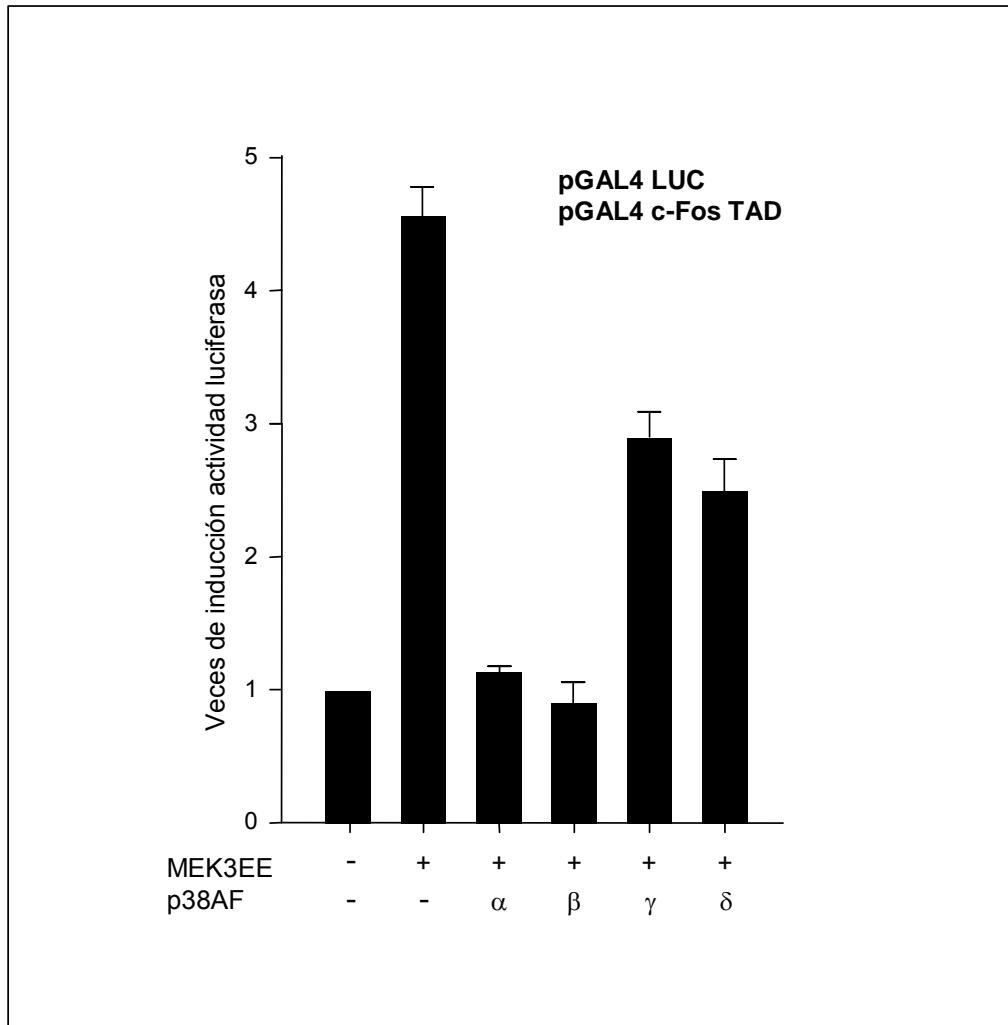


Figura 10:

Las SAPKs activan la transcripción mediada por c-Fos (2).

Se transfectaron células NIH 3T3 con el plásmido reportero pGAL4 LUC, el plásmido que expresa la proteína de fusión GAL4 c-Fos TAD (pCDNA3 GBDX-c-Fos) y pRNull, junto con las formas dominantes negativas (AF) de HA-p38 α , HA-p38 β , HA-p38 γ o HA-p38 δ y el activador río arriba de las p38s, MEK3 EE. 24 horas después de la transfección las células fueron cosechadas y de los lisados celulares se determinó la actividad de Luciferasa y de Renilla como control de transfección, para normalizar.

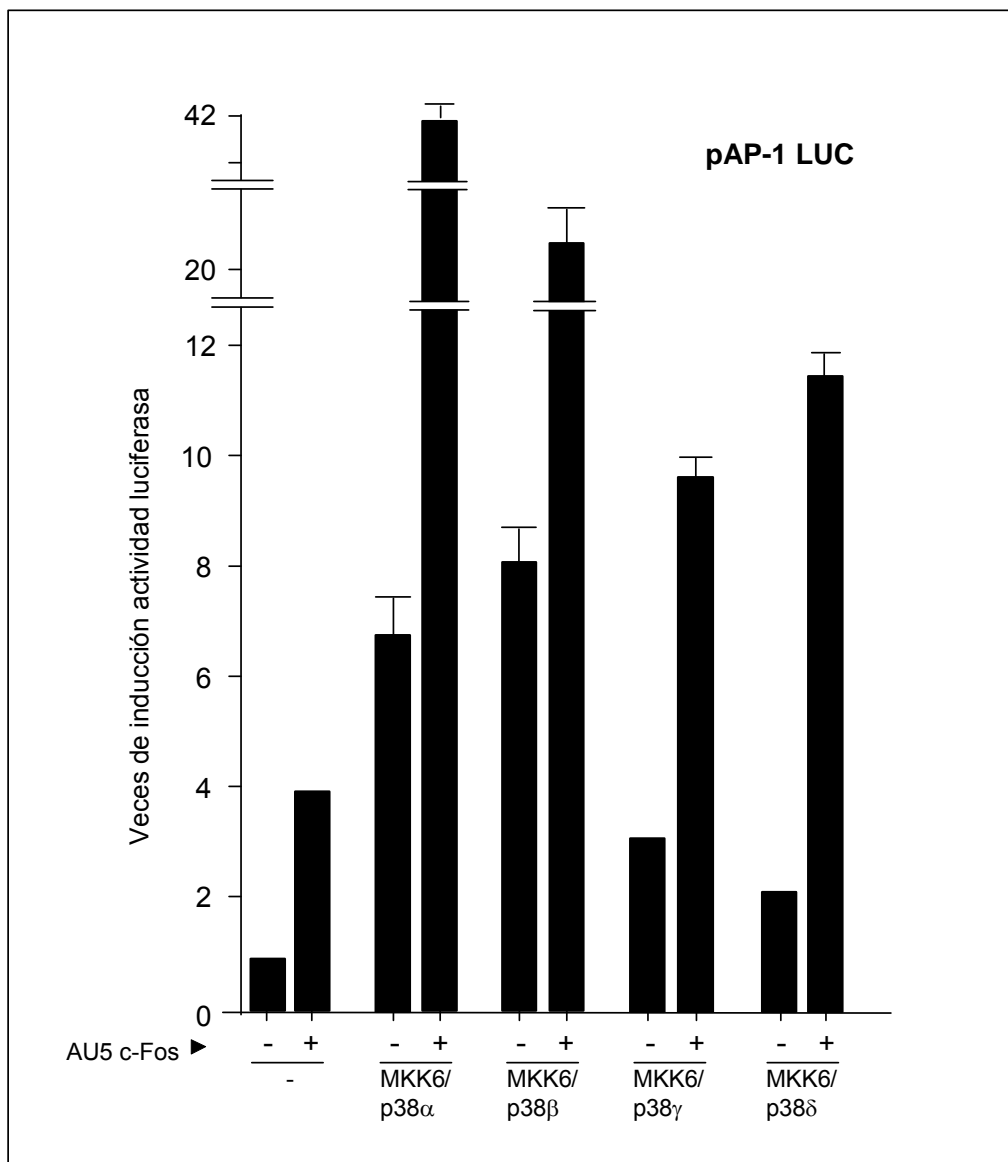


Figura 11:

Las SAPKs activan la transcripción mediada por c-Fos (3).

Células NIH3T3 fueron transfectadas con pCEFL AU5 c-Fos, pRNull, pCDNAIII GST MKK6 y pCEFL HA-p38 α , HA-p38 β , HA-p38 γ o HA-p38 δ como se indica en la figura. 24 horas después de la transfección las células fueron cosechadas y se determinó la actividad de Luciferasa y de Renilla (para normalizar) en los correspondientes lisados.

Estos resultados muestran que las p38 SAPKs, en particular las p38 α y p38 β , inducen la actividad transcripcional de c-Fos y sugieren que esta actividad es controlada diferencialmente por los distintos miembros de las p38 MAPKs.

Efecto de la transactivación de c-Fos sobre sitios de respuesta a AP-1.

La proteína c-Fos es un factor de transcripción que dimeriza con proteínas de la familia Jun para activar la transcripción de genes que contengan sitios AP-1 en su promotor.

Decidimos investigar si c-Fos activado por las p38 MAPKs afecta la transcripción de un promotor mínimo que contiene varios sitios AP-1. Para ello utilizamos un plásmido reportero que contiene 7 elementos de respuesta AP-1 repetidos (en tandem) río arriba del gen de Luciferasa. Este plásmido fue transfectado en células NIH 3T3, conjuntamente con las p38 MAPKs y MKK6 en presencia o ausencia de c-Fos FL (secuencia completa).

La figura R.11 muestra que la sola presencia de c-Fos aumenta la actividad Luciferasa, o lo que es equivalente, activa al promotor con sitios AP-1 del gen reportero Luciferasa. También se observa un fuerte efecto de las p38 α y β activadas sobre la actividad AP-1 al compararlo con el efecto obtenido con las p38 γ y δ , siendo p38 α y β capaces de activar la transcripción dirigida por los elementos AP-1 aún en ausencia de c-Fos transfectado. Asimismo se observa que c-Fos potencia fuertemente la actividad Luciferasa de todas las quinasas activadas llegando a 42 y 25 veces de inducción al ser co-transfectada con p38 α y p38 β respectivamente.

Estos resultados muestran que la transactivación de c-Fos por p38 MAPKs (especialmente las isoformas p38 α y p38 β) induce la actividad de AP-1 y sugieren que actuando a través de la fosforilación de c-Fos, las p38 MAPKs regularían la expresión de genes que contienen sitios de respuesta AP-1.

2- Regulación post-traducciona de c-Fos inducida por luz UV. Ejemplo de regulación de c-Fos por señales inductoras de estrés.

Fosforilación de c-Fos *in vivo* inducida por radiación UV.

Los estímulos extracelulares que inducen estrés celular son activadores tanto de p38 como de JNK. (79,284).

Este hecho nos llevó a buscar un agonista que induzca la fosforilación de c-Fos *in vivo*.

Para ello transfectamos células HEK 293 con el plásmido pCEFL AU5 c-Fos FL. Estas células se incubaron en medio sin suero toda la noche para inhibir la actividad de quinasas intracelulares y al día siguiente se las estimuló con radiación UV ($120\text{J}/\text{m}^2$) o anisomicina ($5\mu\text{M}$), o con otros estímulos que inducen la activación de MAPKs como TNF($10\text{ng}/\text{ml}$) o LPA ($50\mu\text{M}$) por media hora (249,334). Las células fueron colectadas a distintos tiempos y los lisados celulares se resolvieron en geles SDS PAGE para luego realizar Western Blots utilizando un anticuerpo anti AU5.

En la figura R.12A observamos que dos estímulos que producen estrés celular, radiación UV y anisomicina, inducen el retraso en la movilidad electroforética de c-Fos mientras que no lo inducen otros estímulos que también activan MAPKs como LPA o TNF.

En los Western blots de la Figura R.12 B se observa que la disminución en la migración electroforética de c-Fos se va incrementando a medida que transcurre el tiempo después del estímulo, tanto para las células estimuladas con radiación UV como para las células estimuladas con anisomicina.

Estos resultados sugieren que estímulos que produzcan estrés celular inducen la fosforilación de c-Fos.

Para confirmar que los cambios en la movilidad electroforética se deben a fosforilación incubamos muestras de células transfectadas con AU5 c-Fos previamente tratadas o no con luz UV y las sometimos a un tratamiento con la fosfatasa de Serinas y Treoninas, PP2A. La acumulación de bandas de menor movilidad en el SDS PAGE se redujo en presencia de PP2A (no mostrado) reafirmando que el retardo observado en la corrida electroforética es dependiente de la adición de grupos fosfato en residuos de Serina o Treonina.

Estos resultados muestran que c-Fos es un blanco de fosforilación en condiciones en donde las células son sometidas a agentes que causan estrés.

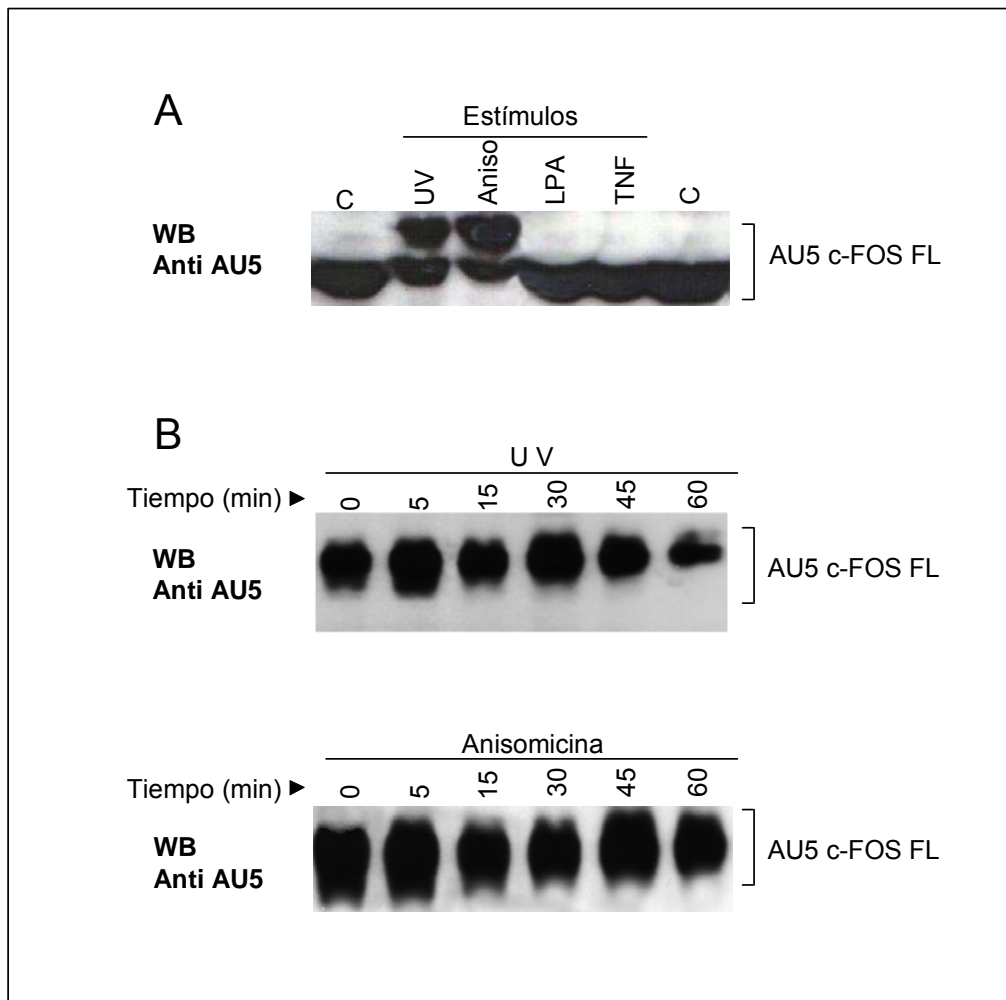


Figura 12:

La radiación UV induce la fosforilación de c-Fos.

A. Células HEK 293 fueron transfectadas con pCEFL-AU5-c-Fos. Luego de 12 horas de la transfección fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche. Al día siguiente las células fueron estimuladas con radiación UV (100J/m²), Anisomicina (5μM), LPA (50μM) o TNF (10ng/ml) y colectadas 45 minutos después del estímulo. Los lisados celulares se analizaron por WB utilizando un anticuerpo anti AU5.

B. Células HEK 293 fueron transfectadas con pCEFL-AU5-c-Fos. 24 horas después las células fueron estimuladas con radiación UV o con Anisomicina y colectadas a diferentes tiempos post-estimulación según se indica en la figura. Los lisados celulares fueron analizados por WB usando anticuerpo anti AU5.

Efecto de la radiación UV sobre la activación de las SAPKS.

Antes de estudiar si las p38 fosforilan a c-Fos en respuesta a radiación UV, analizamos si los estímulos que producen estrés, anisomicina o radiación UV activan a las SAPKS. Un modo de evaluar si las MAPKs se encuentran activadas es analizando su nivel de fosforilación.

Para ello realizamos Western Blots de células transfectadas con las distintas quinasas en estudio (HA p38 α , HA p38 β , HA p38 γ , HA p38 δ o HA JNK), incubadas en medio 1% suero toda la noche y luego estimuladas o no con UV o anisomicina por veinte minutos.

Como se observa en los paneles superiores de la figura R.13, todas las SAPKS son activadas en respuesta a ambos estímulos. En los paneles inferiores se observa el control de expresión de las quinasas transfectadas.

Estos resultados muestran que todas las SAPKS son activadas en respuesta a radiación UV y a anisomicina.

Efecto de las p38 SAPKS activadas por radiación UV sobre la fosforilación de c-Fos.

Hasta el momento observamos que las SAPKS se activan en respuesta a UV, que la luz UV induce la fosforilación de c-Fos y que las p38 SAPKS fosforilan a c-Fos.

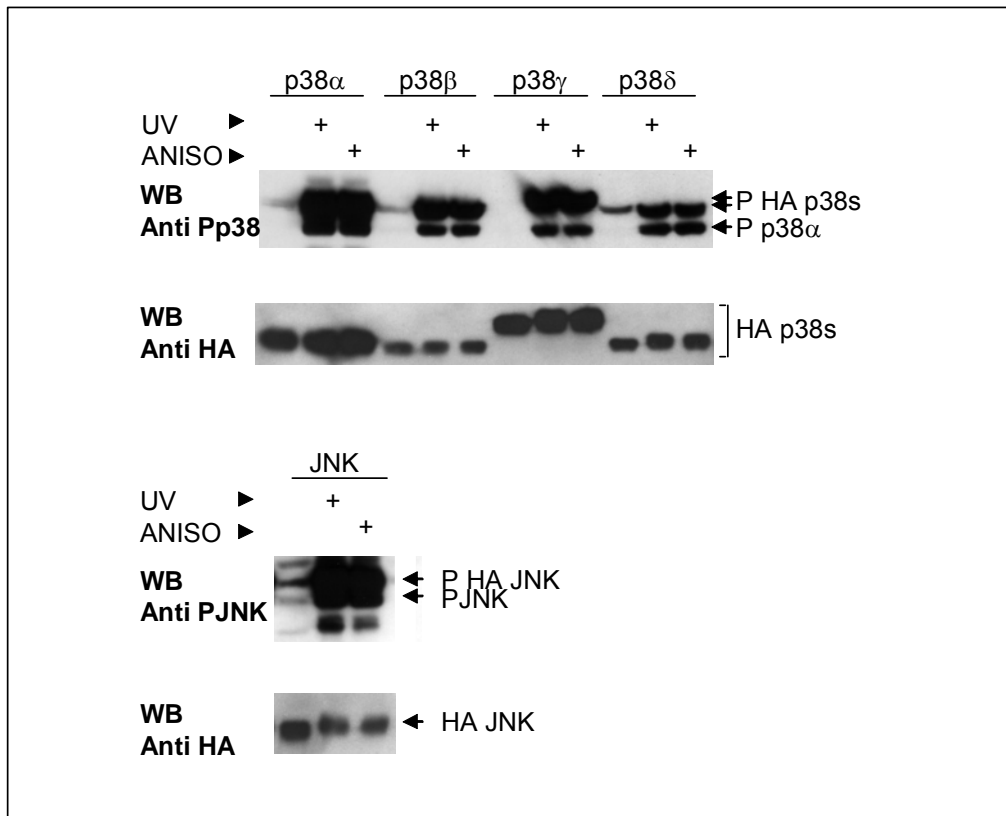
En base a estos resultados decidimos analizar si las p38 MAPKs fosforilan a c-Fos en respuesta a UV.

Para ello realizamos experimentos en los cuales analizamos la movilidad electroforética de c-Fos en respuesta a radiación UV en células transfectadas con las diferentes SAPKS.

Sabiendo que a los 5 minutos de estimulación con UV el retardo en la corrida electroforética de c-Fos aún no es muy notorio (figura R.12), analizamos muestras colectadas 5 minutos post estímulo. En esta situación inferimos que resultaría mas sensible la observación del efecto de las p38 sobrepresadas, sobre la movilidad electroforética de c-Fos.

Células HEK 293 fueron co-transfectadas con pCEFL-AU5 c-Fos y las plásmidos que expresan a las diferentes SAPKS. Estas células se incubaron toda la noche en medio 1% suero y a la mañana siguiente se colectaron a los 5 minutos post estimulación con radiación UV, se lisaron y los lisados totales se analizaron por Western Blots utilizando un anticuerpo anti AU5.

Se observa en la figura R.14 que la co-transfección con cualquier isoforma de p38 aumenta considerablemente la fosforilación de c-Fos en respuesta a UV, mientras que al cotransfectar con

**Figura 13:****Todas las SAPKs se activan en respuesta a radiación UV.**

Se transfectoron vectores de expresión para las distintas HA-SAPKs en células HEK 293. 24 horas después de la transfección las células fueron incubadas en medio con 1% suero y estimuladas con UV o anisomicina. A los 20 minutos post-estimulación las células fueron colectadas y los lisados celulares se analizaron por WB con anticuerpos anti proteínas fosforiladas: anti Fosfo-SAPKs (P-SAPKs), anti Fosfo p38 (P-p38) o anti Fosfo JNK (P-JNK) según corresponda (paneles superiores), o con anticuerpo anti HA para evaluar que las SAPKs se estén expresando (paneles inferiores).

JNK no se observa el mismo efecto. El tratamiento con anisomicina en experimentos equivalentes produjo el mismo efecto (no mostrado). En el panel inferior de la figura R.14 se observa el control de expresión de las quinasas transfectadas.

En base a estos resultados inferimos que la fosforilación de c-Fos producida en respuesta a radiación UV es mediada por las p38 SAPKs.

En la secuencia aminoacídica del dominio de transactivación de c-Fos existen cuatro residuos que podrían ser fosforilados por MAPKs, los aminoácidos Treonina 232, Treonina 325, Treonina 331 y Serina 374. Para confirmar que el retardo en la movilidad electroforética observado se debe a que las p38 MAPKs fosforilan esos residuos, utilizamos un plásmido que lleva la secuencia del dominio de transactivación de c-Fos con los cuatro residuos consenso para fosforilación por MAPKs mutados a Alanina, c-Fos-MUT.

Transfectamos células HEK 293 con pCEFL-AU5 c-Fos-MUT junto con los vectores que expresan las diferentes SAPKs y analizamos los respectivos lisados por SDS-PAGE seguidos de Western Blots revelados con un anticuerpo anti AU5.

Como se observa en la figura R.15, no hay cambios en la movilidad electroforética de AU5 c-Fos-MUT al estimular con radiación UV independientemente de la sobreexpresión de las SAPKs, por lo que el retardo en la movilidad electroforética inducida por UV se debería a la fosforilación de c-Fos por las p38 SAPKs en los sitios consenso de fosforilación para MAPKs del dominio de transactivación de c-Fos.

Nuevamente en el panel inferior se exhibe un Western Blot en el que se controla la expresión de las quinasas transfectadas.

Estos resultados muestran que las cuatro isoformas de p38 MAPKs son responsables de la fosforilación de c-Fos en respuesta a UV en los sitios consenso de fosforilación para MAPKs del dominio de transactivación de c-Fos.

Alternativamente utilizamos el inhibidor de p38 α y p38 β , SB 203580 (304) para estudiar si la fosforilación de c-Fos inducida por UV se debe a la activación de las p38. Se utilizó solo este inhibidor porque que actualmente no se cuenta con inhibidores que actúen sobre las otras isoformas que estén disponibles comercialmente.

Se transfectaron células HEK 293 con pCEFL-AU5 c-Fos FL, y se incubaron en medio 1% suero durante toda la noche. Una hora antes de estimular las células fueron preincubadas con el inhibidor SB 203580 y luego se procedió a estimularlas con UV. Se colectaron a los 20 minutos después del estímulo y los lisados se analizaron por Western Blot utilizando un anticuerpo anti

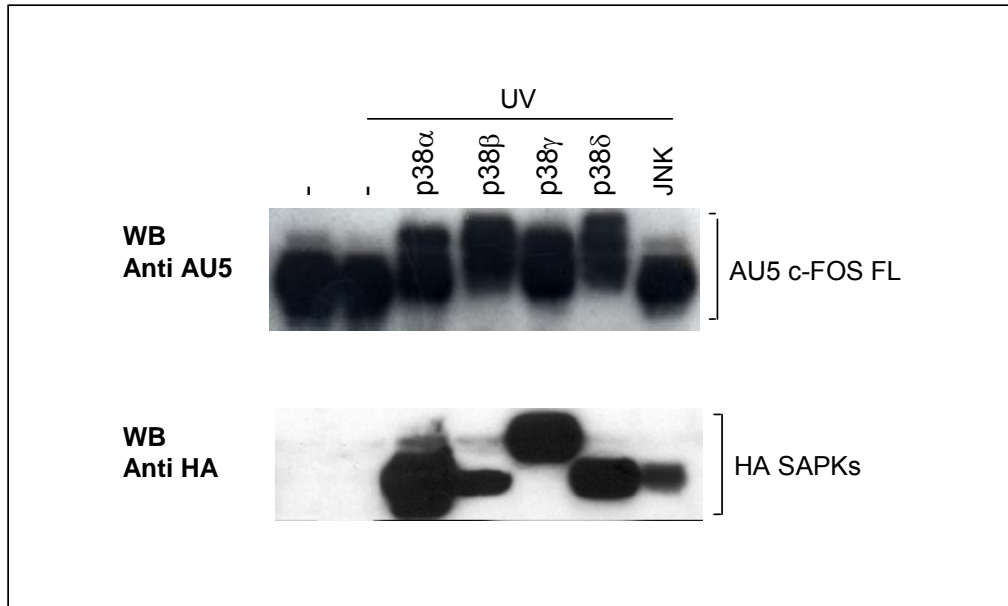


Figura 14:

La fosforilación de c-Fos que ocurre en respuesta a radiación UV es mediada por las p38 SAPKs.

Células HEK 293 fueron co-transfectadas con pCEFL AU5 c-Fos (*wild type*), pCEFL HA-p38 α , HA-p38 β , HA-p38 γ , HA-p38 δ , or HA-JNK, incubadas en medio 1% suero toda la noche y estimuladas con UV. Los lisados se analizaron por WB utilizando un anticuerpo anti AU5 para evaluar la movilidad electroforética de c-Fos FL (FL: *Full lenght*) o con anticuerpo anti HA para controlar la expresión de las SAPKs transfectadas.

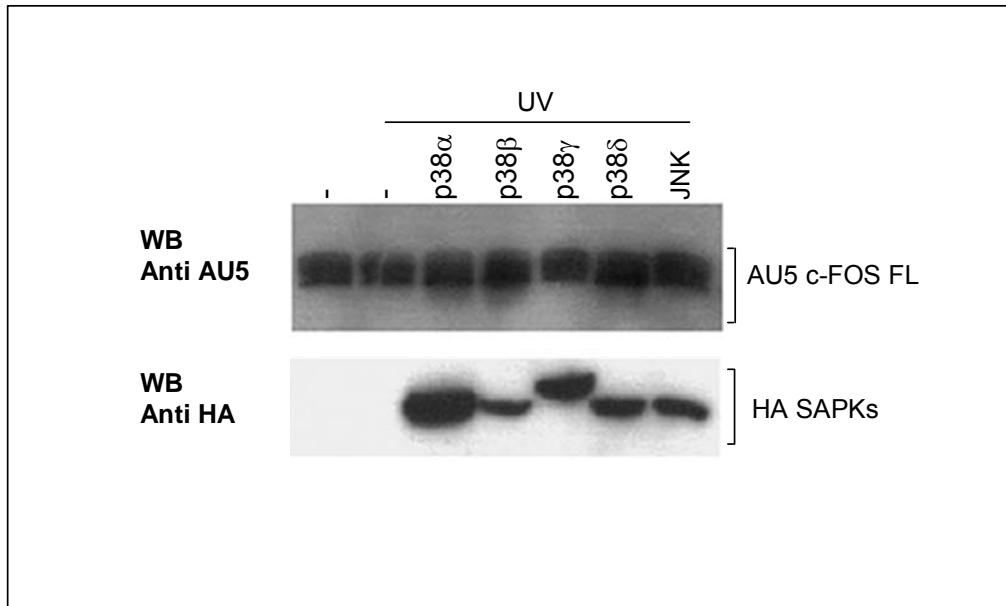


Figura 15:

Las p38 SAPKs fosforilan a c-Fos en el dominio de transactivación en respuesta a la radiación UV.

Células HEK 293 fueron co-transfectadas con pCEFL AU5 c-Fos MUT (Treoninas 232, 325, y 331 y Serina 374 reemplazadas por alaninas), pCEFL HA-p38 α , HA-p38 β , HA-p38 γ , HA-p38 δ , or HA-JNK, incubadas en medio 1% suero toda la noche y estimuladas con UV. Los lisados celulares se analizaron por WB utilizando un anticuerpo anti AU5 para evaluar la movilidad electroforética de c-Fos MUT o con un anticuerpo anti HA para controlar la expresión de las SAPKs transfectadas.

AU5. Como se observa en la figura R.16 el retardo en la movilidad electroforética disminuye con el agregado del inhibidor por lo que podemos inferir que al menos p38 α y β estarían involucradas en la fosforilación de c-Fos en respuesta a UV. Como control se utilizaron los inhibidores de JNK (SP 600125) (30) y de MEK (U 0126) (101) con los cuales, no se observó ningún efecto sobre la movilidad electroforética de c-Fos en respuesta a UV, por lo que ni JNK ni ERK2 estarían involucradas en la fosforilación en respuesta a UV (no mostrado).

Para confirmar estos resultados evaluamos si la proteína c-Fos endógena es también fosforilada en respuesta a radiación UV de manera dependiente de p38 α y/o β . Para ello realizamos un experimento como el de la figura R.16 pero utilizando células sin transfectar. Los lisados celulares fueron analizados por Western Blot utilizando un anticuerpo anti región carboxilo terminal de c-Fos.

Como se observa en la figura R.17 se produce una inhibición del retardo de c-Fos, lo que indica que las isoformas α y β de p38 fosforilan a la proteína endógena *in vivo* en respuesta a UV.

Resultados similares se obtuvieron al co-transfectar c-Fos con la forma dominante negativa de p38 α , p38 α AF, ya que al estimular con radiación UV, no se produce el retardo en la migración electroforética de AU5 c-Fos.(figura R.18).

En conjunto estos resultados indican que la radiación UV induce la fosforilación de c-Fos a través de las p38 SAPKs.

Estudio de la localización de c-Fos en respuesta a UV.

Distintos trabajos muestran que las MAPKs translocan al núcleo después de ser estimuladas (234) y que la localización subcelular de c-Fos puede variar en función de las condiciones en las que se encuentre la célula (140,151,242).

Nos propusimos investigar cual es la localización del factor de transcripción c-Fos luego de que las células son estimuladas con UV, evaluando también si su ubicación está correlacionada con la localización de las p38 MAPKs.

Transfectamos células HEK 293 con pCEFL-GFP c-Fos FL junto con las distintas isoformas de pCEFL-HA p38. Las células se incubaron en 1% suero durante toda la noche y al otro día fueron estimuladas con UV. A los 30 minutos post estimulación se fijaron y se incubaron con anticuerpo 1^{ro} anti-HA y luego con un anticuerpo 2^{ro} acoplado al fluorocromocromo TRITC. Finalizado el proceso de inmunocitoquímica las células se observaron en un microscopio de fluorescencia.

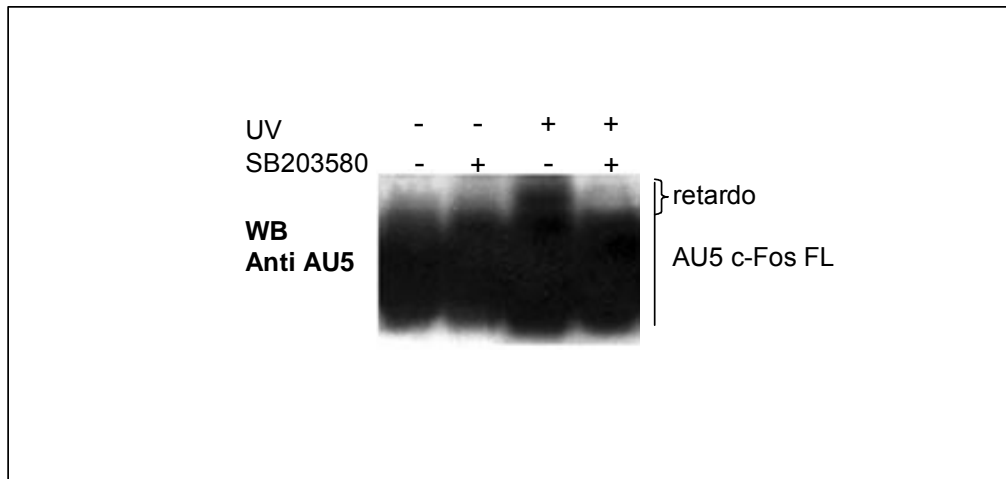


Figura 16:

La fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV es inducida por p38 (1).

Se transfectaron células HEK 293 con el plásmido pCEFL AU5 c-Fos. Las células transfectadas fueron incubadas en medio con 1% suero toda la noche y a la mañana siguiente se preincubaron o no durante una hora con el inhibidor de las isoformas de p38 α y β , SB203580, en una concentración final de 10 μ M. Se estimularon con radiación UV y se colectaron 20 minutos post estimulación. Los lisados celulares fueron analizados por Western Blot, utilizando un anticuerpo anti AU5.

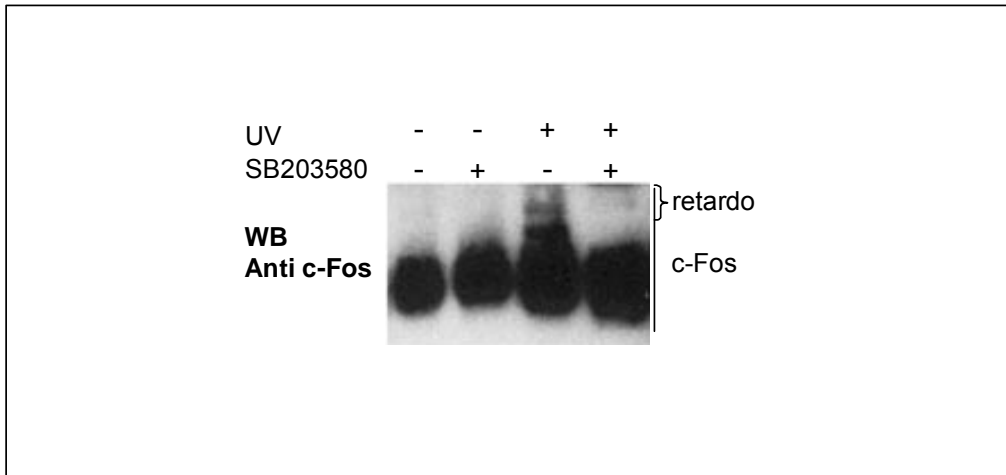


Figura 17:

La fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV es inducida por p38 (2).

Células HEK 293 fueron incubadas en medio con 1% suero toda la noche y a la mañana siguiente se preincubaron o no durante una hora con el inhibidor de las isoformas de p38 α y β , SB203580, en una concentración final de 10 μ M. Se estimularon con UV y se colectaron 20 minutos post estimulación. Los lisados celulares fueron analizados por Western blot, utilizando un anticuerpo anti c-Fos.

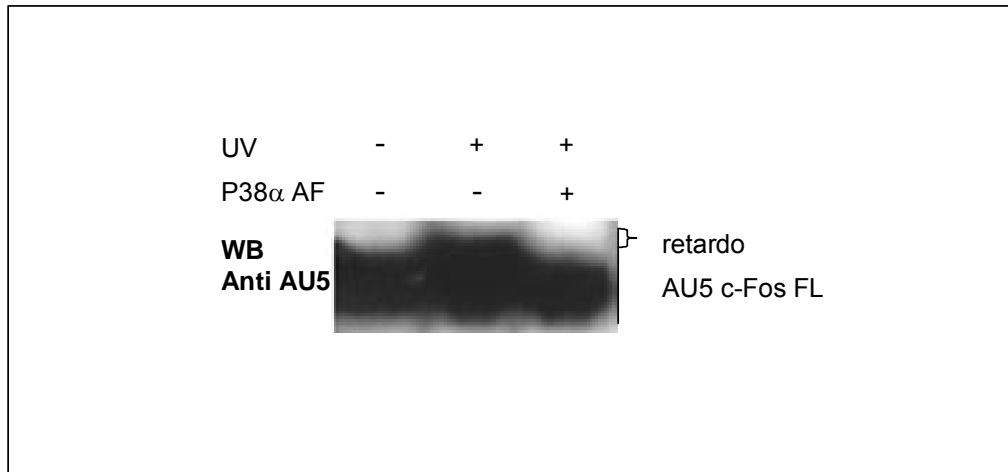


Figura 18:

La fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV es inducida por p38 (3).

Células HEK 293 fueron transfectadas con pCEFL AU5 c-Fos y el plásmido que expresa la forma dominante negativa de p38 α . Fueron incubadas en medio con 1% suero toda la noche y a la mañana siguiente se estimularon con radiación UV y se colectaron 20 minutos post estimulación. Los lisados celulares fueron analizados por Western blot, utilizando un anticuerpo anti AU5.

En las figura R.19 observamos que después de la estimulación con radiación UV la proteína GFP c-Fos transloca al núcleo donde también translocan las p38 α , p38 β y p38 γ . Curiosamente cuando co-tranfectamos con p38 δ , resulta evidente que ni GFP c-Fos, ni p38 δ translocan al núcleo, por el contrario, quedan retenidas en el citoplasma.

Estos resultados señalan que la radiación UV provoca una redistribución de las proteínas quinasas p38 SAPKs y de c-Fos dentro de la célula. En particular, las isoformas p38 α , p38 β y p38 γ , sobreexpresadas translocan al núcleo junto con c-Fos en respuesta a radiación UV, mientras que ante el mismo estímulo la sobreexpresión de p38 δ produce una retención citoplasmática de c-Fos y la proteína quinasa.

Habiendo observado que la luz UV induce cambios en la localización de GFP c-Fos, utilizamos el inhibidor SB 203580 como herramienta alternativa para evaluar la ubicación subcelular de GFP c-Fos en respuesta a UV, y si esta localización es dependiente de las p38.

Células HEK 293 fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche y luego estimuladas con luz UV. Estas células fueron tratadas o no con el inhibidor una hora antes del estímulo. Luego se colectaron y se fraccionaron núcleos y citoplasmas. Ambas fracciones celulares se analizaron por Western Blot utilizando un anticuerpo anti c-Fos. La intensidad de las bandas correspondientes a c-Fos fue analizada y se comparó la relación de cantidad de c-Fos entre núcleo y citoplasma en cada condición.

Se utilizaron anticuerpos anti actina y anti histona H2B para confirmar la pureza de cada una de las fracciones.

Este resultado se muestra en la figura R.20. Los valores obtenidos para la relación en la acumulación de c-Fos entre el núcleo y el citoplasma son de 0.38 en la condición control, 3.33 en respuesta al estímulo y 0.45 en presencia del estímulo más el inhibidor SB 203580, indicando el reestablecimiento de la condición control. Por lo que después de la estimulación con UV, c-Fos endógeno transloca al núcleo y esta acumulación de c-Fos en el núcleo se impide en presencia el inhibidor SB 203580.

Este resultado indica que la actividad de p38 α y/o β es necesaria para que la proteína c-Fos endógena transloque al núcleo en respuesta a UV.

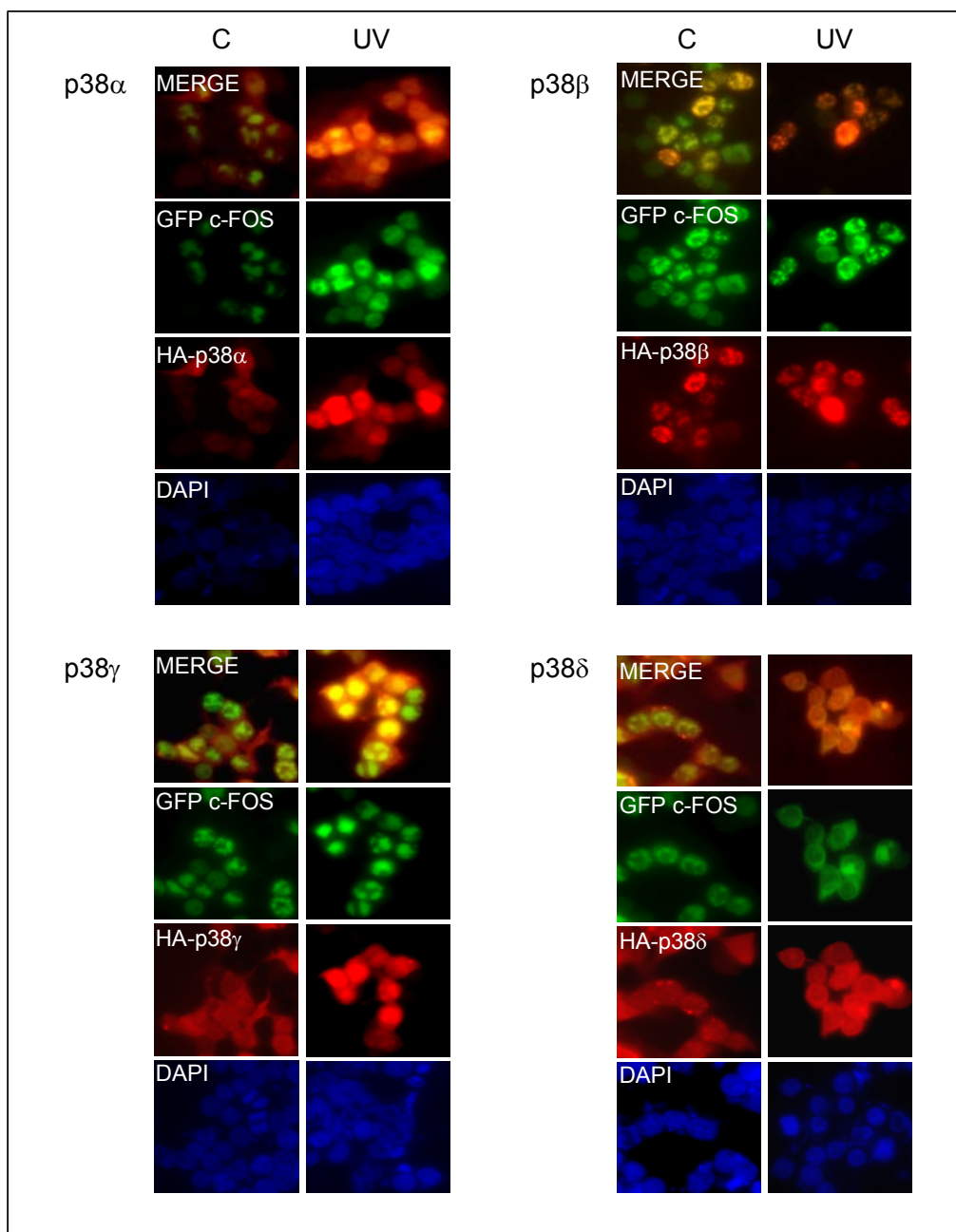


Figura 19:

La radiación UV induce la translocación al núcleo de c-Fos y de distintas p38 SAPKs.

Se transfectaron células HEK 293 sobre cubreobjetos con GFP c-Fos y las distintas isoformas de HA-p38. 16 horas después de incubarlas en medio 1% suero, se trataron o no con radiación UV y a los 20 minutos se fijaron. Luego se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo anti HA para observar la localización de p38 en cada condición, además se observó c-Fos en el microscopio de fluorescencia ya que fue expresado como proteína de fusión con GFP. Se realizó también una tinción nuclear con DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindole). Las fotos mostradas son representativas de entre 5-10 campos diferentes.

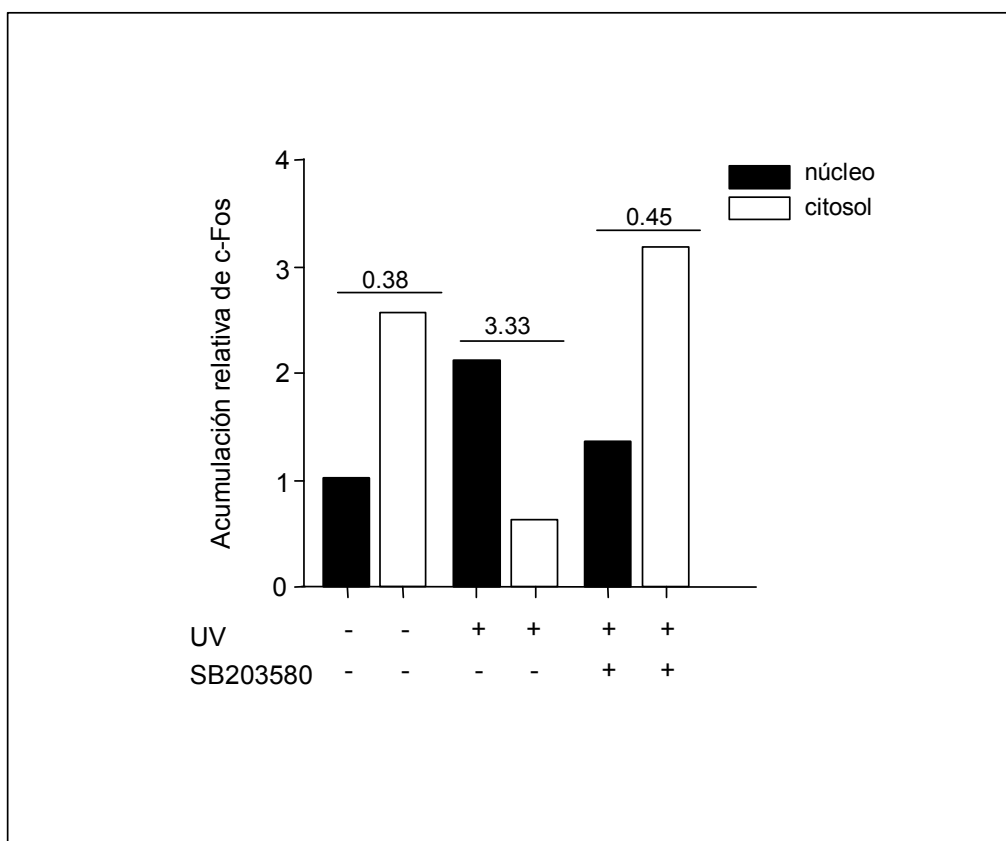


Figura 20:

La translocación de c-Fos al núcleo en respuesta a UV es mediada por las p38s (1).

Células HEK 293 fueron estimuladas con UV luego de haber sido pre-tratadas o no con el inhibidor SB 203580. Se colectaron las células y se extrajeron las fracciones nuclear y citoplasmática. Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE de ambas fracciones, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo anti c-Fos.

Las bandas correspondientes a c-Fos fueron digitalizadas y cuantificadas.

Estas cuantificaciones fueron graficadas como barras que representan la cantidad de c-Fos en cada fracción. Las barras negras representan a las fracciones nucleares y las blancas a las citoplasmáticas. Además se cuantificó la cantidad de c-Fos presente en el núcleo con respecto a la cantidad presente en el citoplasma para cada condición. Este cociente se indica como líneas que abarcan a las dos columnas de cada condición y sobre las que se ubica el valor de intensidad relativa de c-Fos en el núcleo con respecto al citoplasma.

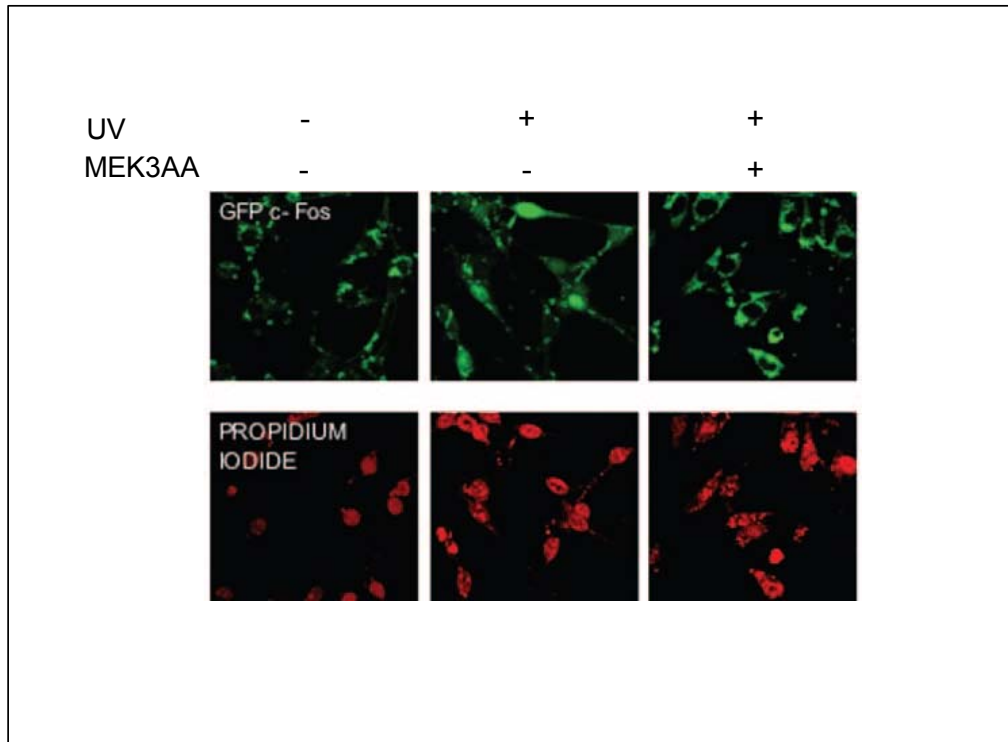


Figura 21:

La translocación de c-Fos al núcleo en respuesta a UV es mediada por las p38s (2).

Se sembraron células HEK 293 sobre cubreobjetos y se transfectaron con plásmidos de expresión para GFP c-Fos conjuntamente con vector vacío o con un vector de expresión de MEK3AA, el dominante negativo de MEK3. Luego de incubar por una noche en medio 1% suero, las células fueron estimuladas con UV y fijadas 20 minutos post estimulación. Luego fueron tratadas con yoduro de propidio para marcar los núcleos y fueron observadas en un microscopio confocal, para determinar la localización subcelular de c-Fos en cada condición.

Además, utilizamos el dominante negativo del activador de p38 MAPKs, MEK3AA (198) para analizar la localización de GFP-c-Fos en respuesta a UV.

Células NIH 3T3 fueron transfectadas con pCDNA3 MEK3AA y pCEFL-GFPc-Fos, luego de incubarlo en medio 1% suero se estimularon con radiación UV y se fijaron 20 minutos después del estímulo para ser observadas por microscopía confocal. Asumimos que en las células en las que se está expresando GFP c-Fos también se está expresando el dominante negativo. En estos experimentos se obtuvieron resultados similares a los expuestos en la figura R.20, en donde observamos que en presencia del dominante negativo, GFP c-Fos se mantiene en el citoplasma aún después de ser estimuladas por UV (figura R.21).

Todos juntos estos resultados indican que c-Fos transloca al núcleo en respuesta a radiación UV de manera dependiente de la actividad las quinasas p38 α y p38 β . Sugiriendo fuertemente que después del estímulo, c-Fos transloca al núcleo si es fosforilado por las p38 SAPKs activadas por UV.

Estudio de la formación de complejos AP-1 conteniendo c-Fos sobre sitios TRE en respuesta a radiación UV.

La translocación de c-Fos al núcleo como resultado de la fosforilación inducida por UV nos llevó a investigar la presencia de c-Fos en complejos proteicos que se unen a los sitios AP-1 o sitios TRE (“TPA Responsive Element”).

Para ello realizamos experimentos de EMSA (“Electromobility shift assays”) en los cuales marcamos radioactivamente oligonucleótidos con la secuencia consenso AP-1 y los incubamos con extractos nucleares de células HEK 293 que fueron previamente estimuladas con UV en presencia o ausencia del inhibidor SB 203580. Como se observa en la figura R.22 los extractos nucleares provenientes de células estimuladas con radiación UV producen un fuerte retraso en la movilidad electroforética del oligonucleótido AP-1 (figura R.22, columna 2). También se observa que el nivel de retraso disminuye al utilizar extractos nucleares de células tratadas con el inhibidor de p38 α y p38 β (tercer columna de la autorradiografía mostrada).

Además, para determinar si c-Fos está presente en el complejo que se une a AP-1 cuando las células son estimuladas con UV, incubamos a los extractos nucleares con el oligonucleotido AP-1 en presencia de un anticuerpo anti extremo carboxilo terminal de c-Fos. En este caso,

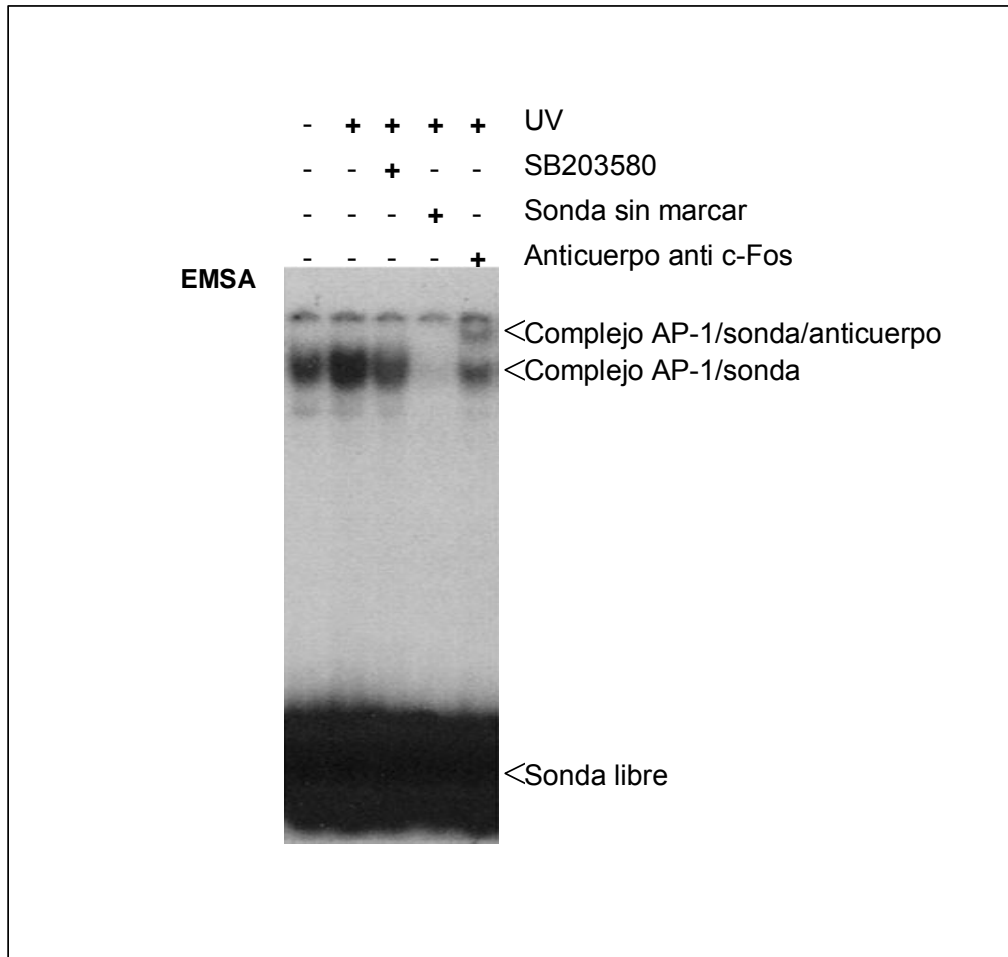


Figura 22:

La radiación UV promueve la formación de complejos AP-1 sobre sitios TRE de modo p38 dependiente.

Se realizaron ensayos de EMSA ("Electromobility shift assays") utilizando extractos nucleares de células HEK 293 tratadas o no con radiación UV. Los extractos nucleares fueron incubados con el oligonucleótido marcado que posee la secuencia de unión de AP-1, TRE ("TPA responsive element"). Además se utilizaron núcleos provenientes de células que habían sido pre tratadas con SB203580. Como control se incubaron los núcleos con sonda sin marcar y para asegurarnos de que c-Fos se encuentre formando parte de los complejos AP-1, los complejos núcleos/sonda se incubaron con anticuerpo anti c-Fos.

observamos que se forma una segunda banda de retardo que corresponde al complejo proteínas nucleares+anticuerpo anti c-Fos+ oligonucleótido AP-1.

Estos datos muestran que en células estimuladas con radiación UV, aumenta la unión de complejos proteicos a sitios AP-1 que contienen a c-Fos y que se requiere la actividad de las p38 para que se produzca esta interacción.

En conjunto, los resultados de las figuras R.13 a R.22 ponen de manifiesto un importante rol para las p38 en la activación del factor de transcripción c-Fos en la respuesta celular a un estímulo que produce estrés celular como la irradiación UV.

Análisis de la fosforilación de los sitios consenso para MAPKs del dominio de transactivación de c-Fos por p38 SAPKs.

Luego de determinar el rol de las p38 activadas por UV en la fosforilación y activación de c-Fos decidimos investigar la contribución de la fosforilación de cada sitio del dominio de transactivación de c-Fos dentro del consenso de fosforilación de MAPKs.

Los cuatro residuos consenso de fosforilación de MAPKs (T232, T325, T331 y S374) fueron analizados independientemente utilizando construcciones mutantes del TAD de c-Fos.

Mediante mutagénesis dirigida, el cDNA de la proteína c-Fos TAD mutante (que había sido utilizado previamente figura R.15) en donde los residuos T232, T331 T325 y S374 fueron reemplazados por Alaninas, fue utilizado para reincorporarle individualmente cada uno de los residuos que podrían ser fosforilados por MAPKs en el laboratorio del Dr. Gutkind.

De esta manera se obtuvieron cuatro nuevas construcciones portando cada una, uno de estos sitios wt y los otros tres mutados a Alaninas. Estos nuevos c-Fos TAD fueron llamados c-Fos TAD T232 o T331 o T325 o S374 según cual sea el residuo WT (salvaje) que codifican. Y fueron subclonados en nuestro laboratorio en los plásmidos pCEFL GFP, en pGAL4 y en pGEX4T3.

En la figura R.23A, se muestra un esquema de los distintos c-Fos TAD utilizados.

Para evaluar que isoforma de p38 fosforila cada residuo realizamos construcciones que permiten expresar todas las variantes del dominios de transactivación de c-Fos en bacterias como proteína de fusión a GST, utilizando para ello el plásmido pGEX4T3 (pGEX 4T3 c-Fos TAD WT, MUT, T232, T331, T325 o S 374). Luego, las proteínas de fusión a GST fueron expresadas y purificadas de bacterias, luego utilizaron como sustratos para ensayos de fosforilación *in vitro*.

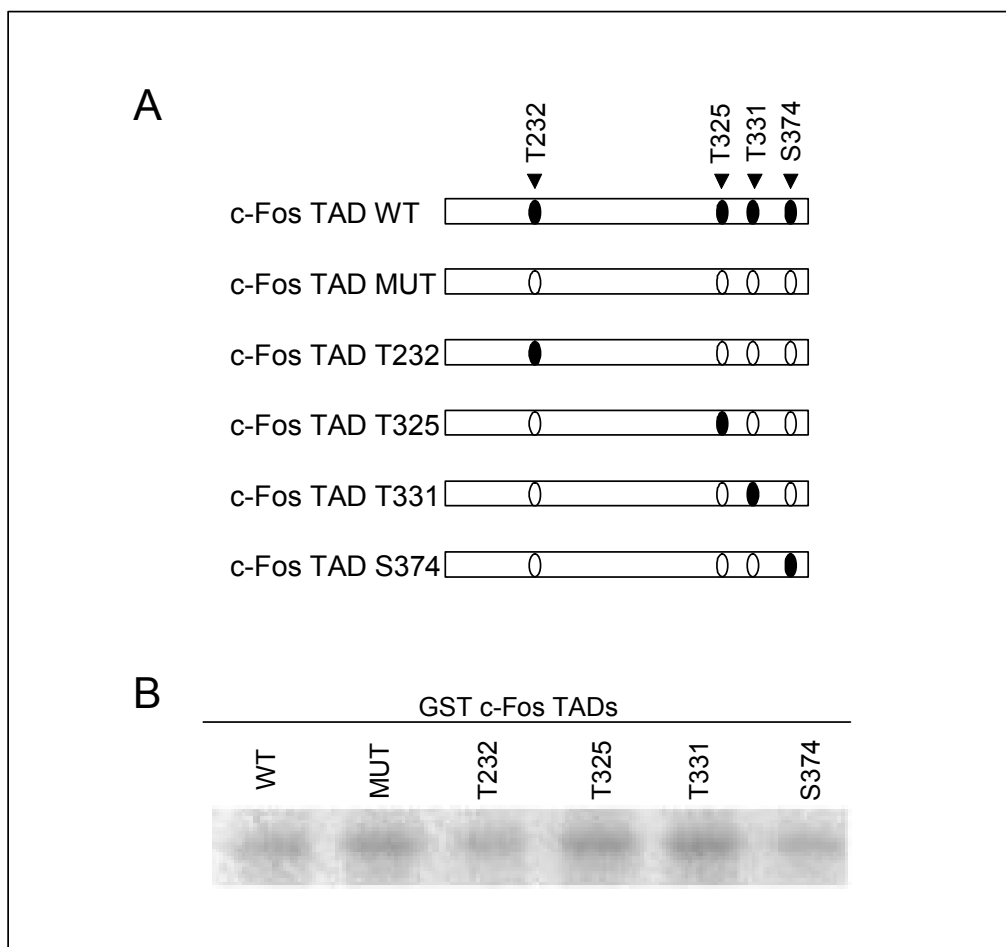


Figura 23:

Purificación de las distintas mutantes del TAD de c-Fos fusionadas a GST utilizadas como sustratos en ensayos de quinasas.

A. se esquematizan los distintos GST c-Fos TADs que serán utilizados en ensayos de fosforilación *in vitro*. Se observan los 4 residuos que podrían ser fosforilados por las p38s (Treonina 232, Treonina 325, Treonina 331 o Serina 374) ya que se encuentran dentro de un consenso de fosforilación para MAPKs. Estos residuos se esquematizan como óvalos llenos cuando están todos los residuos presentes y con óvalos vacíos en el caso en que hayan sido mutados a alaninas.

B. Gel de poliacrilamida teñido con *Coomassie blue* en que se observan las cantidades equivalentes de las proteínas GST c-Fos TAD que se utilizaron en ensayos de fosforilación *in vitro*. Estas proteínas provienen de la purificación de bacterias inducidas con IPTG.

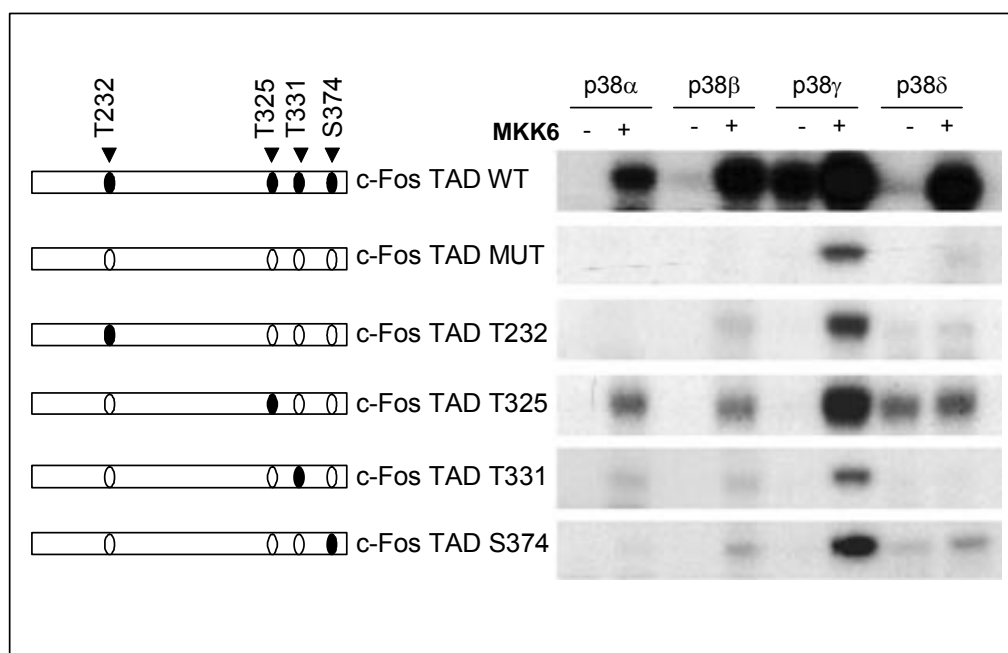


Figura 24:

La Treonina 235 sería el sitio principalmente fosforilado por todas las isoformas de las p38 SAPKs.

A la izquierda se esquematizan los diferentes GST c-Fos TADs (WT y mutantes puntuales) utilizados como sustratos para los ensayos de fosforilación *in vitro* que se observan en las autorradiografías contiguas. Los ensayos de quinasas fueron realizados inmunoprecipitando a las distintas isoformas de HA-p38 de células HEK 293 previamente transfectadas con o sin el vector de expresión del activador de las p38s, MKK6, y con p38 α o p38 β o p38 γ o p38 δ . Estos inmunoprecipitados fueron incubados con las distintas proteínas de fusión GST c-Fos TADs que habían sido purificadas de bacterias previamente.

En La figura R.24 B se observa una electroforesis en un gel SDS-PAGE teñido con *coomasie blue* mostrando las proteínas de fusión a GST purificadas y sembradas en cantidades equivalentes que fueron utilizadas luego para los ensayos de fosforilación.

Para realizar los ensayos de quinasas, los plásmidos pCEFL-HA p38 MAPKs fueron transfectados en células HEK 293, conjuntamente o no con pCEFL-GST MKK6. Las HA p38 MAPKs fueron inmunoprecipitadas y utilizadas para el ensayo de fosforilación *in vitro*.

Como se muestra en la figura R.24 la fosforilación del c-Fos TAD por p38 α , p38 β y p38 δ no se produce cuando se utiliza como sustrato al TAD de c-Fos con los cuatro sitios consenso mutados a Alanina. En el caso de p38 γ , se observa una fosforilación más débil que podría deberse a la acción de esta quinasa en un sitio no canónico para MAPKs.

Analizando cada residuo en particular, es interesante notar que el único sitio con capacidad de ser fuertemente fosforilado (cuando es el único aminoácido WT) es la Treonina 325. Por otro lado el aminoácido T232 es fosforilado por p38 β y p38 γ , y en particular para p38 δ la fosforilación que se observa en T232 no sería mayor a la leve fosforilación marginal que aparece con GST c-Fos TAD MUT como sustrato. p38 α no tendría ningún efecto en la fosforilación de la T 232 *in vitro*. La Treonina 331 es levemente fosforilada por p38 α y p38 β y no hay fosforilación inducida por p38 γ o p38 δ . Con respecto al residuo S374, la fosforilación por p38 α es casi indetectable mientras que por p38 β y δ es leve.

Estos resultados muestran que cada sitio puede ser fosforilado in vitro diferencialmente por las diferentes isoformas de p38 MAPKs, sugiriendo que existe un patrón en el cual cada quinasa posee distinta capacidad de fosforilar cada uno de los sitios del dominio de transactivación de c-Fos.

Contribución de cada sitio de fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos a la capacidad transcripcional del factor de transcripción activada por las p38 SAPKs.

Para averiguar si individualmente cada sitio de fosforilación consenso para MAPKs es capaz de activar la capacidad de transactivación de c-Fos subclonamos cada c-Fos TAD WT, MUT, T232, T325, T331 o S374 en un vector de expresión eucariota que permite que se expresen como proteínas de fusión con el dominio de unión al DNA de GAL4 para realizar ensayos de actividad reportera como los descritos anteriormente (figura R.25).

Transfectamos células NIH 3T3 con las diferentes variantes de pGAL4 c-Fos TAD, pGAL4 LUC, las diferentes pCEFL-HA p38 MAPKs y su activador pCEFL-GST MKK6. Se midió la

actividad Luciferasa en cada condición para cada c-Fos TAD con cada una de las p38 sobre-expresadas y se relativizó el resultado a la actividad β -galactosidasa de cada extracto celular.

Para cada p38 se tomó como 100% de activación a la actividad de Luciferasa obtenida con el GAL4 c-Fos TAD WT y la activación obtenida con cada mutante fue relativizada a ese 100%.

En la figura R.25 se observa que individualmente ningún sitio logra recomponer el 100% de activación del GAL4 c-Fos TAD WT con ninguna de las quinasas transfectadas. Solo la proteína c-Fos TAD WT puede activar la transcripción del gen reportero.

Estos datos muestran que aunque los sitios consenso para MAPKs pueden ser fosforilados por las distintas isoformas de p38 in vitro, estas fosforilaciones no son suficientes para que c-Fos pueda transactivar. Indicando que se requieren múltiples sitios fosforilados para activar la capacidad transactivacional de c-Fos.

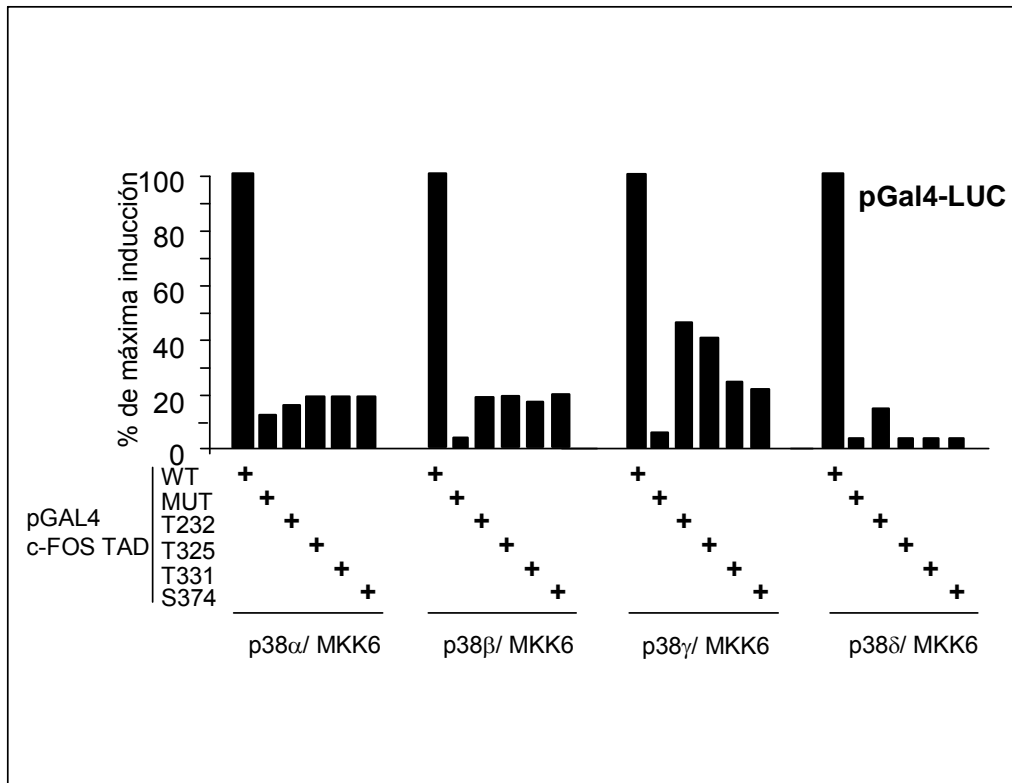


Figura 25:

Análisis del efecto transcripcional de cada sitio de fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos por las p38 SAPKs.

Células NIH 3T3 fueron transfectadas con los plásmidos pTATA GAL4-LUC, pRNull, pCEFL-GST-MKK6, alguna de las diferentes pCEFL-HA-p38 SAPKs y cada una de las c-Fos TADs, pCDNAIIIIGBDX-c-Fos TAD, como se indica en la figura. 24 horas después de la transfección las células fueron lisadas y se analizó la actividad Luciferasa de los extractos celulares. Los datos de Luciferasa están normalizados con la actividad Renilla. Los datos se expresan como porcentaje de inducción relativo al control. Se observa que para que c-Fos sea transcripcionalmente activo necesita la fosforilación de más de un sitio consenso para MAPKs en el dominio de transactivación.

3- Regulación de c-Fos ante un estímulo mitogénico.

Luego de estar enfocados en el estudio de la activación post-traducciona l de c-Fos en respuesta a UV, decidimos estudiar la regulación de c-Fos en respuesta a un estímulo mitogénico como Carbacol.

La activación del receptor muscarínico M1 en presencia de su agonista Carbacol induce la síntesis de DNA y la formación de focos de transformación en células NIH 3T3 transfectadas establemente con dicho receptor (120)

En el año 1995 Omar Coso y colaboradores estudiaron la activación de JNK en respuesta a Carbacol. Observaron que distintos miembros de la familia AP-1 se transcriben y activan en respuesta al estímulo Carbacol en células que expresan el receptor muscarínico M1. A partir de ese descubrimiento, el laboratorio del Dr. Gurkind continuó trabajando en las vías de señales que se activan luego de estimular M1 con Carbacol, pero enfocándose principalmente en la regulación de c-Jun por JNK (66,67,201). En esta etapa del trabajo intentamos entender la regulación del factor de transcripción c-Fos por MAPKs en respuesta a Carbacol.

Estudio de la activación de la transcripción de c-fos por Carbacol.

Para estudiar la regulación de *c-fos* por MAPKs utilizamos células NIH 3T3 que expresan establemente el receptor muscarínico M1, "células m1.2", caracterizadas por el Dr. Silvio Gutkind y colaboradores (72) que expresan aproximadamente 20.000 receptores por célula. Como *c-fos* es un gen de respuesta temprana y normalmente no estás expresado en las células decidimos estudiar primero los efectos de las MAPKs sobre el promotor de este gen.

Transfectamos células m1.2 con un plásmido que expresa el promotor de c-Fos murino río arriba del gen de la Luciferasa. Luego de incubar toda la noche a las células en medio 1% suero se estimularon con Carbacol o con suero -como control positivo de la activación del promotor de *c-fos*- y se midió actividad Luciferasa.

Como se muestra en la figura R.26, los niveles de Luciferasa alcanzados en presencia de Carbacol son tres veces mayores que el control.

Luego, para examinar la activación del promotor de *c-fos* endógeno, realizamos curvas de tiempo de activación del promotor en respuesta a Carbacol.

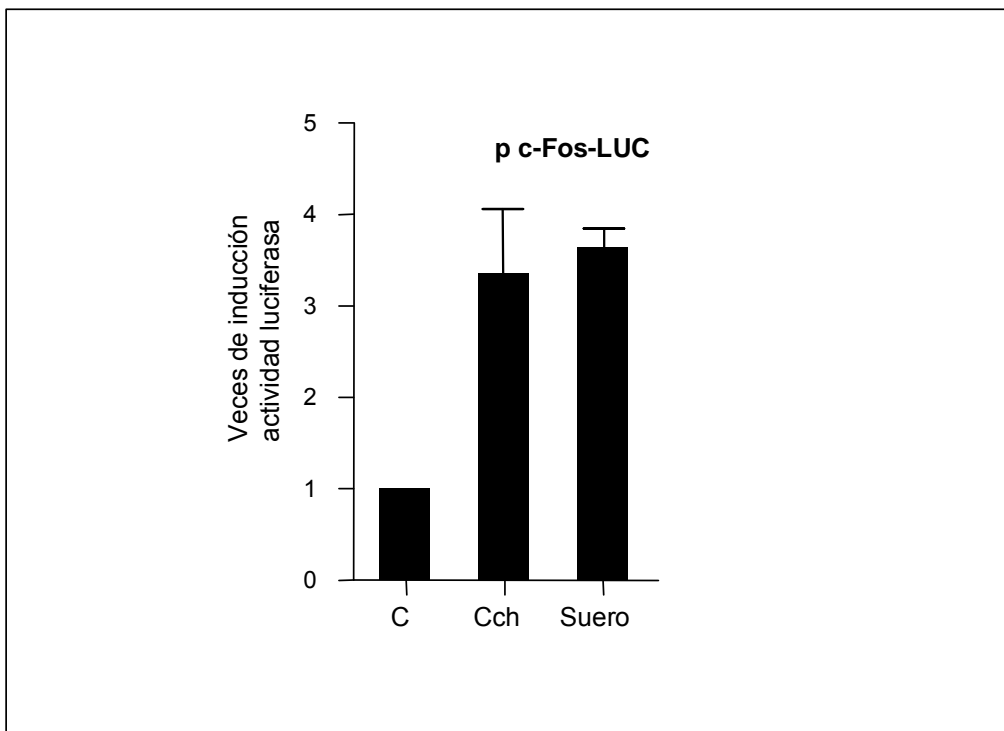


Figura 26:

El agonista Carbacol (Ch) induce la activación del promotor de c-Fos (1).

Células NIH 3T3 transfectadas establemente con el receptor muscarínico M1, células m 1.2, fueron transfectadas con el plásmido p-c-Fos Luc, que porta el promotor de c-Fos río arriba del gen de luciferasa. Las células fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero y luego se estimularon con 100 μ M del agonista carbacol (Ch). Luego de 8 hs las células se lisaron y se midió actividad de Luciferasa. Los valores obtenidos fueron normalizados midiendo actividad β -galactosidasa.

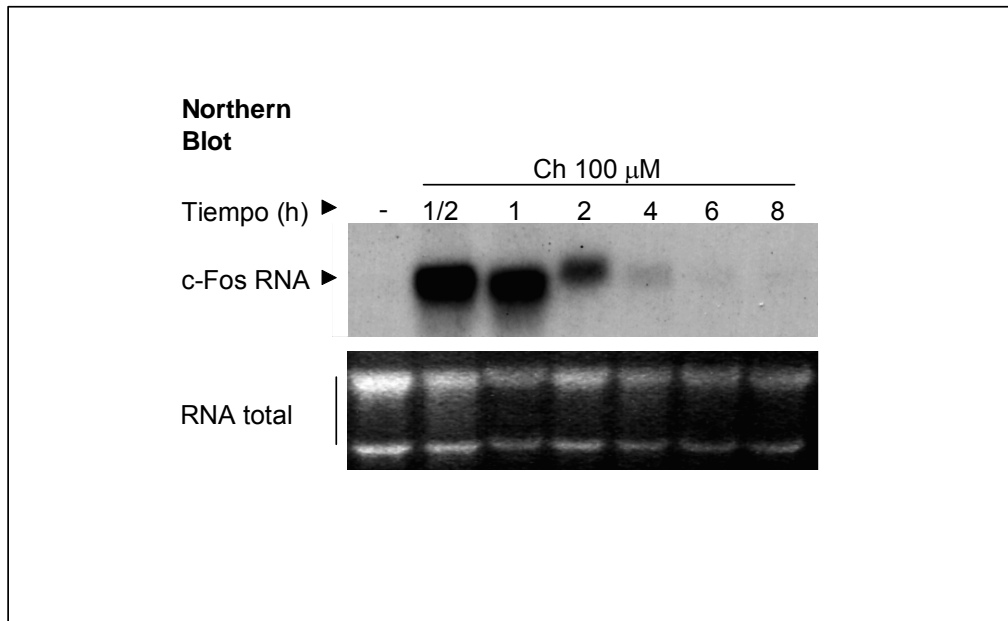


Figura 27:

El agonista Carbacol (Ch) induce la activación del promotor de c-Fos (2).

Células m 1.2 fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero. A la mañana siguiente se estimularon con 100 μ M de Carbacol y se colectaron a diferentes tiempos post-estimulación. Se extrajo RNA total, se corrió en gel de agarosa desnaturalizante y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se agregó una sonda de c-Fos marcada radioactivamente para realizar el Northern Blot (NB).

En la figura se muestra una autorradiografía obtenida luego de realizar el NB, y en el panel inferior, se observa una foto de la membrana de nitrocelulosa después de la transferencia para observar el estado y la cantidad de RNA total transferido.

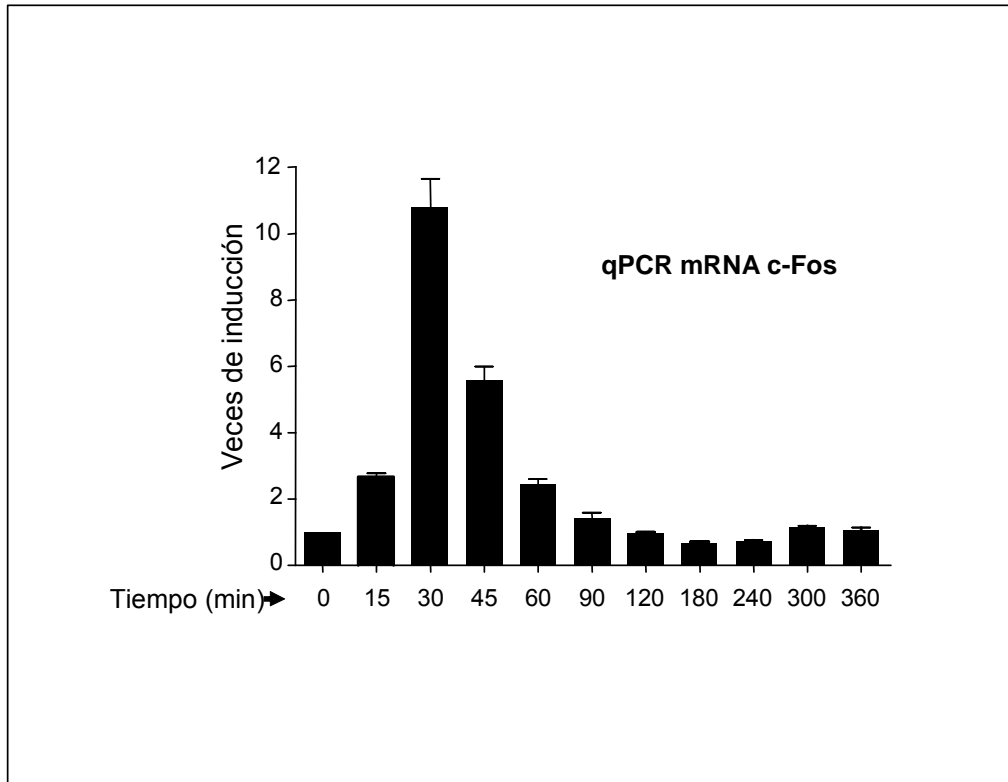


Figura 28:

El agonista Carbacol (Ch) induce la activación del promotor de c-Fos (3).

Células m 1.2 fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero. A la mañana siguiente se estimularon con 100 μ M de Ch y se colectaron a diferentes tiempos post-estimulación. Se extrajo RNA total, se cuantificó y se realizó PCR Reversa para obtener cDNA de cada condición. Luego se realizó una PCR cuantitativa utilizando primers específicos para c-Fos. Se observa un experimento representativo de tres realizados.

Para ello realizamos Northern Blots utilizando como sonda el cDNA de c-Fos marcada radioactivamente. En estos experimentos estimulamos células m1.2 con Carbacol por distintos tiempos. Luego se colectaron las células con TRIZOL, se extrajo el RNA, se cuantificó, se corrió en geles de agarosa desnaturalizantes, se transfirió a una membrana de nylon por capilaridad y se incubó con una sonda específica (cDNA de c-Fos) marcada radioactivamente. En la figura R.27 se muestra una autorradiografía en donde se observa que a la media hora posterior al agregado de Carbacol se encuentra el pico máximo de acumulación de transcripto de c-fos. Si bien a la hora se sigue observando RNA acumulado pasado este tiempo, los niveles decaen fuertemente.

Para corroborar estos resultados realizamos PCRs cuantitativas. Se realizó un experimento similar al de la figura R.27 en donde luego de purificar y cuantificar el RNA, se retrotranscribieron iguales cantidades de RNA para obtener cDNA. Luego, el cDNA obtenido se utilizó como molde en una PCR cuantitativa utilizando primers específicos para c-Fos (Figura R.28).

En estos experimentos observamos nuevamente que a la media hora post estimulación se encuentra el punto máximo de acumulación del transcripto de c-fos y que luego va disminuyendo en función del tiempo.

Estos resultados permiten afirmar que el promotor de c-Fos se activa como respuesta al agregado de Carbacol en las células m 1.2. Además, muestran que el punto máximo de acumulación del RNA de c-Fos se encuentra a la media hora post estimulación del receptor M1 con Carbacol.

Activación de MAPKs en respuesta a Carbacol.

Para investigar que MAPKs se activan en respuesta a Carbacol realizamos curvas de activación de las distintas MAPKs. Al no disponer de anticuerpos específicos para cada una de estas quinasas realizamos las curvas de activación transfectando en células m1.2 los plásmidos que codifican para las distintas MAPKs fusionadas a un epítotope HA. Las células fueron incubadas en 1% suero toda la noche y luego estimuladas con Carbacol. Se colectaron a distintos tiempos y se inmunoprecipitaron las quinasas transfectadas utilizando anticuerpos anti HA. Luego se incubaron por 30 minutos con los sustratos específicos para cada quinasa y γ ATP P³². Se resolvieron en geles SDS PAGE, luego se secaron los geles y se expusieron a placas autorradiográficas. La radioactividad incorporada se cuantificó en función del tamaño de banda obtenida en la placa autorradiográfica utilizando el programa de computación Scion image for windows. Esto nos permitió observar las curvas de activación de cada quinasa en función del tiempo de agregado de Carbacol. En la tabla de la figura R.29 se observa que los picos de

Tiempo quinasa	control	5 min	10 min	20 min	30 min	1 h
ERK2	+	++++	+++	+	+	+
ERK5	+	+++	+++	++	++	+
JNK	+	+	++	++++	++++	+
p38 α	+	+	+++	++++	++++	+
p38 β	+	+	++	++++	++++	+
p38 γ	+	+	++	+++	++++	+
p38 δ	+	++	++	+++	+++	++

Figura 29:

Tabla que muestra los tiempos de activación de MAPKs.

Se transfectaron células m1.2 para realizar ensayos de fosforilación *in vitro* con los plásmidos que expresan a las distintas MAPKs como proteínas de fusión con un epítipo. Se incubaron a las células toda la noche en medio 1% suero y se las estimuló con Carbacol. Se lisaron las células a distintos tiempos post-estimulación, se inmunoprecipitaron las quinastas con anticuerpos específicos anti epítipo y se realizaron los ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando sustratos específicos purificados previamente de bacterias y γ ATP 32 P. Una vez realizado el ensayo, se corrió en SDS PAGE, se secaron los geles y sobre ellos se expusieron placas radiográficas. Luego se digitalizaron las bandas de las autorradiografías y se determinó el tiempo aproximado de activación de las MAPKs ERK1, 2 y 5, JNKs 1 y 2 y las 4 isoformas de p38s.

activación para las quinasas son de 5 minutos para ERK2 y ERK5 y de aproximadamente 20 minutos para las SAPKs.

Estos resultados muestran que la activación del receptor M1 por Carbacol induce la activación de todos los miembros de las MAPKs.

Estudio de la activación del promotor de c-Fos por MAPKs.

Para investigar si las MAPKs están involucradas en la activación del promotor de *c-fos*, transfectamos células m1.2 con los plásmidos correspondientes a las HA-MAPKs pCEFL-HA ERK2, ERK5, JNK1, p38 α , p38 β , p38 γ o p38 δ , en presencia de un plásmido pCEFL-HA vacío o de sus respectivos activadores río arriba (un plásmido que expresa MEKEE para ERK2, MEK5 para ERK5, MEKK para JNK y MKK6 para las p38s). Además se co-transfectaron con el plásmido pCDNA3 β -galactosidasa para normalizar la actividad Luciferasa a la eficiencia de transfección de cada condición.

Las células se incubaron en medio 1% suero y luego de 16 horas se colectaron y se midió actividad Luciferasa de los lisados celulares. Los valores de Luciferasa obtenidos se relativizaron a los de β -galactosidasa y luego se expresaron los resultados como veces de inducción de Luciferasa con respecto al control. En la figura R.30 se observa que al transfectar con MEKEE mas ERK2 se obtienen unas 4.5 veces de inducción de la actividad Luciferasa, y que inclusive MEKEE en ausencia de ERK2 puede activar al promotor obteniéndose unas 2 veces de inducción de la actividad Luciferasa, sugiriendo que MEKEE estaría actuando sobre la proteína ERK2 endógena. Además se observa que las otras quinasas en estudio no producen la activación del promotor de *c-fos* del plásmido reportero.

De este resultado se desprende que ERK2 es capaz de activar el promotor de c-Fos en células m1.2.

Estudio de la activación del promotor de c-Fos por MAPKs en respuesta a Carbacol.

Para investigar si el agregado de Carbacol induce la activación del promotor de *c-fos* a través de MAPKs comenzamos transfectando el plásmido pc-Fos Luc junto con las distintas MAPKs (pCEFL-HA ERK2, ERK5, JNK1, p38 α , p38 β , p38 γ o p38 δ) y pCEFL β -galactosidasa. Después de incubar toda la noche en medio 1% suero, las

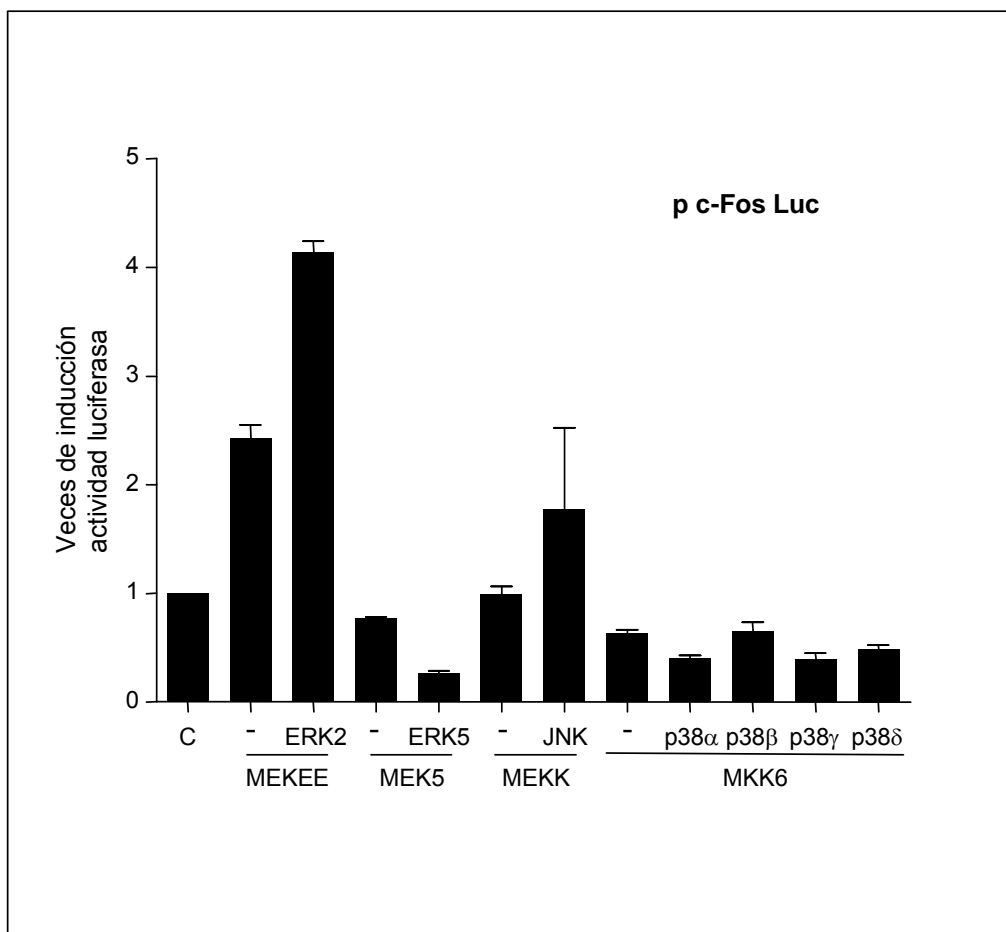


Figura 30:

El promotor de c-Fos es activado por ERK2.

Células m1.2 fueron tranfectadas con el plásmido p-c-Fos Luc, un plásmido que expresa β -galactosidasa río debajo de un promotor mínimo cuya actividad no es inducible por MAPKs y los plásmidos que expresan a las distintas MAPKs en estudio, en presencia o ausencia de sus activadores río arriba como se indica en la figura (MEKEE para ERK2, MEK5 para ERK5, MEKK para JNK y MEK3EE para las p38s). Las células fueron colectadas después de 18 hs de incubación en medio 1% suero y de cada extracto celular se midió actividad Luciferasa. Además se midió actividad β -galactosidasa para normalizar.

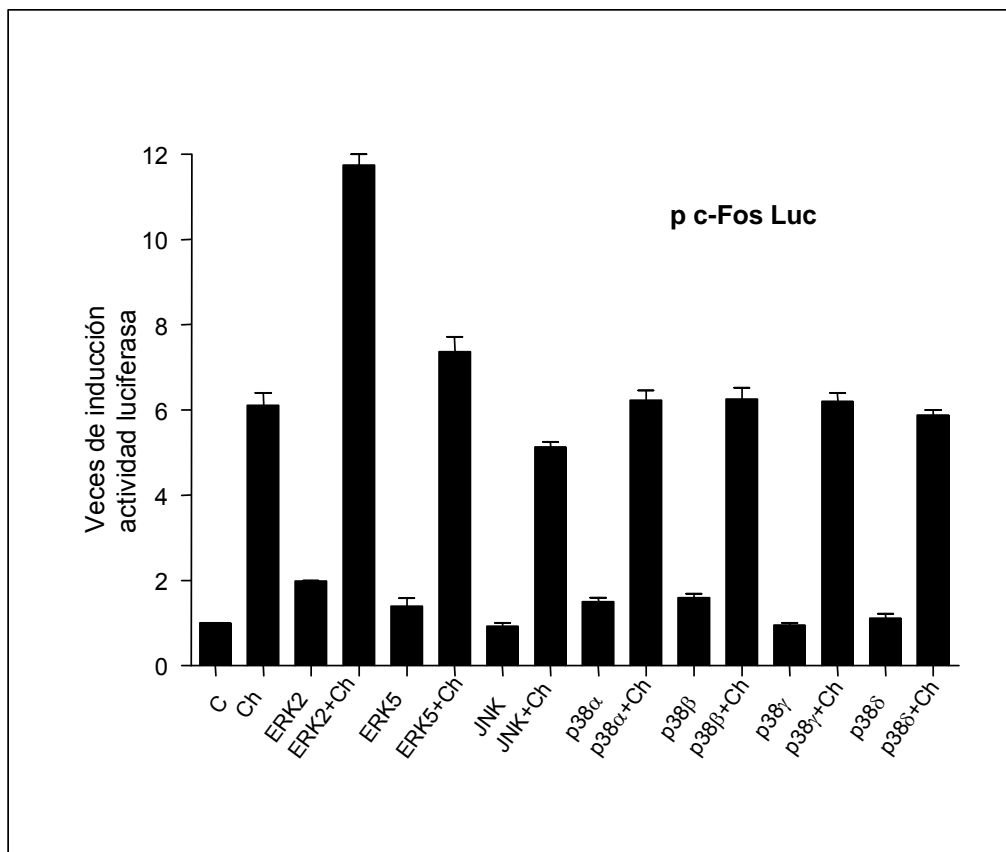


Figura 31:

La activación del promotor de c-Fos inducida por Carbacol es mediada por ERK2(1).

Células m1.2 fueron tranfectadas con el plásmido p-c-Fos Luc, el plásmido que expresa β -galactosidasa y los plásmidos que expresan a las distintas MAPKs en estudio (ERK2, ERK5, JNK, p38s). Las células fueron incubadas en medio 1% suero durante toda la noche y luego estimuladas con Ch. Las células se colectaron después de 8 hs de agregado el estímulo. De cada extracto celular se midió actividad Luciferasa y β -galactosidasa para normalizar.

células se estimularon con Carbacol y se colectaron 8 horas después del estímulo. Se midió actividad Luciferasa y β -galactosidasa de cada extracto y se graficaron los resultados en función de las veces de activación de la actividad Luciferasa con respecto al control. Como se muestra en la figura R.31, cuando ERK2 es activada con Carbacol se observa un fuerte aumento de la actividad Luciferasa, mientras que no se observa potenciación de la activación con ninguna otra de las quinasas.

Hasta el momento trabajamos con un plásmido que porta el promotor de *c-fos* río arriba del cDNA de Luciferasa transfectado en células m1.2. Para estudiar la activación del promotor endógeno de *c-fos* en respuesta a la activación del receptor muscarínico M1 realizamos ensayos de Northern Blot y de PCR cuantitativa de células m1.2 que fueron pre-incubadas con distintos inhibidores para MAPKs y estimuladas con Carbacol.

Brevemente, células m1.2 fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche, y luego incubadas con: DMSO (solvente de los inhibidores); Inhibidor de la quinasa activadora de ERK2, PD 098059; inhibidor de p38 α y p38 β , SB 203580 e inhibidor de JNK, SP 600125. Una hora después del agregado de los inhibidores las células se estimularon con Carbacol y se levantaron en TRIZOL media hora después de la estimulación. Se extrajo el RNA, se cuantifico, y luego, dependiendo de cual fuera el ensayo que fuéramos a realizar, se retrotranscribió (para PCR cuantitativa) o se corrió en geles de agarosa desnaturalizantes (para Northern Blots).

En la figura R.32 se muestra el resultado de un Northern Blot en donde se observa que al inhibir ERK2 se reduce fuertemente la transcripción de *c-fos*, también se observa que ni el inhibidor de p38 ni el de JNK reducen la cantidad de transcripto presente.

Alternativamente, cuando realizamos PCRs cuantitativas (figura R.33) obtuvimos resultados similares a los obtenidos por Northern Blot, donde se observa que ERK2 es la MAPK responsable de activar el promotor de *c-fos* en respuesta a Carbacol.

Todos juntos, estos resultados nos permiten afirmar que el promotor de c-fos es activado por ERK2 en respuesta a Carbacol.

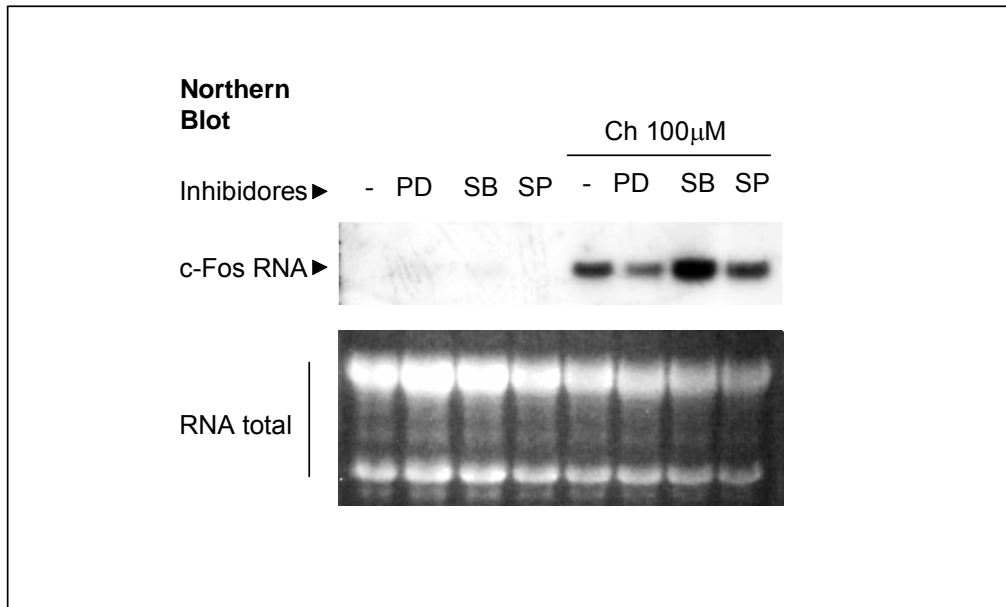


Figura 32:

La activación del promotor de c-Fos por Carbacol es mediada por ERK2 (2).

Células m1.2 fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero. A la mañana siguiente se pre-incubaron con 10 µM de los inhibidores PD 098059, inhibidor de la quinasa activadora de ERK o SB203580, inhibidor de p38 α y β o SP 600125, inhibidor de JNK. Después de una hora del agregado de los inhibidores se estimularon con 100 µM de Carbacol y se colectaron a la media hora post-estimulación.

Se extrajo RNA total, se corrió en un gel de agarosa desnaturalizante y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se agregó una sonda de c-Fos marcada radioactivamente para realizar un Northern Blot.

En la figura se muestra una autorradiografía obtenida luego de realizar el NB, y en el panel inferior, se observa una foto de la membrana de nitrocelulosa después de la transferencia para observar el estado y la cantidad de RNA total transferido.

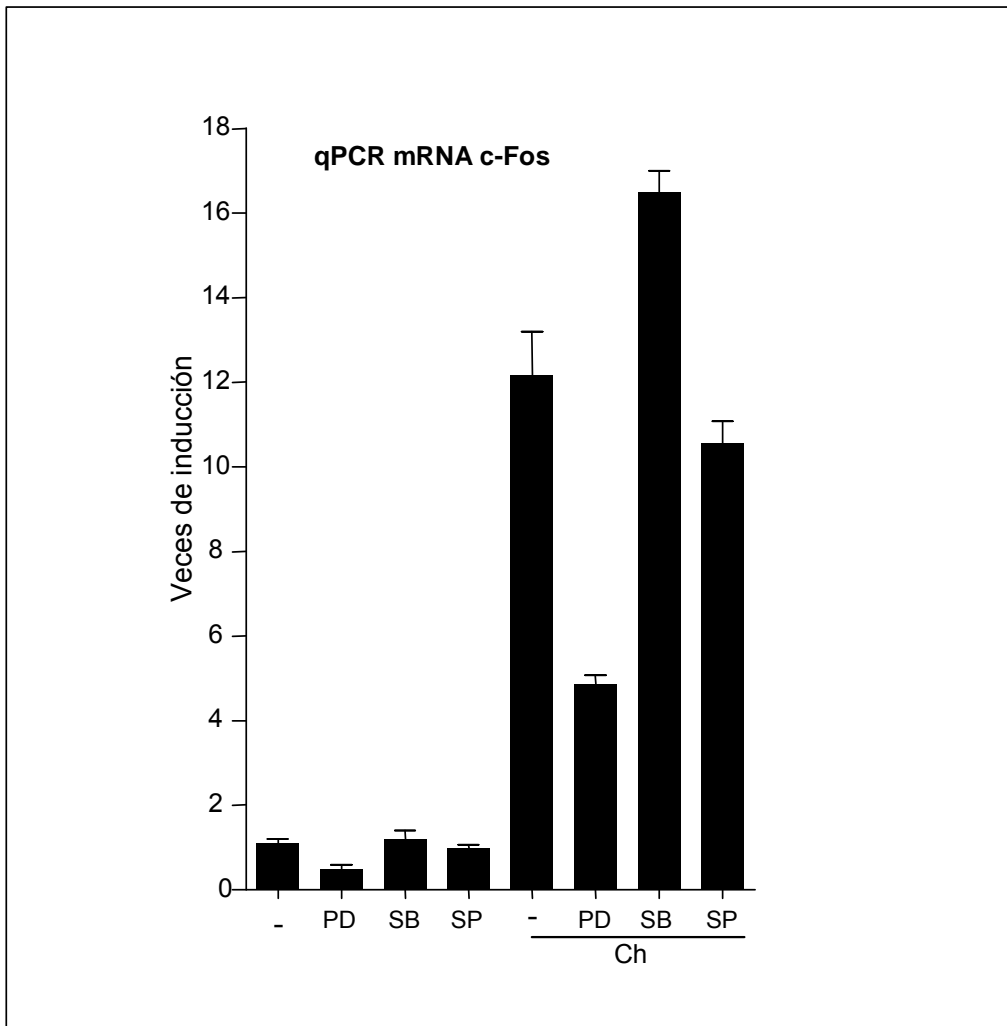


Figura 33:

La activación del promotor de c-Fos por Carbacol es mediada por ERK2 (3).

Células m 1.2 fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero. A la mañana siguiente se incubaron con los inhibidores PD 098059, SB 203580 o SP 600125 según se indica en la figura y una hora después se estimularon con 100 μ M de ch. A la media hora se colectaron, se extrajo RNA total, se cuantificó y se realizó PCR reversa para obtener el ADN copia de cada condición. Luego se realizó una PCR cuantitativa utilizando primers específicos para c-Fos.

Expresión de c-Fos en respuesta a Carbacol.

Para investigar si el fuerte aumento en la cantidad de transcripto de *c-fos* en respuesta a Carbacol se correlaciona también con un aumento en la cantidad de proteína c-Fos endógena realizamos ensayos de Western Blot de células m1.2 estimuladas con Carbacol utilizando un anticuerpo anti c-Fos.

Para ello incubamos células m1.2 durante toda la noche en medio 1% suero y a la mañana siguiente las estimulamos con 100 μ M de Carbacol. Luego levantamos a distintos tiempos post-estimulación como se muestra en la figura R.34. Se purificaron los núcleos celulares y se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes para realizar luego Western Blots revelando con un anticuerpo anti c-Fos.

En la figura R.34 se observa que a los 30 minutos ya comienza a notarse la presencia de c-Fos llegando a un máximo de expresión a las 2 horas, el cual se mantiene hasta las 4 horas. A tiempos mayores la cantidad de proteína presente comienza a decaer. Además se observa que a medida que c-Fos se va sintetizando aumenta la cantidad de bandas de migración lenta en la corrida electroforética sugiriendo que a medida que c-Fos se sintetiza se modifica post-traduccionalmente por fosforilación en respuesta a Carbacol.

Este resultado indica que el agonista del receptor muscarínico M1 Carbacol induce la expresión de la proteína c-Fos y además estaría induciendo la fosforilación de la misma.

Estudio de la formación de complejos AP-1 conteniendo c-Fos sobre sitios TRE en respuesta Carbacol.

La presencia de c-Fos en el núcleo como resultado de la estimulación de células m1.2 con Carbacol nos llevó a investigar la presencia de c-Fos en complejos proteicos que se unen a los sitios AP-1 o sitios TRE.

Para ello realizamos experimentos de EMSA en los cuales marcamos radioactivamente oligonucleótidos con la secuencia consenso AP-1 y los incubamos con extractos nucleares de células m1.2 que fueron previamente estimuladas con Carbacol por distintos tiempos. En la figura R.35 se observa que el agonista Carbacol induce la formación de complejos proteicos-oligonucleótido de manera tiempo dependiente, observándose a las 4 horas el punto de mayor cantidad de complejos formados.

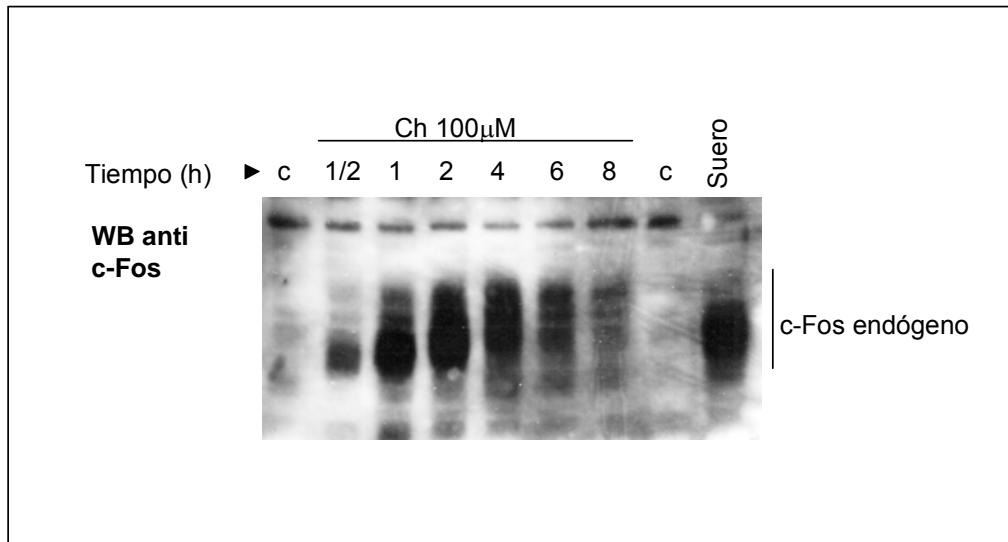


Figura 34:

El agonista Carbacol induce la expresión de c-Fos.

Células m1.2 fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche y luego estimuladas con Carbacol y colectadas a distintos tiempos post estimulación. Se extrajeron los núcleos celulares y se sembraron en un SDS PAGE. Luego se realizó un Western Blot utilizando un anticuerpo anti c-Fos.

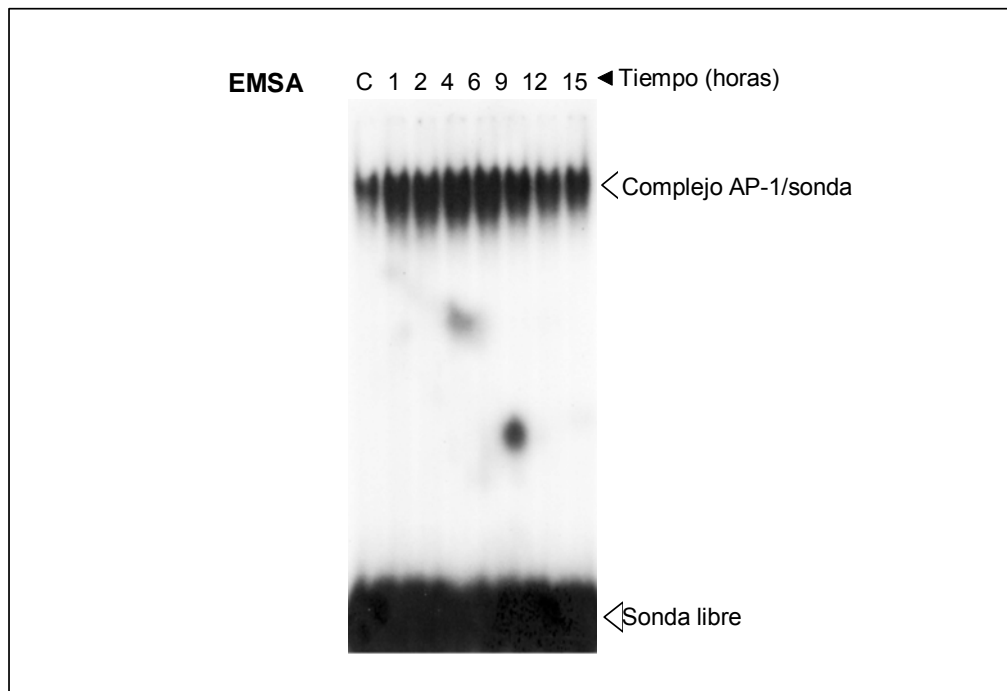


Figura 35:

El agonista Carbacol promueve la formación de complejos AP-1 sobre sitios TRE.

Células m1.2 fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche y luego estimuladas con carbacol y colectadas a distintos tiempos post estimulación. Se extrajeron los núcleos celulares y se incubaron con el oligonucleótido marcado que posee la secuencia de unión de AP-1, TRE ("TPA Responsive Element"). Los complejos se corrieron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Se observa una autorradiografía obtenida luego de exponer los geles (secados previamente) en un placa radiográfica.

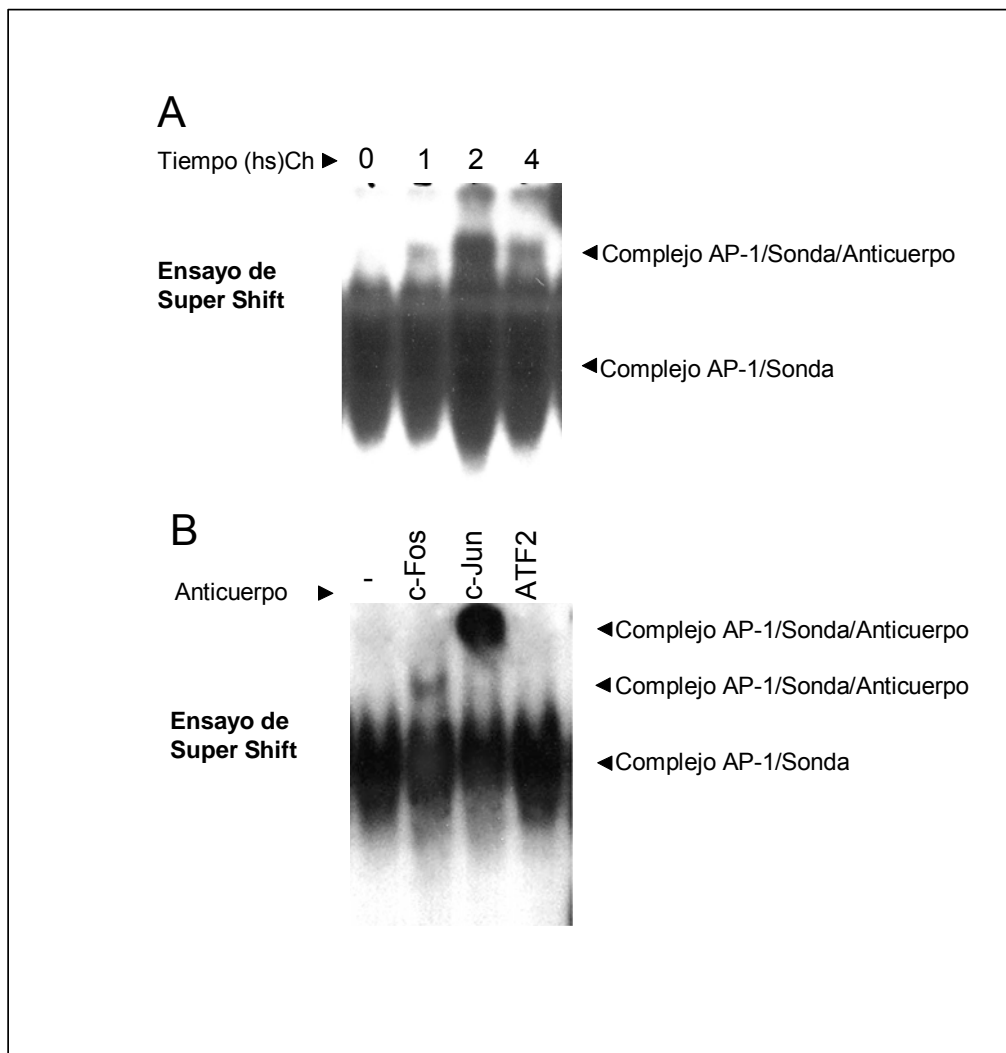


Figura 36:

El factor de transcripción c-Fos forma parte de los complejos que se forman sobre sitios TRE en respuesta a Carbacol.

A. Células m1.2 fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche, estimuladas con Carbacol y colectadas a distintos tiempos post estimulación. Se purificaron los núcleos celulares, se incubaron con el oligonucleótido macado que posee la secuencia TRE y con anticuerpo anti c-Fos, (panel izquierda). Los complejos se corrieron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, se secaron y se expusieron junto a una película autorradiográfica.

B. Ídem punto A. pero se incubaron extractos nucleares de células colectadas a las 2 hs de estimulación con Carbacol o sin anticuerpo o con anticuerpo anti c-Fos, anti c-Jun -como control positivo- o anticuerpo anti ATF2 -como control negativo-, (panel derecho).

Luego se realizaron curvas de formación de complejos en función del tiempo post-estímulo incubando también con un anticuerpo anti c-Fos para evaluar la presencia de c-Fos en los complejos formados (“super shift”).

En la figura R.36 A se observa que a las dos horas post estimulación la presencia de c-Fos en los complejos es máxima y continúa presente aunque en menor medida a las 4 horas post estimulación. Como control se realizaron super-shifts utilizando extractos de células colectadas a la hora de estimular con Carbacol utilizando anticuerpo anti c-Jun (se sabe que está presente en los complejos AP-1 que se unen a los oligos utilizados) y ATFII (no se une a los oligos utilizados), tal como se observa en la figura R.36 B.

De estos resultados podemos afirmar que el estímulo mitogénico Carbacol induce la unión del factor de transcripción c-Fos a los sitios de respuesta AP-1.

Estudio de la activación de un promotor mínimo con sitios de unión para AP-1 por c-Fos.

Para investigar si la unión de c-Fos a los sitios TRE que fue descrita en la figura R.36 tiene alguna implicancia en la activación transcripcional de un promotor que contenga sitios AP-1 transfectamos células m1.2 con un plásmido que contiene 7 sitios TRE (sitios a los que se une AP-1) en tandem río arriba del gen de Luciferasa (pAP-1-LUC), un plásmido que expresa β -galactosidasa y cantidades crecientes de pCEFL-HA c-FOS y decrecientes del vector pCEFL vacío. Las células fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche y se colectaron a la mañana siguiente. Se midió actividad Luciferasa de los extractos celulares y actividad β -galactosidasa para normalizar, luego, los valores de activación se graficaron como veces de inducción de la actividad Luciferasa con respecto al control.

Como se observa en la figura R.37, a medida que aumentamos las cantidades de plásmido pCEFL-AU5 c-Fos aumentan los valores de Luciferasa obtenidos en cada extracto celular.

Este resultado muestra que c-Fos induce la activación de un promotor que contiene sitios TRE y sugiere que la presencia de c-Fos en células m1.2 induce la activación de promotores que contengan sitios de unión de AP-1.

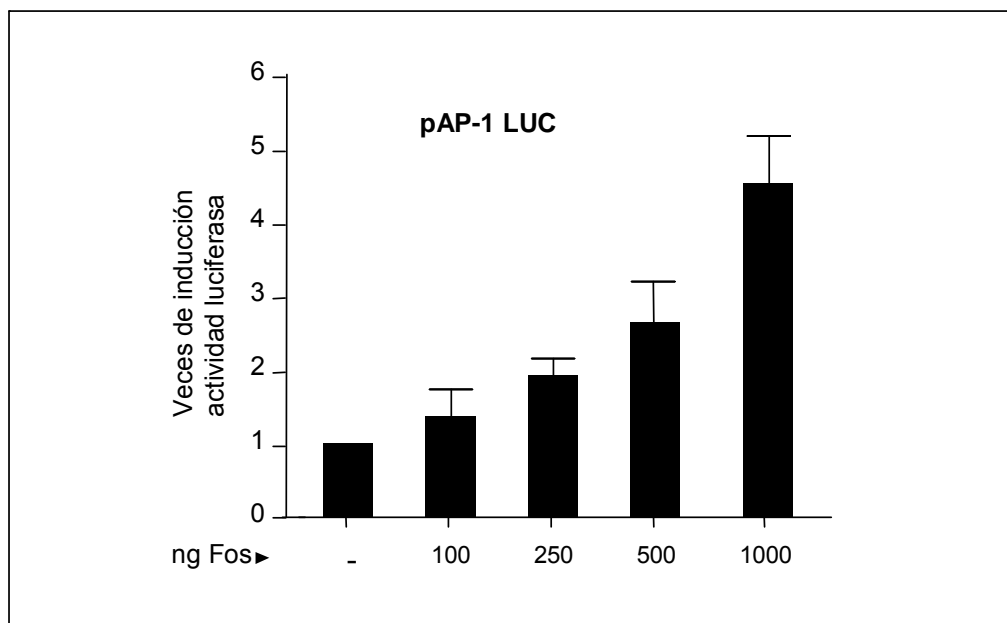


Figura 37:

c-Fos induce la activación transcripcional de un promotor mínimo que contiene sitios TRE.

Células m1.2 fueron transfectadas con un plásmido que contiene sitios TRE (sitios a los que se une AP-1) río arriba del gen de luciferasa, un plásmido que expresa β -galactosidasa y cantidades crecientes de pCEFL HA c-FOS y decrecientes del vector pCEFL vacío para que todas las condiciones tengan igual cantidad de DNA. 24 horas después de la transfección se incubaron en medio 1% suero toda la noche y se colectaron a la mañana siguiente. Luego se midió actividad Luciferasa y actividad β -galactosidasa para normalizar.

Activación de un promotor mínimo con sitios TRE por c-Fos en respuesta a Carbacol.

Para investigar si el agonista Carbacol incrementa la activación transcripcional inducida por c-Fos sobre un promotor que contenga sitios AP-1 realizamos experimentos en los cuales transfectamos células m1.2 con pAP-1 LUC, pCDNA3 β -galactosidasa y distintas cantidades de plásmido pCEFL-HA c-Fos (100 o 500 ng). 24 horas después de la transfección las células se incubaron en medio 1% suero toda la noche y a la mañana siguiente se estimularon o no con Carbacol. A las 8 horas post estimulación las células se colectaron y se midió actividad Luciferasa y actividad β -galactosidasa para normalizar.

La figura R.38 muestra que cuando las células son estimuladas con Carbacol en presencia de c-Fos se potencia la activación del promotor entre 2 y 3 veces con respecto a la activación que se obtiene con Carbacol en ausencia de c-Fos.

Estos resultados muestran que Carbacol potencia la activación transcripcional del promotor pAP-1 Luc inducida por c-Fos, sugiriendo que en respuesta a Carbacol c-Fos activa la transcripción de promotores que contengan sitios TRE.

Análisis de la activación transcripcional de c-Fos en respuesta a Carbacol.

Ya que nuestras observaciones muestran que el agregado de Carbacol induce la unión de c-Fos a sus sitios blanco, TRE, decidimos estudiar si este agonista tiene algún efecto en la capacidad de transactivar que posee el factor de transcripción c-Fos.

Para ello realizamos ensayos de expresión del gen reportero Luciferasa con el sistema de expresión génica GAL4, tal como se menciona en la figura R.10. Se co-transfectaron los plásmidos pGAL4 LUC y pGAL4-c-Fos TAD WT en células m1.2. Se colectaron a las 6 o 24 horas después de estimular y se midió actividad Luciferasa. Como se observa en la figura R.39, el agregado de Carbacol induce la actividad transcripcional de c-Fos.

Además, realizamos experimentos similares pero utilizando el plásmido pGAL4-c-Fos TAD MUT en lugar del WT. En este caso no se observa efecto del agregado de Carbacol en la actividad transcripcional de c-Fos (figura R.39).

Esto sugiere que la actividad transcripcional de c-Fos inducida por Carbacol es dependiente de la fosforilación en los sitios consenso para MAPKs.

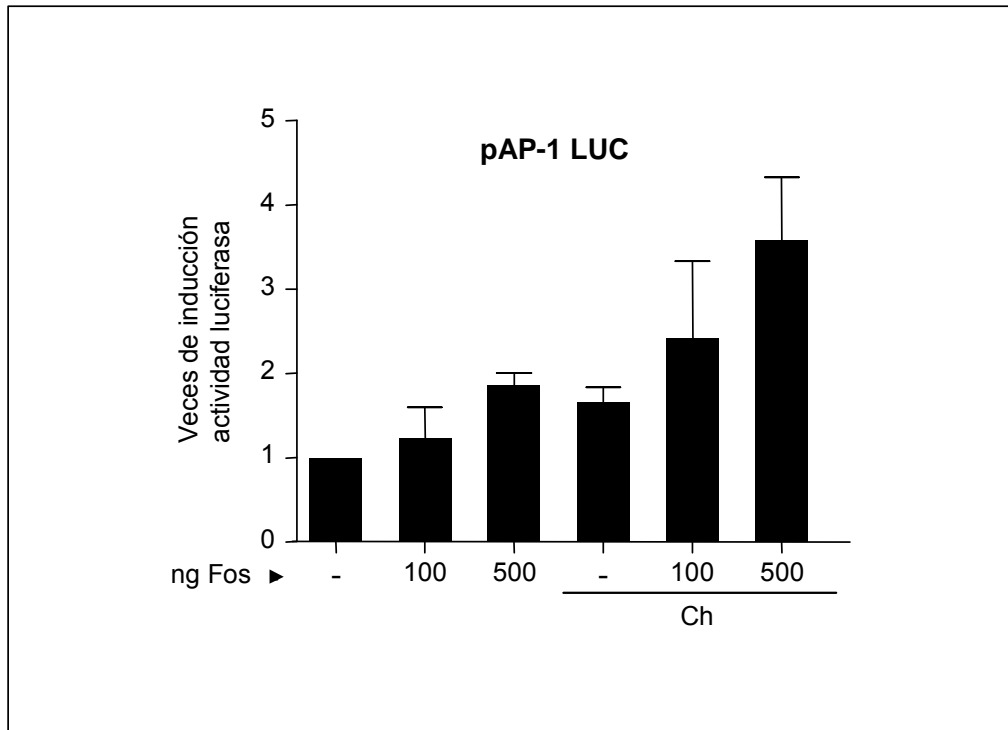


Figura 38:

El factor de transcripción de c-Fos potencia la activación transcripcional del gen reportero p-AP-1 Luc inducida por Carbacol.

Células m1.2 fueron transfectadas con un plásmido que contiene sitios TRE (sitios a los que se une AP-1) río arriba del gen de luciferasa, un plásmido que expresa β -galactosidasa y 100 o 500 ng de pCEFL HA c-Fos.

24 horas después de la transfección se incubaron en medio 1% suero durante toda la noche y a la mañana siguiente se estimularon con Carbacol. 8 horas post estimulación se midió actividad Luciferasa y actividad β -galactosidasa para normalizar.

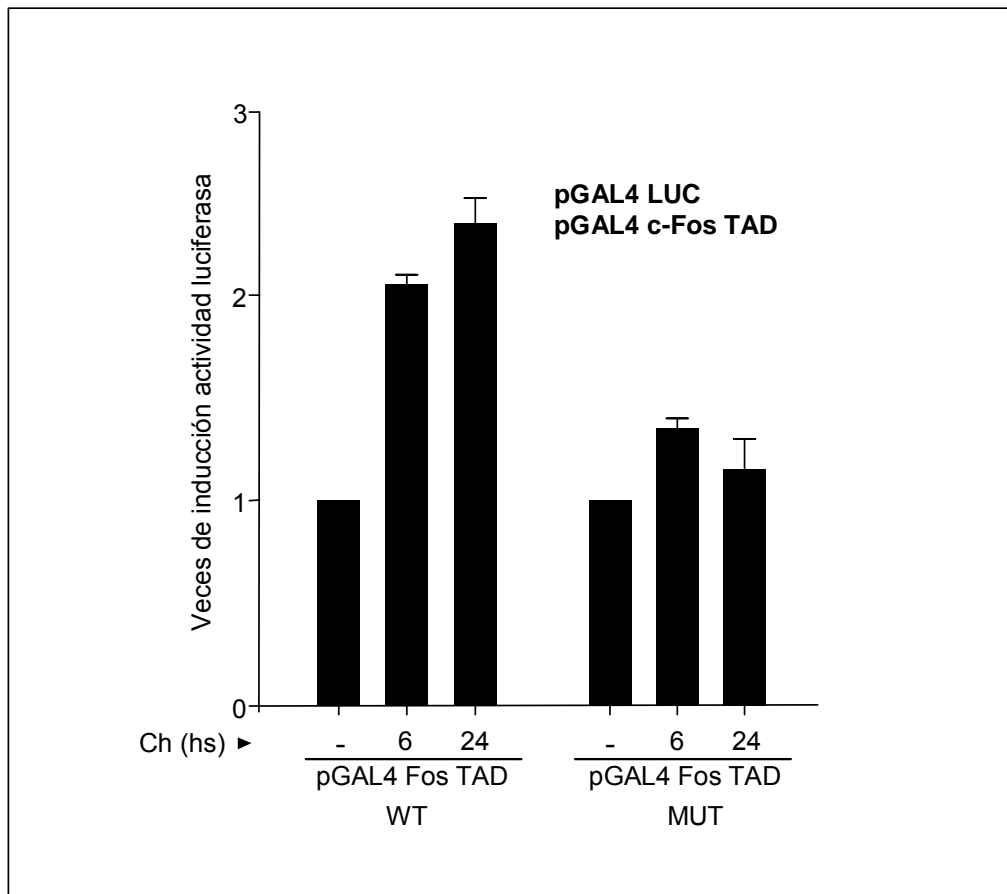


Figura 39:

El agonista Carbacol induce la actividad transcripcional de c-Fos.

Se transfectaron células m1.2 con el plásmido reportero pGAL4 LUC, p CDNAIII β -galactosidasa y el plásmido que expresa la proteína de fusión GAL4 c-Fos TAD WT o GAL4 c-Fos TAD MUT. 24 horas después de la transfección las células fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero. A la mañana siguiente fueron estimuladas con Ch y luego fueron cosechadas a las 6 o 24 horas después del estímulo. Se determinó la actividad de Luciferasa y de β -galactosidasa como control de transfección, para estandarizar.

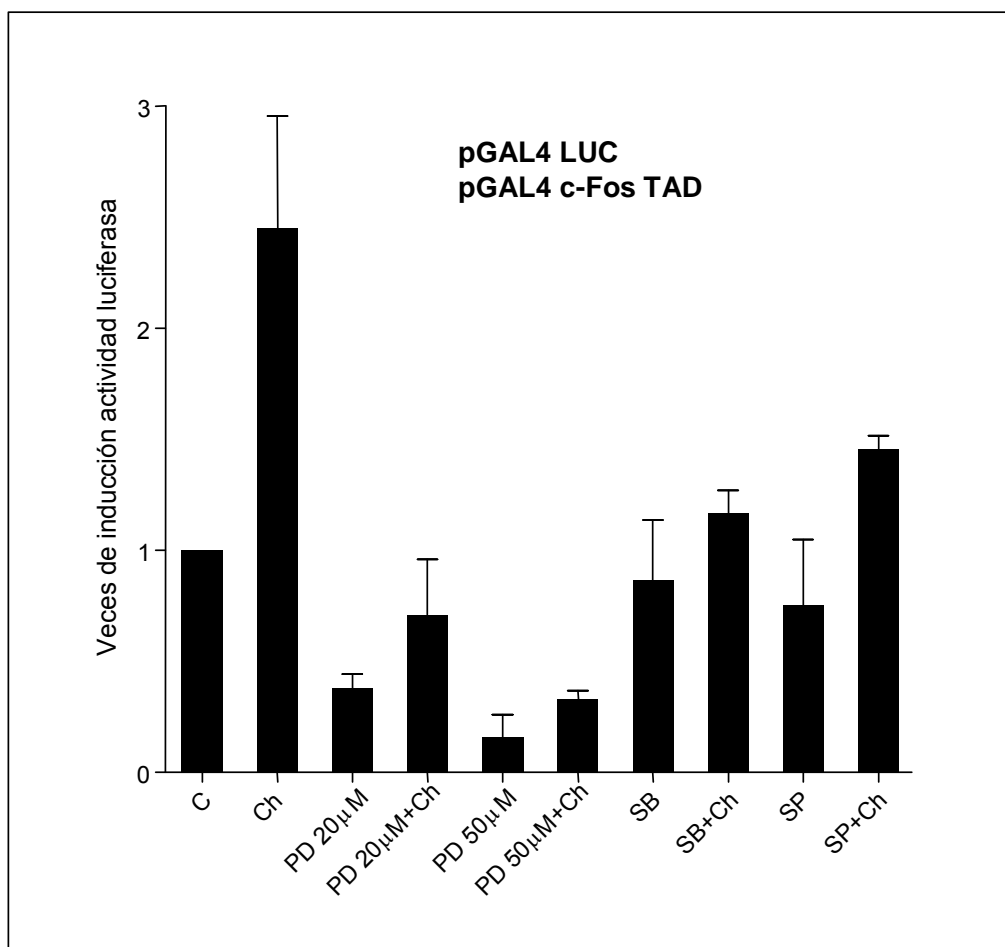


Figura 40:

La actividad transcripcional de c-Fos activada por carbaccol es mediada por MAPKS.

Se transfectaron células m1.2 con el plásmido reportero pGAL4 LUC, pCDNAIII β -galactosidasa y pGAL4 c-Fos TAD WT. 24 horas después de la transfección las células fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero. A la mañana siguiente se pre-incubaron con los distintos inhibidores de MAPKs -como se muestra en la figura- durante una hora y luego se estimularon con Carbaccol. Fueron cosechadas 8 después de que se agregó el estímulo. Se determinó la actividad de Luciferasa y de β -galactosidasa como control de transfección para normalizar.

Esto nos llevó a investigar el rol de cada MAPK en la activación transcripcional de c-Fos inducida por Carbacol, para ello transfectamos células m1.2 con pGAL4 LUC y pGAL4-c-Fos TAD WT, luego de incubarlas toda la noche en medio 1% suero, se preincubaron con los distintos inhibidores para MAPKs disponibles: PD 098059 20 μ M (para inhibir ERK) y 50 μ M (para inhibir además ERK5), SB 203580 20 μ M (inhibe p38) y SP 600125 20 μ M (inhibe JNK). Una hora después del agregado de los inhibidores, las células se estimularon con Carbacol y se colectaron luego de 8 horas. En la figura R.40 se observa que luego del agregado de carbacol, la actividad Luciferasa se induce 2,5 veces, mientras que en presencia de cualquiera de los inhibidores utilizados nunca se alcanzan dichos valores. No solo se observa que la activación transcripcional disminuye sino que además el cociente entre las condiciones control y estimulado para cada inhibidor es menor que 2,5. Se observa que ningún inhibidor logra anular completamente la actividad Luciferasa. Esto sugiere que todas las MAPKs podrían activar a c-Fos en respuesta a Carbacol y además, en base a los resultados de la figura R.39, sugiere que las quinasas estarían actuando a través de la fosforilación de los sitios consenso de fosforilación para MAPKs del dominio de transactivación de c-Fos.

De estos resultados se desprende que la activación del receptor M1 por Carbacol induce la activación de c-Fos como factor de transcripción y que varias MAPKs estarían involucradas en su activación fosforilando sitios que responden al consenso Serina o Treonina seguida de Prolina en su dominio de transactivación.

Estudio de la fosforilación de c-Fos inducida por Carbacol.

En la figura R.34 observamos como el agregado de Carbacol induce la expresión de c-Fos, pero además observamos que a medida que pasa el tiempo post estimulación aparecen mayor cantidad de bandas de menor movilidad electroforética, sugiriendo que a medida que c-Fos es sintetizado se va fosforilando en respuesta a Carbacol. Además los resultados de las figuras R.39 y R.40 indicarían que c-Fos es fosforilado por MAPKs en las Serinas o Treoninas que responden al consenso.

Para verificar que c-Fos es fosforilado en los aminoácidos blanco de MAPKs, se transfectaron células m1.2 con pCEFL-AU5 c-Fos utilizando Lipofectamina. Se incubaron en medio 1% suero toda la noche y luego, se estimularon con Carbacol y se colectaron a distintos tiempos. Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitaciones con anticuerpo anti fosfo-Serina o anti fosfo-Treonina, luego se corrieron en un SDS PAGE y se realizaron Western Blots anti AU5. Como se observa en la figura R.41, hay un pico de fosforilación en Serinas de c-Fos a

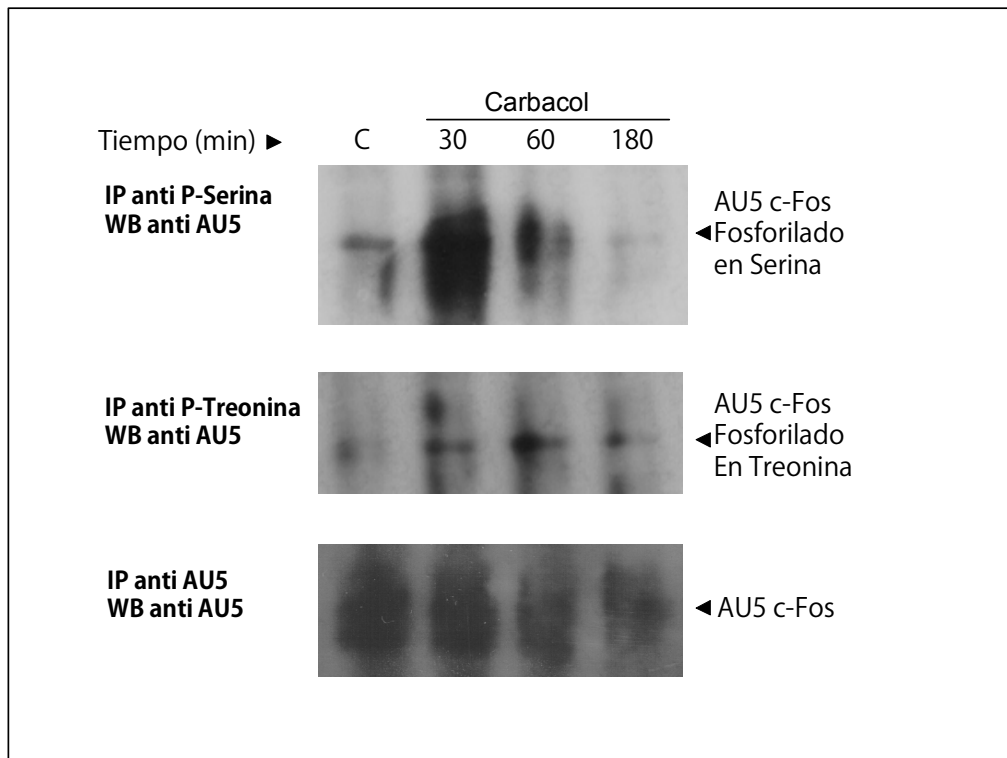


Figura 41:

La proteína c-Fos es fosforilada en Serinas y Treoninas.

Células m1.2 transfectadas con pCEFL-AU5 c-Fos fueron estimuladas por distintos tiempos con Carbacol. Las células fueron colectadas y los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti Serina fosforilada seguida de Prolina (P-Serina) o anti Treonina fosforilada (P-Treonina). Las inmunoprecipitaciones se corrieron en geles SDS PAGE y luego se analizaron por Western Blots realizados utilizando un anticuerpo anti AU5.

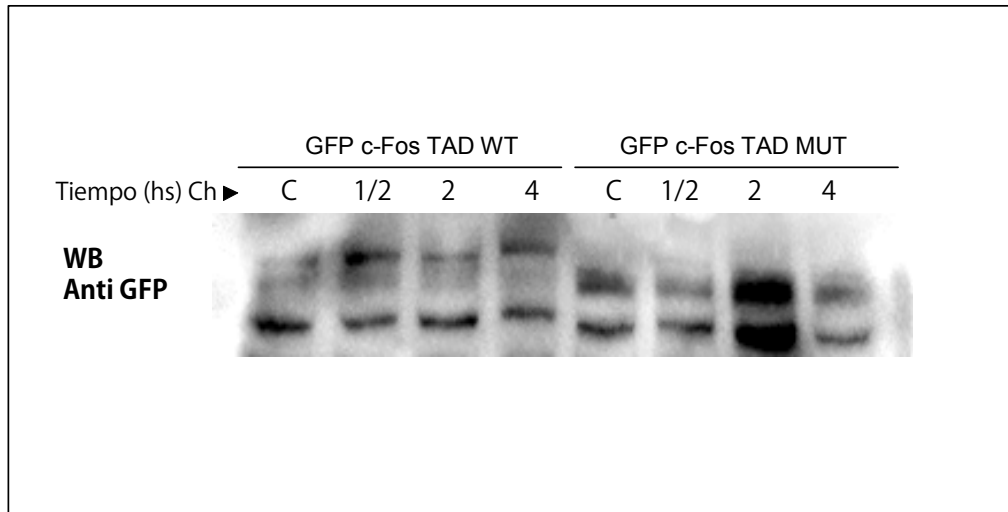


Figura 42:

El agonista Carbacol induce la fosforilación de c-Fos en el dominio de transactivación.

Se transfectaron células m1.2 con los plásmidos pCEFL GFP c-Fos TAD WT o pCEFL GFP c-Fos TAD MUT. Las células transfectadas fueron incubadas en medio 1% suero toda la noche y luego estimuladas con Carbacol. Luego, las células se colectaron a distintos tiempos post-estimulación, como se indica en la figura. Se purificaron los núcleos de los extractos celulares y se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante para realizar un Western Blot utilizando un anticuerpo anti GFP.

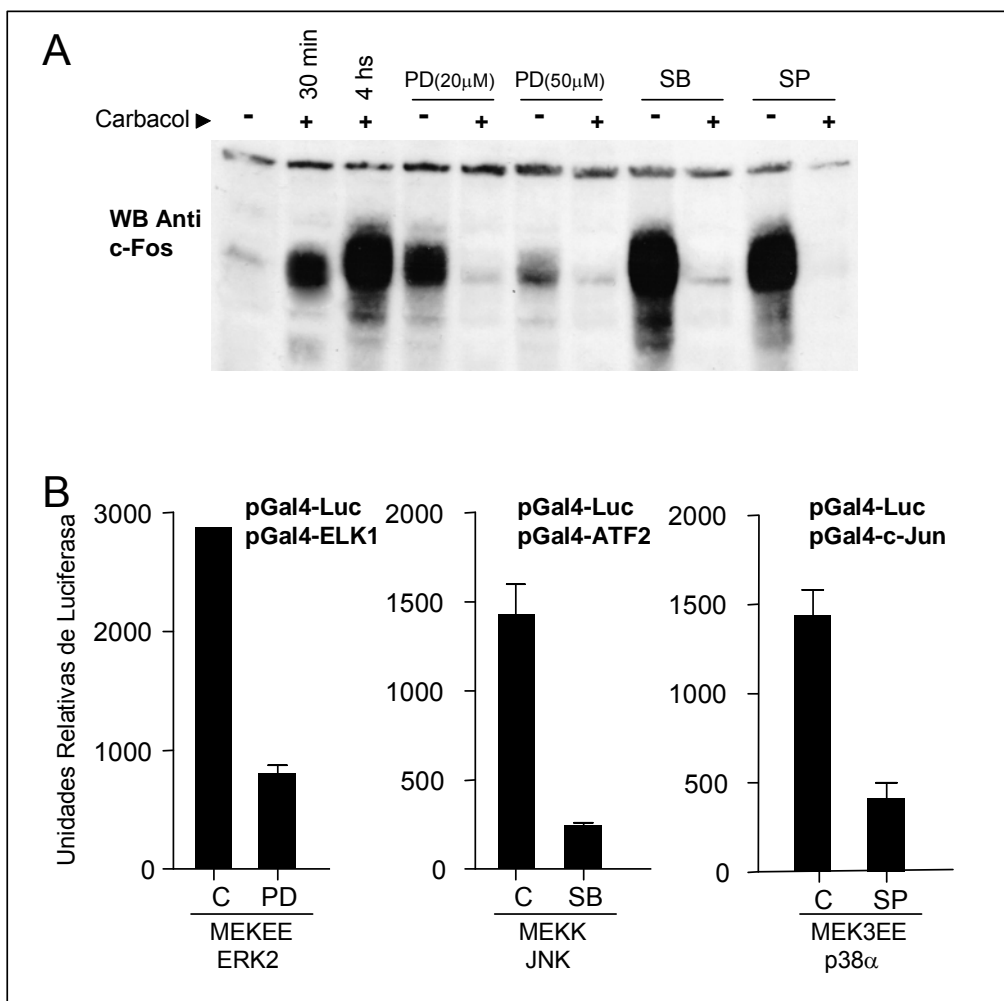


Figura 43:

La inhibición de una única quinasa no impide el retardo en la movilidad electroforética de c-Fos.

A. Células m1.2 fueron pre-incubadas con los inhibidores de MAPKs SB 203580 y SP 600125 y a la media hora se agregó Carbacol. El inhibidor PD 098059 se agregó media hora después de agregado el estímulo para permitir la expresión de la proteína c-Fos.

Las células se colectaron 4 horas después del agregado el estímulo. Se purificaron los núcleos y se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante para realizar un Western Blot utilizando un anticuerpo anti c-Fos.

B. Para controlar el funcionamiento de los inhibidores utilizados, células m1.2 fueron co-transfectadas con las quinasas ERK2, JNK o p38, sus respectivos activadores río arriba (MEKEE, MEKK o MEKK6 respectivamente), los plásmidos que expresan a sustratos conocidos de cada quinasa como proteína de fusión con el dominio de unión al DNA de Gal4 (Gal4-ELK1, Gal4-ATF2 o GAL4-c-Jun) como se muestra en la figura, junto con el gen reportero pGal4 Luc. Estas células fueron incubadas toda la noche en medio 1% suero y colectadas a la mañana siguiente. Se midió actividad Luciferasa de cada lisado celular y actividad β -galactosidasa para normalizar.

los 30 minutos post estimulación, el cual luego decae en función del tiempo (panel superior). Además se observa que inmunoprecipitando con anticuerpo anti Treonina fosforilada la fosforilación del AU5 c-Fos aumenta a los 30 minutos post estímulo y se mantiene constante a la hora, comenzando a decaer a las dos horas post estimulación.

Estos resultados indican que c-Fos es fosforilado en respuesta a Carbacol en Serinas y Treoninas.

Luego se transfectaron células m1.2 con pCEFL-GFP c-Fos TAD WT o pCEFL-GFP c-Fos TAD MUT. Estas células, después de ser incubadas toda la noche en medio 1% suero, fueron estimuladas con Carbacol y colectadas a distintos tiempos post estimulación. Como se observa en la figura R.42 cuando transfectamos con el plásmido que porta el TAD de c-Fos WT, se produce el retardo en la movilidad electroforética de c-Fos que se evidencia a las 4 horas post-estimulación. Además, cuando las células fueron transfectadas con pCEFL-GFP c-Fos TAD MUT, no se observa dicho retardo, sugiriendo que el dominio de transactivación de c-Fos es fosforilado por MAPKs en respuesta a Carbacol.

En un intento alternativo por averiguar que MAPKs están involucradas en la fosforilación de c-Fos endógeno en respuesta a Carbacol utilizamos los inhibidores de MAPKs PD098059 (20 μ M y 50 μ M), SB203580 (20 μ M) y SP600125 (20 μ M). Células m1.2 en cultivo, luego de haber sido incubadas en medio 1% suero, se estimularon con Carbacol media hora después de que se les hayan agregado los inhibidores SB 203580 o SP 600125 para evaluar si p38 o JNK están involucradas en la fosforilación de c-Fos. Para evaluar el efecto de ERK2 y ERK5, el inhibidor se agregó media hora después del estímulo, ya que como observamos anteriormente ERK2 está involucrada en la activación del promotor de c-Fos, y si utilizamos el inhibidor media hora antes no hubiéramos obtenido proteína c-Fos para evaluar su fosforilación. Las células fueron colectadas a las 4 horas post estimulación. En la figura R.43A se observa un Western Blot donde se analizan los extractos nucleares extraídos. Se muestra que ni el inhibidor de p38 ni el inhibidor de JNK logran disminuir la presencia de las bandas de menor migración electroforética. Además en la segunda calle se observa el estado de c-Fos en las células, transcurridos 30 minutos del agregado de Carbacol, momento en el que se agregó PD 098059. También se puede observar que el agregado de PD 098059 tampoco disminuye la presencia de bandas de menor movilidad electroforética. En la figura R.43B se observa el control del funcionamiento de los inhibidores utilizados.

Este resultado conjuntamente con el resultado de la figura R.40 en el que todos los inhibidores tienen un efecto en la actividad transcripcional de c-Fos sugieren que c-Fos es fosforilado en respuesta a Carbacol por múltiples MAPKs y que no habría una única responsable de activar a c-Fos como factor de transcripción.

DISCUSIÓN

La expresión génica está controlada por una gran variedad de señales extracelulares que varían a lo largo de la vida de las células en función de su estado nutricional y de la arquitectura y el entorno del órgano del cual forman parte. Las MAPKs actúan como mediadoras del pasaje de señales extracelulares a intracelulares ejerciendo su acción sobre factores de transcripción que determinan cambios en la expresión génica en las células (65,168)

La respuesta de una célula ante un estímulo involucra cambios en la tasa de transcripción de determinados genes. Cuando comienza la respuesta se activan los genes de respuesta temprana (ERG) que son aquellos cuya síntesis es estimulada rápida y transitoriamente como consecuencia del estímulo. De esta manera, las proteínas codificadas por ERGs pueden desencadenar una respuesta celular rápida y de manera controlada, ya que las proteínas codificadas por estos genes son velozmente degradadas como mecanismo de regulación de la señal.

La actividad prolongada de estas proteínas o su desregulación suele estar asociada a transformación celular en los casos en que activen genes que codifiquen para proteínas implicadas en la regulación de la división celular y proliferación.

El factor de transcripción c-Fos está codificado por un proto oncogén de respuesta temprana. Su actividad está finamente regulada a nivel transcripcional, a nivel de la vida media del RNA mensajero transcrito, a nivel de la vida media de la proteína y a nivel de modificaciones post traduccionales que se adicionan sobre esa proteína.

A lo largo de este trabajo de tesis hemos contribuido al conocimiento de la regulación de c-Fos por MAPKs a varios niveles, y a la vez hemos abierto interrogantes, algunos de los cuales se continuarán investigando en el laboratorio.

De este estudio como un todo, mostramos evidencias de que la exposición de las células a radiación UV lleva a la activación de miembros de la subfamilia de p38 SAPKs las cuales, como consecuencia de dicha activación, fosforilan a c-Fos en su dominio de transactivación produciendo un aumento en su capacidad de transactivar genes con sitios de unión AP-1.

Además, observamos que el agonista del receptor muscarínico 1, Carbacol, induce la expresión de *c-fos* activando su promotor a través de la MAPK ERK2; luego, c-Fos sería fosforilado por múltiples MAPKs en su dominio de transactivación activando su función como factor de transcripción.

1- Búsqueda de proteínas que interactúen físicamente con p38 γ . Estudio de la interacción entre p38 y c-Fos.

Logramos identificar a c-Fos en varios insertos de clones positivos para interacción con la carnada p38 γ en el ensayo de doble híbrido en Levaduras, (tal como se puede observar en la figura R.1). Este resultado fue el iniciador de todo este trabajo ya que introdujo la posibilidad de que c-Fos interaccionara con la MAPK p38 γ en células de mamífero y de que esta interacción tuviera consecuencias dentro de la célula que aún no habían sido descritas. Entonces, nos propusimos investigar las consecuencias bioquímicas y biológicas de dicha interacción.

Para ello realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando un plásmido que expresa una variante de c-Fos a la que llamamos c-Fos sh, que incluye casi toda la porción de c-Fos que fue levantada en el ensayo de doble híbrido y un plásmido que expresa a HA p38 γ . En estos ensayos observamos que estas proteínas pueden interaccionar *in vivo* en células de mamífero y además que para que estas dos proteínas puedan interaccionar es suficiente con que esté presente la porción de c-Fos representada en c-Fos sh (figura R.2). La confirmación de la interacción entre estas dos proteínas *in vivo* en una línea celular nos permitió seguir avanzando en el estudio.

Al ser c-Fos un factor de transcripción y p38 γ una MAPK, hipotetizamos que podría estar ocurriendo una regulación análoga a la que ocurre entre JNK y c-Jun, o sea, que p38 γ estuviera fosforilando a c-Fos. Por ello intentamos primero responder si c-Fos es un sustrato de la proteína quinasa p38 γ . En ensayos de fosforilación de c-Fos sh *in vitro* se demostró que p38 γ puede fosforilarlo, y además que la Treonina 232 de c-Fos es un residuo fosforilable por esta quinasa (figuras R.2, R.3 y R.5).

Posteriormente decidimos ampliar el estudio a todas las SAPKs (a las 4 isoformas de p38 y a JNK). Realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* para analizar la función de c-Fos como sustrato de las distintas SAPKs. Encontramos que las p38s inmunoprecipitadas de células en cultivo efectivamente transfieren el grupo fosfato gamma del ATP a la proteína GST Fos expresada previamente en bacterias. También encontramos que JNK puede fosforilar a c-Fos *in vitro* (figura R.6).

Las fosforilaciones de sustratos *in vitro* no necesariamente reflejan una interacción funcional *in vivo* ya que las dos proteínas que se están evaluando como quinasa-sustrato se encuentran físicamente de modo forzado. El hecho de que estemos incubando a una proteína quinasa con un exceso de una proteína “sustrato” que contiene sitios consenso para ser fosforilados por esa familia de quinasas podría llevar a un resultado falso positivo. Sin embargo, no siempre es fácil determinar fosforilaciones *in vivo*, por ello, los resultados *in vitro* son válidos ya

que orientan al investigador y lo guían en su estudio. Estos experimentos sirven para investigar en primera instancia si una proteína podría ser sustrato de otra *in vivo*.

Cambios en la movilidad electroforética de c-Fos están considerados como cambios en el estado de fosforilación de esta proteína (27,57). Investigamos la fosforilación de c-Fos *in vivo* observando su movilidad en Western Blots de extractos de células en cultivo que expresaban a las distintas SAPKs y a sus respectivos activadores. Cabe destacar que c-Fos es una proteína que se hiperfosforila y por lo tanto resulta muy difícil obtener anticuerpos anti residuo específico de c-Fos fosforilado; cuando realizamos estos estudios no existían disponibles comercialmente este tipo de anticuerpos.

En estos experimentos observamos una marcada disminución en la movilidad de c-Fos cuando las células fueron transfectadas con las distintas p38s y MKK6, su activador río arriba, pero no con JNK (figura R.7). El mismo retardo en la movilidad electroforética se observó cuando transfectamos el plásmido que expresa solo al dominio de transactivación de c-Fos, c-Fos TAD, confirmando que el retardo en la movilidad electroforética se debe a modificaciones inducidas por las p38s sobre el TAD de c-Fos *in vivo* (figura R.8). Estos resultados mostraron que en nuestras células c-Fos es un sustrato de p38 SAPKs *in vivo* pero no de JNK, evidenciando que no todas las SAPKs llevan a la fosforilación de los mismos factores de transcripción, inclusive cuando todas pueden fosforilarlo *in vitro*.

En el momento en que realizábamos estos estudios, se habían publicado pocos trabajos en los que estudiaran fosforilación de c-Fos, y hasta el momento solo se habían descrito claramente fosforilaciones residuo específica por la quinasa RSK2 en la Serina 362 de c-Fos (293), por lo que a nuestro entender nuestros resultados eran los primeros en los que se observaba fosforilación de c-Fos por MAPKs *in vivo*. Sin embargo, rápidamente salieron a la luz distintos reportes que hablaban de fosforilación de c-Fos por ERK2 en respuesta a suero o a PDGF, ambos estímulos mitogénicos (211,217), y en el momento en que nuestro trabajo estaba en mano de los evaluadores, se reportó la fosforilación de c-Fos por JNK en respuesta a H₂O₂, un estímulo que produce estrés celular (64). Estos trabajos nos sirvieron para reforzar el hecho de estudiar la fosforilación de c-Fos analizando el cambio en la movilidad electroforética del mismo mediante Western Blots, y a su vez nos permitieron asegurarnos que c-Fos podía ser sustrato de MAPKs. Por otro lado, abrieron el interrogante de cuales son los estímulos que determinan que este factor de transcripción sea fosforilado por una u otra MAPK.

Como se ha descrito, c-Fos contiene un dominio de activación transcripcional localizado en su extremo carboxilo terminal. La fosforilación de c-Fos en este dominio (TAD) por las p38s promueve su actividad transcripcional, tal como se observa cuando utilizamos el sistema heterólogo GAL 4 c-Fos TAD en las condiciones en que las p38 se encuentran activadas (figura R.9). Corroboramos este resultado al observar que la supresión de la actividad de las p38

endógenas mediante la utilización de formas dominantes negativas de las mismas llevó a una actividad limitada del reportero GAL4 Luciferasa (figura R.10).

Por otra parte, el hecho de que la sobre-expresión de JNK y su activador MEKK no produzca modificaciones en los valores de actividad Luciferasa en el ensayo de la figura R.9 resulta concordante con los resultados anteriores en los que no observamos cambios en la movilidad electroforética de c-Fos en presencia de JNK y MEKK.

En las figuras R.9 y R.10 se observa que si bien todas las p38s activarían la capacidad transcripcional de c-Fos, existen diferencias en la intensidad de activación en función de la p38 SAPK estudiada. P38 α y p38 β serían los activadores más potentes mientras que p38 γ y p38 δ producirían una activación más modesta a pesar de que puedan fosforilar a c-Fos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Resultados similares en cuanto a la activación de c-Fos por distintas p38s se obtuvieron utilizando un plásmido que expresa AU5 c-Fos y un sistema reportero en el cual sitios AP-1 están repetidos dentro de un promotor mínimo que se encuentra río arriba del gen de Luciferasa (figura R.11). Aquí observamos que c-Fos potencia la activación del gen reportero AP-1 LUC cuando las p38s están activadas, principalmente p38 α y p38 β , postulando que cuando c-Fos es activado por las p38s forma parte de dímeros AP-1 que activan la transcripción del gen reportero y muy probablemente de varios genes que contengan sitios de respuesta TRE. También se observa que p38 α y p38 β son capaces de activar la transcripción del gen reportero aún en ausencia de c-Fos transfectedo, sugiriendo que estas quinasas podrían estar actuando sobre la proteína c-Fos endógena.

Existe también la posibilidad de que la diferencia en las activaciones al transfectar con las distintas quinasas se deba al efecto de estas quinasas sobre otros factores de transcripción que componen AP-1. Por ejemplo un trabajo del laboratorio del Dr. Chen (55) muestra que p38 α puede fosforilar a c-Jun y activar AP-1 mientras que p38 γ y p38 δ inhiben el efecto de AP-1 inhibiendo la síntesis de c-Jun. Si esto está ocurriendo también en nuestras células es posible que el menor efecto que observamos en la activación del gen reportero cuando utilizamos p38 γ o p38 δ se deba al efecto conjunto de la falta de activación de c-Jun y la menor activación de la capacidad transcripcional de c-Fos, que como vimos en los experimentos del sistema GAL4-c-Fos TAD actuando sobre el gen reportero GAL4 Luc es menor que la transactivación que se induce al co-transfectar con las isoformas de p38 α o p38 β .

Todos juntos estos resultados sugieren que la capacidad de regular a c-Fos de las diferentes p38s sería atribuible no solo a la capacidad de estas quinasas de fosforilar a c-Fos sino también a la posibilidad de que estas quinasas recluten diferencialmente componentes adicionales a la maquinaria de transcripción que dependiendo de cual sea la p38 SAPK involucrada, serían

críticos para que ocurran cambios en la actividad transcripcional. Además, la localización subcelular de las proteínas involucradas podría también estar influyendo en la activación de c-Fos como factor de transcripción.

2- Regulación post-traduccional de c-Fos inducida por luz UV.

Ejemplo de regulación de c-Fos por señales que inducen estrés.

Si bien todas las SAPKs se activan en respuesta a radiación UV solo las p38 SAPKs intervienen en la fosforilación de c-Fos inducida por dicho estímulo (figuras R.13 y R.14). Como mencionamos previamente mientras nuestro trabajo se encontraba en manos de revisores otros grupos publicaron la fosforilación de c-Fos en respuesta a H₂O₂ por JNK en cardiomiocitos (64), y no por las p38 SAPKs. Esto sugiere que el estímulo que la célula recibe desencadena señales intracelulares que determinarían específicamente que interacción quinasa-sustrato va a ocurrir. Además, es posible que el contexto o tipo celular que recibe la señal sea también un factor determinante de cuales interacciones pueden suceder.

En la misma línea de lo comentado anteriormente, observamos que el pre-tratamiento de las células con el inhibidor SB 203580 (304) reduce el cambio en la movilidad electroforética de c-Fos inducida por la radiación UV, por lo que podemos afirmar que p38 α y/o p38 β fosforilan a c-Fos en respuesta a luz UV (figuras R.16 y R.17). El inhibidor SB 203580 es un compuesto ampliamente utilizado y aceptado ya que resulta específico para las isoformas de p38 α y β en la concentración utilizada, sin embargo, como todo fármaco, podría llegar a estar actuando inespecíficamente sobre alguna otra quinasa a la que desconocemos que inhibe. Por esta razón este resultado fue corroborado utilizando una forma dominante negativa de p38 α (figura R.18), que si bien tiene la desventaja de estar introduciendo otro plásmido y otra proteína a la célula, tiene la ventaja de ser específico para inhibir la vía de señalización en cuestión.

El inhibidor de MEK, U0126 (101), no produce ningún efecto en la migración electroforética de c-Fos en células estimuladas con UV ni tampoco lo producen la sobreexpresión de las quinasas ERK2 y ERK5 activadas (no mostrado), indicando que en contraste con lo que se observa luego de la activación de receptores de tipo Tirosina quinasa, la vía de señalización que involucra a ERK no estaría involucrada en la respuesta de c-Fos a UV (211,217,301), haciendo foco nuevamente en las diferentes consecuencias bioquímicas intracelulares de cada estímulo en un contexto celular determinado.

SB 203580 inhibe también la formación de complejos AP-1/oligonucleótido radioactivo producidos en respuesta a radiación UV en los EMSA mostrando la dependencia de la actividad de p38 para la formación de los mismos. Podemos asegurar que c-Fos forma parte de los

complejos AP-1 en respuesta a luz UV analizando el “supershift” que se produce al agregar el anticuerpo correspondiente (figura R.22).

Además, observamos que SB 203580 también inhibe la translocación de c-Fos al núcleo en respuesta a radiación UV, por lo que las p38 α y p38 β estarían involucradas en la translocación de c-Fos al núcleo en respuesta a luz UV (figuras R.19 y R.20). Nuestros resultados muestran diferencias en la localización sub-celular de las distintas isoformas de p38. Mientras que después de la exposición a UV, las quinasas HA p38 α y p38 β transfectadas se observan predominantemente en el núcleo de las células junto con c-Fos, p38 γ se observa en el núcleo inclusive antes de que las células fueran expuestas a luz UV. Además p38 γ se observa tanto en el núcleo como en el citoplasma, al igual que fue observado por Paramanik y colaboradores (24,244). Asimismo, observamos que p38 δ colocaliza con c-Fos principalmente en el citosol. El hecho de que p38 α , p38 β y p38 γ colocalicen en el núcleo con c-Fos mientras que p38 δ permanezca citosólico serviría para entender las diferencias observadas en la capacidad de transactivar de c-Fos en los ensayos con genes reporteros.

Estos resultados ayudarían a explicar porque las p38 AF (formas dominante negativas) pueden inhibir la transactivación de c-Fos inducida por MEK3EE, ya que los mutantes AF podrían estar secuestrando a c-Fos en el citosol o simplemente, impidiendo que se fosforilen.

Con respecto a las diferencias observadas en la localización de las p38 SAPKs en respuesta a radiación UV, podemos mencionar que si bien muchos trabajos postulan que las distintas p38s cumplirían roles similares (102,227) algunos reportes recientes muestran antagonismos entre distintos miembros de las p38s, sugiriendo que cada isoforma podría regular funciones específicas (221,244,247). Por ejemplo, observan que las distintas isoformas de p38 tienen efectos opuestos sobre la transcripción dependiente de AP-1 a través de la regulación diferencial de c-Jun, donde p38 β regula positivamente la actividad de AP-1 mientras que p38 γ y p38 δ la regulan de modo negativo ya que estimulan o inhiben la fosforilación de c-Jun respectivamente (244). Otro grupo postula un antagonismo entre p38 α y p38 γ también actuando sobre c-Jun (247), en este caso postulan que cuando p38 α es activado inhibe la transcripción de p38 γ y además estimula su degradación por el proteasoma de manera dependiente de c-Jun. Además observan que p38 γ es activado principalmente ante estímulos mitogénicos como Ras mientras que p38 α es activado en respuesta a señales de estrés o que activan apoptosis. Estos trabajos ejemplifican el delicado equilibrio entre las actividades de las distintas MAPKs y la especificidad de las mismas al transducir señales en función del estímulo recibido que van a afectar el destino de la célula.

Aunque el inhibidor SB 203580 no permite medir la participación de p38 γ y p38 δ en la fosforilación de c-Fos, el hecho de que p38 α y p38 β sean los activadores más potentes de la

transactivación de c-Fos junto con que el efecto de la luz UV sobre la fosforilación de c-Fos, la translocación al núcleo y la capacidad de unirse a AP-1 sean casi abolidas en presencia de SB 203580 indica que estas isoformas tienen un rol predominante en la señalización activada por UV que actúa sobre c-Fos (figuras R.10-12; R.16-17; R.19-20; R.22). Por otro lado, el hecho de que cuando sobre-expresamos c-Fos MUT no se produce el retardo en la movilidad electroforética (figura R.15) y que este es revertido con el tratamiento con la fosfatasa PP2A (no mostrado) indicarían que los cambios observados en la movilidad electroforética se deben a la adición de grupos fosfato en estos residuos.

En ese sentido, y dado el notorio cambio en la movilidad electroforética, no descartamos que otras modificaciones post-traduccionales ocurran como consecuencia de esta primera fosforilación y que también contribuyan al aumento en el peso molecular aparente de c-Fos.

Con respecto al análisis de la participación de cada sitio en la transactivación de c-Fos, la situación pareciera ser más compleja que en el caso de la fosforilación de c-Jun por JNK donde solo dos sitios, Serina 63 y 73, son los residuos críticos que determinan la actividad transcripcional de c-Jun. La Treonina 325 parece ser el sitio de elección para ser fosforilado por las distintas p38s *in vitro*, sin embargo, cuando este sitio se encuentra como único sitio WT (que podría ser fosforilado por MAPKs) en el TAD de c-Fos no se restaura la actividad transcripcional de la proteína sugiriendo que se necesita la fosforilación de varios sitios a la vez para que pueda transactivarse (figura R.25).

Cabe destacar que la intensidad de las fosforilaciones observadas *in vitro* con los mutantes no necesariamente reflejan lo que ocurre *in vivo*, ya que es probable que se produzcan fosforilaciones secuenciales en donde una vez que ha ocurrido la fosforilación de un sitio en particular se produzca un cambio en la estructura de la proteína que permita que otro sitio sea posteriormente fosforilado. Un ejemplo conocido de este tipo de fosforilaciones secuenciales sobre c-Fos es la fosforilación de las Serinas 362 y Serina 374 por RSK2 y ERK2 respectivamente, donde estas fosforilaciones llevan a un aumento de la estabilidad de la proteína (226) y además producen un cambio conformacional en el que se expone un sitio de unión para ERK2 (58). Solo después de que han ocurrido todos estos cambios se puede fosforilar la Treonina 325 de c-Fos en respuesta a PDGF.

Resulta también interesante el hecho de que p38 γ puede fosforilar a c-Fos *in vitro* inclusive cuando los cuatro residuos consenso para fosforilación por MAPKs se encuentran mutados a Alanina. Esto podría deberse a la fosforilación directa en un sitio no consenso para MAPKs por p38 γ o también, podría ser la consecuencia de una fosforilación indirecta por alguna quinasa que esté co-inmunoprecipitando con p38 γ a pesar de los fuertes lavados que se realizan en la co-inmunoprecipitación. Por los resultados de los experimentos con el sistema reportero de GAL4, esta fosforilación no sería un inductor de la capacidad transcripcional de c-Fos (figura R.26). Esto

indicaría que se necesita que varios sitios estén fosforilados para que c-Fos pueda ser transactivado. Podría ocurrir que esta fosforilación no esté involucrada en la activación de c-Fos como factor de transcripción sino que influya en otras funciones celulares del mismo.

Se sabe por ejemplo que c-Fos puede estimular la síntesis de fosfolípidos al asociarse al retículo endoplasmático dependiendo del estado de fosforilación de las Tirosinas 10 y 30 del extremo amino terminal (242). Existe la posibilidad de que otras fosforilaciones estén participando en la regulación de este tipo de actividad o de otra aún no descrita y que no estén asociadas a un cambio en la actividad transcripcional de c-Fos.

Se han reportado efectos sobre el promotor de c-Fos inducidos por radiación UV (245,330). Nuestros datos agregan información a la regulación de c-Fos por luz UV ya que muestran por primera vez que p38 promueve la fosforilación del factor de transcripción c-Fos afectando su localización subcelular y su capacidad transactivacional.

La luz UV activa múltiples vías de señalización que estimulan la activación de los promotores c-Fos y c-Jun (284) y aumentan la actividad transcripcional de AP-1 a través de la fosforilación de c-Jun por JNK como ha sido ampliamente descrito (37,333). En base a los resultados aquí reportados, proponemos un modelo en el cual la estimulación celular con radiación UV contribuye también a la actividad de AP-1 actuando a través de la fosforilación de c-Fos por las p38s como se muestra aquí por primera vez (figura D.1).

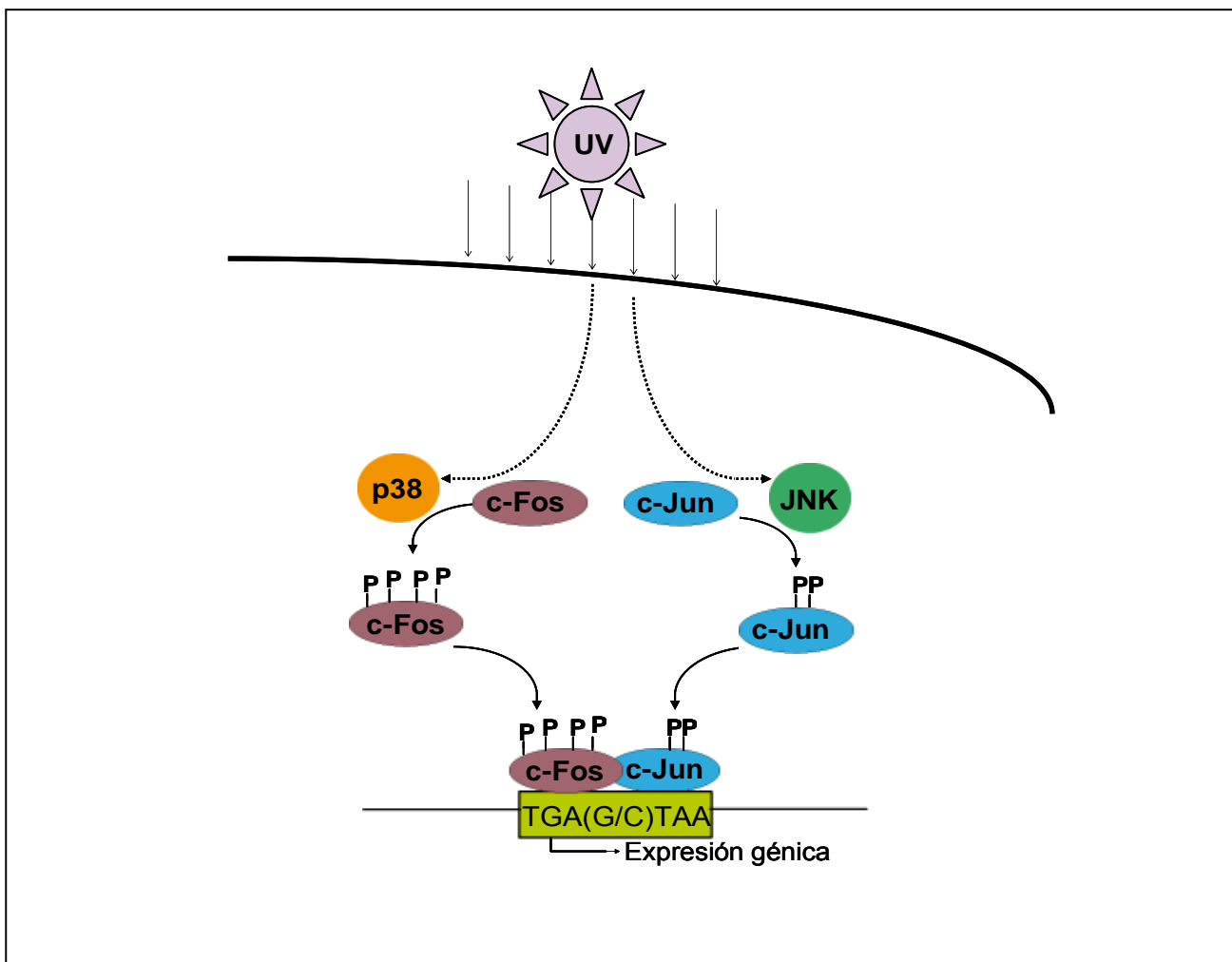


Figura D. 1.:

La radiación UV activa AP-1 induciendo la fosforilación de c-Fos y c-Jun.

En el esquema se observa que luego de la irradiación UV, se activan vías de señalización paralelas que convergen sobre el factor de transcripción AP-1. Nuestros resultados muestran que c-Fos es fosforilado en respuesta a radiación UV por las p38 SAPKs contribuyendo así a la activación de AP-1 de modo análogo al descrito previamente para c-Jun y JNK.

3- Regulación transcripcional de c-Fos inducida por la activación del receptor M1.

Ejemplo de regulación de c-Fos por señales que inducen proliferación.

En el laboratorio del Dr. Silvio Gutkind se demostró que en células que expresan establemente el receptor muscarínico M1 se induce la síntesis de DNA y se producen focos de transformación en cultivo, cuando son incubadas en presencia del agonista Carbacol (120). Posteriormente trabajos derivados del mismo laboratorio mostraron que la activación del receptor

acoplado a proteína G, M1, activa la transcripción de varios genes de respuesta temprana (65) y se estudió principalmente la regulación del gen de respuesta temprana c-Jun como consecuencia de la activación de receptores acoplados a proteínas G (65,67,199). Con el objetivo de estudiar la regulación de c-Fos por MAPKs en respuesta a un estímulo mitogénico, retomamos la línea de trabajo mencionada pero ahora enfocándonos en la activación del otro componente mayoritario de AP-1, c-Fos.

Observamos mediante distintas técnicas complementarias que el promotor de *c-fos* es inducido por Carbacol y que se necesita de la activación de ERK2 para que este promotor se active (figuras R.26-28 y R.30-33).

En los ensayos de Northern Blot con los inhibidores para distintas MAPKs se observa claramente que el agregado de PD 098059 produce una gran disminución de la cantidad de transcripto de *c-fos* acumulado en células estimuladas con Carbacol, sin embargo, no es abolido completamente por lo que además de ERK2 podrían estar actuando otras vías de señalización, como por ejemplo, la vía de PKA tal como ocurre al activar otros receptores acoplados a proteínas G (281).

Además hemos observado que el agregado del inhibidor SB 203580 no solo no disminuye sino que lleva a un aumento en la cantidad de transcripto de *c-fos*. La cantidad de mensajero presente se debe a un balance entre la síntesis del mensajero y la degradación del mismo. Postulamos distintas hipótesis que expliquen lo observado.

Por un lado, y esta es la hipótesis que actualmente estamos investigando, creemos que ese efecto se debe a la regulación de la estabilidad del mensajero de *c-fos* por p38 SAPKs.

Una característica del mRNA de *c-fos* es su corta vida media, que estaría regulada por elementos ARE (elementos ricos en Adeninas y Uracilos) en la región 3' no codificante y en la parte codificante del transcripto. Estos elementos ARE permiten la unión de proteínas AUBPs (AU-rich element-binding proteins) que están directamente involucradas en la estabilidad del mensajero (260), además se sabe que p38 está involucrada en la regulación de la estabilidad de varios mensajeros, como por ejemplo de citoquinas inflamatorias (84,85) y que puede fosforilar a proteínas AUBPs como TTP (Tristetraprolin). Existe una variedad de proteínas que pueden unirse a las secuencias ARE, incluidas TTP (48,129).

Analizando la secuencia aminoacídica de dichas proteínas hemos encontrado que contienen varios sitios potencialmente fosforilables por MAPKs. Un dato curioso, que apoya la teoría de que las p38 MAPKs estarían regulando la estabilidad del RNA mensajero de *c-fos* es que mientras que el inhibidor SB 203580 aumenta significativamente la cantidad de RNA mensajero, no tiene el mismo efecto sobre los valores de actividad Luciferasa de un plásmido reportero bajo el control del promotor de *c-fos* (no mostrado). Este hecho apoya nuestra hipótesis de que los

efectos del inhibidor de p38 observados en las figuras R.32 y R.33 no se deben a una acción sobre el promotor sino sobre los transcritos del ERG en estudio. En ese sentido, la figura D.2 muestra que el agregado de SB 203580 en células estimuladas con Carbacol impide el decaimiento del RNA de *c-fos*.

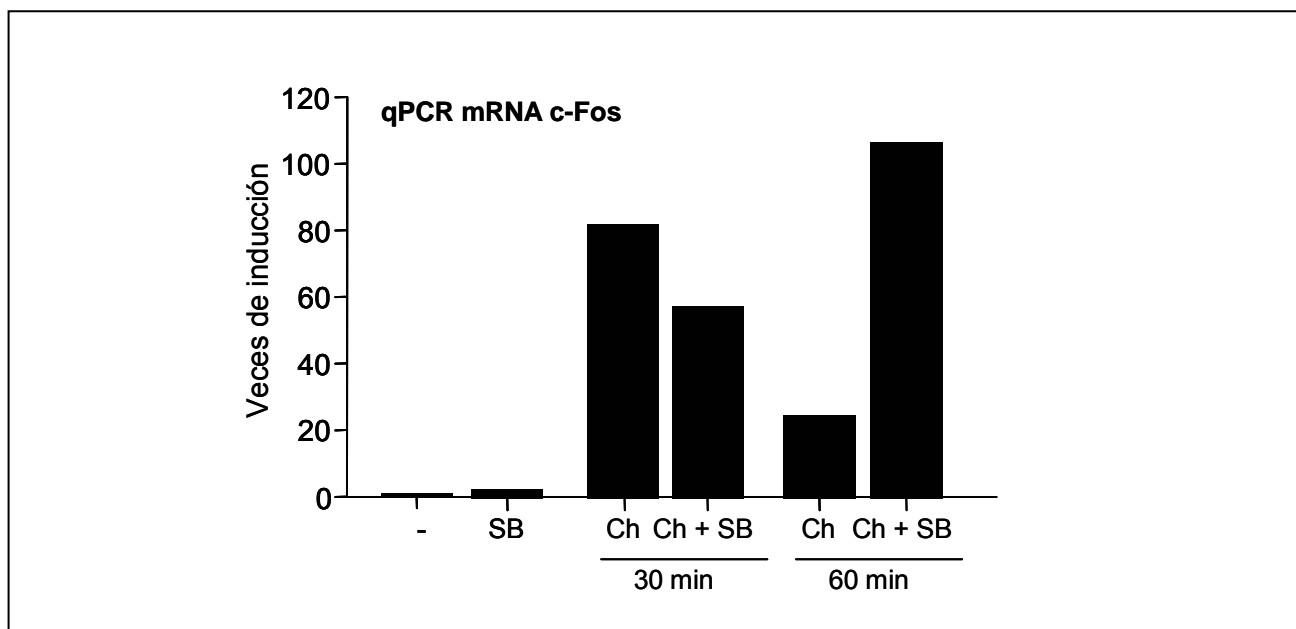


Figura D.2.:

Las p38 SAPKs regularían la estabilidad del mensajero de c-fos

Células m1.2 fueron incubadas en medio 1% suero y a la mañana siguiente se incubaron o no en presencia del inhibidor SB 203580. A la hora se estimularon con Carbacol y se colectaron media o una hora después de la estimulación. Luego se extrajo el RNA, se retrotranscribió y se realizó una PCR cuantitativa utilizando primers anti c-fos.

Otras posibilidades involucrarían la regulación de la actividad de ERK2 por p38, a través de la posible regulación diferencial de MKPs (MAPKs fosfatasas) que podrían actuar sobre ERK2 cuando son activadas por p38, (y en este caso al no estar p38 activada no se regularía la actividad de ERK2 por desfosforilación) o al posible aumento de la activación del promotor de c-Fos por mecanismos que en presencia de p38 activada no ocurrirían, como por ejemplo la posibilidad de que p38 active algún inhibidor transcripcional de c-Fos. También es posible que una combinación de mecanismos sean los que están determinando el aumento de la cantidad de mensajero de *c-fos* en presencia de SB 203580.

El aumento en la transcripción observado se continúa con el posterior aumento de la proteína c-Fos presente. Como se muestra en la Figura R.34, a medida que pasa el tiempo después del estímulo, c-Fos se va acumulando y a su vez su movilidad electroforética disminuye.

Para investigar si el cambio en la movilidad se debe a la fosforilación de c-Fos por MAPKs realizamos Westerns Blots utilizando anticuerpos dirigidos contra Serinas fosforiladas seguidas de Prolina o Treoninas fosforiladas. De esta manera pudimos observar que c-Fos es fosforilado *in vivo* en respuesta a Carbacol tanto en Serinas seguidas de Prolinas como en Treoninas, residuos blanco de MAPKs (figura R.41).

Además sobre-expresamos a las proteínas c-Fos TAD WT y c-Fos TAD MUT y luego estimulamos a las células con Carbacol (figura R.42). Solo observamos el retardo en la corrida electroforética en la proteína c-Fos TAD WT por lo que podemos afirmar que c-Fos es fosforilado en los sitios consenso para MAPKs del dominio de transactivación o bien, que el retardo en la movilidad electroforética es una consecuencia de esta fosforilación.

La gran diferencia en la intensidad de bandas que se observa en estos experimentos con respecto a lo observado en experimentos anteriores, se debe a que estamos transfectando células m1.2 que son un tipo celular que incorpora DNA exógeno con muy baja eficiencia con todos los métodos que hemos evaluado. Creemos que la disminución de la movilidad electroforética de c-Fos se evidencia recién a las 4 hs porque es allí cuando la mayoría de las moléculas de c-Fos alcanzaron el mayor peso molecular posible por la adición de Fosfatos o de otras modificaciones post traduccionales dependientes de la fosforilación por MAPKS.

Entre las modificaciones post traduccionales que puede sufrir c-Fos (además de las múltiples fosforilaciones) se encuentran sumoilación (41), ubiquitinación (39) e isomerización (210). La sumoilación de c-Fos produce un aumento del peso molecular aparente de la proteína pero este aumento es mucho mayor que el reportado por fosforilación y estaría alrededor de los 88 Kda. En cuanto a la ubiquitinación, se sabe que c-fos puede ser ubiquitinado *in vivo*, pero nuevamente esta ubiquitinación le otorga a la proteína un peso molecular aparente que va desde aproximadamente 67KDa hasta más de 97 Kda, además es solo una pequeña porción de la proteína la que se encuentra ubiquitinada, y es muy probable que no lográramos verla en el tipo de experimentos que nosotros realizamos (39). Con respecto a la isomerización, Pin1 es una enzima que produce la isomerización de cis a trans de enlaces peptidil-prolyl correspondientes a prolinas que se encuentran junto a Treoninas o Serinas fosforiladas. Se observó que c-Fos es isomerizado por Pin 1 luego de ser fosforilado por ERK2, por lo que no descartamos que en nuestros experimentos estemos observando el resultado de la isomerización que se produce luego de que c-Fos sea fosforilado.

Por último, observamos que algunos factores de transcripción pueden o-glicosilarse (165). La o-glicosilación une el OH- de GalNAc (*N*-acetilglucosamina con el OH- de grupos Serina o

Treonina de proteínas intracelulares. En colaboración con el grupo del Dr. Julio Caramelo observamos que c-Fos es O-glicosilado luego de ser traducido, pero no encontramos que esta O-glicosilación esté regulada por el agregado del estímulo Carbacol (no mostrado).

Para tratar de identificar a las MAPKs responsables de la fosforilación de c-Fos en respuesta a Carbacol utilizamos los inhibidores para las MAPKs JNK y p38, y el inhibidor indirecto de ERK (SP 600125, SB 203580 y PD 098059 respectivamente). Hasta el momento nuestros resultados sugieren que múltiples MAPKs estarían actuando sobre c-Fos ya que ninguno de los inhibidores utilizados cambia la movilidad electroforética de c-Fos en los Western Blots de la figura R.43. Además, sobre-expresando a c-Fos con cada una de las MAPKs en estudio y estimulando a las células con Carbacol observamos que el retardo en la movilidad electroforética no se produce ni más rápidamente ni es mayor que el observado en células transfectadas con plásmido control (no mostrado). En base a estos resultados creemos que no hay una única quinasa fosforilando a c-Fos sino que estarían actuando múltiples MAPKs en conjunto.

Cabe mencionar que en un principio supusimos que las SAPKs serían las responsables de la fosforilación de c-Fos en respuesta a la activación de M1 ya que se produce un pico de activación de estas quinasas alrededor de los 25 minutos post estimulación, tiempo suficiente para que se hayan sintetizado varias moléculas de c-Fos, mientras que el pico de activación de ERK2 se produce a los 5 minutos del agregado de Carbacol y luego disminuye casi a niveles basales. En base a los resultados obtenidos podemos afirmar que mientras ERK2 es responsable de la activación del promotor de *c-fos* en respuesta a Carbacol, aún no podemos determinar cuales son las múltiples MAPKs involucradas en la fosforilación de esta proteína.

Cuando evaluamos la capacidad transcripcional de c-Fos al activar el receptor M1 observamos que la activación del receptor M1 promueve la transactivación de GAL4 c-Fos TAD. Evaluamos si esta activación depende de la fosforilación de c-Fos por MAPKs utilizando el plásmido pGAL4 c-Fos TAD MUT en comparación con pGAL4 c-Fos WT y observamos un aumento en la actividad Luciferasa en respuesta a Carbacol solo al utilizar la versión WT, por lo que las MAPKs están involucradas en la transactivación de c-Fos (figura R.39). Adicionalmente utilizamos inhibidores específicos de estas quinasas y observamos que todas las MAPKs en estudio estarían fosforilando a c-Fos y activan su capacidad transcripcional, ya que inhibiendo a cualquiera de ellas disminuimos solo parcialmente la capacidad de transactivar de c-Fos (figura R.40). Esto refuerza la idea de que es probable que varias MAPKs puedan fosforilar a c-Fos, además estas quinasas podrían estar compitiendo por los mismos sitios o fosforilando sitios independientes.

Si cada sitio es fosforilado por una quinasa diferente, la inhibición de la actividad de una única quinasa no lleva a un cambio en la movilidad electroforética ya que no se impide que los otros sitios sean fosforilados. De esta manera, la capacidad de transactivar de c-Fos disminuiría

(ya que no están todos los sitios necesarios fosforilados) pero a la vez se continuaría produciendo el cambio en la movilidad electroforética.

En el caso de que las MAPKs compitieran por los mismos sitios es probable que cada quinasa tenga cierta “preferencia” o cierta eficiencia sobre cada residuo particular y por ello se observaría menor transactivación pero no se impediría el retardo en la movilidad electroforética ya que finalmente habría moléculas de c-Fos fosforiladas en todos los sitios consenso.

Observamos que con el agregado de Carbacol se induce la formación de complejos entre oligos con secuencias TRE y el factor de transcripción AP-1; la formación de estos complejos muestran un pico máximo a las dos horas, tiempo suficiente para que la proteína c-Fos sintetizada luego del estímulo forme parte del complejo tal como se muestra en ensayos de Super Shift (figuras R.35 y R.36). Además luego del estímulo se induce la actividad del gen reportero AP-1 Luc y esta se potencia al transfectar c-Fos, sugiriendo que la activación de este factor de transcripción por Carbacol induce la transcripción de genes que contengan sitios AP-1 en sus promotores (figuras R.37 y R.38).

Actualmente estamos realizando varios experimentos de los que aún no hemos obtenido resultados concluyentes:

- 1- Inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP) sobre los promotores de las Metaloproteasas MMP-1, MMP-9 y MMP-13. Se ha publicado que estas metaloproteasas se transcriben en respuesta a c-Fos, por lo que nos proponemos investigar si la activación de c-Fos en respuesta a carbacol, puede aumentar la actividad de estos promotores.
- 2- Para dilucidar cual MAPK fosforila cada sitio en respuesta a carbacol se están transfectando distintas construcciones pCEFL GFP c-Fos TAD WT o MUT o T232 o T325 o T331 o S374 en células m1.2 y evaluando la movilidad electroforética de cada una de estas proteínas en presencia o ausencia de inhibidores de MAPKs y además en presencia o ausencia de la sobreexpresión conjunta de cada MAPK en estudio.

Otros estudios que realizaremos en breve gracias a la reciente reincorporación al equipo de trabajo del Dr. Federico Coluccio:

- Se utilizará la técnica “in gel Kinase Assay” en un intento adicional por encontrar cuales quinasas fosforilan a c-Fos en respuesta a Carbacol. En estos experimentos se realizan geles SDS-PAGE que se polimerizan con el sustrato, en este caso, con GST c-Fos purificado de bacterias. Luego se realizará una electroforesis de lisados de células m1.2 control y estimulados. Posteriormente el gel

se somete a tratamientos renaturalizantes y se le agrega ^{32}P γATP . De esta manera, uno puede identificar sitios en el gel en donde ocurrieron fosforilaciones, y como primero se corrió en un SDS-PAGE uno puede determinar el Peso Molecular (al menos el peso molecular aparente) de las quinasas que están fosforilando al sustrato. Estos ensayos también se realizarán con las diferentes mutanes GST c-Fos TAD T232 o T325 o T331 o S374 o MUT.

- Otra herramienta que utilizaremos para analizar la fosforilación de c-Fos en respuesta a Carbacol es la espectrometría de masa. Se realizarán transfecciones en células m1.2 con el plásmido pCEFL GFP c-FOS TAD en presencia o ausencia de los inhibidores de MAPKs disponibles. Luego se inmunoprecipitará GFP c-Fos TAD y se lo enviará a realizar espectrometría de masa (MALDI TOF) para determinar que sitios son fosforilados por cada quinasa.

- Por último, hemos conseguido anticuerpos dirigidos contra sitios de c-Fos fosforilados como anti S374 o T325 fosforiladas, los cuales no estaban disponibles comercialmente con anterioridad. Se utilizarán estos anticuerpos para estudiar la fosforilación de c-Fos transfectando en células m1.2 el plásmido PCEFL GST c-FOS TAD, que hemos construido recientemente. De esta manera podremos purificar al dominio de transactivación de c-Fos a partir de lisados de células m1.2 estimuladas con Carbacol utilizando resinas de Sefarosa-Glutatión y luego realizaremos Western Blots utilizando los anticuerpos mencionados.

Podemos destacar que si bien esta parte del estudio aún no ha sido concluida en su totalidad, intenta abarcar la regulación de un factor de transcripción por MAPKs a múltiples niveles.

Por un lado, a nivel de la inducción del promotor, por otro lado a nivel de las fosforilaciones que ocurren sobre este factor de transcripción que producen su transactivación, y por otro lado, ya que si bien escapa al trabajo de esta tesis se desprende de ella, a nivel de la regulación de la estabilidad del mensajero de c-Fos por MAPKs (estos experimentos están siendo continuados por la Lic. Sol Degese quien está desarrollando su Tesis Doctoral en base a preguntas abiertas por la presente).

Por último, mostramos un modelo (figura D.3) originado a partir de estos resultados en el cual se muestra a las MAPKs involucradas en la regulación de la actividad de c-Fos de varios modos. Es interesante destacar que mientras que las MAPKs de activación temprana como ERK2 (figura R.29) activan la síntesis del mRNA de c-Fos, otras de activación más tardía como las p38 se encargarían de desestabilizar a la molécula del mensajero. Esto habla del modo elegante con que la naturaleza modula la regulación concertada de varios caminos de transducción de señales frente a un estímulo externo de modo de permitir que un gen de respuesta temprana como *c-fos* sea activo de manera rápida y, a la vez, transitoria.

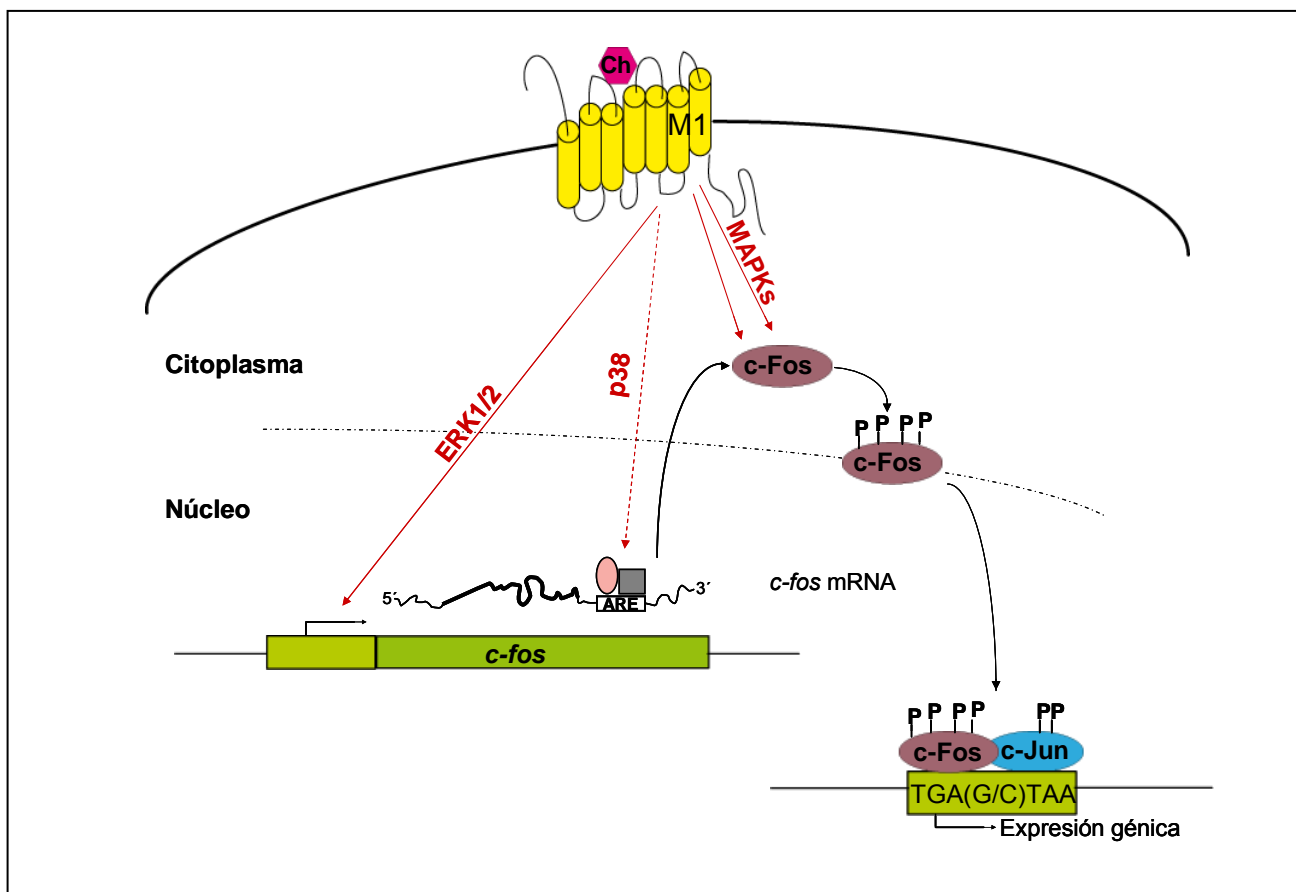


Figura D. 3.:

La activación del receptor muscarínico M1 regula la expresión y actividad de c-Fos actuando a través de distintas MAPKs.

En el esquema se observa que luego del agregado de Carbacol, se activan distintas vías de MAPKs involucradas en la actividad de c-Fos. Se muestra que las MAPKs ERK1/2 activan la transcripción de c-fos en respuesta a la activación del receptor M1. Una vez traducido el mensajero, la proteína c-Fos sintetizada en respuesta a Carbacol es fosforilada por MAPKs entre las que se incluirían a las SAPKs y a ERK 1/2. Estas fosforilaciones activan la capacidad transcripcional de c-Fos y por lo tanto llevan a la activación del factor de transcripción AP-1 regulando la transcripción de genes con sitios de respuesta TRE. En línea punteada roja se muestra que las p38 MAPKs estarían involucradas en la regulación de la estabilidad del RNA mensajero de c-fos actuando sobre proteínas que se unen a secuencias ARE del extremo 3' no codificante del transcripto.

CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados de este trabajo podemos resaltar que c-Fos es un factor de transcripción cuya actividad, se encuentra diferencialmente regulada tanto a nivel transcripcional como post-traducciona por distintas MAPKs y en función del estímulo suministrado.

Además de haber determinado la interacción por doble híbrido de p38 γ y el factor de transcripción c-Fos en levaduras, observamos que estas proteínas co-inmunoprecipitan, mostrando su capacidad de interactuar en células de mamífero *in vivo*. También advertimos que c-Fos puede ser sustrato de fosforilación de todas las SAPKs *in vitro*. Asimismo observamos que las p38 SAPKs fosforilan a c-Fos *in vivo* en su dominio de transactivación, regulando la actividad de este factor de transcripción al activar su capacidad transactivacional. También observamos que estas quinasas son responsables de la localización nuclear de c-Fos y de la fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV. En base a estos resultados postulamos un modelo en el cual ante un estímulo que produce estrés como la radiación UV, las células responden activando las vías de SAPKs, luego las p38 SAPKs fosforilarían a c-Fos y JNK fosforilaría a c-Jun, permitiendo que el factor de transcripción AP-1 se active y regule la transcripción de sus genes blanco.

Por otro lado, trabajando con un estímulo mitogénico, observamos que el agonista del receptor Muscarínico1, Carbacol, induce la activación del promotor de *c-fos*. Esto produce un aumento en la cantidad de transcripto de *c-fos* y también de la proteína c-Fos. Se observa además que a medida que transcurre el tiempo después del agregado de Carbacol, la proteína c-Fos se va fosforilando y esta fosforilación estaría mediada por múltiples MAPKs actuando sobre c-Fos en respuesta a Carbacol. Estas fosforilaciones en su dominio de transactivación activan su función como factor de transcripción, activando su capacidad transactivacional y aumentando la expresión de genes que contengan sitios AP-1.

Si bien esta parte del trabajo forma parte de un proyecto que continúa en la actualidad, hasta el momento podemos postular que ante un estímulo proliferativo como Carbacol, las células activan las vías de MAPKs y regulan a c-Fos a diferentes niveles. Por un lado, la sola activación de ERK1/2 lleva a la activación del promotor de *c-fos*. Por otro lado, c-Fos sería fosforilado en los sitios consenso para MAPKs de su extremo carboxilo terminal por múltiples MAPKs, entre las que podemos mencionara p38, JNK y a ERK2, las cuales activarían su capacidad de transactivar genes con sitios de unión AP-1. Por último, el trabajo provee evidencias que dejan sentadas las bases para estudiar la regulación por MAPKs de la estabilidad del transcripto de *c-fos*, mas específicamente por p38 MAPKs.

En su conjunto, este trabajo presenta una visión integral sobre la regulación de la expresión y actividad del producto del gen de respuesta temprana *c-fos* por MAPKs. De modo análogo a lo que ocurre con el principal socio de Fos en AP-1, c-Jun, se muestra como las MAPKs regulan *c-fos* por mecanismos alternativos, actuando a nivel del promotor del gen y de la actividad de la proteína resultante. Añadiendo un nuevo giro a la investigación, los resultados de esta tesis abren el estudio de la regulación de la estabilidad del mensajero de *c-fos* por MAPKs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de líneas Celulares:

HEK 293T: (células embrionarias humanas de hígado, “human embryonic kidney”, inmortalizadas con el antígeno T) fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) alta glucosa (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 2 mM (Gibco BRL), penicilina 100 µg/ml y estreptomycin 80 µg/ml (Gibco BRL), a 37°C y 5 % de CO₂.

NIH 3T3: (Fibroblastos de ratón) fueron cultivadas en medio DMEM alta glucosa (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero de ternera (CALF) (Hyclone), glutamina 2 mM (Gibco BRL), penicilina 100 µg/ml y estreptomycin 80 µg/ml (Gibco BRL), a 37°C y 5 % de CO₂.

M1.2: Fibroblastos NIH 3T3 que expresan aproximadamente 20,000 receptores por célula del receptor Muscarínico humano M1 (72) fueron cultivados en las mismas condiciones que las NIH 3T3.

Las células se repicaron cada 48/72hs según su confluencia, con una solución de tripsina al 0.5% (GIBCO BRL). Previo a este paso, las células fueron lavadas con una solución de PBS 1X. (PBS 10X: NaCl 1.37M , KCl 26.8mM, KH₂PO₄ 14.7mM, NaH₂PO₄ 43mM. pH=7.4).

Transfecciones:

Transfección con fosfato de calcio

Células HEK 293T semi-confluentes en placa de 10cm, fueron separadas 1/6 el día anterior a la transfección, con Tripsina 0.25% (GIBCO BRL) en placas de 10cm, obteniéndose placas con aproximadamente 50-70% de confluencia.

Luego de aproximadamente 24hs, se transfectaron con la técnica de Ca₃(PO₄)₂ utilizando una masa total de 2 µg de ADN.

En tubos tipo Falcon de 15ml estériles se agregan los plásmidos a utilizar y se le agrega 1ml de la solución 1. Esta solución se homogeneiza y tomándola con una pipeta se vuelca gota a gota sobre 1ml de solución 2 que se encuentra en agitación constante por burbujeo, en otro tubo tipo Falcon estéril. Se deja 20’-30’ para que se forme el precipitado que contiene fosfato de calcio y el ADN. Una vez formados estos complejos se agregan los 2 ml finales sobre las células gota a gota y se agita suavemente hasta que se observe una solución homogénea (no se retira el medio sino que se agregan estos 2 ml a ese medio).

Luego de 12-16hs se observan las células al microscopio para evaluar su estado, se aspira el medio, se lava con PBS a 37 °C y se agrega medio completo (con suero y antibióticos) para que las células continúen dividiéndose.

Solución 1 (por placa a transfectar)(0.86ml H₂O, 12µl DNA carrier 30µg/µl (Boehringer),125µl de CaCl₂ 2M).

Solución 2 (por placa a transfectar) (1ml HN (HN: 50mM Hepes pH=7.1, 280mM NaCl, 22.5µl NaH₂PO₄ 70mM pH=7)

Transfección con liposomas catiónicos

El principio general de este método de transfecciones es la adsorción del ADN a lípidos cargados que luego se fusionan con las células.

El día previo a la transfección se plaquearon aproximadamente 3 x10⁶ células NIH 3T3 o M1.2 en placas de seis pocillos, de 3 cm. de diámetro. Al día siguiente se agregaron el ADN (entre 2-3 µg de ADN por pocillo) y los liposomas (Lipofectamina + Plus Reagent, invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células fueron incubadas durante tres horas con medio sin suero + la mezcla de liposomas. Las estimulaciones se realizaron al día siguiente a la transfección.

Plásmidos

Varios

El plásmido pAP-1 LUC fue obtenido de Statagene. Este plásmido fue realizado insertando 7 repeticiones en tandem de elemento de respuesta AP-1 (TGA C TAA) río arriba del gen de luciferasa en el vector pA3 (111)

El plásmido pGAL4-LUC fue diseñado insertando seis copias en tandem del elemento de respuesta al factor de transcripción GAL4 y un promotor mínimo TATA en lugar del SV40 del vector pGL3 de Promega. (199)

Para estandarizar transfecciones se utilizó pRL-null (plásmido que expresa la enzima Renilla de Renilla reniformis) o pCDNA3 beta-galactosidasa.

Se utilizaron los plásmidos de expresión en bacterias pGEX 4T3 c-Jun (65,65)

c-Fos

c-Fos, Principio de la Tesis:

A partir de una library de cDNA proveniente de células NIH3T3 se clonó la región del cDNA de c-Fos que corresponde a los aminoácidos 220 (S 220) al aminoácido 353 (C 353) utilizando los siguientes primers:

Primer5':5'TCCCTGGATTTGACTGGAGGTCTG3',

Primer3':5'ACAGCTTGGGAAGGAGTCAGC3'.

El producto de amplificación se clonó primero en el plásmido de expresión en bacterias pGEX 4T3 (Amersham Pharmacia) utilizando los sitios de clonado en los sitios Bamh I- Not I. Se corroboró su expresión purificando la proteína expresada. El plásmido resultante se denominó pGEX 4T3 Fos short.

Posteriormente se sub-clonó en vectores de expresión eucariota pCEFL AU5 y pCEFL HA.

Estos plásmidos se llamaron pCEFL AU5 Fos sh y pCEFL HA Fos sh. Los plásmidos pCEFL son una versión modificada del vector de expresión pCDNA3 que contiene al promotor de EF-1 en marco de lectura con el epítipo AU5 o HA según el caso (199) Además se realizó una mutación puntual en la Treonina 232 y se clonó también en pGEX 4T3, dando como resultado al plásmido pGEX 4T3 Fos short mut.

Tanto el fragmento de c-Fos WT como el mutante fueron clonados en el vector pGBDX, que es una versión modificada del pCDNA III en el cual se clonó el dominio de unión al DNA (DBD) del factor de transcripción de levaduras GAL 4 (pCDNA3-GBDEX).

c-Fos, Plásmidos utilizados posteriormente:

Se utilizaron plásmidos que portaban el cDNA de c-Fos (codifica para los aminoácidos 209 al 380) en pCEFL AU5, HA o GFP, llamados pCEFL AU5 c-Fos FL o pCEFL HA c-FOS TAD, según portaran el cDNA completo o solo la región correspondiente al dominio de transactivación de c-Fos

Además se utilizaron las versiones mutantes de estos plásmidos, pCEFL AU5 c-Fos MUT FL y pCEFL AU5 c-Fos TAD MUT (obtenido con el kit QuikChange multisitedirected mutagenesis de Stratagene, además los mutantes TAD MUT, T232, T325, T331, y S374 en donde la Treonina o la Serina correspondiente fue reemplazada por Alanina utilizando el método de mutagénesis dirigida de stratagene (QuikChange site-directed mutagenesis). Estos plásmidos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Silvio Gutkind (211). También obtuvimos del laboratorio del Dr. Gutkind el plásmido pGBDEX c-Fos TAD y las versiones mutantes.

Luego subclonamos en los vectores pCEFL GFP y en pGEX 4T3, en sitios Bamh I-Not I, los fragmentos correspondientes a c-Fos TAD MUT, y a las versiones mutantes T232, T325, T331 y S374.

Quinasas

Los vectores de expresión para pCEFL HA JNK, ERK2, ERK5, p38 α , p38 β , p38 γ , y p38 δ , pCEFL-MEKK, pCEV29-MEKKEE, pCEFL-GST-MKK6, pcDNA3-MEK3EE y AA, y pGEX4T3-ATF2 fueron descritos en trabajos del Dr. Silvio Gutkind (200). Los dominantes negativos AF (en donde la T183 fue reemplazada por una A y la Y185 por F) de las distintas isoformas de p38 fueron obtenidas del laboratorio de Dr. Han (244)

Estímulos utilizados:

UV: Células HEK 293 fueron irradiadas en un UV Stratalinker (Stratagene) con 100 J/m² UV C.

Suero: Se estimula con 10 % suero células que fueron hambreadas (desprovistas de suero) durante toda la noche.

Carbacol: Se utiliza una concentración final de 1 mM de Carbacol.

NaCl: Se utiliza una concentración final de 100 μ M de NaCl. El estímulo fue de 20 minutos y luego se colectan las células.

Anisomisina: Se utiliza una concentración final de 10 μ g/ml durante 20 minutos.

Anticuerpos utilizados:

Anticuerpos anti región carboxilo terminal de c-Fos: normal y 10X, Santa Cruz Biotechnology (Sc52 y Sc 52X). Anticuerpos anti epítopes: AU5, Covance, (MMS 135R); HA, Covance, (HA.11); GFP, Santa Cruz Biotechnology (Sc 9996). Anticuerpos anti formas fosforiladas de p38 y JNK, Cell Signaling Technology. Anticuerpos anti Mouse o anti Rabbit conjugados a peroxidasa, Santa Cruz Biotechnology.

Inhibidores utilizados:

SB 203580 (Calbiochem): inhibidor de p38 alfa y beta; SP 600125 (Calbiochem): inhibidor de JNK; PD 098059 (Calbiochem): inhibidor de MEK1/2, sirve para inhibir la activación de ERK de manera indirecta.

Secuenciación:

Se realizó el método de Sanger utilizando un kit comercial desarrollado en 1974. Se utilizó el kit comercial de farmacia “Pharmacia commercial Sanger dideoxy sequencing” según las especificaciones del fabricante.

Preparación de Bacterias Competentes:

Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libres de antibiótico, suficientemente diluídas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16 hs. Al día siguiente, una colonia fue picada y crecida durante 16 hs en 5 ml de medio LB en agitación (200 rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200 ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm y el pellet bacteriano fue resuspendido en 100 ml de cloruro de calcio 100 nM pre-enfriado en hielo. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El pellet fue resuspendido en 5 ml de cloruro de calcio 100 nM e incubado en hielo por 30 min. Posteriormente 200 μ l de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos eppendorf con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15%. Finalmente las bacterias fueron conservadas a –80°C.

Transformación Bacteriana:

Se siguió un protocolo de transformación modificado a partir del original de Hanahan (126). En este protocolo, 50-100 μ l de bacterias competentes DH5 α (eficiencia de al menos 1×10^6 colonias/ml), almacenadas a –80°C son descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez que se descongelan se agregan entre 50 ng y 1 μ g de plásmido, y se las incuba 30 min en hielo. Luego se les aplica un shock térmico de 90 seg a 42°C y nuevamente se las coloca en hielo. Se agregan 700 μ l de medio LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C. Finalmente, se toman cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500 μ l), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquean en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

Soluciones utilizadas:

LB (1 litro): 0.5% p/v extracto levadura, 1% p/v bacto-triptona, 1% p/v NaCl

LB agar: LB + 1.5% p/v bactoagar

LB/ampicilina: 100mg/ml (tanto en medio sólido como líquido)

Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones:

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (34). Tubos de vidrio conteniendo 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente, fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés.

Los cultivos se mantienen por 20 hs aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm. Luego, 1.5 ml de cultivo son trasvasados a tubos tipo eppendorf y centrifugados a 2000 rpm 5 min.

El pellet celular es resuspendido en 300 µl de P1 (Tris-HCl 50 mM, pH:7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 µg/ml). Luego se agragan 300 µl de P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1%), se mezcla por inversión y se mantiene por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 300 µl de P3 (KAcO 3M, pH:5.2) fría. Se incuba la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700 µl del sobrenadante son precipitados con un volumen de isopropanol, y el pellet se lava con 1 ml de etanol 70%. El pellet finalmente se deja secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20-100 µl de agua.

Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxipreparaciones:

Las maxipreparaciones fueron llevadas a cabo mediante el uso de columnas de afinidad (QIAGEN). Este protocolo esta basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado, seguido de una purificación del DNA plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico.

Brevemente, 300 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado para la selección, es inoculado con una alícuota de bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés. Los cultivos son mantenidos por 20 hs aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm. Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento son trasvasados a botellas de policarbonato de 500 ml y centrifugados a 6000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se descarta y el pellet celular es resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM, pH:7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 microgramos/ml). Luego se agregan 10 ml de P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1 %) se mezcla por inversión y se agregan otros 10 ml adicionales de P3 (KAcO 3 M, pH:5.2)fría, se incuba la mezcla en hielo durante 20 min y luego se centrifuga a 20.000 xg durante 10 min a 4°C. Durante la centrifugación se equilibran las columnas QIAGEN-tip 500 con buffer QBT. El sobrenadante se filtra en un embudo con gasa y se vuelca en la columna. La columna se vacía por gravedad y se lava dos veces con 30 ml de buffer de lavado QC. Finalmente el DNA atrapado en la columna es eluído con 15 ml buffer de elución QF.

El DNA del eluato se precipita con 0.7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000 xg. El DNA precipitado fue lavado dos veces con etanol 70 % y el pellet se seca al aire durante 20 min y resuspende en 300 μ l de H₂O. La calidad del DNA plasmídico se verifica por geles de agarosa y la concentración final se mide por espectrofotometría. El rendimiento de estas maxi-preparaciones es aproximadamente de 500 μ g de ADN plasmídico.

Cuantificación del ADN plasmídico:

Una vez disuelto en agua, el ADN plasmídico fue cuantificado midiendo la absorbancia de la solución a 260 nm en un Gene Quant (Pharmacia). Las concentraciones se calcularon multiplicando el valor de absorbancia obtenido por el factor de dilución por la constante de absorbancia molar teniendo en cuenta que 1 unidad A₂₆₀ es equivalente a 50ng/microlitros de ADN. También se cuantificaron muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa, comparando las intensidades observadas bajo luz UV con las intensidades dadas por cantidades conocidas de ADN del fago Lambda digerido con la enzima Hind III (Lambda Hind III, GIBCO BRL).

Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción:

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron chequeados mediante mapeos por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos.

Para ello el DNA plasmídico fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: aproximadamente 1 μ g de DNA plasmídico, 2 μ l de buffer de restricción correspondiente 10X, 1 U de la/las enzima de restricción escogida y agua hasta completar 20 μ l de volumen final. Se incubó durante 2 hs a 37°C. Luego se realizan electroforesis en geles de agarosa de entre 0.6-2 % en buffer TAE 1X(TAE 50X: (1 litro) 242g Tris base, 57.1ml acético glacial, 100ml 0.5M EDTA pH=8) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles es determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente las bandas se observan mediante exposición a luz UV.

Geles de agarosa nativos:

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TAE 1X (TAE 50X: para 1 litro: 242g Tris base, 57.1ml acético glacial, 100ml 0.5M EDTA pH=8) al 0.7-1.5 % con 0.5 μ g/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

(conteniendo un 20 % de Glicerol y Azul de Bromofenol). Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta (UV), utilizando un equipo FOTODYNE, pudiéndose fotografiar en papel térmico.

Se utilizaron distintos marcadores de peso molecular según el tamaño del fragmento corrido. Estos son: 1Kb Ladder y 100 bp, ambos de New England Biolabs, o la combinación de estos.

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa:

Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit GeneClean II (Bio101). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa (low melting point) en buffer TAE 1X. Las muestras se sembraron en un buffer conteniendo un 20 % de Glicerol y Azul de Bromofenol como colorante indicativo del frente de la corrida. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó bajo luz UV, y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Ligaciones:

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo, intentando respetar una relación inserto:vector de 3:1. A modo de ejemplificar una reacción típica, se utilizaron 50 ng de vector y 25 ng de inserto. La reacción se llevó a cabo en 20 µl de volumen final. Se utilizó 1 U de la enzima ADN ligasa del fago T4 (Promega). La incubación fue a 16°C durante toda la noche. Como control se incubó el vector con enzima y buffer, pero sin agregar inserto. Se transformaron bacterias competentes con 5 µl de la reacción de ligación (con y sin ligasa), como ya fue descrito. Se plaquearon 200 µl de cada transformación y se dejó durante una noche en una estufa a 37°C.

PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa:

La reacción de PCR se realizó utilizando 2,5 U de Taq DNA polymerase (Promega) en 50 µl de reacción que contiene 5 µl de buffer de reacción 10X, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de dNTPs y 100 pM de cada primer. Las condiciones de ciclado térmico fueron las siguientes: Primero, desnaturalización a 94°C por 1 min; luego "annealing" o anillado a 55–65°C (dependiendo de cada par de primers); luego elongación a 72°C por 2 min, Estos pasos se repitieron durante 30 ciclos y finalmente se realizó un paso adicional de extensión a 72°C por 10 min. Los primers utilizados para clonar la zona del cDNA de c-Fos codificante para los aminoácidos 220 (S 220) al aminoácido 353 (C 353) son los siguientes:

Primer 5' 5' TCCCTGGATTTGACTGGAGGTCTG 3'

Primer 3' 5' ACAGCTTGGGAAGGAGTCAGC 3'

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; 0.30 % p/v de glicerol) antes de sembrar.

El producto de PCR y un marcador de peso molecular en nuestro caso el 1 Kb Ladder (New England Biolabs) se sembraron en un gel de agarosa 1 % en buffer TBE 1X (8,9 mM Tris base; 8,9 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 1 h. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta, utilizando un equipo FOTODYNE.

Preparación de cDNA:

Para la síntesis de DNA complementario a partir del RNA extraído, el RNA contenido en 5 µl fue desnaturalizado a 65°C por 5 min, incubado a 0°C por 2 min y mezclado con 15 µl de una solución "Mix" conteniendo Tris-HCl 50 mM pH:7.3; KCL 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM, 20 U de RNAsin (Promega, Madison, WI, EUA), dNTPs 400 µM, Oligo dT 2.5 µM y 300 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 min, luego a 35°C durante 60 min y finalmente la enzima fue desnaturalizada durante 95°C durante 5 min.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real:

Se aisló RNA de células M1.2 estimuladas con Carbacol y fue retrotranscripto.

El cDNA obtenido fue sujeto a PCR en tiempo real.

En el caso de la PCR en tiempo real es un requisito indispensable obtener un único producto que correlacione con un único pico de fluorescencia detectado por el termociclador. La obtención de un único pico así como la forma final de ese pico dependen críticamente de una serie de factores como la concentración de Cl₂Mg, la temperatura de "annealing", la calidad del cDNA y la secuencia de los primers. Se determinó la concentración de Magnesio óptimo para cada par de primers variando inicialmente entre 2,5 y 4,5 mM de Magnesio.

Durante la puesta a punto de cada primer, además de la concentración de Magnesio, se realizó una curva de temperaturas de annealing en la cual se probaron simultáneamente 12 reacciones con diferentes temperaturas de anillado en una misma corrida. Luego se eligió la adecuada para cada primer.

Para los primers de c-Fos la concentración de Magnesio óptima fue de 4 mM y para beta-actina de 3 mM.

La temperatura de annealing óptima para c-Fos fue de 68,5 °C y para beta actina de 61°C.

Se realizaron las mezclas de reacción correspondientes, según la concentración de Magnesio requerida, junto con 1 microlitro de Taq polimeasa, 2,5 microlitros de buffer de reacción 10X, primers correspondientes, dNTPs 1 micromolar con el agregado de Cybergreen (0.025 microlitros por reacción de una solución de trabajo 1/30 en DMSO).

Los primers utilizados fueron:

beta-actina:

Primer 5' 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'

Primer 3' 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG -3'

Fos:

Primer 5' 5'-TCCCTGGATTTGACTGGAGGTCTG-3'

Primer 3' 5'-ACAGCTTGGAAGGAGTCAGC-3'

Todos ellos dieron un pico único en la PCR de tiempo real y fue el que se utilizó para los estudios de expresión del mensajero.

Para las PCR se utilizaron ciclos con las siguientes características:

- 1- 95°C por 10 min
- 2- 95°C por 30 seg.
- 3- 68°C o 61°C por 1 min (para c-Fos o actina respectivamente)
- 4- 72°C por 1 min
- 5- 78°C por 2 seg.
- 6- Leer placa
- 7- Ir al paso 2, 35 veces
- 8- 65 °C 1 min
- 9- Curva de melting: de 65°C a 95°C, leer cada 0.3°C, 8 segundos
- 10- Incubar a 4°C 15 hs.

La intensidad de fluorescencia fue graficada en función de los ciclos utilizando un algoritmo provisto por los fabricantes.

Extracción del RNA:

En este procedimiento se utilizó Trizol y se siguieron las especificaciones del fabricante.

Se lavan las células con PBS y se agrega 1 ml de Trizol (Invitrogen) por placa de 10 cm. Se pipetea varias veces cada placa hasta observar que todas las células se despegan y que se obtiene una solución homogénea. Luego se transfiere a tubos eppendorf y se agregan 200 μ l de cloroformo, se agita a mano y se incuba durante 2 minutos.

Posteriormente se centrifuga a 11,500 rpm por 15 min at 4°C.

Luego se extrae la fase acuosa (la de arriba) y se transfiere a otro eppendorf.

Se agregaron 500 μ l de Isopropanol y se mezcla por inversión 4-5 veces. El RNA se precipita a -20 °C durante entre 2h a toda la noche.

Luego se centrifuga a 11,500 rpm por 15 min at 4°C. Se descarta el Isopropanol y se agrega 1 ml de Etanol 70%. A continuación se centrifuga nuevamente, se descarta el Etanol y se deja secar el pellet aproximadamente 10 minutos, hasta que se torna transparente. Luego el RNA se resuspende en H₂O. Para lograr resuspenderlo bien se incuba a 55°C por 10 minutos.

Para la cuantificación del RNA se utilizó una dilución 1/100 de la muestra en agua y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La pureza de las muestras se determinó mediante el índice de absorbancia a 260/280 nm. Una relación de 1,8-2 de este índice es indicativo de una alta pureza del RNA obtenido.

Previamente a la realización de la reacción de transcripción reversa o de los ensayos de Northern Blot, la calidad y cantidad relativa de las muestras fue chequeada mediante electroforesis a 30 V/cm en geles de agarosa 1 % en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de etidio. Solo fueron utilizadas aquellas muestras que no mostraron ningún grado de degradación.

Electroforesis de RNA:

Las muestras de RNA se prepararon de la siguiente manera para sembrarlas en la electroforesis:

MOPS(10×)	2 μ l
Formaldehído	3.5 μ l
Formamida	10 μ l
RNA	4.5 μ l
Total	20 μ l

Se incuban a 65 °c por 10 min. Se enfrían en hielo inmediatamente por 2 minutos.

Luego se agrega el RNA "loading" (buffer de siembra) buffer (3-4 μ l del 10×) y 1 μ l de bromuro de etidio por muestra.

El Gel se prepara disolviendo la agarosa en H₂O (1% gel : 1 g in 85 ml water), luego se deja enfriar hasta aproximadamente 50 °C y se le agrega MOPS y Formaldehído (MOPS(10×) 10 ml (1×), Formaldehido 37% 5.4 ml (2%)).

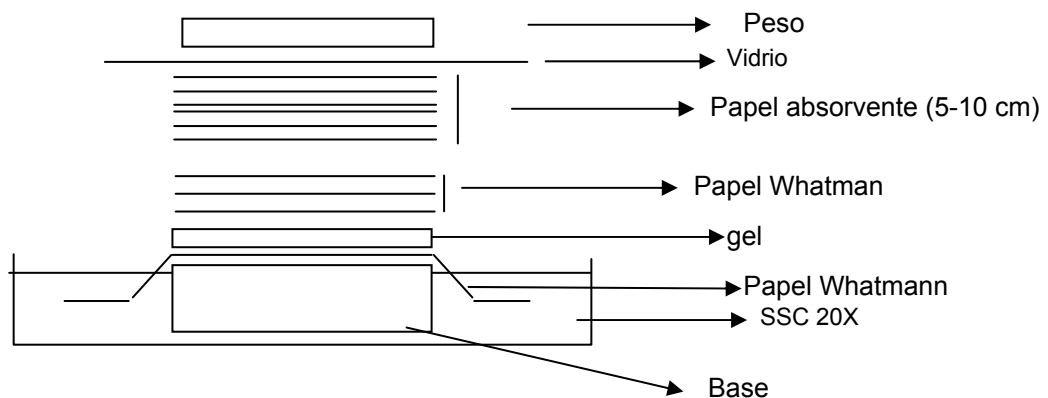
A continuación se realiza la electroforesis a 70-80 V

Northern Blot:

Transferencia de RNA a la membrana de Nylon:

Al finalizar la electroforesis, el RNA fue transferido a una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham). Para ello se colocó el gel en contacto con la membrana de nylon previamente hidratada se utilizó la transferencia por capilaridad durante 18 hs utilizando una solución 20 X SSC (NaCl 3M; citrato de sodio 0.3M). Luego las membranas transferidas se expusieron a UV por 50-60 segundos en un transiluminador, al mismo tiempo que se observó la integridad del RNA. La visualización de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28 S y 18 S se utilizó como indicativo de la integridad del RNA total corrido. Luego las membranas son guardadas a 4°C para la posterior detección por hibridización con sondas radiactivas de la expresión de genes específicos.

El procedimiento se esquematiza a continuación:



Marcación de la Sonda

Se purificó el fragmento correspondiente a c-Fos short, proveniente de la digestión del plásmido pGEX 4T3 Fos Sh con las enzimas Not I-Eco RI.

Se utilizó el kit de Promega "Probe preparation" y se marcó con el método de random-primer. En este método los hexanucleótidos contenidos en el buffer de reacción funcionan como primers inespecíficos y mediante la extensión de la cadena por la enzima se incorpora el nucleótido marcado radiactivamente. Se obtuvieron entonces productos marcados radiactivamente

de tamaños diversos complementarios al DNA utilizado como molde. Para una reacción, se hierven entre 25 a 50 ng de RNA y se enfría en hielo rápidamente. Luego se realiza una Mix conteniendo: 10 µl de 5× buffer (random primers), 2 µl de BSA (10 mg/ml), 2 microlitros de dNTPs (dATP+dTTP+dGTP), 25 µl de H₂O y un µl de enzima Klenow. Posteriormente se agregan 40 µl de premix al DNA, junto con 5 µl de [α^{32} P] dCTP. A continuación se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para eliminar la marca no incorporada, se utilizaron columnas G-50 de Amesham-Pharmacia siguiendo las instrucciones del fabricante.

La eficiencia de la marcación se determinó mediante el conteo de la radiactividad incorporada al DNA utilizando un contador β Beckman (Beckman Coulter Inc). La sonda marcada se guarda luego a -20°C para su posterior utilización.

Hibridización con sondas radiactivas

Para la detección en las membranas de nylon de los niveles de expresión de genes específicos se utilizó la hibridización por complementariedad utilizando para ello las sondas radiactivas. Las membranas fueron prehibridizadas por un mínimo de 2 hs a 50°C, en una solución de prehibridización para bloquear los sitios inespecíficos “Express Hybridization Solution” (Clontech). Se agregó luego la sonda marcada (10.000 cpm/cm²) previamente desnaturalizada a 100°C de y se hibridizó durante dos horas a 55°C.

Finalizada la hibridización se procedió a realizar lavados sucesivos en condiciones de astringencia cada vez mayores con el objetivo de liberar la radiactividad incorporada inespecíficamente en la membrana. Los lavados fueron: 2 de 15 min a temperatura ambiente (2X SSC, SDS 0.1 %); 30 min a 42°C (1 x SSC, SDS 0.1 %), 15-30 min a 42-60°C (0.1 X SSC, SDS 0.1 %), dependiendo de la sonda utilizada. Los filtros se expusieron con placas intensificadoras en cuarto oscuro a la película autorradiográfica (Kodak-XOMAT, Sigma, MO, EUA). La exposición es realizó a -80°C por el tiempo necesario para tener una señal apreciable.

Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA):

Preparación de los extractos proteicos nucleares

Brevemente, las células en estudio con un 70-80% de confluencia fueron lavadas dos veces con PBS 1X frío y se les agregó 1 ml de PBS 1X frío por placa de 10 cm. Luego fueron levantadas de la placa utilizando un “rubber”. Se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugan a 3000 rpm for 30 sec a 4 °C. El pellet se resuspende en 400 µl de buffer A frío y se incuba en hielo durante 15 minutos. Se agregan 25 µl de una solución 10% NP-40 y se mezcla con un vortex por

10 segundos. Luego se centrifuga a 13,000 g (11,600 rpm in Sorvall Biofuge fresco)/4°C for 30 sec). En este paso, en el sobrenadante quedan las proteínas citoplasmáticas y el RNA. El pellet es resuspendido en 50 µl de buffer C2, e incubado en frío en agitación constante durante 15 minutos. Por último se centrifuga 5 min a 4°C y el sobrenadante que contiene el extracto nuclear se guarda a -80°C para su posterior utilización. (Por lo general se obtienen entre 2 y 4 microgramos/microlitro de proteína).

Soluciones:

Buffer A: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA.

Buffer C2: 20 mM Hepes, pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA.

A ambas soluciones se le agregan antes de usar: 1 mM DTT, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 0.5 mM PMSF.

Marcación del oligonucleótido

El oligonucleótido doble cadena utilizado en los ensayos de EMSA corresponde al sitio de unión del factor de transcripción AP-1 (Promega).

Para la marcación se prepara una mezcla de 50 ng de oligonucleótido doble cadena con 50 µCi de [³²P]-γ-ATP; 1 µl de enzima T₄PNK (Promega); 2 µl de buffer T₄PNK 10X y H₂O destilada c.s.p. 20 µl. Luego se incuba 15 min a 37 °C.

El oligonucleótido marcado se purificó utilizando una columna G-25 (Amersham Biosciences) según las indicaciones del fabricante.

Reacción de Binding

Una vez determinada la concentración de proteínas de los extractos nucleares, 2 µg de proteína fueron incubados 15 minutos en hielo con 1 µg de poly(dI-dC) y 0.1 microgramos de DNA de espermatozoos de Salmón en 20 µl de Buffer de reacción (12 mM HEPES, pH 7.8, 60 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.12 mM EDTA, 0.3 mM DTT, 0.3 mM PMSF, 12% glycerol). Luego, se agrega el oligonucleótido marcado (aproximadamente 10,000 cpm) y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 2 microlitros de buffer de siembra (40% glyceol, 50% K buffer, 0.2% Xylene cyanol, 0.2% Bromophenol blue). Se siembra y se realiza la electroforesis.

Super shift.

Cuando se realizaron ensayos de Super-shift, se realizó el mismo protocolo que el mencionado para la reacción de binding, pero luego de la incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se agregó 1 µg del anticuerpo utilizado y se incubó por 20 minutos más a temperatura ambiente. Luego se procedió de la misma manera que la descrita previamente.

Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

Los complejos entre DNA y proteína fueron resueltos en un gel 5 % de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.

Este gel se realizó de la siguiente manera: 40 ml de un gel de acrilamida 5%: 5 ml acrylamide bis (19:1, 40% = AccuGel™ sequencing grade, 40% (w/v) 19:1 acrylamide:bis-acrylamide), 8 ml TGE 5X , 27 ml H₂O, 200 µl 10% APS, 50 µl TEMED. (TGE 5X buffer: Tris 48.449 g, EDTA 7.4g, Glycina 202.4g, para un volumen de 2 litros). Luego el gel se pre-corrió durante 30 minutos a 200 V a 4°C y se sembraron las muestras.

La electroforesis se realiza a 200 V a 4°C. Luego los geles se secaron por 2 horas a 80°C y los resultados fueron visualizados por autorradiografía de los geles secos.

Cuantificación de Proteínas:

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford. Brevemente se mezclaron 5 µl del extracto (diluídos en 395 µl de H₂O) con 100 µl del reactivo de Bradford 5X (Bio-Rad). 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 estándar de BSA (0.5-10 µg/µl).

Fraccionamiento Celular y Ensayos de Translocación al núcleo:

Los extractos nucleares y citoplasmáticos se obtuvieron como fue descrito anteriormente, en los ensayos de EMSA, utilizando buffers hipotónicos.

Se tomaron fracciones nucleares y citoplasmáticas y se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE), luego se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P membranas y se detectó c-Fos por Western Blot.

Como control de que no estuvieran contaminadas las fracciones nucleares y citoplasmáticas con proteínas citoplasmáticas y nucleares respectivamente se utilizaron anticuerpos anti actina o anti Histona H2B.

Las placas autorradiográficas resultantes de los Western Blots fueron digitalizadas y se midió la intensidad de cada banda. El análisis se realizó utilizando el programa de análisis de geles "NIH image" o el programa "Scion image for windows".

Ensayos de detección de la actividad luciferasa:

Cosecha de las células

Luego de estimular, se lavan las monocapas con PBS 1X. Se agregan 200 μ l de buffer de lisis (5X Reporter Lysis Buffer, Promega) por pocillo de una placa de 6 pocillos y se incuba 10 min a temperatura ambiente. Se trasvasan los lisados a tubos eppendorf y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min. Se recuperan los sobrenadantes sobre los que se ensaya la actividad enzimática.

Detección de la actividad Luciferasa:

Para medir la actividad presente en los extractos se toman 15 μ l de extracto y se pasa a tubos para luminómetro de 5 ml. Luego se agregan 50 μ l del reactivo para el ensayo de luciferasa (kit: Luciferase Assay System Freezer 1-Pack, de Promega) que contiene luciferina y ATP y se midió en un luminómetro Junior Berthold realizando una lectura de 30 segundos para cada tubo.

Como blanco se utilizó el buffer de lisis sin extractos celulares o con extractos de células no transfectadas con genes reporteros.

Se anotan los valores obtenidos de las Unidades Relativas de Luciferasa (URL) y se procede al análisis de los datos, normalizando estos valores con los obtenidos para el ensayo de β -galactosidasa, es decir el cociente entre URL y los valores de β -galactosidasa.

Medición de la actividad de β -galactosidasa.

En tubos eppendorf se mezclan: un volumen de buffer β -gal 2X (0.2 M Fosfato de sodio pH 7,4; 2 mM $MgCl_2$; 0.1 M β -mercaptoetanol; 1.33 mg/ml (ONPG) Orto-nitro-fenil-galactopiranosido) y un volumen del extracto de células transfectadas. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 100 μ l. Luego Se incuba a 37 °C hasta la aparición de color amarillo moderado.

Se detiene la reacción con 1 volumen (respecto del volumen de reacción) de 1M Na_2CO_3 que intensifica el color amarillo de la reacción y se cuantifica la aparición del producto coloreado (orto-nitro-fenol) midiendo la absorbancia a 415 nm en un lector de Elisa (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

Western Blot:

Preparación de los extractos celulares

Se prepara el buffer de lisis agregando a ultimo momento el DDT y el PMSF (25 mM HEPES, pH7.5, 0.3 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% Triton X-100, 0.1%

SDS, 20 mM beta-glycerophosphate, 1 mM sodium vanadate, and 1 mM PMSF, and 0.4 M NaCl). Se lavan las células con PBS 1X frío, y se agrega buffer de lisis (1 ml para una placa de 10 cm).

Se obtienen los extractos nucleares para WB lisando células en cultivo que están a 80% de confluencia. Una vez que los lisados celulares se pasaron a tubos eppendorfs se dejan en hielo durante 10-20 minutos y luego se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

En caso de necesitar romper núcleos, se agrega NaCl 400 micromolar 10 minutos en hielo antes de centrifugar.

De un volumen total de 1ml de lisado de células, se toman 100µl para el ensayo de Western Blot. Se agregan 20µl de 5X Laemmli buffer y se hierve por 5 minutos. Se deja en hielo hasta sembrar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12 %* o al 10 %** de 1,5 mm de espesor. Luego de la siembra de las muestras, la corrida electroforética fue llevada a cabo en una cuba de electroforesis (mini Protean II, Bio-Rad) a 150 V constante en buffer de electroforesis (15.1g Tris; 94 g glicina; 50 ml de SDS 10 %) durante 2 hs.

Preparación de geles:

* *Gel de poliacrilamida al 12 % (gel de resolución):* 3.3 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 4 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

** *Gel de poliacrilamida al 10 % (gel de resolución):* 4 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 3,3 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

Gel de poliacrilamida concentrador: 3 ml de agua destilada; 1,25 ml de buffer (0,5 M Tris-HCl pH: 6,8); 0,65 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 50 µl de SDS 10 % y 50 µl de persulfato de amonio 10%.

Se utilizó un marcador de peso molecular "Rainbow Marker" (Amersham) como referencia.

Transferencia a membranas de PVDF

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PDVF, polyvinylidene fluoride (Amersham Biosciences) o HyBond (Amersham) utilizando un equipo Mini trans blot (Bio-Rad). La transferencia se realiza una hora a 100V en frío. Esto permite transferir proteínas cargadas negativamente, mediante una corriente eléctrica, desde el gel a la membrana.

Luego la membrana se bloquea una hora con 5% leche descremada. (Con la finalidad de que no haya pegado en toda la membrana del primer anticuerpo. Las proteínas de la leche se pegarán a toda la membrana en donde no haya proteína pegada). Se hacen 3 lavados con TTBS de 5' cada uno. Esto es para sacar el exceso de proteínas de la leche. Se agrega el primer anticuerpo 1:1000 y se deja por 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Se realizan 3 lavados con TTBS de 5' cada uno (se saca el primer anticuerpo en exceso) Se agrega el segundo anticuerpo 1:25000 anti "mouse" y se deja por 30'. Este anticuerpo reconoce la Fc (fracción constante) del primer anticuerpo por estar hecho en ratón y tiene acoplado la proteína HRP (horse-radish peroxidase) que reacciona con ECL para dar quimioluminiscencia. Se realizan 3 lavados con TTBS de 5' cada uno, para sacar exceso de segundo anticuerpo. Se agrega reactivo de quimioluminiscencia (ECL, Amersham), según las indicaciones del fabricante. Se expone con placa radiográfica y se revela mediante exposición a placas radiográficas.

Soluciones:

5X de Laemmli buffer: 0.3125M Tris pH=6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0.05% bromo fenol blue; 10% β -mercaptoetanol.

5X Buffer Tris-glicina-SDS (corrida): para 1 litro: 15.1g Tris base; 94g glicina; 50ml de una solución 10% SDS.

10X Buffer Tris-glicina (transferencia, para Westerns Blot): para 1 litro; 29g glicina; 58g Tris base; 3.7g SDS; en el momento la solución 1X se prepara con 20% metanol

TTBS: Tris 20mM pH=7.5, NaCl 9g/litro, 0.05% Tween 20.

Ensayos de inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación:

Inmunoprecipitación:

Se inmunoprecipitó la proteína deseada con el anticuerpo específico durante 2 hs a 4°C de lisados celulares obtenidos como fue descrito en la explicación de Western blot. Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron del resto de las proteínas del lisado celular mediante el uso de bolitas A/G sefarosa que se unen a inmunoglobulinas (Farmacia). Estas bolitas se incubaron con los lisados durante 40 min a los cuales se los agitó por inversión cada 5 min. Finalmente las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron 1 vez con PBS (el cual contiene 1 % de NP-40 y 2 mM de vanadato) y se resuspendieron en 40 μ l de este mismo buffer a los que se le agregó 10 μ l del buffer Laemli 5X (0.3125 M Tris pH 6.8; 10 % SDS; 25 % glicerol; 0,05 % Bromo Fenol Blue; 10 % β -mercaptoetanol). Por último las muestras se incubaron durante 5 min a 95 °C y se sembraron en un gel de poliacrilamida para realizar ensayos de Western Blot.

Co-inmunoprecipitación:

Aproximadamente 6×10^6 células HEK 293 previamente transfectadas con 1 microgramo de pCEFL AU5 c-Fos short o pCEFL HA quinasa fueron cosechadas usando un buffer de lisis que contiene: Tris-Hcl 50 mM, pH 7.4; EGTA 1 mM; NP-40 1%; ClNa 150 mM; orthovanadate 2 mM; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM; Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH). Luego el extracto fue inmunoprecipitado usando un anticuerpo anti-c-Fos o anti-quinasa o sus respectivos epítopes. Se lavo tres veces con el buffer de lisis y una vez con PBS 1X, realizando centrifugaciones a 3000 rpm durante 30 segundos en cada lavado. El extracto inmunoprecipitado fue corrido en geles de poliacrilamida desnaturalizante. Las membranas luego fueron incubadas con los el anticuerpo correspondiente a la proteína que se sobreexpresó pero que no fue inmunoprecipitada (si use el anticuerpo anti epítope de Fos para precipitar revelo con el anticuerpo anti epítope de la quinasa) y la señal se detectó como fue descrito con anterioridad.

Inmunofluorescencias:

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia indirecta células HEK 293T fueron plaqueadas sobre coverslips y transfectadas con Lipofectamina y Plus Reagent (invitrogen). Las células fueron hambreadas durante 16 hs y estimuladas con UV. Luego se lavaron con PBS1X, se fijaron y permeabilizaron con Formaldehído 4% y 0.05% Triton X-100 en PBS 1X por 10 min. Luego las células se bloquean en BSA 1% 20 minutos y a continuación se incuban con anti-HA (Covance) (1:500) como anticuerpo primario por 1 h. Luego de esa incubación las células son lavadas tres veces con PBS 1X e incubadas con los anticuerpos secundarios (1:200) conjugados con tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Jackson ImmunoResearch).

El medio de montaje utilizado contiene DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole, (Vector Laboratories). Las muestras se observaron utilizando un microscopio Zeiss "Axiophot photomicroscope" equipado con epifluorescencia.

Para analizar la localización subcelular utilizando inhibidores de p38 seguimos el mismo protocolo pero utilizamos un microscopio confocal Olympus, "Fluoview FV300 laser-scanning confocal microscope".

Purificación de Proteínas expresadas en bacterias fusionadas a GST:

Se inoculó un cultivo de 20ml de LB/Amp de bacterias transformadas con un plásmido que codifica para la proteína de fusión GST-X. Una vez saturado el cultivo, se pasó a un matraz erlenmeyer conteniendo 500ml de LB/Amp. Se dejó por una hora hasta que el cultivo estuviese en crecimiento exponencial y se agregó IPTG (0.2mM). Luego de 3 horas de crecimiento, se colectaron las bacterias a 6000g por 15'. Se procedió a la purificación de la proteína de fusión

utilizando el siguiente protocolo: Resuspender el pellet en 10ml de 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM PMSF/PBS. Congelar y descongelar en nitrógeno líquido y en baño a 37°C dos veces. Sonicar las muestras 3 veces por 10seg. Centrifugar por 15' a 14.000RPM. Agregar al sobrenadante 500µl de glutatión-agarosa. Dejar incubando en agitación por 1 hora a 4°C. Centrifugar a 3000RPM por 5'. Descartar el sobrenadante y diluir con 1ml 1% Triton-X, 1mM PMSF en PBS y pasar a tubo limpio. Lavar 3 veces con 1% Triton-X, 100mM PMSF en PBS. Lavar 2 veces con 1mM PMSF en PBS. Resuspender en una solución de 0.03g de glutatión en 10ml de Tris 0.25M, pH=7.5-8. Se resuspende por 5' a 4°C. Centrifugar y coleccionar el sobrenadante. Repetir 2 veces los pasos 11 y 12, combinando los sobrenadantes. Agregar 2X freezing solution (1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glicerol). Se cuantifica en gel de poliacrilamida con standards de BSA. Guardar la proteína a -20°C.

Unos microlitros de la proteína purificada se mezcla con Laemmli buffer (llamado también "cracking" buffer) para ser corrida en un gel de poliacrilamida. La cuantificación se realiza con estándares de BSA y posterior tinción con el colorante *Coomasie Blue*. Las proteínas se evidencian al someter al gel teñido a la solución decolorante.

Soluciones:

5X de Laemmli buffer: 0.3125M Tris pH=6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0.05% bromo fenol blue; 10% β-mercaptoetanol

5X Buffer Tris-glicina-SDS (corrida); para 1litro: 15.1g Tris base; 94g glicina; 50ml de una solución 10% SDS

Solución Coomasie blue: 0.05p/v Coomasie Blue en 30% metanol; 10% ácido acético glacial.

Solución decolorante: 30% metanol; 10% ácido acetico glacial.

Ensayos de Fosforilación *in vitro*:

Los ensayos de actividad de MAPKs se realizaron según el protocolo descrito por Coso y colaboradores en 1995 (66). Brevemente lo que se hizo fue transfectar células HEK 293 o M1.2 con 0,5 µg de pCDNA-HA-Quinasa. se ajustó la cantidad total de plásmido a 3 µg por pocillo usando plásmido vacío. Un día después de la transfección las células fueron hambreadas durante 2 hs en medio sin suero. Luego las células fueron estimuladas, lavadas con PBS frio y lisadas con el buffer de lisis (25 mM Hepes pH 7,5; 0,3 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT; 1 % Triton X-100; 0,5 % vanadato de sodio; 1 mM PMSF; 20 µg/ml de leupeptina) a 4 °C. Se centrifugaron y el sobrenadante fue incubado con el anticuerpo correspondiente durante 1 hora a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron del resto de las proteínas del lisado celular mediante el uso de bolitas de sefarosa que se unen a inmunoglobulinas (Farmacia), luego se lavaron 1 vez con buffer 1 (PBS 1X; 1 % NP-40; 2mM de vanadato de sodio) una vez con buffer 2

(100 mM Tris pH 7,5; 0,5 M LiCl) y una vez con buffer de reacción de quinasas (12,5 mM MOPS pH 7,5; 12,5 mM β -glicerofosfato; 7,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA; 0,5 mM de fluoruro de sodio; 0,5 mM de vanadato de sodio). Posteriormente para ensayar la actividad quinasa, las proteínas inmunoprecipitadas fueron resuspendidas en 30 μ l del buffer de reacción conteniendo 1 μ Ci de [^{32}P]- γ -ATP, 20 μ M de ATP frío y 1 μ g de sustrato (GST-ATF2 o GST-GR según se indique) e incubadas 30 min a 30 C. La reacción se detuvo con el agregado de 10 μ l del buffer Laemli 5X (0.3125 M Tris pH 6.8; 10 % SDS; 25 % glicerol; 0,05 % Bromo Fenol Blue; 10 % β -mercaptoetanol). Por último las muestras se incubaron durante 5 min a 95 °C y se sembraron en un gel de poliacrilamida 12 %. Luego el gel se secó 2 hs. a 80 °C y finalmente se lo expuso a una placa radiográfica durante 1 día a temperatura ambiente.

REFERENCIAS

1. **Abate, C. and T. Curran.** 1990. Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1. *Semin. Cancer Biol.* **1**:19-26.
2. **Abate, C., D. R. Marshak, and T. Curran.** 1991. Fos is phosphorylated by p34cdc2, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* **6**:2179-2185.
3. **Abe, M. K., K. T. Kahle, M. P. Saelzler, K. Orth, J. E. Dixon, and M. R. Rosner.** 2001. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J. Biol. Chem.* **276**:21272-21279.
4. **Abe, M. K., W. L. Kuo, M. B. Hershenson, and M. R. Rosner.** 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol. Cell Biol.* **19**:1301-1312.
5. **Abe, M. K., M. P. Saelzler, R. Espinosa, III, K. T. Kahle, M. B. Hershenson, M. M. Le Beau, and M. R. Rosner.** 2002. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **277**:16733-16743.
6. **Acquaviva, C., G. Bossis, P. Ferrara, F. Brockly, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2002. Multiple degradation pathways for Fos family proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**:426-434.
7. **Acquaviva, C., P. Ferrara, G. Bossis, F. Brockly, C. Salvat, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2001. Degradation of cellular and viral Fos proteins. *Biochimie* **83**:357-362.
8. **Acquaviva, C., C. Salvat, F. Brockly, G. Bossis, P. Ferrara, M. Piechaczyk, and I. Jariel-Encontre.** 2001. Cellular and viral Fos proteins are degraded by different proteolytic systems. *Oncogene* **20**:942-950.
9. **Adams, R. H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Panelli, A. Valladares, L. Perez, R. Klein, and A. R. Nebreda.** 2000. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol. Cell* **6**:109-116.
10. **Adler, V., A. Polotskaya, F. Wagner, and A. S. Kraft.** 1992. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* **267**:17001-17005.
11. **Akaike, M., W. Che, N. L. Marmarosh, S. Ohta, M. Osawa, B. Ding, B. C. Berk, C. Yan, and J. Abe.** 2004. The hinge-helix 1 region of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) mediates interaction with extracellular signal-regulated kinase 5 and PPARgamma1 transcriptional activation: involvement in flow-induced PPARgamma activation in endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* **24**:8691-8704.
12. **Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Saltiel.** 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**:27489-27494.
13. **Alitalo, R., J. Partanen, L. Pertovaara, E. Holttä, L. Sistonen, L. Andersson, and K. Alitalo.** 1990. Increased erythroid potentiating activity/tissue inhibitor of metalloproteinases and jun/fos transcription factor complex characterize tumor promoter-induced megakaryoblastic differentiation of K562 leukemia cells. *Blood* **75**:1974-1982.
14. **Allen, M., L. Svensson, M. Roach, J. Hambor, J. McNeish, and C. A. Gabel.** 2000. Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J. Exp. Med.* **191**:859-870.
15. **Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin.** 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**:699-711.
16. **Angel, P., I. Baumann, B. Stein, H. Delius, H. J. Rahmsdorf, and P. Herrlich.** 1987. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell Biol.* **7**:2256-2266.
17. **Angel, P. and M. Karin.** 1992. Specific members of the Jun protein family regulate collagenase expression in response to various extracellular stimuli. *Matrix Suppl* **1**:156-164.
18. **Angel, P. and M. Karin.** 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**:129-157.

19. **Aouadi, M., F. Bost, L. Caron, K. Laurent, B. Y. Le Marchand, and B. Binetruy.** 2006. p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis. *Stem Cells* **24**:1399-1406.
20. **Aouadi, M., K. Laurent, M. Prot, Y. Le Marchand-Brustel, B. Binetruy, and F. Bost.** 2006. Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes* **55**:281-289.
21. **Arnott, C. H., P. G. Atkinson, E. M. Sale, and G. J. Sale.** 1997. PHAS-I phosphorylation in response to foetal bovine serum (FBS) is regulated by an ERK1/ERK2-independent and rapamycin-sensitive pathway in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* **406**:179-183.
22. **Aronheim, A., E. Zandi, H. Hennemann, S. J. Elledge, and M. Karin.** 1997. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* **17**:3094-3102.
23. **Arteaga, C. L. and J. T. Holt.** 1996. Tissue-targeted antisense c-fos retroviral vector inhibits established breast cancer xenografts in nude mice. *Cancer Res.* **56**:1098-1103.
24. **Askari, N., R. Diskin, M. Avitzour, R. Capone, O. Livnah, and D. Engelberg.** 2007. Hyperactive variants of p38alpha induce, whereas hyperactive variants of p38gamma suppress, activating protein 1-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **282**:91-99.
25. **Badger, A. M., M. N. Cook, M. W. Lark, T. M. Newman-Tarr, B. A. Swift, A. H. Nelson, F. C. Barone, and S. Kumar.** 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**:467-473.
26. **Bagrodia, S., B. Derijard, R. J. Davis, and R. A. Cerione.** 1995. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **270**:27995-27998.
27. **Barber, J. R. and I. M. Verma.** 1987. Modification of fos proteins: phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol. Cell Biol.* **7**:2201-2211.
28. **Beardmore, V. A., H. J. Hinton, C. Eftychi, M. Apostolaki, M. Armaka, J. Darragh, J. McIlrath, J. M. Carr, L. J. Armit, C. Clacher, L. Malone, G. Kollias, and J. S. Arthur.** 2005. Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol. Cell Biol.* **25**:10454-10464.
29. **Behrens, A., K. Sabapathy, I. Graef, M. Cleary, G. R. Crabtree, and E. F. Wagner.** 2001. Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:1769-1774.
30. **Bennett, B. L., D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, and D. W. Anderson.** 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:13681-13686.
31. **Bergman, M. R., S. Cheng, N. Honbo, L. Piacentini, J. S. Karliner, and D. H. Lovett.** 2003. A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem. J.* **369**:485-496.
32. **Berman, K., J. McKay, L. Avery, and M. Cobb.** 2001. Isolation and characterization of pmk-(1-3): three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **4**:337-344.
33. **BERTHET, J., T. W. RALL, and E. W. SUTHERLAND.** 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J. Biol. Chem.* **224**:463-475.
34. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
35. **Bito, H., K. Deisseroth, and R. W. Tsien.** 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**:1203-1214.
36. **Blattner, C., P. Kannouche, M. Litfin, K. Bender, H. J. Rahmsdorf, J. F. Angulo, and P. Herrlich.** 2000. UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **20**:3616-3625.

37. **Bode, A. M. and Z. Dong.** 2003. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci. STKE.* **2003**:RE2.
38. **Bos, T. J., D. Bohmann, H. Tsuchie, R. Tjian, and P. K. Vogt.** 1988. v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell* **52**:705-712.
39. **Bossis, G., P. Ferrara, C. Acquaviva, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2003. c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol. Cell Biol.* **23**:7425-7436.
40. **Bossis, G., P. Ferrara, C. Acquaviva, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2003. c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol. Cell Biol.* **23**:7425-7436.
41. **Bossis, G., C. E. Malnou, R. Farras, E. Andermarcher, R. Hipskind, M. Rodriguez, D. Schmidt, S. Muller, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2005. Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol. Cell Biol.* **25**:6964-6979.
42. **Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, P. Even, N. Belmonte, M. Prot, C. Dani, P. Hofman, G. Pages, J. Pouyssegur, Y. Le Marchand-Brustel, and B. Binetruy.** 2005. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* **54**:402-411.
43. **Boulton, T. G., S. H. Nye, D. J. Robbins, N. Y. Ip, E. Radziejewska, S. D. Morgenbesser, R. A. DePinho, N. Panayotatos, M. H. Cobb, and G. D. Yancopoulos.** 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-675.
44. **Boulton, T. G., G. D. Yancopoulos, J. S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu, and M. H. Cobb.** 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**:64-67.
45. **Brancho, D., N. Tanaka, A. Jaeschke, J. J. Ventura, N. Kelkar, Y. Tanaka, M. Kyuuma, T. Takeshita, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* **17**:1969-1978.
46. **Bravo, R., J. Burckhardt, T. Curran, and R. Muller.** 1986. Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle. *EMBO J.* **5**:695-700.
47. **Brewster, J. L., V. T. de, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin.** 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760-1763.
48. **Brook, M., C. R. Tchen, T. Santalucia, J. McIlrath, J. S. Arthur, J. Saklatvala, and A. R. Clark.** 2006. Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol. Cell Biol.* **26**:2408-2418.
49. **Brusselbach, S., U. Mohle-Steinlein, Z. Q. Wang, M. Schreiber, F. C. Lucibello, R. Muller, and E. F. Wagner.** 1995. Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene* **10**:79-86.
50. **Bulavin, D. V., O. N. Demidov, S. Saito, P. Kauraniemi, C. Phillips, S. A. Amundson, C. Ambrosino, G. Sauter, A. R. Nebreda, C. W. Anderson, A. Kallioniemi, A. J. Fornace, Jr., and E. Appella.** 2002. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat. Genet.* **31**:210-215.
51. **Buttayan, R., Z. Zakeri, R. Lockshin, and D. Wolgemuth.** 1988. Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol. Endocrinol.* **2**:650-657.
52. **Camps, M., A. Nichols, C. Gillieron, B. Antonsson, M. Muda, C. Chabert, U. Boschert, and S. Arkininstall.** 1998. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* **280**:1262-1265.
53. **Cavigelli, M., F. Dolfi, F. X. Claret, and M. Karin.** 1995. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* **14**:5957-5964.
54. **Chao, T. H., M. Hayashi, R. I. Tapping, Y. Kato, and J. D. Lee.** 1999. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **274**:36035-36038.
55. **Chen, D. B. and J. S. Davis.** 2003. Epidermal growth factor induces c-fos and c-jun mRNA via Raf-1/MEK1/ERK-dependent and -independent pathways in bovine luteal cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **200**:141-154.

56. **Chen, R. H., C. Abate, and J. Blenis.** 1993. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:10952-10956.
57. **Chen, R. H., C. Abate, and J. Blenis.** 1993. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:10952-10956.
58. **Chen, R. H., P. C. Juo, T. Curran, and J. Blenis.** 1996. Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* **12**:1493-1502.
59. **Chen, Y. R. and T. H. Tan.** 2000. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int. J. Oncol.* **16**:651-662.
60. **Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt, and M. H. Cobb.** 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* **101**:2449-2476.
61. **Cohen, D. R. and T. Curran.** 1988. fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol. Cell Biol.* **8**:2063-2069.
62. **Cooper, J. A. and T. Hunter.** 1983. Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. *J. Biol. Chem.* **258**:1108-1115.
63. **Cooper, J. A. and T. Hunter.** 1981. Similarities and differences between the effects of epidermal growth factor and Rous sarcoma virus. *J. Cell Biol.* **91**:878-883.
64. **Coronella-Wood, J., J. Terrand, H. Sun, and Q. M. Chen.** 2004. c-Fos phosphorylation induced by H₂O₂ prevents proteasomal degradation of c-Fos in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **279**:33567-33574.
65. **Coso, O. A., M. Chiariello, G. Kalinec, J. M. Kyriakis, J. Woodgett, and J. S. Gutkind.** 1995. Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **270**:5620-5624.
66. **Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**:1137-1146.
67. **Coso, O. A., H. Teramoto, W. F. Simonds, and J. S. Gutkind.** 1996. Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **271**:3963-3966.
68. **Coulombe, P. and S. Meloche.** 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:1376-1387.
69. **Coulombe, P., G. Rodier, S. Pelletier, J. Pellerin, and S. Meloche.** 2003. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell Biol.* **23**:4542-4558.
70. **Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C. J. Marshall.** 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**:841-852.
71. **Craxton, A., G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs, and E. A. Clark.** 1998. p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *J. Immunol.* **161**:3225-3236.
72. **Crespo, P., N. Xu, J. L. Daniotti, J. Troppmair, U. R. Rapp, and J. S. Gutkind.** 1994. Signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **269**:21103-21109.
73. **Curran, T. and B. R. Franza, Jr.** 1988. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* **55**:395-397.
74. **Curran, T., F. J. Rauscher, III, D. R. Cohen, and B. R. Franza, Jr.** 1988. Beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **53 Pt 2**:769-777.
75. **Curran, T. and N. M. Teich.** 1982. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. *J. Virol.* **42**:114-122.

76. **Curran, T. and N. M. Teich.** 1982. Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology* **116**:221-235.
77. **Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind, and S. Spiegel.** 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**:800-803.
78. **Da, S. J., B. Pierrat, J. L. Mary, and W. Lesslauer.** 1997. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**:28373-28380.
79. **Davis, R. J.** 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268**:14553-14556.
80. **Davis, R. J.** 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-252.
81. **de Groot, R. P. and P. Sassone-Corsi.** 1993. Hormonal control of gene expression: multiplicity and versatility of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive nuclear regulators. *Mol. Endocrinol.* **7**:145-153.
82. **de, A. L., J. Zhao, J. J. Andreucci, E. N. Olson, G. Cossu, and J. C. McDermott.** 2005. Regulation of vertebrate myotome development by the p38 MAP kinase-MEF2 signaling pathway. *Dev. Biol.* **283**:171-179.
83. **Deak, M., A. D. Clifton, L. M. Lucocq, and D. R. Alessi.** 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* **17**:4426-4441.
84. **Dean, J. L., G. Sully, A. R. Clark, and J. Saklatvala.** 2004. The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal.* **16**:1113-1121.
85. **Dean, J. L., R. Wait, K. R. Mahtani, G. Sully, A. R. Clark, and J. Saklatvala.** 2001. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol. Cell Biol.* **21**:721-730.
86. **Deng, T. and M. Karin.** 1994. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* **371**:171-175.
87. **Deng, T. and M. Karin.** 1993. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev.* **7**:479-490.
88. **Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. J. Davis.** 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025-1037.
89. **Dong, C., D. D. Yang, C. Tournier, A. J. Whitmarsh, J. Xu, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2000. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* **405**:91-94.
90. **Dong, C., D. D. Yang, M. Wusk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 1998. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* **282**:2092-2095.
91. **Dougherty, M. K., J. Muller, D. A. Ritt, M. Zhou, X. Z. Zhou, T. D. Copeland, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, K. P. Lu, and D. K. Morrison.** 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol. Cell* **17**:215-224.
92. **Downward, J.** 1996. Control of ras activation. *Cancer Surv.* **27**:87-100.
93. **Eblaghie, M. C., J. S. Lunn, R. J. Dickinson, A. E. Munsterberg, J. J. Sanz-Ezquerro, E. R. Farrell, J. Mathers, S. M. Keyse, K. Storey, and C. Tickle.** 2003. Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr. Biol.* **13**:1009-1018.
94. **Eferl, R. and E. F. Wagner.** 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**:859-868.
95. **Efimova, T., A. M. Broome, and R. L. Eckert.** 2003. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J. Biol. Chem.* **278**:34277-34285.
96. **Engelman, J. A., M. P. Lisanti, and P. E. Scherer.** 1998. Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**:32111-32120.
97. **English, J., G. Pearson, J. Wilsbacher, J. Swantek, M. Karandikar, S. Xu, and M. H. Cobb.** 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* **253**:255-270.

98. **English, J. M. and M. H. Cobb.** 2002. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**:40-45.
99. **Enslin, H., J. Raingeaud, and R. J. Davis.** 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* **273**:1741-1748.
100. **Fanger, G. R., P. Gerwins, C. Widmann, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson.** 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:67-74.
101. **Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle, and J. M. Trzaskos.** 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:18623-18632.
102. **Fearns, C., L. Kline, H. Gram, P. F. Di, M. Zurini, J. Han, and R. J. Ulevitch.** 2000. Coordinate activation of endogenous p38alpha, beta, gamma, and delta by inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* **67**:705-711.
103. **Feng, L., X. Zhou, J. Liao, and M. B. Omary.** 1999. Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 13)**:2081-2090.
104. **Ferrara, P., E. Andermarcher, G. Bossis, C. Acquaviva, F. Brockly, I. Jariel-Encontre, and M. Piechaczyk.** 2003. The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene* **22**:1461-1474.
105. **Foltz, I. N., J. C. Lee, P. R. Young, and J. W. Schrader.** 1997. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **272**:3296-3301.
106. **Franza, B. R., Jr., L. C. Sambucetti, D. R. Cohen, and T. Curran.** 1987. Analysis of Fos protein complexes and Fos-related antigens by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Oncogene* **1**:213-221.
107. **Freshney, N. W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala.** 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**:1039-1049.
108. **Fromm, C., O. A. Coso, S. Montaner, N. Xu, and J. S. Gutkind.** 1997. The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:10098-10103.
109. **Fukunaga, R. and T. Hunter.** 1997. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* **16**:1921-1933.
110. **Funk, M., B. Poensgen, W. Graulich, V. Jerome, and R. Muller.** 1997. A novel, transformation-relevant activation domain in Fos proteins. *Mol. Cell Biol.* **17**:537-544.
111. **Galang, C. K., C. J. Der, and C. A. Hauser.** 1994. Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* **9**:2913-2921.
112. **Ge, B., H. Gram, P. F. Di, B. Huang, L. New, R. J. Ulevitch, Y. Luo, and J. Han.** 2002. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**:1291-1294.
113. **Goldsmith, Z. G. and D. N. Dhanasekaran.** 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**:3122-3142.
114. **Gomez del, A. P., S. Martinez-Martinez, J. L. Maldonado, I. Ortega-Perez, and J. M. Redondo.** 2000. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.* **275**:13872-13878.
115. **Gonzalez, G. A., K. K. Yamamoto, W. H. Fischer, D. Karr, P. Menzel, W. Biggs, III, W. W. Vale, and M. R. Montminy.** 1989. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* **337**:749-752.
116. **Grigoriadis, A. E., K. Schellander, Z. Q. Wang, and E. F. Wagner.** 1993. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J. Cell Biol.* **122**:685-701.
117. **Guan, Z., S. Y. Buckman, A. P. Pentland, D. J. Templeton, and A. R. Morrison.** 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:12901-12908.

118. **Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard, and R. J. Davis.** 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**:2760-2770.
119. **Gutkind, J. S.** 2000. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci. STKE.* **2000**:RE1.
120. **Gutkind, J. S., E. A. Novotny, M. R. Brann, and K. C. Robbins.** 1991. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:4703-4707.
121. **Hagiwara, M., A. Alberts, P. Brindle, J. Meinkoth, J. Feramisco, T. Deng, M. Karin, S. Shenolikar, and M. Montminy.** 1992. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**:105-113.
122. **Hai, T. and T. Curran.** 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:3720-3724.
123. **Han, J., Y. Jiang, Z. Li, V. V. Kravchenko, and R. J. Ulevitch.** 1997. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**:296-299.
124. **Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch.** 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**:808-811.
125. **Han, J., J. D. Lee, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch.** 1993. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J. Biol. Chem.* **268**:25009-25014.
126. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
127. **Hanks, S. K. and T. Hunter.** 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**:576-596.
128. **Haq, R., J. D. Brenton, M. Takahashi, D. Finan, A. Finkielstein, S. Damaraju, R. Rottapel, and B. Zanke.** 2002. Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res.* **62**:5076-5082.
129. **Hau, H. H., R. J. Walsh, R. L. Ogilvie, D. A. Williams, C. S. Reilly, and P. R. Bohjanen.** 2007. Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J. Cell Biochem.* **100**:1477-1492.
130. **Hayashi, M., S. W. Kim, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, E. D. Abel, B. Eliceiri, Y. Yang, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 2004. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J. Clin. Invest* **113**:1138-1148.
131. **Hayashi, M. and J. D. Lee.** 2004. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J. Mol. Med.* **82**:800-808.
132. **Hazzalin, C. A., E. Cano, A. Cuenda, M. J. Barratt, P. Cohen, and L. C. Mahadevan.** 1996. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr. Biol.* **6**:1028-1031.
133. **Heidenreich, O., A. Neininger, G. Schratt, R. Zinck, M. A. Cahill, K. Engel, A. Kotlyarov, R. Kraft, S. Kostka, M. Gaestel, and A. Nordheim.** 1999. MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**:14434-14443.
134. **Herdegen, T. and J. D. Leah.** 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **28**:370-490.
135. **Herschman, H. R.** 1991. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:281-319.
136. **Herskowitz, I.** 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**:187-197.
137. **Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner.** 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* **117**:5965-5973.

138. **Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin.** 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**:2135-2148.
139. **Hill, C. S. and R. Treisman.** 1995. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J.* **14**:5037-5047.
140. **Hill, C. S. and R. Treisman.** 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**:199-211.
141. **Hirai, S., M. Katoh, M. Terada, J. M. Kyriakis, L. I. Zon, A. Rana, J. Avruch, and S. Ohno.** 1997. MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:15167-15173.
142. **Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil.** 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**:333-336.
143. **Hollenbach, E., M. Neumann, M. Vieth, A. Roessner, P. Malfertheiner, and M. Naumann.** 2004. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J.* **18**:1550-1552.
144. **Holt, J. T., T. V. Gopal, A. D. Moulton, and A. W. Nienhuis.** 1986. Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:4794-4798.
145. **Hoshino, R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, Ari-i S, H. Wada, J. Fujimoto, and M. Kohno.** 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* **18**:813-822.
146. **Hu, E., E. Mueller, S. Oliviero, V. E. Papaioannou, R. Johnson, and B. M. Spiegelman.** 1994. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J.* **13**:3094-3103.
147. **Hu, L., M. Hatano, U. Ruther, and T. Tokuhsa.** 1996. Overexpression of c-Fos induces apoptosis of CD43+ pro-B cells. *J. Immunol.* **157**:3804-3811.
148. **Hu, M. C., Y. P. Wang, A. Mikhail, W. R. Qiu, and T. H. Tan.** 1999. Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **274**:7095-7102.
149. **Huang, C. K., L. Zhan, Y. Ai, and J. Jongstra.** 1997. LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**:17-19.
150. **Huang, R. P., J. X. Wu, Y. Fan, and E. D. Adamson.** 1996. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J. Cell Biol.* **133**:211-220.
151. **Hunter, T. and M. Karin.** 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**:375-387.
152. **Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, D. P. ten, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh.** 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**:90-94.
153. **Ip, Y. T. and R. J. Davis.** 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**:205-219.
154. **Ivanov, V. N. and J. Nikolic-Zugic.** 1997. Transcription factor activation during signal-induced apoptosis of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. A protective role of c-Fos. *J. Biol. Chem.* **272**:8558-8566.
155. **Iwasa, H., J. Han, and F. Ishikawa.** 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* **8**:131-144.
156. **Janknecht, R. and T. Hunter.** 1997. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* **16**:1620-1627.
157. **Jenuwein, T. and R. Muller.** 1987. Structure-function analysis of fos protein: a single amino acid change activates the immortalizing potential of v-fos. *Cell* **48**:647-657.

158. **Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin, and J. Han.** 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J. Biol. Chem.* **271**:17920-17926.
159. **Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, P. F. Di, R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* **272**:30122-30128.
160. **Jochum, W., J. P. David, C. Elliott, A. Wutz, H. Plenk, Jr., K. Matsuo, and E. F. Wagner.** 2000. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.* **6**:980-984.
161. **Johnson, G. V. and C. D. Bailey.** 2003. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **183**:263-268.
162. **Johnson, R., B. Spiegelman, D. Hanahan, and R. Wisdom.** 1996. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol. Cell Biol.* **16**:4504-4511.
163. **Johnson, R. S., B. M. Spiegelman, and V. Papaioannou.** 1992. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* **71**:577-586.
164. **Kaina, B., S. Haas, and H. Kappes.** 1997. A general role for c-Fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs. *Cancer Res.* **57**:2721-2731.
165. **Kamemura, K. and G. W. Hart.** 2003. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **73**:107-136.
166. **Kannan, N. and A. F. Neuwald.** 2004. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci.* **13**:2059-2077.
167. **Karin, M. and T. Hunter.** 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5**:747-757.
168. **Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi.** 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:240-246.
169. **Kasler, H. G., J. Victoria, O. Duramad, and A. Winoto.** 2000. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol. Cell Biol.* **20**:8382-8389.
170. **Kato, Y., T. H. Chao, M. Hayashi, R. I. Tapping, and J. D. Lee.** 2000. Role of BMK1 in regulation of growth factor-induced cellular responses. *Immunol. Res.* **21**:233-237.
171. **Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch, and J. D. Lee.** 1997. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* **16**:7054-7066.
172. **Kolch, W., M. Calder, and D. Gilbert.** 2005. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett.* **579**:1891-1895.
173. **Kontoyiannis, D., A. Kotlyarov, E. Carballo, L. Alexopoulou, P. J. Blakeshear, M. Gaestel, R. Davis, R. Flavell, and G. Kollias.** 2001. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.* **20**:3760-3770.
174. **Kontoyiannis, D., M. Pasparakis, T. T. Pizarro, F. Cominelli, and G. Kollias.** 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity.* **10**:387-398.
175. **Kovary, K. and R. Bravo.** 1991. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **11**:4466-4472.
176. **Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**:667-676.
177. **Kuma, Y., G. Sabio, J. Bain, N. Shpiro, R. Marquez, and A. Cuenda.** 2005. BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**:19472-19479.

178. **Kumar, S., P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee, and P. R. Young.** 1997. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**:533-538.
179. **Kusuhara, M., E. Takahashi, T. E. Peterson, J. Abe, M. Ishida, J. Han, R. Ulevitch, and B. C. Berk.** 1998. p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circ. Res.* **83**:824-831.
180. **Kwon, H., S. Park, S. Lee, D. K. Lee, and C. H. Yang.** 2001. Determination of binding constant of transcription factor AP-1 and DNA. Application of inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **268**:565-572.
181. **Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch, and J. R. Woodgett.** 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**:156-160.
182. **Kyriakis, J. M., D. L. Brautigan, T. S. Ingebritsen, and J. Avruch.** 1991. pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* **266**:10043-10046.
183. **Lam, E., R. T. Kilani, Y. Li, E. E. Tredget, and A. Ghahary.** 2005. Stratifin-induced matrix metalloproteinase-1 in fibroblast is mediated by c-fos and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Invest Dermatol.* **125**:230-238.
184. **Lamb, P. and S. L. McKnight.** 1991. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem. Sci.* **16**:417-422.
185. **Lawler, S., Y. Fleming, M. Goedert, and P. Cohen.** 1998. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr. Biol.* **8**:1387-1390.
186. **Lechner, C., M. A. Zahalka, J. F. Giot, N. P. Moller, and A. Ullrich.** 1996. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:4355-4359.
187. **Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter, and .** 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**:739-746.
188. **Lee, S. J., T. Zhou, and E. J. Goldsmith.** 2006. Crystallization of MAP kinases. *Methods* **40**:224-233.
189. **Lee, W., P. Mitchell, and R. Tjian.** 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**:741-752.
190. **Li, Z., Y. Jiang, R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1996. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**:334-340.
191. **Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel, and M. Karin.** 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**:565-576.
192. **Lukasiuk, K. and L. Kaczmarek.** 1994. AP-1 and CRE DNA binding activities in rat brain following pentylentetrazole induced seizures. *Brain Res.* **643**:227-233.
193. **Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242-245.
194. **Mahtani, K. R., M. Brook, J. L. Dean, G. Sully, J. Saklatvala, and A. R. Clark.** 2001. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraproline, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* **21**:6461-6469.
195. **Malnou, C. E., T. Salem, F. Brockly, H. Wodrich, M. Piechaczyk, and I. Jariel-Encontre.** 2007. Heterodimerization with JUN family members regulates c-fos nucleocytoplasmic traffic. *J. Biol. Chem.*
196. **Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter, and S. Sudarsanam.** 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **27**:514-520.
197. **Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn.** 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**:966-970.

198. **Marinissen, M. J., M. Chiariello, and J. S. Gutkind.** 2001. Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes Dev.* **15**:535-553.
199. **Marinissen, M. J., M. Chiariello, M. Pallante, and J. S. Gutkind.** 1999. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol. Cell Biol.* **19**:4289-4301.
200. **Marinissen, M. J., M. Chiariello, T. Tanos, O. Bernard, S. Narumiya, and J. S. Gutkind.** 2004. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol. Cell* **14**:29-41.
201. **Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind.** 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**:368-376.
202. **Marti, A., B. Jehn, E. Costello, N. Keon, G. Ke, F. Martin, and R. Jaggi.** 1994. Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene* **9**:1213-1223.
203. **Mazzucchelli, C., C. Vantaggiato, A. Ciamei, S. Fasano, P. Pakhotin, W. Krezel, H. Welzl, D. P. Wolfer, G. Pages, O. Valverde, A. Marowsky, A. Porrazzo, P. C. Orban, R. Maldonado, M. U. Ehrenguber, V. Cestari, H. P. Lipp, P. F. Chapman, J. Pouyssegur, and R. Brambilla.** 2002. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**:807-820.
204. **McKay, M. M. and D. K. Morrison.** 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**:3113-3121.
205. **McLaughlin, M. M., S. Kumar, P. C. McDonnell, H. S. Van, J. C. Lee, G. P. Livi, and P. R. Young.** 1996. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **271**:8488-8492.
206. **Meier, R., J. Rouse, A. Cuenda, A. R. Nebreda, and P. Cohen.** 1996. Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinase homologues in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.* **236**:796-805.
207. **Merritt, S. E., M. Mata, D. Nihalani, C. Zhu, X. Hu, and L. B. Holzman.** 1999. The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate. *J. Biol. Chem.* **274**:10195-10202.
208. **Miao, G. G. and T. Curran.** 1994. Cell transformation by c-fos requires an extended period of expression and is independent of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **14**:4295-4310.
209. **Molnar, A., A. M. Theodoras, L. I. Zon, and J. M. Kyriakis.** 1997. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J. Biol. Chem.* **272**:13229-13235.
210. **Monje, P., J. Hernandez-Losa, R. J. Lyons, M. D. Castellone, and J. S. Gutkind.** 2005. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J. Biol. Chem.* **280**:35081-35084.
211. **Monje, P., M. J. Marinissen, and J. S. Gutkind.** 2003. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol. Cell Biol.* **23**:7030-7043.
212. **Morgan, J. I. and T. Curran.** 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**:421-451.
213. **Moriguchi, T., N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida, and M. Hagiwara.** 1996. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**:13675-13679.
214. **Morrison, D. K. and R. J. Davis.** 2003. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**:91-118.
215. **Muda, M., A. Theodosiou, N. Rodrigues, U. Boschert, M. Camps, C. Gillieron, K. Davies, A. Ashworth, and S. Arkinstall.** 1996. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**:27205-27208.
216. **Mudgett, J. S., J. Ding, L. Guh-Siesel, N. A. Chartrain, L. Yang, S. Gopal, and M. M. Shen.** 2000. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:10454-10459.

217. **Murphy, L. O., S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar, and J. Blenis.** 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* **4**:556-564.
218. **Nagata, Y., N. Takahashi, R. J. Davis, and K. Todokoro.** 1998. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* **92**:1859-1869.
219. **Nebreda, A. R. and A. Porras.** 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* **25**:257-260.
220. **Nel, A. E., L. K. Taylor, G. P. Kumar, S. Gupta, S. C. Wang, K. Williams, O. Liao, K. Swanson, and G. E. Landreth.** 1994. Activation of a novel serine/threonine kinase that phosphorylates c-Fos upon stimulation of T and B lymphocytes via antigen and cytokine receptors. *J. Immunol.* **152**:4347-4357.
221. **Nemoto, S., J. Xiang, S. Huang, and A. Lin.** 1998. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:16415-16420.
222. **Neuberg, M., M. Schuermann, and R. Muller.** 1991. Mutagenesis of the DNA contact site in Fos protein: compatibility with the scissors grip model and requirement for transformation. *Oncogene* **6**:1325-1333.
223. **Nir, U., E. Fodor, and W. J. Rutter.** 1988. Capturing nuclear sequence-specific DNA-binding proteins by using simian virus 40-derived minichromosomes. *Mol. Cell Biol.* **8**:982-987.
224. **Ofir, R., V. J. Dwarki, D. Rashid, and I. M. Verma.** 1990. Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* **348**:80-82.
225. **Okada, S., Z. Q. Wang, A. E. Grigoriadis, E. F. Wagner, and R. T. von.** 1994. Mice lacking c-fos have normal hematopoietic stem cells but exhibit altered B-cell differentiation due to an impaired bone marrow environment. *Mol. Cell Biol.* **14**:382-390.
226. **Okazaki, K. and N. Sagata.** 1995. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J.* **14**:5048-5059.
227. **Ono, K. and J. Han.** 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* **12**:1-13.
228. **Owens, D. M. and S. M. Keyse.** 2007. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**:3203-3213.
229. **Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur.** 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**:1374-1377.
230. **Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur.** 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:8319-8323.
231. **Papavassiliou, A. G., M. Treier, C. Chavrier, and D. Bohmann.** 1992. Targeted degradation of c-Fos, but not v-Fos, by a phosphorylation-dependent signal on c-Jun. *Science* **258**:1941-1944.
232. **Pargellis, C., L. Tong, L. Churchill, P. F. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, P. M. Grob, E. R. Hickey, N. Moss, S. Pav, and J. Regan.** 2002. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.* **9**:268-272.
233. **Pawson, T.** 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**:573-580.
234. **Pearson, M. A., A. M. O'Farrell, T. M. Dexter, A. D. Whetton, P. J. Owen-Lynch, and C. M. Heyworth.** 1998. Investigation of the molecular mechanisms underlying growth factor synergy: the role of ERK 2 activation in synergy. *Growth Factors* **15**:293-306.
235. **Perregaux, D. G., D. Dean, M. Cronan, P. Connelly, and C. A. Gabel.** 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**:433-442.
236. **Pfarr, C. M., F. Mechta, G. Spyrou, D. Lallemand, S. Carillo, and M. Yaniv.** 1994. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* **76**:747-760.

237. **Piechaczyk, M. and J. M. Blanchard.** 1994. c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **17**:93-131.
238. **Pierrat, B., J. S. Correia, J. L. Mary, M. Tomas-Zuber, and W. Lesslauer.** 1998. RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J. Biol. Chem.* **273**:29661-29671.
239. **Pietersma, A., B. C. Tilly, M. Gaestel, J. N. de, J. C. Lee, J. F. Koster, and W. Sluiter.** 1997. p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**:44-48.
240. **Platenik, J., N. Kuramoto, and Y. Yoneda.** 2000. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* **67**:335-364.
241. **Popa-Burke, I., S. Birkos, L. Blackwell, L. Cheatham, J. Clark, J. K. Dickson, Jr., S. Galasinski, W. P. Janzen, J. Mendoza, J. L. Miller, R. P. Mohny, P. M. Steed, and C. N. Hodge.** 2005. Discovery of highly selective inhibitors of p38alpha. *Curr. Top. Med. Chem.* **5**:941-951.
242. **Portal, M. M., G. O. Ferrero, and B. L. Caputto.** 2007. N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene* **26**:3551-3558.
243. **Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai, and H. Saito.** 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.
244. **Pramanik, R., X. Qi, S. Borowicz, D. Choubey, R. M. Schultz, J. Han, and G. Chen.** 2003. p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. *J. Biol. Chem.* **278**:4831-4839.
245. **Price, M. A., F. H. Cruzalegui, and R. Treisman.** 1996. The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* **15**:6552-6563.
246. **Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett.** 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**:670-674.
247. **Qi, X., N. M. Pohl, M. Loesch, S. Hou, R. Li, J. Z. Qin, A. Cuenda, and G. Chen.** 2007. p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J. Biol. Chem.*
248. **Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis.** 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**:7420-7426.
249. **Rao, K. M.** 2001. MAP kinase activation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **69**:3-10.
250. **Rauscher, F. J., III, D. R. Cohen, T. Curran, T. J. Bos, P. K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian, and B. R. Franza, Jr.** 1988. Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**:1010-1016.
251. **Ray, L. B. and T. W. Sturgill.** 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:3753-3757.
252. **Rechsteiner, M. and S. W. Rogers.** 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**:267-271.
253. **Reichmann, E., H. Schwarz, E. M. Deiner, I. Leitner, M. Eilers, J. Berger, M. Busslinger, and H. Beug.** 1992. Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* **71**:1103-1116.
254. **Reynolds, C. H., A. R. Nebreda, G. M. Gibb, M. A. Utton, and B. H. Anderton.** 1997. Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J. Neurochem.* **69**:191-198.

255. **Robertson, L. M., T. K. Kerppola, M. Vendrell, D. Luk, R. J. Smeyne, C. Bocchiaro, J. I. Morgan, and T. Curran.** 1995. Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron* **14**:241-252.
256. **Roffler-Tarlov, S., J. J. Brown, E. Tarlov, J. Stolarov, D. L. Chapman, M. Alexiou, and V. E. Papaioannou.** 1996. Programmed cell death in the absence of c-Fos and c-Jun. *Development* **122**:1-9.
257. **Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner.** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**:364-368.
258. **Rossomando, A. J., D. M. Payne, M. J. Weber, and T. W. Sturgill.** 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:6940-6943.
259. **Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A.onso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda.** 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**:1027-1037.
260. **Roy, N., G. Laflamme, and V. Raymond.** 1992. 5' untranslated sequences modulate rapid mRNA degradation mediated by 3' AU-rich element in v-c-fos recombinants. *Nucleic Acids Res.* **20**:5753-5762.
261. **Ruther, U., C. Garber, D. Komitowski, R. Muller, and E. F. Wagner.** 1987. Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* **325**:412-416.
262. **Ryder, K., A. Lanahan, E. Perez-Albuerne, and D. Nathans.** 1989. jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:1500-1503.
263. **Ryder, K., L. F. Lau, and D. Nathans.** 1988. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:1487-1491.
264. **Saba-El-Leil, M. K., F. D. Vella, B. Vernay, L. Voisin, L. Chen, N. Labrecque, S. L. Ang, and S. Meloche.** 2003. An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep.* **4**:964-968.
265. **Sabapathy, K., W. Jochum, K. Hochedlinger, L. Chang, M. Karin, and E. F. Wagner.** 1999. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech. Dev.* **89**:115-124.
266. **Sabio, G., J. S. Arthur, Y. Kuma, M. Pegg, J. Carr, V. Murray-Tait, F. Centeno, M. Goedert, N. A. Morrice, and A. Cuenda.** 2005. p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J.* **24**:1134-1145.
267. **Saez, E., S. E. Rutberg, E. Mueller, H. Oppenheim, J. Smoluk, S. H. Yuspa, and B. M. Spiegelman.** 1995. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* **82**:721-732.
268. **Salvador, J. M., P. R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T. D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, A. J. Fornace, Jr., and J. D. Ashwell.** 2005. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* **6**:390-395.
269. **Salvat, C., I. Jariel-Encontre, C. Acquaviva, S. Omura, and M. Piechaczyk.** 1998. Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts. *Oncogene* **17**:327-337.
270. **Sasaoka, T., W. J. Langlois, J. W. Leitner, B. Draznin, and J. M. Olefsky.** 1994. The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J. Biol. Chem.* **269**:32621-32625.
271. **Sassone-Corsi, P., L. J. Ransone, W. W. Lamph, and I. M. Verma.** 1988. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* **336**:692-695.
272. **Sassone-Corsi, P., J. C. Sisson, and I. M. Verma.** 1988. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* **334**:314-319.
273. **Schattenberg, J. M., R. Singh, Y. Wang, J. H. Lefkowitz, R. M. Rigoli, P. E. Scherer, and M. J. Czaja.** 2006. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* **43**:163-172.
274. **Schlessinger, J.** 1993. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* **18**:273-275.

275. **Schuermann, M., M. Neuberg, J. B. Hunter, T. Jenuwein, R. P. Ryseck, R. Bravo, and R. Muller.** 1989. The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell* **56**:507-516.
276. **Schutte, J., J. Viallet, M. Nau, S. Segal, J. Fedorko, and J. Minna.** 1989. jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**:987-997.
277. **Seger, R. and E. G. Krebs.** 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**:726-735.
278. **Shalom-Barak, T., J. Quach, and M. Lotz.** 1998. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **273**:27467-27473.
279. **Shapiro, L., A. J. Puren, H. A. Barton, D. Novick, R. L. Peskind, R. Shenkar, Y. Gu, M. S. Su, and C. A. Dinarello.** 1998. Interleukin 18 stimulates HIV type 1 in monocytic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:12550-12555.
280. **Shaulian, E. and M. Karin.** 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**:2390-2400.
281. **Shayo, C., C. Davio, A. Brodsky, A. G. Mladovan, B. L. Legnazzi, E. Rivera, and A. Baldi.** 1997. Histamine modulates the expression of c-fos through cyclic AMP production via the H2 receptor in the human promonocytic cell line U937. *Mol. Pharmacol.* **51**:983-990.
282. **Shiozaki, K. and P. Russell.** 1995. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**:739-743.
283. **Shiozaki, K. and P. Russell.** 1997. Stress-activated protein kinase pathway in cell cycle control of fission yeast. *Methods Enzymol.* **283**:506-520.
284. **Silvers, A. L., M. A. Bachelor, and G. T. Bowden.** 2003. The role of JNK and p38 MAPK activities in UVA-induced signaling pathways leading to AP-1 activation and c-Fos expression. *Neoplasia.* **5**:319-329.
285. **Simi, A., Y. Edling, M. Ingelman-Sundberg, and N. Tindberg.** 2005. Activation of c-fos by lipopolysaccharide in glial cells via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of serum or cyclic AMP/calcium response element. *J. Neurochem.* **92**:915-924.
286. **Smeal, T., B. Binetruy, D. A. Mercola, M. Birrer, and M. Karin.** 1991. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**:494-496.
287. **Smith, T. G., M. Karlsson, J. S. Lunn, M. C. Eblaghie, I. D. Keenan, E. R. Farrell, C. Tickle, K. G. Storey, and S. M. Keyse.** 2006. Negative feedback predominates over cross-regulation to control ERK MAPK activity in response to FGF signalling in embryos. *FEBS Lett.* **580**:4242-4245.
288. **Stokoe, D., K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen, and M. Gaestel.** 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**:307-313.
289. **Sun, H., C. H. Charles, L. F. Lau, and N. K. Tonks.** 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**:487-493.
290. **Sun, W., K. Kesavan, B. C. Schaefer, T. P. Garrington, M. Ware, N. L. Johnson, E. W. Gelfand, and G. L. Johnson.** 2001. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J. Biol. Chem.* **276**:5093-5100.
291. **Sunters, A., J. McCluskey, and A. E. Grigoriadis.** 1998. Control of cell cycle gene expression in bone development and during c-Fos-induced osteosarcoma formation. *Dev. Genet.* **22**:386-397.
292. **Sunters, A., D. P. Thomas, W. A. Yeudall, and A. E. Grigoriadis.** 2004. Accelerated cell cycle progression in osteoblasts overexpressing the c-fos proto-oncogene: induction of cyclin A and enhanced CDK2 activity. *J. Biol. Chem.* **279**:9882-9891.
293. **Swanson, K. D., L. K. Taylor, L. Haung, A. L. Burlingame, and G. E. Landreth.** 1999. Transcription factor phosphorylation by pp90(rsk2). Identification of Fos kinase and NGFI-B kinase I as pp90(rsk2). *J. Biol. Chem.* **274**:3385-3395.

294. **Swanson, K. D., L. K. Taylor, L. Haung, A. L. Burlingame, and G. E. Landreth.** 1999. Transcription factor phosphorylation by pp90(rsk2). Identification of Fos kinase and NGFI-B kinase I as pp90(rsk2). *J. Biol. Chem.* **274**:3385-3395.
295. **Takekawa, M., T. Maeda, and H. Saito.** 1998. Protein phosphatase 2 α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.* **17**:4744-4752.
296. **Takekawa, M., F. Posas, and H. Saito.** 1997. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J.* **16**:4973-4982.
297. **Takenaka, K., T. Moriguchi, and E. Nishida.** 1998. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* **280**:599-602.
298. **Tamura, K., T. Sudo, U. Senftleben, A. M. Dadak, R. Johnson, and M. Karin.** 2000. Requirement for p38 α in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* **102**:221-231.
299. **Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariaty, P. Cohen, and M. J. Comb.** 1996. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* **15**:4629-4642.
300. **Teramoto, H., O. A. Coso, H. Miyata, T. Igishi, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1996. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J. Biol. Chem.* **271**:27225-27228.
301. **Terasawa, K., K. Okazaki, and E. Nishida.** 2003. Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* **8**:263-273.
302. **Thepot, D., J. B. Weitzman, J. Barra, D. Segretain, M. G. Stinnakre, C. Babinet, and M. Yaniv.** 2000. Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development* **127**:143-153.
303. **Thomson, S., L. C. Mahadevan, and A. L. Clayton.** 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**:205-214.
304. **Tong, L., S. Pav, D. M. White, S. Rogers, K. M. Crane, C. L. Cywin, M. L. Brown, and C. A. Pargellis.** 1997. A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat. Struct. Biol.* **4**:311-316.
305. **Torres, M.** 2003. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci.* **8**:d369-d391.
306. **Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**:870-874.
307. **Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R. J. Davis.** 1999. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol. Cell Biol.* **19**:1569-1581.
308. **Treisman, R.** 1992. The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* **17**:423-426.
309. **Treisman, R. and G. Ammerer.** 1992. The SRF and MCM1 transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**:221-226.
310. **Tsurumi, C., N. Ishida, T. Tamura, A. Kakizuka, E. Nishida, E. Okumura, T. Kishimoto, M. Inagaki, K. Okazaki, N. Sagata, and .** 1995. Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Mol. Cell Biol.* **15**:5682-5687.
311. **Turgeon, B., M. K. Saba-El-Leil, and S. Meloche.** 2000. Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *Biochem. J.* **346 Pt 1**:169-175.
312. **Turjanski, A. G., J. P. Vaque, and J. S. Gutkind.** 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**:3240-3253.
313. **Ubeda, M., X. Z. Wang, H. Zinszner, I. Wu, J. F. Habener, and D. Ron.** 1996. Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell Biol.* **16**:1479-1489.
314. **Ullrich, A. and J. Schlessinger.** 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**:203-212.

315. **Unlap, T. and R. S. Jope.** 1994. Dexamethasone attenuates kainate-induced AP-1 activation in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **24**:275-282.
316. **van Der, G. P., S. Wiley, V. K. Lai, J. P. Olivier, G. D. Gish, R. Stephens, D. Kaplan, S. Shoelson, and T. Pawson.** 1995. A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr. Biol.* **5**:404-412.
317. **van, D. H. and M. Castellazzi.** 2001. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* **20**:2453-2464.
318. **van, S. F., R. Muller, T. Curran, B. C. Van, and I. M. Verma.** 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**:3183-3187.
319. **Vogt, P. K., T. J. Bos, and R. F. Doolittle.** 1987. Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:3316-3319.
320. **Wada, T. and J. M. Penninger.** 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**:2838-2849.
321. **Wagner, B. J., T. E. Hayes, C. J. Hoban, and B. H. Cochran.** 1990. The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J.* **9**:4477-4484.
322. **Wagner, E. F.** 2001. AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* **20**:2334-2335.
323. **Wang, W., J. X. Chen, R. Liao, Q. Deng, J. J. Zhou, S. Huang, and P. Sun.** 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol. Cell Biol.* **22**:3389-3403.
324. **Wang, X., C. H. McGowan, M. Zhao, L. He, J. S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang, and J. Han.** 2000. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell Biol.* **20**:4543-4552.
325. **Wang, X. Z. and D. Ron.** 1996. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272**:1347-1349.
326. **Wang, Y., S. Huang, V. P. Sah, J. Ross, Jr., J. H. Brown, J. Han, and K. R. Chien.** 1998. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **273**:2161-2168.
327. **Wang, Z. Q., C. Ovitt, A. E. Grigoriadis, U. Mohle-Steinlein, U. Ruther, and E. F. Wagner.** 1992. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**:741-745.
328. **Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud, and J. A. Cooper.** 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16**:1909-1920.
329. **Weston, C. R. and R. J. Davis.** 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**:142-149.
330. **Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis.** 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**:589-607.
331. **Whitmarsh, A. J., S. H. Yang, M. S. Su, A. D. Sharrocks, and R. J. Davis.** 1997. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell Biol.* **17**:2360-2371.
332. **Wilkinson, D. G., S. Bhatt, R. P. Ryseck, and R. Bravo.** 1989. Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Development* **106**:465-471.
333. **Wisdom, R.** 1999. AP-1: one switch for many signals. *Exp. Cell Res.* **253**:180-185.
334. **Wojciak-Stothard, B. and A. J. Ridley.** 2002. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul. Pharmacol.* **39**:187-199.

335. **Wurgler-Murphy, S. M., T. Maeda, E. A. Witten, and H. Saito.** 1997. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* **17**:1289-1297.
336. **Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg.** 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**:1326-1331.
337. **Yan, C., H. Luo, J. D. Lee, J. Abe, and B. C. Berk.** 2001. Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J. Biol. Chem.* **276**:10870-10878.
338. **Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic, and R. A. Flavell.** 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* **389**:865-870.
339. **Yang, E., L. Lerner, D. Besser, and J. E. Darnell, Jr.** 2003. Independent and cooperative activation of chromosomal *c-fos* promoter by STAT3. *J. Biol. Chem.* **278**:15794-15799.
340. **Yee, A. S., E. K. Paulson, M. A. McDevitt, K. Rieger-Christ, I. Summerhayes, S. P. Berasi, J. Kim, C. Y. Huang, and X. Zhang.** 2004. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* **336**:1-13.
341. **Yoon, S. and R. Seger.** 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**:21-44.
342. **Yoshida, T., Y. Shindo, K. Ohta, and H. Iba.** 1989. Identification of a small region of the *v-fos* gene product that is sufficient for transforming potential and growth-stimulating activity. *Oncogene Res.* **5**:79-89.
343. **Young, P. R., M. M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, M. L. Doyle, D. McNulty, T. F. Gallagher, S. Fisher, P. C. McDonnell, S. A. Carr, M. J. Huddleston, G. Seibel, T. G. Porter, G. P. Livi, J. L. Adams, and J. C. Lee.** 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* **272**:12116-12121.
344. **Zarubin, T. and J. Han.** 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* **15**:11-18.
345. **Zeitlinger, J., I. Simon, C. T. Harbison, N. M. Hannett, T. L. Volkert, G. R. Fink, and R. A. Young.** 2003. Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**:395-404.
346. **Zerial, M., L. Toschi, R. P. Ryseck, M. Schuermann, R. Muller, and R. Bravo.** 1989. The product of a novel growth factor activated gene, *fos B*, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* **8**:805-813.
347. **Zhang, J., D. Zhang, J. S. McQuade, M. Behbehani, J. Z. Tsien, and M. Xu.** 2002. *c-fos* regulates neuronal excitability and survival. *Nat. Genet.* **30**:416-420.
348. **Zhang, J., B. Zhou, C. F. Zheng, and Z. Y. Zhang.** 2003. A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.* **278**:29901-29912.
349. **Zhang, S., J. Han, M. A. Sells, J. Chernoff, U. G. Knaus, R. J. Ulevitch, and G. M. Bokoch.** 1995. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* **270**:23934-23936.
350. **Zhao, M., L. New, V. V. Kravchenko, Y. Kato, H. Gram, P. F. Di, E. N. Olson, R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1999. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol. Cell Biol.* **19**:21-30.
351. **Zhou, G., Z. Q. Bao, and J. E. Dixon.** 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **270**:12665-12669.

ÍNDICE

	página
Abreviaturas	5
Resumen Español	6
Resumen Inglés	9
Introducción	12
<u>El factor de transcripción AP-1</u>	14
<i>Resumen AP-1</i>	17
<u>El factor de transcripción c-Fos</u>	17
<i>Regulación de la expresión de c-Fos a nivel de la activación transcripcional.</i>	19
<i>Regulación de la expresión de c-Fos a nivel del RNA mensajero.</i>	20
<i>Regulación de la vida media de c-Fos.</i>	20
<i>Regulación de la actividad de c-Fos. Modificaciones post traduccionales.</i>	21
<i>Rol de c-Fos en la transformación celular.</i>	22
<i>Rol de c-Fos en Apoptosis.</i>	23
<i>Resumen c-Fos</i>	24
<u>Otros componentes de la familia Fos.</u>	24
<i>Fra</i>	24
<i>Fos B</i>	25
<u>Proteínas de la familia JUN.</u>	25
<i>c-Jun</i>	25
<i>JunB y JunD</i>	26
<u>MAPKs</u>	27
<i>Que son las MAPKs?</i>	27
<i>Cascadas de activación de MAPKs.</i>	28
<i>Comienzo de la activación.</i>	30
<i>Apagado de las vías de señalización</i>	31
<i>Un poco de historia.</i>	32
<i>Proteínas de andamiaje.</i>	33
<u>ERK1/2</u>	34
<i>Activación de ERK1/2.</i>	34
<i>Regulación por fosfatasas.</i>	35
<i>Inhibidores químicos de la vía ERK1/2.</i>	36
<i>Ratones “Knock outs” para ERK1/2.</i>	36
<i>Efectos de la activación de ERK1/2.</i>	36
<u>JNK</u>	37
<i>Activación de JNK.</i>	38
<i>Apagado de la señal.</i>	39
<i>Inhibidores específicos</i>	39
<i>Ratones “Knock out” para JNKs.</i>	39

<i>Efectos de la activación de JNK.</i>	40
p38	41
<i>Activación de p38 MAPKs.</i>	41
<i>Apagado de la señal.</i>	42
<i>Inhibidores de p38 MAPKs.</i>	42
<i>Ratones "Knock out" de p38 MAPKs.</i>	43
<i>Efecto de la activación de p38s.</i>	44
<i>Rol de p38 en distintos procesos fisiológicos.</i>	45
Otras MAPKs	47
<i>ERK5</i>	47
<i>ERK7</i>	47
<i>ERK8</i>	47
<i>ERK3</i>	47
<i>ERK4</i>	48
Resumen MAPKs	48
Objetivos	49
Resultados	51
<u><i>1-Búsqueda de proteínas que interactúen físicamente con p38γ. Estudio de la interacción entre p38 y c-Fos.</i></u>	53
<i>Rastreo de proteínas que interaccionen con p38γ en un ensayo de doble híbrido</i>	53
<i>Estudios de interacción in vivo entre p38γ y c-Fos. Ensayos de co-inmunoprecipitación.</i>	55
<i>Análisis de la fosforilación de c-Fos sh por p38γ. Ensayos de fosforilación in vitro.</i>	56
<i>Análisis de la fosforilación de la Treonina 232 de c-Fos sh por p38γ. Ensayos de fosforilación in vitro.</i>	59
<i>El estudio se amplía a todos los miembros de las SAPKs.</i>	62
<i>Análisis de la fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos por SAPKs. Ensayos de fosforilación in vitro.</i>	62
<i>Análisis de la fosforilación de c-Fos por SAPKs in vivo.</i>	64
<i>Análisis de la actividad transcripcional de c-Fos en respuesta a la activación de las p38 SAPKs.</i>	65
<i>Efecto de la transactivación de c-Fos sobre sitios de respuesta a AP-1.</i>	72
<u><i>2- Regulación post-traducciona l de c-Fos inducida por luz UV. Ejemplo de regulación de c-Fos por señales inductoras de estrés.</i></u>	73
<i>Fosforilación de c-Fos in vivo inducida por radiación UV.</i>	73
<i>Efecto de la radiación UV sobre la activación de las SAPKs.</i>	75
<i>Efecto de las p38 SAPKs activadas por radiación UV sobre la fosforilación de c-Fos.</i>	75

<i>Estudio de la localización de c-Fos en respuesta a UV.</i>	80
<i>Estudio de la formación de complejos AP-1 conteniendo c-Fos sobre sitios TRE en respuesta a radiación UV.</i>	88
<i>Análisis de la fosforilación de los sitios consenso para MAPKs del dominio de transactivación de c-Fos por p38 SAPKs.</i>	90
<i>Contribución de cada sitio de fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos a la capacidad transcripcional del factor de transcripción activada por las p38 SAPKs.</i>	93
<u>3- Regulación de c-Fos ante un estímulo mitogénico.</u>	96
<i>Estudio de la activación de la transcripción de c-fos por Carbacol.</i>	96
<i>Activación de MAPKs en respuesta a Carbacol.</i>	100
<i>Estudio de la activación del promotor de c-Fos por MAPKs.</i>	102
<i>Estudio de la activación del promotor de c-Fos por MAPKs en respuesta a Carbacol.</i>	102
<i>Expresión de c-Fos en respuesta a Carbacol.</i>	108
<i>Estudio de la formación de complejos AP-1 conteniendo c-Fos sobre sitios TRE en respuesta Carbacol.</i>	108
<i>Estudio de la activación de un promotor mínimo con sitios de unión para AP-1 por c-Fos.</i>	112
<i>Activación de un promotor mínimo con sitios TRE por c-Fos en respuesta a Carbacol</i>	114
<i>Análisis de la activación transcripcional de c-Fos en respuesta a Carbacol.</i>	114
<i>Estudio de la fosforilación de c-Fos inducida por Carbacol</i>	118
Discusión	123
<i>1-Búsqueda de proteínas que interactúen físicamente con p38γ. Estudio de la interacción entre p38 y c-Fos.</i>	125
<i>2- Regulación post-traducciona de c-Fos inducida por luz UV. Ejemplo de regulación de c-Fos por señales que inducen estrés.</i>	128
<i>3-Regulación transcripcional de c-Fos inducida por la activación del receptor M1.Ejemplo de regulación de c-Fos por señales que inducen proliferación.</i>	132
<i>Experimentos a Realizar</i>	137
Conclusiones	140
Materiales y Métodos	143
<i>Cultivo de líneas Celulares</i>	144
<i>Transfección con fosfato de calcio</i>	144
<i>Transfección con liposomas catiónicos</i>	145
<i>Plásmidos</i>	145

<i>Estímulos utilizados</i>	147
<i>Anticuerpos utilizados</i>	147
<i>Inhibidores utilizados</i>	147
<i>Secuenciación</i>	148
<i>Preparación de Bacterias Competentes</i>	148
<i>Transformación Bacteriana</i>	148
<i>Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones</i>	149
<i>Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxipreparaciones</i>	149
<i>Cuantificación del ADN plasmídico</i>	150
<i>Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción</i>	150
<i>Geles de agarosa nativos</i>	150
<i>Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa</i>	151
<i>Ligaciones</i>	151
<i>PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	151
<i>Preparación de cDNA</i>	152
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real</i>	152
<i>Extracción del RNA</i>	154
<i>Electroforesis de RNA</i>	154
<i>Northern Blot</i>	155
<i>Transferencia de RNA a la membrana de Nylon</i>	155
<i>Marcación de la Sonda</i>	155
<i>Hibridización con sondas radiactivas</i>	156
<i>Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)</i>	156
<i>Preparación de los extractos proteicos nucleares</i>	156
<i>Marcación del oligonucleótido</i>	157
<i>Reacción de Binding</i>	157
<i>Super shift</i>	157
<i>Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes</i>	158
<i>Cuantificación de Proteínas</i>	158
<i>Fraccionamiento Celular y Ensayos de Translocación al núcleo</i>	158
<i>Ensayos de detección de la actividad luciferasa</i>	159
<i>Cosecha de las células</i>	159

<i>Detección de la actividad Luciferasa</i>	159
<i>Medición de la actividad de β-galactosidasa</i>	159
<i>Western Blot</i>	159
<i>Preparación de los extractos celulares</i>	159
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).</i>	160
<i>Transferencia a membranas de PVDF</i>	160
<i>Ensayos de inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación</i>	161
<i>Inmunoprecipitación</i>	161
<i>Co-inmunoprecipitación</i>	162
<i>Inmunofluorescencias</i>	162
<i>Purificación de Proteínas expresadas en bacterias fusionadas a GST</i>	162
<i>Ensayos de Fosforilación in vitro</i>	162
Referencias	165

Índice de Figuras:

Introducción

Figura I.1 <i>Componentes del factor de transcripción AP-1</i>	15
Figura I.2 <i>Esquema del factor de transcripción c-Fos</i>	18
Figura I.3 <i>Esquema del promotor de c-Fos</i>	19
Figura I.4 <i>Sitios consenso de fosforilación por MAPKKs (quinasas de fosforilación dual) sobre MAPKs</i>	28
Figura I.5 <i>Secuencias consenso de reconocimiento y fosforilación por proteínas quinasas</i>	29
Figura I.6 <i>Cascadas de MAPKs</i>	31
Figura I.7 <i>Proteínas de andamiaje</i>	34

Resultados

Figura R.1 <i>El factor de transcripción c-Fos interacciona con p38γ en un ensayo de doble híbrido.</i>	54
Figura R.2 <i>Las proteínas c-Fos y p38γ co-inmunoprecipitan in vivo</i>	57
Figura R.3 <i>El factor de transcripción c-Fos es sustrato de p38 γ in vitro</i>	58
Figura R.4 <i>Secuenciación de los insertos de c-Fos sh y c-Fos sh Mutante (MUT) clonados en pGEX4T3.</i>	60
Figura R.5 <i>El factor de transcripción c-Fos es fosforilado in vitro en la Treonina 232.</i>	61

Figura R.6 <i>La proteína c-Fos es sustrato de todas las SAPKs in vitro</i>	63
Figura R.7 <i>La proteína c-Fos es fosforilada in vivo por las 4 isoformas de p38.</i>	66
Figura R.8 <i>El dominio de transactivación de c-Fos es fosforilado in vivo por las distintas p38 SAPKs</i>	67
Figura R.9 <i>Las SAPKs activan la transcripción mediada por c-Fos (1).</i>	69
Figura R.10 <i>Las SAPKs activan la transcripción mediada por c-Fos (2).</i>	70
Figura R.11 <i>Las SAPKs activan la transcripción mediada por c-Fos (3).</i>	71
Figura R.12 <i>La radiación UV induce la fosforilación de c-Fos.</i>	74
Figura R.13 <i>Todas las SAPKs se activan en respuesta a radiación UV.</i>	76
Figura R.14 <i>La fosforilación de c-Fos que ocurre en respuesta a radiación UV es mediada por las p38 SAPKs.</i>	78
Figura R.15 <i>Las p38 SAPKs fosforilan a c-Fos en el dominio de transactivación en respuesta a la radiación UV.</i>	79
Figura R.16 <i>La fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV es inducida por p38 (1).</i>	81
Figura R.17 <i>La fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV es inducida por p38 (2).</i>	82
Figura R.18 <i>La fosforilación de c-Fos en respuesta a radiación UV es inducida por p38 (3)</i>	83
Figura R.19 <i>La radiación UV induce la translocación al núcleo de c-Fos y de distintas p38 SAPKs.</i>	85
Figura R.20 <i>La translocación de c-Fos al núcleo en respuesta a UV es mediada por las p38s (1).</i>	86
Figura R.21 <i>La translocación de c-Fos al núcleo en respuesta a UV es mediada por las p38s (2).</i>	87
Figura R.22 <i>La radiación UV promueve la formación de complejos AP-1 sobre sitios TRE de modo p38 dependiente.</i>	89
Figura R.23 <i>Purificación de las distintas mutantes del TAD de c-Fos fusionadas a GST utilizadas como sustratos en ensayos de quinasas.</i>	91
Figura R.24 <i>La Treonina 235 sería el sitio principalmente fosforilado por todas las isoformas de las p38 SAPKs.</i>	92
Figura R.25 <i>Análisis del efecto transcripcional de cada sitio de fosforilación del dominio de transactivación de c-Fos por las p38 SAPKs.</i>	95
Figura R.26 <i>El agonista Carbacol (Ch) induce la activación del promotor de c-Fos (1).</i>	97
Figura R.27 <i>El agonista Carbacol (Ch) induce la activación del promotor de c-Fos (2).</i>	98
Figura R.28 <i>El agonista Carbacol (Ch) induce la activación del promotor de c-Fos (3).</i>	99
Figura R.29 <i>Tabla que muestra los tiempos de activación de MAPKs</i>	101
Figura R.30 <i>El promotor de c-Fos es activado por ERK2.</i>	103

Figura R.31 <i>La activación del promotor de c-Fos inducida por Carbacol es mediada por ERK2 (1).</i>	104
Figura R.32 <i>La activación del promotor de c-Fos por Carbacol es mediada por ERK2 (2).</i>	106
Figura R.33 <i>La activación del promotor de c-Fos por Carbacol es mediada por ERK2 (3).</i>	107
Figura R.34 <i>El agonista Carbacol induce la expresión de c-Fos.</i>	109
Figura R.35 <i>El agonista Carbacol promueve la formación de complejos AP-1 sobre sitios TRE.</i>	110
Figura R.36 <i>El factor de transcripción c-Fos forma parte de los complejos que se forman sobre sitios TRE en respuesta a Carbacol.</i>	111
Figura R.37 <i>c-Fos induce la activación transcripcional de un promotor mínimo que contiene sitios TRE.</i>	113
Figura R.38 <i>El factor de transcripción de c-Fos potencia la activación transcripcional del gen reportero pAP-1 Luc inducida por Carbacol.</i>	115
Figura R.39 <i>El agonista Carbacol induce la actividad transcripcional de c-Fos.</i>	116
Figura R.40 <i>La actividad transcripcional de c-Fos activada por carbacol es mediada por MAPKS.</i>	117
Figura R.41 <i>La proteína c-Fos es fosforilada en Serinas y Treoninas.</i>	119
Figura R.42 <i>El agonista Carbacol induce la fosforilación de c-Fos en el dominio de transactivación.</i>	120
Figura R.43 <i>La inhibición de una única quinasa no impide el retardo en la movilidad electroforética de c-Fos.</i>	121
Discusión	
Figura D.1 <i>La radiación UV activa AP-1 induciendo la fosforilación de c-Fos y c-Jun</i>	132
Figura D.2 <i>Las p38 SAPKs regularían la estabilidad del mensajero de c-fos</i>	134
Figura D.3 <i>La activación del receptor muscarínico M1 regula la expresión y actividad de c-Fos actuando a través de distintas MAPKs</i>	139

Parte de los resultados que se presentan en este manuscrito fueron publicados en:

-**Tamara Tanos**, Maria Julia Marinissen, Federico Coluccio Leskow, Daniel Hochbaum, Horacio Martinetto, J. Silvio Gutkind, & Omar A. Coso. Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light.. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18842-52.

Los resultados de la última parte de esta tesis serán enviados para su publicación cuando terminemos con algunos de los experimentos que se detallan en la discusión con el título tentativo:

-**Tamara Tanos**, Sol Degese, Maria Jose Martin, Ana Cuenda, Maria Julia Marinissen and Omar Coso. Gene expression regulation by agonist induced M1 G-Protein coupled receptor is mediated by c-Fos at two different levels.

Además durante estos años he colaborado en otros trabajos en paralelo a esta tesis:

-María José Martín, **Tamara Tanos**, Ana Belén García , Daniel Martin, J. Silvio Gutkind, Omar A. Coso and Maria Julia Marinissen. The small GTPase RhoA links the Kaposi sarcoma-associated herpes virus-G protein coupled receptor (KSHV-GPCR) to Heme oxygenase-1 (HO-1) expression and tumorigenesis. En prensa.

-Alvarez ME, Bass JI, Geffner JR, Calotti PX, Costas M, Coso OA, Gamberale R, Vermeulen ME, Salamone G, Martinez D, **Tanos T**, Trevani AS. Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):4037-46.

-Aoki M del P, Cano RC, Pellegrini AV, **Tanos T**, Guinazu NL, Coso OA, Gea S. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a Trypanosoma cruzi glycoprotein. *Microbes Infect*. 2006 Jun;8(7):1723-31..

-Marinissen MJ, **Tanos T**, Bolos M, de Sagarra MR, Coso OA, Cuadrado A. Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2006 Apr 21;281(16):11332-46.

-Martinez D, Vermeulen M, Trevani A, Ceballos A, Sabatte J, Gamberale R, Alvarez ME, Salamone G, **Tanos T**, Coso OA, Geffner J. Extracellular Acidosis Induces Neutrophil Activation

by a Mechanism Dependent on Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK Pathways. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):1163-71.

-Blaustein M, Pelisch F, **Tanos T**, Munoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Caceres JF, Coso OA, Srebrow A. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol.* 2005 Dec;12(12):1037-44.

-Marinissen MJ, Chiariello M, **Tanos T**, Bernard O, Narumiya S, Gutkind JS. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell.* 2004 Apr 9;14(1):29-41.

-Stempin CC, **Tanos TB**, Coso OA, Cerban FM. Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol.* 2004 Jan;34(1):200-9.

-Hochbaum D, **Tanos T**, Ribeiro-Neto F, Altschuler D, Coso OA. Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem.* 2003 Sep 5;278(36):33738-46.