



**Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**ROL DEL COACTIVADOR DE RECEPTORES  
NUCLEARES RAC3 EN LA SENSIBILIDAD A LA  
APOPTOSIS**

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

**GEORGINA PAMELA COLÓ**

Director de Tesis: **Dra. Mónica Alejandra Costas**  
Consejero de Estudio: **Dr. Arturo Romano**

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

**Buenos Aires, 2007**

## **ROL DEL COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES RAC3 EN LA SENSIBILIDAD A LA APOPTOSIS**

### **RESUMEN**

Los coactivadores de receptores esteroideos (SRC), cumplen un rol importante en varios procesos biológicos. En células normales estas moléculas están presentes en cantidades limitantes, siendo casi indetectables, sin embargo, en ciertos tumores se encuentran sobre-expresadas. RAC3 pertenece a la familia de coactivadores p160 y hemos demostrado previamente que es coactivador de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que induce numerosas respuestas biológicas relacionadas con la proliferación, diferenciación celular, y protección de apoptosis entre otras. En este trabajo se estudió el rol de RAC3 en la sensibilidad a la apoptosis, inducida tanto por vía intrínseca como la vía extrínseca. En la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) estudiamos la vía mitocondrial inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en células de leucemia mieloide crónica humana (K562), la vía extrínseca asociada a receptores con dominios de muerte inducida por una citoquina perteneciente a la familia de TNF: TRAIL. Esta línea fue descrita como naturalmente resistente al tratamiento con TRAIL.

Observamos que la línea tumoral K562 posee niveles altos de RAC3 respecto de la línea HEK293. La sobre-expresión natural o por transfección del coactivador inhibe la apoptosis vía una disminución de la activación de caspasas, aumento de la actividad NF- $\kappa$ B, AKT, p38 y disminución de ERK. Lo opuesto fue observado por disminución de RAC3 mediante RNAi en K562, sensibilizando a la apoptosis por TRAIL. Observamos además, que la sobre-expresión de RAC3 inhibe la translocación de AIF al núcleo a través de mecanismos que involucran una interacción física entre RAC3, AIF, Hsp90 y proteínas del citoesqueleto.

Estas observaciones sugieren que RAC3, además de actuar como coactivador a nivel transcripcional tendría un rol citoplasmático, participando en las cascadas que controlan la muerte celular y contribuyendo de este modo al desarrollo tumoral.

**Palabras Clave:** Apoptosis, NF- $\kappa$ B, Coactivadores de Receptores Nucleares

## **ROLE OF NUCLEAR RECEPTOR COACTIVATOR RAC3 IN THE SENSITIVITY TO APOPTOSIS**

### **ABSTRACT**

The steroid receptor coactivators (SRC) play important roles in many biological processes. These molecules are present in limiting quantities in normal cells, but they were found over-expressed in several tumors. RAC3 is a member of p160 coactivator family and we have previously demonstrated that RAC3 is a NF- $\kappa$ B coactivator. This transcription factor induces many biologic responses related to cell proliferation, differentiation, anti-apoptotic and others. In this work we analyzed the role of RAC3 in the sensitivity to apoptosis, induced by both the intrinsic and the extrinsic pathway. We studied the mitochondrial pathway induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human embryonic kidney (HEK293) line and the extrinsic cascade associated to the death receptor induced by TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the human chronic myelocytic leukemia cell line (K562). It has been previously demonstrated that K562 cells are naturally resistant to TRAIL-induced apoptosis.

In this work, we observed that K562 cells have higher levels of RAC3 than HEK293 cell line. The natural or transfected coactivator over-expression inhibits apoptosis through a molecular mechanism that involves the reduction of caspase activation, the increase on the activity of NF- $\kappa$ B, AKT and p38 and decrease on ERK activity. In addition, we also found that K562 cells become sensitive to TRAIL induced apoptosis after inhibition of RAC3 levels through siRNA transfection. Moreover, the RAC3 over-expression inhibits the AIF nuclear translocation through a physical interaction between RAC3, AIF, Hsp90 and cytoskeleton proteins.

Taken together all these results suggest that RAC3 contributes to tumor development exerting an anti-apoptotic role through cytoplasmatic actions in addition to its classical genomic effects as nuclear receptor coactivator.

**Keywords:** Apoptosis, NF- $\kappa$ B, nuclear receptor coactivators

## Agradecimientos,

*Esta es la parte más difícil para mí, por todo lo que me cuesta expresar en palabras los sentimientos vividos durante estos 5 años.*

*Pero hay mucha gente que me apoyó en este camino tan importante de mi vida, que no puedo dejar de nombrarla y agradecer todo lo que me ayudaron para que yo salga adelante. Cada uno puso su grano de arena contribuyendo con lo que soy hoy en día, un persona formada y feliz de haber llegado hasta acá rodeada de gente querida.*

*Primero que todos quiero agradecer a FCEN-UBA que me dio la oportunidad de poder desarrollar esta Tesis de Doctorado y a CONICET que me acepto como becaria Doctoral.*

*A Mónica, mi mentora, amiga y madre postiza. Que siempre estuvo a mi lado acompañando cada triunfo y fracaso en lo personal como en lo laboral. A ella por ser una persona llena de fuerza capaz de enfrentarse a todo por defender sus convicciones y ponerte en línea cuando descarrilas. Gracias por el apoyo incondicional!*

*A Santiago W. por estar siempre atento a mis avances o retrocesos y por sus infinitos consejos sobre protocolos y experimentos.*

*A Victor Nahmod, gracias por sus interesantes y a veces desopilantes charlas sobre viejos y nuevos descubrimientos, y de ser una máquina generadora de ideas.*

*A los compañeros del labo, que tantos buenos momentos he compartido con ellos. A Nacho, porque me enseñó a dar los primeros pasos en la mesada, que con su optimismo y disposición me ayudó a salir adelante cuando me ahogaba en un experimento. A Fer, por ser una amiga siempre dispuesta a ayudarme en lo que necesitaba y bancarme en todas. A Pablo Echeverría por esa risa contagiosa que alegró los días grises en el labo y por la paciencia que ha tenido para responder a todas mis preguntas sobre hsp y todo lo que respecta a llenado de formularios. A Cey, que mientras no estaba se puso las pilas con mis cosas, por ser tan enérgica y buena onda (y por comerse las S como yo). A Cechu por compartir buenos momentos en el labo y el subte. A Sabri que es nueva en el labo, pero ya se la ve super laboradora y con ganas de descubrir el fabuloso mundo de la ciencia. A Pablo Galarza por la paciencia que me tuvo como instructora. Gracias a todos por hacer que el trabajo día a día sea placentero y lleno de sorpresas.*

*A los chicos “de abajo”, a Berti por ayudarme con el diseño del RNAi y trasmitirme esa pasión que le pone a todo lo que hace. A Gasman por hacerme reír tanto con sus chistes y estar siempre dispuesto a ayudarme con la compu. A Marian por su generosidad. Gracias por los divertidos momentos que mi hicieron pasar.*

*A las chicas de Bachi, Yani y Sil por ser tan amables y colaborar en todo lo que fué con las K562. A su jefe Basilio Kotsias, por su respeto y cordialidad.*

*A nuestro vecino, el Dr. Semeniuk, por la buena onda que tuvo siempre con nuestro grupo y por sus interminables ganas de aprender y entender biología molecular.*

*A la gente de "Riñón", a Elvira Arrizurieta por los consejos que me dió antes de viajar, a Pablo Azurmendi por alegrar cada momento de encuentro y ayudarme con el espectro. Y a todos los que integran esa gran familia.*

*Al grupo de Felisa Molinas, por prestarme los equipos.*

*A las secretarias del Lanari, Marga y Jéssica, por siempre tan atentas con migo y solucionarme todo el papeleo*

*A la gente de USA, Roberto, Jorge y Stephanie, por enseñarme tantas técnicas y nuevas experiencias. Muchas gracias por hacerme sentir como en casa.*

*A la gente del Roffo, Ale Adams por ayudarme con las primeras inmunofluorescencias.*

*A Mario y los chicos del labo en Campomar, gracias a Geor, nuevamente a Pablo Echeverría y Luli, que me ayudaron con el confocal.*

*A mis amigos de la Facu y del alma, gracias por compartir tantos buenos momentos. Especialmente gracias a Geor, mi amiga desde el 98, que me acompañó en los primeros pasos por la Universidad de Quilmes y nunca más nos separamos. Gracias por su super ayuda con los experimentos y contribuir en todo lo que necesitaba para que éstos salgan adelante, por escucharme y compartir tanto alegrías como fracasos. A Bet, Euge, Axel, Marianito, Juan Manuel y Santy, que desde la facultad no dejamos de juntarnos y compartir siempre buenos momentos y charlas interminables. Gracias por el apoyo incondicional y confiar en mi.*

*Gracias a mis amigas del alma y de mi pueblo, a Yanina que desde lejos siempre está y Naty por ser la mejor consejera, amiga y estar siempre a mi lado en las buenas y las malas. A todas mis amigas de Choele, que siempre me escucharon hablar de cosas raras y poco me entendían.*

*A mi mamá y mi papá por apoyarme en todos mis proyectos, mi carrera y en mi vida. Porque me dan la fuerza para seguir adelante y luchar para crecer. Gracias por darme la vida y contribuir con lo que soy hoy. A mi hermano, por que se que me apoya y me extraña cuando me voy. Los amo!!!*

*A mi pareja, mi novio, mi amor Christian, que además de darme la energía y el amor para seguir avanzando, me ayudó mucho en lo laboral, aunque es ingeniero tuvo el esmero y capacidad para corregir mis papers y ayudarme con la tesis. Gracias amor por todo tu apoyo y por bancarme a mí, que no es nada fácil.*

*Muchas gracias a todos los que participaron en este hermoso periodo de mi vida!*

*A mi mamá y a mi papá*

*“Me pregunta qué pensé al ver la pantalla fluorescente iluminada por unos rayos desconocidos. No pensé nada, experimenté.”*

Palabras del descubridor de los Rayos X, Guillermo Conrado Röntgen  
a un periodista, 1896

## ÍNDICE

	Pag.
<u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
<b>1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA</b> .....	<b>2</b>
1.1. El gatillo fácil, caspasas .....	4
1.2. Vías que conducen a la muerte celular.....	7
1.3. La familia de proteínas Bcl-2.....	8
1.4. Proteína supresora de tumor.....	12
1.5. Apoptosis desencadenada por señales internas: vía intrínseca o mitocondrial .....	12
1.5.1. <i>Estrés oxidativo</i> .....	13
1.6. Apoptosis independiente de caspasas (AIF).....	15
1.7. Disparadores de la vía extrínseca.....	16
1.7.1. <i>Receptores de muerte</i> .....	16
1.7.1.1. <i>TRAIL</i> .....	19
1.7.1.1.1. <i>En búsqueda del receptor de TRAIL</i> .....	20
<b>2. CASCADA DE SEÑALES MEDIADA POR PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)</b> .....	<b>25</b>
2.1. Familias de proteínas Erk1/2.....	27
2.2. Familia de proteínas JNKs.....	27
2.3. Familia de proteínas p38.....	28
2.4. Localización subcelular de MAPK.....	29
<b>3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K Y ACTIVACIÓN DE AKT</b> .....	<b>29</b>
<b>4. RECEPTORES NUCLEARES</b> .....	<b>31</b>
4.1. Características generales de receptores nucleares .....	31
4.2. Tres grandes familias.....	31
4.3. Estructura molecular.....	32
<b>5. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB</b> .....	<b>33</b>
5.1. Estructura molecular de NF-κB.....	33
5.2. Familia de inhibidores de la actividad NF-κB .....	34
5.2.1. <i>Estructura general de las proteínas IκB</i> .....	34
5.2.2. <i>Mecanismo de acción</i> .....	36
5.2.3. <i>La quinasa IKK regula la actividad proteolítica de IκB</i> .....	37
5.3. Activación de NF-κB.....	38
5.4. NF-κB regula un amplio número de genes.....	39
5.5. Rol de NF-κB en la tumorigénesis.....	40
<b>6. COREGULADORES</b> .....	<b>41</b>
<b>7. COACTIVADORES DE RECEPTORES ESTEROIDEOS DE LA FAMILIA p160</b> .....	<b>43</b>
7.1 Estructura general de SRCs.....	44



---

7.2 Mecanismos de acción.....	45
7.3. SRC-1.....	47
7.3.1. SRC-1 juega un rol importante en el desarrollo y función del cerebro.....	48
7.3.3.2. Rango de acción de SRC-1.....	48
7.4. TIF2: Factor Intermediario de la Transcripción.....	49
7.4.1 Estructura general.....	50
7.4.2 Rol fisiológico.....	50
7.4.3 TIF2 es clave en el metabolismo de los lípidos.....	51
7.4.4 Rango de acción.....	51
7.5. RAC3: Su descubrimiento y caracterización.....	52
7.5.1. Estructura molecular.....	53
7.5.2. Rol de RAC3 en tumorigénesis.....	55
7.5.3. Modelo de ratón transgénico.....	56
7.5.4. Modelo de ratón deficiente en RAC3.....	57
7.5.5. Mecanismos de acción de RAC3.....	57
7.5.6. Localización sub-celular.....	58
7.5.7. RAC3 interviene en la proliferación de manera independiente de hormonas.....	59
<b>8. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.....</b>	<b>60</b>
8.1. Regulación de la expresión de las HSPs.....	60
8.2. Hsp90.....	62
8.2.1. Hsp90 y proteínas clientes.....	63
8.2.2. Hsp90, cáncer y tratamiento.....	64
8.3. Dominios TPR y proteínas con dominios TPR.....	64
8.4. Inmunofilinas.....	65
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO.....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
<b>1. CULTIVO DE CÉLULAS.....</b>	<b>72</b>
<b>2. VECTORES DE EXPRESION Y PLÁSMIDOS REPORTEROS.....</b>	<b>72</b>
<b>3. CONSTRUCCION DE RNA DE INTERFERENCIA ANTI RAC3.....</b>	<b>72</b>
3.1. Transformación de bacterias.....	74
3.2. Preparación de ADN a pequeña escala.....	76
3.3. Mapeo de clones positivos.....	77
3.4. Purificación de plásmido a gran escala.....	78
3.5. Cuantificación del ADN plasmídico.....	78
3.6. Geles nativos de agarosa.....	78
<b>4. TRANFECCION DE CÉLULAS EN CULTIVO.....</b>	<b>79</b>

4.1. Transfección transitoria por el método de cloruro de calcio	79
4.2. Transfección mediante electroporación y generación de clones estables	80
<b>6. ENSAYOS DE APÓPTOSIS Y SUPERVIVENCIA</b>	<b>81</b>
6.1. Drogas y tratamientos	81
6.2. Tinción de células supervivientes con cristal violeta	81
6.3. Detección de célula apoptóticas	81
6.4. Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo	82
6.5. Detección de pérdida de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por citometría de flujo	82
<b>7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS</b>	<b>83</b>
7.1. Cosecha de células y preparación de extractos	83
7.2. Detección de la actividad luciferasa	83
7.3. Medición de la actividad $\beta$ -galactosidasa	83
<b>8. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD QUINASA</b>	<b>84</b>
8.1. Estímulos	84
8.2. Preparación de extracto celular para quinasas	84
<b>9. ENSAYO DE WESTERN BLOT</b>	<b>85</b>
9.1. Preparación de extractos celulares	85
9.2. Preparación de extractos nucleares y citoplasmáticos de células en cultivo	87
9.3. Determinación de la concentración de proteínas	87
9.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE)	87
9.5. Transferencia a membranas	87
9.6. Ensayo de <i>Western Blot</i> .	87
<b>10. ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN</b>	<b>89</b>
<b>11. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICOS</b>	<b>90</b>
<b>12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DR4 Y DR5</b>	<b>91</b>
<b>13. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA</b>	<b>91</b>
<b>14. ANTICUERPOS UTILIZADOS</b>	<b>91</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>93</b>
<b>1. RAC3 PROTEGE DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PERÓXIDO EN CÉLULAS HEK293</b>	<b>94</b>
1.1. La sobre-expresión de coactivadores de la familia p160 y CBP protege a células HEK293 de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno	94
1.2. La inhibición de la actividad de-acetilasa por TSA en células HEK293 disminuye la sensibilidad a la apoptosis	95
1.3. La sobre-expresión de RAC3 disminuye la sensibilidad a apoptosis inducida por $H_2O_2$ en HEK293	96

---

1.4. La sobre-expresión de RAC3 disminuye la activación de caspasas y la localización de AIF y p53 al núcleo.....	101
1.5. La sobre-expresión de RAC3 aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B y regula los niveles de expresión de sus genes blanco.....	102
1.6. Rol de RAC3 en la regulación de la actividad de MAPKs y AKT.....	105
<b>2. LA DISMINUCIÓN DE RAC3 ENDÓGENO EN LA LÍNEA MIELOIDE LEUCÉMICA K562, LAS SENSIBILIZA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TRAIL.....</b>	<b>108</b>
2.1. Las células K562 expresan altos niveles endógenos de RAC3.....	108
2.2. La inhibición de RAC3 sensibiliza las células K562 a la apoptosis inducida por TRAIL.....	109
2.3. Mayor activación de caspasas y aumento del clivaje de Bid y PARP en clones estables con bajos niveles de RAC3.....	111
2.4. TRAIL induce la activación de la vía mitocondrial en células con bajos niveles de RAC3.....	113
2.5. Aumento en la expresión de DR4 y DR5 por disminución del coactivador RAC3.....	113
2.6. La disminución de RAC3 afecta la actividad de NF- $\kappa$ B y de algunos de sus genes blanco.....	115
2.7. Modulación en la actividad de JNK.....	118
2.8. Rol de RAC3 en la diferenciación de células de leucemia mieloide crónica.....	119
2.10. RAC3 tiene un rol protector en la apoptosis inducida por TRAIL y Flavopiridol en células K562.....	120
<b>3. LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE RAC3 Y FORMACIÓN DEL HETEROCOMPLEJO RAC3-AIF-HSP90.....</b>	<b>124</b>
3.1. Localización sub-celular de RAC3 en distintas líneas celulares.....	124
3.2. RAC3 se encuentra físicamente asociado con AIF en un complejo proteico que contiene Hsp90, la inmunofilina (FKBP52) y la proteína asociada a microtúbulos dineína.....	126
3.3. La sobre-expresión de RAC3 inhibe la translocación nuclear de AIF.....	128
<u>CONCLUSIONES</u> .....	132
<u>DISCUSIÓN</u> .....	135
<u>PUBLICACIONES</u> .....	143
<u>ABREVIATURAS</u> .....	144
<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	147

# INTRODUCCIÓN

## ENTRE LA VIDA Y LA MUERTE

### 1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Lockshin y Williams en 1965 observaron durante el desarrollo un proceso activo y altamente controlado de autodestrucción celular, parecido a un suicidio celular y los denominaron muerte celular programada<sup>1</sup>. En 1972, Kerr, Wyllie y Currie distinguieron células que morían de una manera ordenada de aquellas que lo hacían en forma catastrófica (necrosis), y al proceso lo denominaron apoptosis (del griego APO: separar, PTOSIS: caer)<sup>2</sup>.

La muerte celular programada juega un rol clave en procesos fisiológicos como en la metamorfosis de insectos y anfibios, en el desarrollo fetal, en el remodelamiento de huesos y cartílago, en la eliminación de neuronas que fracasan en la sinapsis o maduración de los linfocitos T. También se encuentra altamente ligada a procesos patológicos, cuando hay un aumento desregulado en la apoptosis por ejemplo, como es el caso de fallas cardíacas, infartos, SIDA, Alzheimer, Parkinson, daño hepático por el alcohol, o una disminución en la muerte celular y como consecuencia se produce un aumento en la proliferación, como sucede en el cáncer, herpes y en enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritematoso.

La apoptosis es un proceso que requiere energía en forma de ATP e involucra cambios morfológicos característicos como el encogimiento celular, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados sin que se desate una respuesta inflamatoria, a diferencia de la necrosis que involucra un proceso inflamatorio, debido a que el contenido celular es liberado al exterior (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Diferencias entre Necrosis y Apoptosis</b>		
<b>Características</b>	<b>NECROSIS</b>	<b>APOPTOSIS</b>
Respuesta	Patológica: alto estrés	Fisiológica: genéticamente regulada, mediano estrés
Balance osmótico	Importante desequilibrio: entra iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Se activan proteasas y fosfolipasas. La célula se hincha y se desintegra. Hay respuesta inflamatoria.	Menor desequilibrio: la célula se encoge, <i>blebbing</i> de la membrana, formación de cuerpos apoptóticos, ausencia de respuesta inflamatoria.
Ocurre en:	Grupos celulares	Células aisladas
Organelas citoplasmáticas	Se hinchan tempranamente	Condensación nuclear y citoplasmática
Núcleo	Desaparición	Repliegue y ruptura. Fragmentación
Cromatina nuclear	Condensación no definida	Condensación perinuclear
Ruptura del ADN	Al azar	Internucleosomal
Expresión génica “ <i>de novo</i> ”	No	Si (con excepciones)

Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis:

**A) Fase de señalización iniciadora**, durante la cual la célula recibe estímulos apoptóticos por:

- Privación de factores de crecimiento, agentes citotóxicos, radiaciones ionizantes
- Receptores de muerte: TNF- $\alpha$ , Fas (Apo1/CD95), FADD, TRAIL
- Inductores fisiológicos: ROS,  $\text{Ca}_2^+$ , JNK/SAPK activación

**B) Fase de preparación**, el tránsito por esta etapa constituye un punto de no retorno.

- Activación de caspasas iniciadoras: caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10, caspasa 12
- Inductores fisiológicos: Bax, ROS, MMPT, citocromo c, apoptosoma
- Nucleasas: AIF, endonucleasa G, PARP

**C) Ejecución**, en el curso de la cual la célula adquiere la morfología final.

- Caspasas efectoras: caspasa 3, 6, y 7
- Cambios fisiológicos: formación de cuerpos apoptóticos, fragmentación del DNA

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales deben de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende del la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladores de

colonias), y la eliminación de ellos conduce irremediablemente a la apoptosis en lugar de a la cesación del crecimiento.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del ADN, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.<sup>3</sup>; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte los más estudiados son el TNF- $\alpha$  que se une al TNFR y el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95<sup>4, 5</sup>.

Entre los segundos mensajeros que participan en la muerte celular mas estudiados se encuentran el calcio y las especies reactivas del oxígeno, aunque también otros como la ceramida, proteínas como p53 y oncogenes (c-myc, familia Bcl-2)<sup>6, 7</sup>. La activación de estos segundos mensajeros suele conducir a la disfunción de organelas citoplasmáticas, como mitocondria y el retículo endoplásmico, o la regulación de la actividad de complejos enzimáticos como quinasa y fosfatasa que a su vez regulan la función de otras proteínas<sup>8</sup>.

### **1.1. El gatillo fácil, caspasas**

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas, verdaderas guillotinas moleculares, son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteólisis<sup>9</sup>.

Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis, cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las siguientes características:

1. Son cisteína proteasas específicas de aspartato, porque tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato. También tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (D) de sus sustratos, que clivan en los enlaces D-X<sup>10</sup>.
2. Son sintetizadas como pro-caspasas que adquieren su actividad por proteólisis (zymógenos).

3. Efectúan la proteólisis en una serie específica de sustratos, proceso que es irreversible<sup>11</sup>.

4. Las caspasas y sus inhibidores siempre coexisten en las células normales, lo cual previene de una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de células normales.

Las pro-caspasas (30-50kD) contienen tres dominios: un predominio N-terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14, el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas 2, 8, 9, 10, y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye a las restantes 3, 6 y 7<sup>12, 13</sup> (Tabla 2).

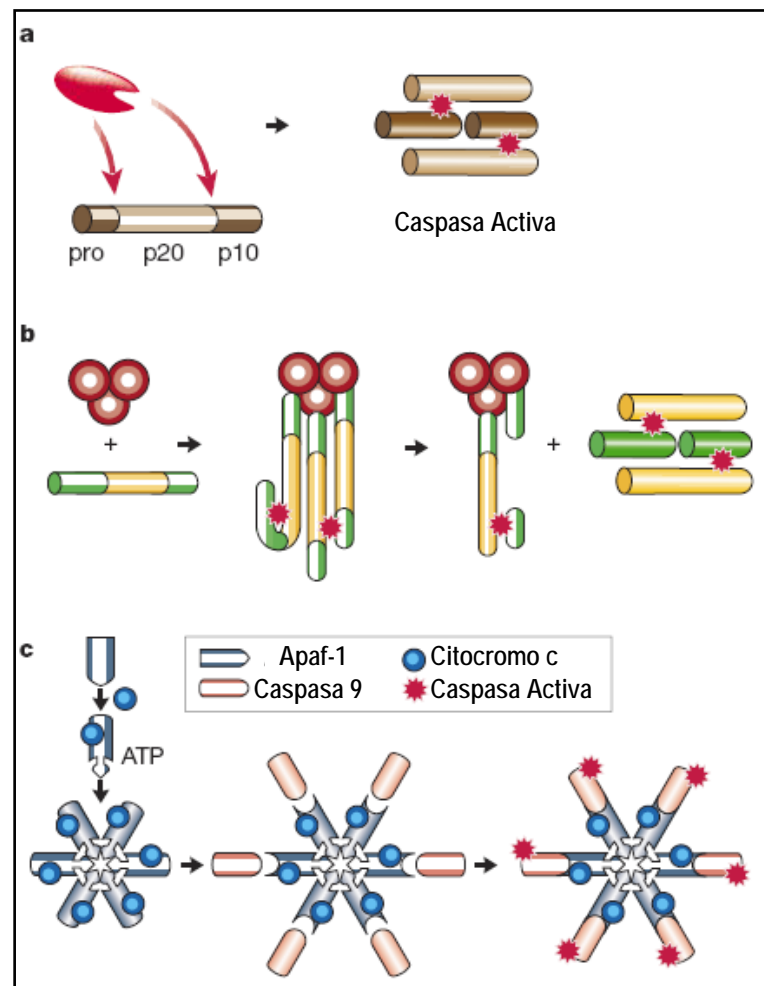
<b>Tabla 2. Rol de las caspasas en la Muerte Celular</b>			
<b>Clase</b>	<b>Nombre</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Efecto Biológico</b>
<b>Iniciadoras</b>	Caspasa 2	PARP-1	Inactiva la reparación ADN
	Caspasa 8	Procaspasas BID	Activación de la apoptosis Degradación de reguladores de la apoptosis
	Caspasa 9	Caspasa 3, 9, 7	Activación de la apoptosis
	Caspasa 10	Caspasa 14	Activación de la apoptosis
<b>Efectoras</b>	Caspasa 3	Vimentina, Fodrina p21, p27, Rb	Degradación del citoesqueleto <i>Blebbing</i> Desregulación del ciclo celular
	Caspasa 6	Keratina, Vimentina, laminina	Condensación citoplasmática Condensación cromatínica
	Caspasa 7	PARP, Vimentina, Keratina	Inactiva la reparación del ADN Degradación del citoesqueleto

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto la caspasa 14. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las pro-caspasas y sus adaptadores y juegan importantes papeles en su activación. Por el



contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas<sup>8</sup>.

Ha sido determinada la estructura tridimensional de las caspasas 1, 3, y 8. Se componen de dos heterodímeros (p10 y p20) que se unen para formar un tetrámero dispuesto en dirección opuesta, con las dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las dos subunidades grandes. Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis<sup>13, 14</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Activación de pro-caspasas. (A) La pro-caspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad grande (p20) y otra pequeña (p10). La pro-caspasa inactiva, una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes, por ejemplo caspasa 3. (B) La activación inducida por proximidad, por ejemplo la caspasa 8 es activada por proximidad a los receptores de muerte. (C) Formación del apoptosoma, necesita de ATP y citocromo c, para poder activar a la caspasa 9. Adaptado de Hengartner, M., 2000<sup>8</sup>.

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las siguientes misiones: cortar contactos con células vecinas, reorganizar el citoesqueleto y clivar proteínas como fodrin y gelsolin. También activan nucleasas, como por ejemplo la caspasa 3 es capaz de clivar al inhibidor de la DNAsa activada por caspasas (CAD), dejándola libre para la fragmentación del ADN, generando el patrón característico de fragmentación internucleosomal de 180pb<sup>15</sup>. Las caspasas activas pueden dismantelar las láminas nucleares (condensación); clivar a PAK2, un miembro de la familia activada por kinasa p21, mediar la formación de los característicos cuerpos apoptóticos<sup>16</sup>, junto a la proteína rock (una kinasa de la familia de Rho)<sup>17</sup>; expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina), y activar proteínas específicas que preparan a la célula para el cese de las funciones metabólicas<sup>9</sup> (Tabla 2).

## 1.2. Vías que conducen a la muerte celular

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas (Figura 2). Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión al ADN. Estas dos vías, también denominadas extrínsecas e intrínsecas, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente y pueden ser disparadas por diversos inductores de la apoptosis como muestra la tabla 3.

<b>Fisiológicos</b>	<b>Asociados al daño celular</b>	<b>Terapia</b>	<b>Toxinas</b>
TNF	Golpe térmico	Quimioterapéutica (cisplatino, doxorubicina, pleomicina, citicina arabinosida, metotrexato, vincristina)	Etanol
Ligando de Fas	Infección viral		Beta-amiloide
TGF-beta	Toxinas bacterianas		Veratridina (alcaloide de las Liliaceas)
Neurotransmisores (glutamato, dopamina)	Oncogenes: myc, rel, E1A		6-Hydroxydopamine (neuro toxina)
Ausencia de factores de crecimiento	Factores de transcripción: p53		3-ácido nitropropiónico (toxina mitochondrial)
Pérdida de fijación de la matriz	Linfocitos T citotóxicos	Radiación $\gamma$	Metanfetamina
Ca <sup>2+</sup>	Agentes oxidantes	Radiación UV	Toxinas bacterinas
Glucocorticoides	Radicales libres		

La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c, smac/DIABLO y AIF. El citocromo c se une a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa 9 y con ello la cascada de activación de caspasas, mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por acciones opuesta de la familia Bcl-2<sup>3,8</sup>.

La vía extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL) para activar a las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 10), que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas 3 y 7<sup>18</sup>. Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las caspasas iniciadoras y a las ejecutoras<sup>19</sup>.

### **1.3. La familia de proteínas Bcl-2**

El proto-oncogen Bcl-2 se descubrió inicialmente en linfomas humanos de células B. La familia de proteínas de Bcl-2 incluye moléculas pro y anti-apoptóticas, de hecho la relación entre ambos subtipos ayuda a determinar en parte la susceptibilidad de las células a las señales de muerte<sup>20</sup>.

Por lo menos 30 miembros de la familia de Bcl-2 se han identificado en células de mamíferos y muchas otras en virus<sup>21, 22</sup>. Todos los miembros de esta familia poseen al menos uno de los cuatro motivos conservados, conocidos como dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4) y los que se encuentran anclados a membranas poseen dominios de trans-membrana (TM)<sup>23</sup> (Figura 3). La mayoría de los miembros anti-apoptóticos contienen al menos BH1 y BH2, y aquellos más parecidos a Bcl-2 poseen los cuatro dominios BH. Las dos subfamilias pro-apoptóticas difieren bastante con respecto a Bcl-2. Mientras que Bax, Bak y Bok, contienen BH1, BH2 y BH3, y se parecen a Bcl-2, los otros siete miembros pro-apoptóticos poseen sólo una parte central del dominio BH3<sup>24</sup> (Figura 3).

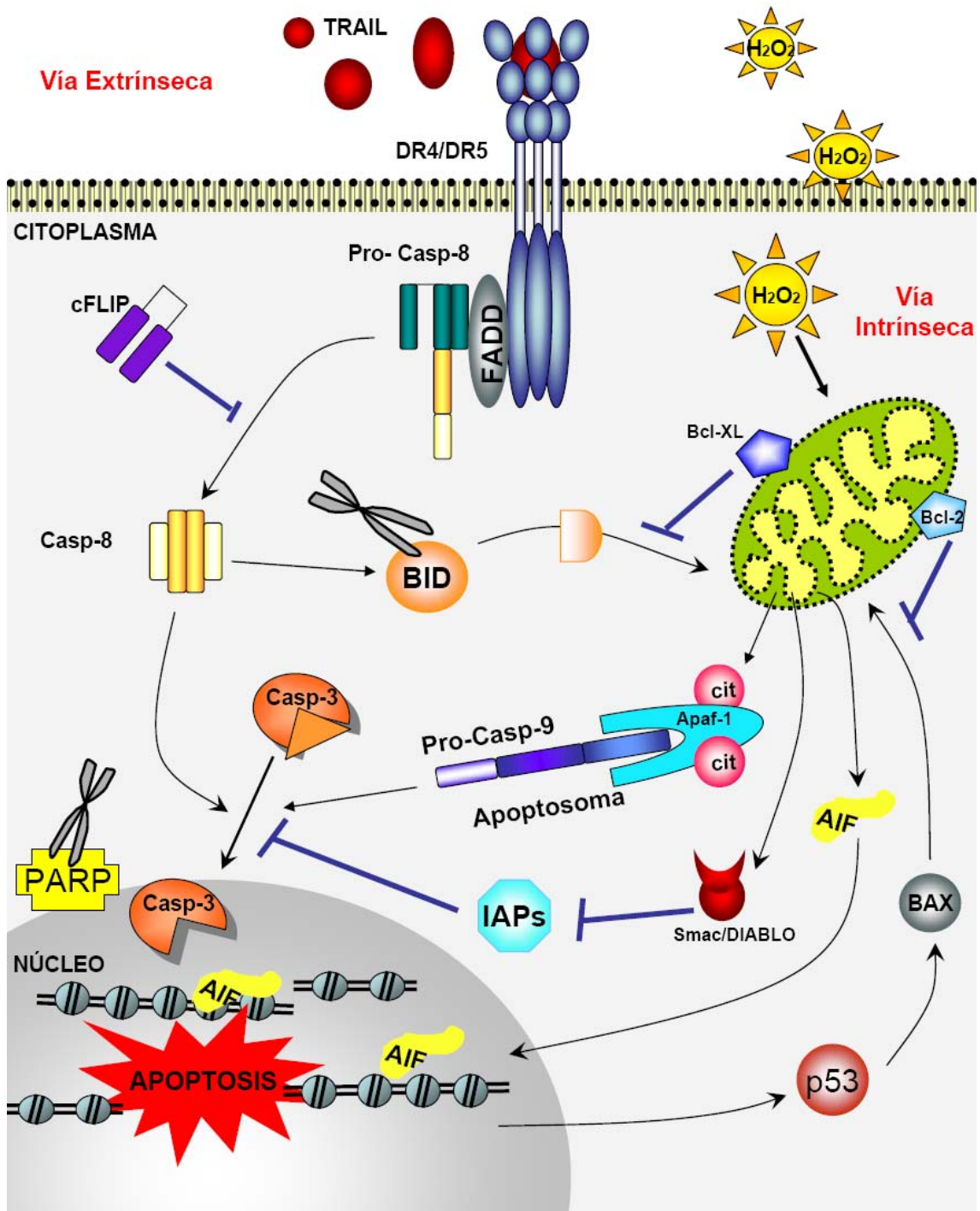
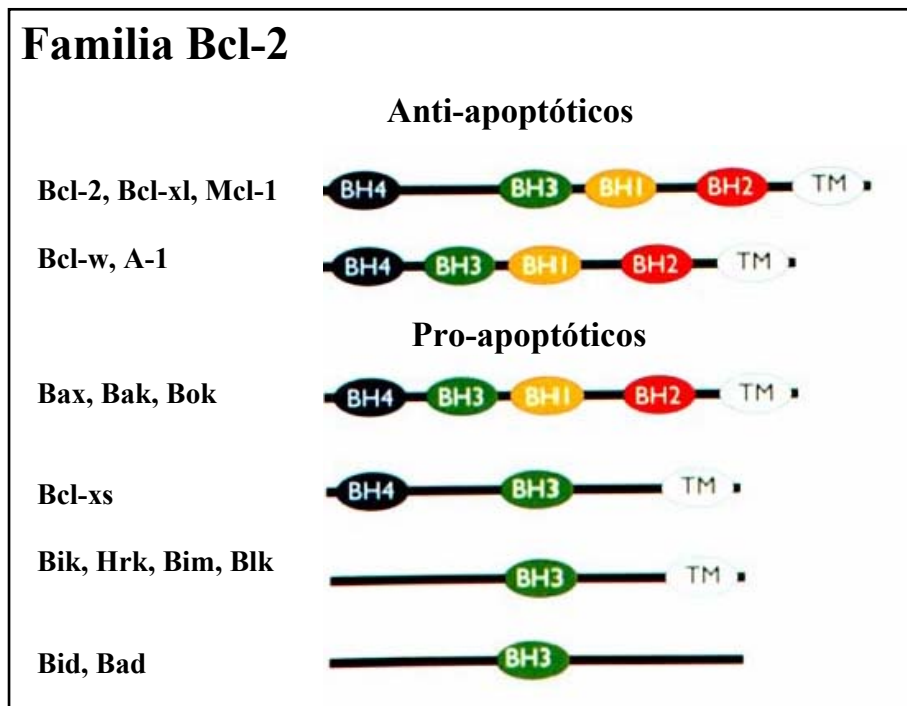


Figura 2. Vía extrínseca y vía intrínseca de apoptosis.



**Figura 3.** Miembros de la familia Bcl-2. En círculo se muestran los motivos conservados, BH: dominio de homología a Bcl-2 y TM: dominio de transmembrana.

Una característica importante de los miembros de esta familia es su capacidad de formar homo- y heterodímeros, lo que sugiere una competencia neutralizante entre ambos subtipos. Hay evidencias que sugieren que la heterodimerización no es requerida para las funciones anti-apoptóticas de esta familia<sup>25</sup>, mientras que es esencial para las actividades pro-apoptóticas a través de las interacciones entre los dominios BH3<sup>26</sup>.

Otra característica de algunos de los miembros de esta familia como Bcl-xl, Bcl-2 y Bax corresponde a su habilidad de formar canales en bicapas lipídicas *in vitro*. Asimismo se vio que los canales creados por Bax y Bcl-2 tienen distintas características incluida la selectividad de algunos iones.

Los miembros pro- y anti-apoptóticos de esta familia se localizan en compartimentos sub-celulares distintos en ausencia de una señal de muerte. Los miembros anti-apoptóticos son inicialmente proteínas integrales de membrana que se encuentran en mitocondria, retículo endoplasmático o membrana nuclear, mientras que algunos de los miembros pro-apoptóticos se encuentran en el citoplasma o en el citoesqueleto. Luego de una señal de muerte, los miembros pro-apoptóticos que han sido analizados hasta el momento sufren un cambio conformacional que les permite llegar e integrarse en las membranas, especialmente en la membrana externa de la mitocondria<sup>8</sup>.

Existen varios mecanismos posibles de acción para los distintos miembros de esta familia:

1) La relación de los miembros pro- y anti-apoptóticos es muy importante para determinar la susceptibilidad de una célula a sufrir apoptosis, por ejemplo la relación de Bcl-2/Bax varía durante el desarrollo de distintos linajes celulares.

2) Hay evidencias que muestran que los miembros anti-apoptóticos de esta familia están involucrados en la mantención de la integridad de las organelas. Por ejemplo, Bcl-2 directa o indirectamente previene la liberación de citocromo c de la mitocondria el cual, junto a ATP, pueden facilitar el cambio estructural de Apaf-1 lo que a su vez permite el reclutamiento de pro-caspasa 9 y su activación<sup>27,28</sup> (Figura 6).

3) Asimismo existen evidencias bioquímicas que sugieren que los miembros anti-apoptóticos podrían funcionar inhibiendo directamente la habilidad de ciertas moléculas de activar caspasas. Por ejemplo, Bcl-x<sub>L</sub> puede inhibir la asociación de Apaf-1 con la pro-caspasa 9 y de esta manera impedir la activación de esta caspasa<sup>29</sup>. Por otro lado una señal de muerte puede provocar la interacción de un miembro de la familia BH3 o de un miembro de la familia Bax con Bcl-x<sub>L</sub>, impidiendo entonces la neutralización de Apaf-1<sup>30 31</sup>.

4) Si bien la mayoría de las proteínas pro-apoptóticas antagonizan directamente con las proteínas anti-apoptóticas, el grupo de proteínas Bax puede provocar la muerte independientemente de la activación de caspasas a través del daño de organelas, siendo la mitocondria un blanco posible. Esto probablemente esté mediado por su capacidad formadora de poros, los cuales podrían alterar la permeabilidad mitocondrial<sup>32,33</sup>.

La familia de proteínas Bcl-2 es regulada por citoquinas, por señales de muerte y por señales de sobrevida a distintos niveles. Varios genes anti-apoptóticos son inducidos transcripcionalmente por ciertas citoquinas<sup>34</sup>. Sin embargo se ha observado que las señales de sobrevida inducidas por citoquinas involucran una regulación post-traducciona. La fosforilación de los miembros anti-apoptóticos, puede aumentar o inhibir su actividad. La activación sostenida de quinasas, algunas de las cuales se describen más adelante, luego de la activación de caspasas se ha relacionado con apoptosis, y la fosforilación de los miembros de la familia de Bcl-2 podrían ser sus blancos<sup>35</sup>. Sin embargo, la mayoría de los eventos de fosforilación parecen ser inactivantes y entonces promovedores de la muerte celular.

#### **1.4. Proteína supresora de tumor**

La proteína supresora de tumor p53, es un factor de transcripción que es activado en respuesta a daño en el ADN, estrés celular, radiación gamma y fármacos genotóxicos<sup>36</sup>. Este daño es detectado por proteínas que se encuentran en los puntos de chequeo Chk1 y 2, y que fosforilan a p53 activando su translocación al núcleo. El aumento en los niveles de p53 conduce a la inducción en la transcripción de otros genes como p21/WAF1/Cip1, un inhibidor de proteínas quinasas reguladas por ciclinas, inhibiendo la fase S del ciclo celular y el gen 14.3.3. La célula frena el ciclo celular en G1, de esta manera puede parar la replicación del genoma potencialmente dañado, si la célula no puede reparar el daño, p53 induce la muerte celular, aumentando la síntesis de Noxa, puma y Apaf-1 y disminuyendo la de Bcl-2 y Map4, produciendo la liberación de Bax desde la mitocondria<sup>7</sup>. En células normales la concentración de p53 es baja, porque se encuentra altamente regulada por MDM2, que es capaz de ubiquitinarlo para la degradación vía proteosoma<sup>37</sup>. Un mal funcionamiento o mutación de p53 puede promover el desarrollo de tumores al permitir la proliferación de células que no han completado la reparación del ADN. Hoy en día sabemos que muchos tumores presentan algún tipo de mutación en p53<sup>38</sup>.

#### **1.5. Apoptosis desencadenada por señales internas: vía intrínseca o mitocondrial**

En la apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés, la mitocondria juega un rol central en la integración y propagación de señales de muerte originadas en el interior celular, como daño en el ADN, estrés oxidativo, o drogas quimioterapéuticas<sup>39, 40</sup> (Tabla 3). Los mecanismos de lesión mitocondrial en respuesta a diferentes situaciones de estrés es un tema que se encuentra en debate, se inicia con la despolarización de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y la formación de poros que permiten la salida de moléculas menores a 1,5 kDa<sup>41</sup>. Sin embargo, la activación de Bax, mediada por p53, parece que en la actualidad está ganando adeptos, y puede servir como paradigma para explicar la alteración mitocondrial activada por estrés. Se ha demostrado que Bax se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), que se forma por el transportador de adenín nucleótido (ANT), el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje (VACN) y la ciclofilina D. El poro

MPTPC participa en la regulación del calcio, el pH, el potencial de la membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) y del volumen mitocondrial, funcionando como un canal aniónico. Se ha demostrado que la proteína pro-apoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo con ANT que se localiza en la membrana interna mitocondrial<sup>41, 42</sup>. La apertura del poro trae consigo un descenso en  $\Delta\Psi_m$  y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluye: al citocromo c, que desencadena la activación de las caspasas; smac/diablo, que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP) y el factor inductor de la apoptosis (AIF) que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas<sup>3, 43</sup> (Figura 2).

### *1.6.1. Estrés oxidativo*

Existen suficientes evidencias donde el estrés oxidativo juega un rol importante en la inducción de la apoptosis. Los sistemas biológicos continuamente están expuestos a oxidantes, generados endogenamente por reacciones metabólicas (por ej. Generados por la cadena respiratoria en la mitocondria o durante la activación de fagocitos), o exógenamente, como la contaminación ambiental.

Especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) o el radical oxidrilo ( $\cdot OH$ ) son especies muy inestables con electrones desapareados, capaces de iniciar la oxidación. ROS causa la oxidación de proteínas, ADN, lípidos que pueden causar daño pulmonar o inducir una variedad de respuesta celular, a través de la generación de metabolitos secundarios de las especies reactivas<sup>44</sup>.

Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en varias patologías en enfermedades humanas. Hay evidencias que sugieren que una concentración moderada de ciertas formas de ROS como el  $H_2O_2$  actúan como mensajeros en la traducción de señales<sup>45</sup>. ROS puede alterar la remodelación de la matriz extracelular, los glóbulos rojos, estimular la secreción mucosa, causar la apoptosis y regular la proliferación celular.

$O_2^-$  y  $H_2O_2$  son producidos por un amplio número de células del sistema inmune. En cambio, otros tipos celulares, como del músculo liso, condrocitos y fibroblastos producen bajas cantidades de estas moléculas. Este mecanismo oxidativo cumple un rol importante en la traducción de señales relacionadas con los factores de transcripción NF- $\kappa B$  y AP-1. También se conoce que el estrés oxidativo y el estado redox de las células pueden modificar el remodelamiento de la cromatina, acetilando o des-acetilando las



histonas conducidas por la expresión de genes mediadores pro-inflamatorios. Una concentración alta de radicales libres, activa endonucleasas y contribuye a la apoptosis<sup>46</sup>.

NF- $\kappa$ B y AP-1, están regulados por el estado redox intracelular y están implicados en inducir la expresión de genes mediadores de la inflamación<sup>47</sup>, siendo AP-1 un importante mediador de la progresión tumoral. Varios proto-oncogenes son activados transcripcionalmente por un aumento en la oxidación celular. Por ejemplo, se expusieron células normales y transformadas a UV o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se vió aumentada la expresión de jun-B, jun-D, c-fos y fos-B<sup>48</sup>.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cumple un rol como segundo mensajero en la transducción de señales desde la mitocondria al núcleo, activando genes como TGF- $\beta$ 1 y PDGF en células humanas<sup>49</sup>.

ROS induce la expresión de genes asociados a la reparación del ADN, pudiendo ocurrir sin que haya daño en el ADN. La respuesta celular derivada de estímulos por ROS o especies reactivas de nitrógeno, pueden dividirse en cinco categorías: 1- modulación de citoquinas, factores de crecimiento, secreción y acción de hormonas; 2- transporte de inones; 3- transcripción; 4- neuromodulación y 5- apoptosis<sup>50</sup>.

La activación de la respuesta antioxidante es mediada parcialmente por NF- $\kappa$ B y se ha encontrado que es uno de los factores involucrados en la regulación transcripcional de SOD-2 y  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa. ROS activa a NF- $\kappa$ B causando la liberación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B del complejo, por ejemplo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la luz UV y la radiación ionizante estimulan la degradación de I $\kappa$ B. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa a la IKK, mediante la fosforilación de los residuos de serina<sup>51</sup>. Nuevos datos demuestran un mecanismo adicional aumentando la actividad de NF- $\kappa$ B por medio de la fosforilación de p65/RelA por varias quinasas<sup>52</sup>. En cambio los antioxidantes disminuyen la actividad y tanslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo<sup>53</sup>.

ROS, además de aumentar la actividad de NF- $\kappa$ B, también modula la activación de las MAPKs y la vía de esfingomielinasa-ceramida, que aumenta la transcripción de genes que regulan la respuesta pro-inflamatoria, pro-apoptótica y anti-proliferativa<sup>54</sup>.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiendo de las concentraciones usadas, los tiempos y del tipo celular puede inducir estímulos de supervivencia, apoptosis o necrosis. Concentraciones bajas activan la vía de Akt y NF- $\kappa$ B que son factores anti-apoptóticos. En células HEK293 concentraciones en el orden del mM inducen apoptosis activando caspasa 9 y

3, como el clivado de PARP, concentraciones mayores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden inducir necrosis<sup>55-59</sup>.

### 1.6. Apoptosis independiente de caspasas (AIF)

Recientemente se ha clonado una flavoproteína mitocondrial de 67-kDa que posee actividad dependiente de FAD oxidoreductasa, y se encuentra anclada en el espacio intermembrana de la mitocondria, denominada factor inductor de la apoptosis (AIF)<sup>60</sup>. Fue la primer proteína identificada en la muerte celular independiente de caspasas<sup>43</sup>.

La ausencia de AIF causa neurodegeneración, ceguera<sup>61</sup>, atrofia muscular y cardiomiopatía dilatada debido a defectos en la mitocondria en los complejos I y III, aumentando la generación de ROS y la sensibilidad a la apoptosis<sup>62</sup>. Ante un estímulo, AIF cliva su péptido amino terminal adquiriendo un peso molecular de 57kDa y se transloca al núcleo<sup>43</sup> (Figura 2).

Aparentemente, la salida de AIF de mitocondria es anterior a la de citocromo c y requiere de la activación de la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP-1), una enzima nuclear que responde al daño a ADN y facilita su reparación<sup>63</sup>. En condiciones *in vitro* y en núcleos purificados AIF provoca la condensación de la cromatina y la ruptura del ADN en fragmentos aproximadamente de 50kb, de manera independiente a caspasa<sup>64</sup>. Este año se encontró que AIF recombinante se puede unir directamente al ADN y ARN, teniendo preferencia por las simples cadenas, promoviendo la condensación de la cromatina<sup>65</sup>.

Fue descripta que existe una interacción directa entre AIF y Hsp70. Por otro lado, esta chaperona tiene la capacidad de antagonizar el efecto pro-apoptótico de AIF<sup>66</sup>.

En el 2006 se encontró una nueva isoforma corta de AIF, denominada AIFsh (*short*), la cual pierde la fracción N-terminal, pero no su capacidad apoptótica de clivar el ADN en fragmentos largos. Por lo tanto, al carecer de la señal de localización mitocondrial, se encuentra en el citoplasma y su acción no se encuentra regulada por la familia Bcl-2. En experimentos *in vitro* Hsp70 falla en inhibir el efecto apoptogénico de AIFsh. También se encontró esta isoforma fuertemente regulada negativamente en células tumorales derivadas de riñón, vulva, piel, tiroides y páncreas. Esto estaría indicando un rol potencial de AIF en cáncer<sup>67</sup>.

## 1.7. Disparadores de la vía extrínseca

### 1.7.1. Receptores de muerte

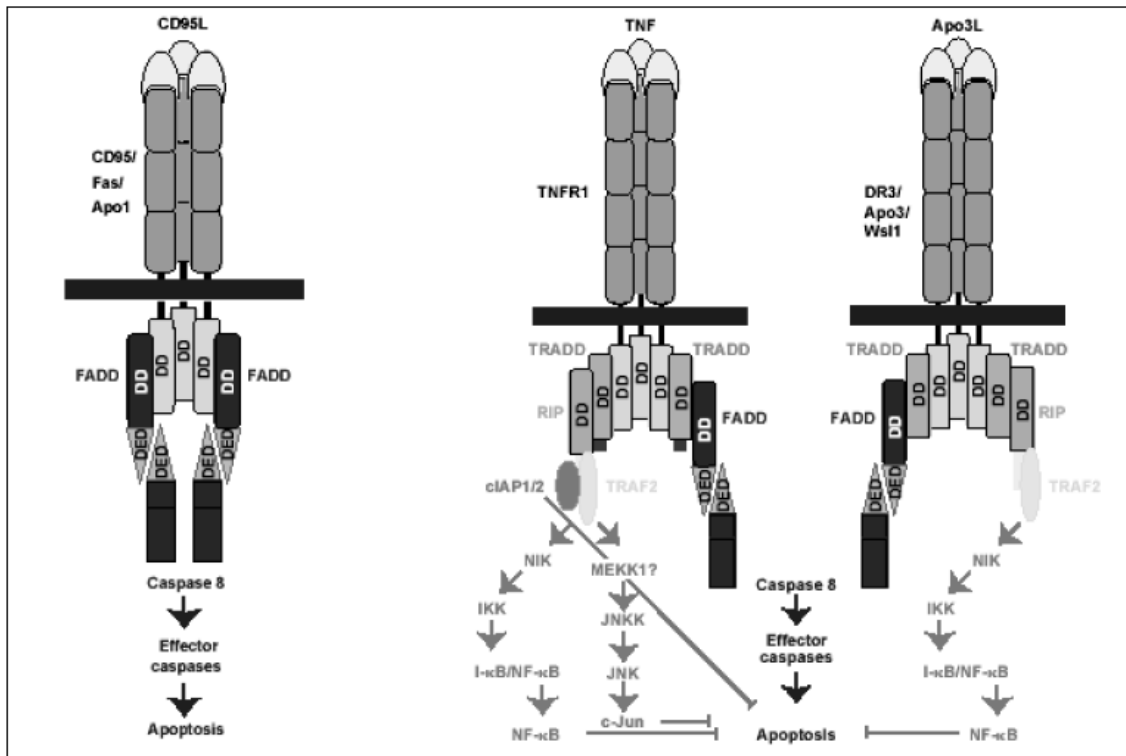
Los mamíferos han evolucionado otro tipo de mecanismo que le permite al organismo dirigir a una sola célula a su propia destrucción. Este tipo de apoptosis “instructiva” es muy importante especialmente en el sistema inmune. Los receptores de muerte, localizados en la superficie celular son los encargados de transmitir las señales apoptóticas iniciadas por la unión con sus ligandos específicos. Estos detectan la presencia de señales extracelulares de muerte y en respuesta, activan rápidamente la maquinaria apoptótica ocasionando la muerte específica de la célula dentro de horas.

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF, por lo tanto poseen dominios extracelulares ricos en cisteínas<sup>68</sup>. Así mismo poseen secuencias citoplasmáticas idénticas llamadas dominios de muerte (DD) (Figura 4).

Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95 (también llamado Fas o Apo 1)<sup>69</sup> y TNFR1 (también llamado p55)<sup>68</sup>. Otros receptores de muerte son CAR1<sup>70</sup>; DR3 (receptor de muerte 3) también llamado Apo3, WSL-1, TRAMP, o LARD<sup>71</sup>; los pertenecientes a la familia de TRAIL como DR4<sup>72</sup> y DR5<sup>73</sup>. El receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) también contiene un dominio de muerte<sup>74</sup>. Los ligandos que activan a estos receptores con excepción de NGFR, son moléculas estructuralmente relacionadas que pertenecen a la superfamilia de TNF. El ligando CD95 (CD95L) se une al CD95; TNF y la linfoxina  $\alpha$  se unen al TNFR1; el ligando Apo3 se une al DR3; el ligando Apo2 se une a DR4 y DR5.

Un aspecto importante a considerar en estas cascadas, es que pocas células son sensibles naturalmente a la muerte inducida por estas vías. En el caso particular del TNF- $\alpha$  por ejemplo, si bien fue descubierto por su capacidad de inducir necrosis en tumores sólidos de ratón<sup>75</sup>, casi ningún tipo celular es sensible a la apoptosis por TNF- $\alpha$  (con excepción la de la línea celular de ratón L-929 y WEHI que constituyen un blanco de acción para esta citoquina y se usan en ensayos de titulación) a menos que se inhiba la actividad de NF- $\kappa$ B<sup>75-79</sup>.

Por esta razón, en general para el estudio de estas cascadas suelen emplearse distintos agentes sensibilizadores como la actinomicina D, la cicloheximida, sulfazalacina o flavopiridol.



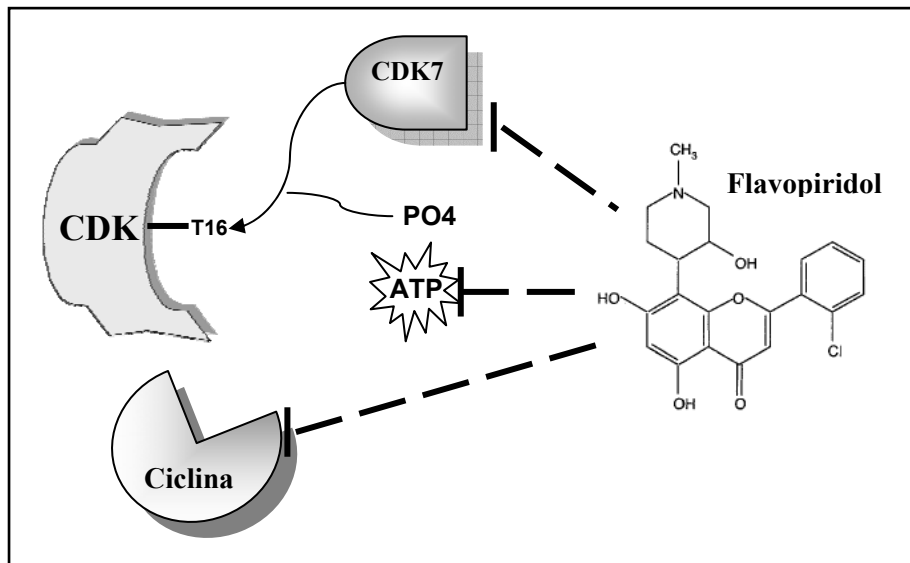
**Figura 4.** Receptores de muerte. Ashkenazi, A. and Dixit, V., 1998<sup>19</sup>.

La actinomicina D y la cicloheximida, como antibióticos inhibidores de la transcripción y la traducción respectivamente actuarían inhibiendo la expresión de genes anti-apoptóticos<sup>75</sup>. Muchos de estos genes son controlados por NF- $\kappa$ B, cuya actividad puede ser inhibida por sulfazalacina, que es un inhibidor específico de la IKK<sup>80, 81</sup>.

En cuanto al Flavopiridol (FP) que fue utilizado en este trabajo de tesis como un agente sensibilizador de la apoptosis combinado con la citoquina TRAIL (que luego detallamos) en células leucémicas, es un flavonioide sintético que inhibe las ciclinas dependiente de quinasas (CDKs). Los anillos aromáticos del inhibidor se unen al bolsillo de unión a adenina de las CDKs y el grupo fenol es capaz de inhibir el contacto con la enzima, compitiendo por el sitio activo de unión a ATP de estas quinasas<sup>82</sup> (Figura 5).

Consistente con esta acción, FP arresta al ciclo celular en G1 y G2. Por esta cualidad suprime el crecimiento tumoral de carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, de leucemia crónica de células B y linfomas, múltiples mielomas y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.<sup>83</sup>. Actúa como un potente modulador transcripcional inhibiendo a CDK-7 y CDK-9, las cuales son responsables de fosforilar el dominio

carboxiterminal de la RNA polimerasa II <sup>84</sup>. FP puede arrestar el ciclo celular por tres diferentes mecanismos: primero, por la inhibición directa de las CDKs; segundo, por prevenir la fosforilación necesaria en la treonina 160 de las CDKs, inhibiendo a CDK7 y finalmente por disminuir la expresión de ciclina D1 y ciclina D3, cofactores importantes para la activación de CDK4 y CDK6 y la progresión del ciclo celular (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura molecular y mecanismos de arresto en G1/S por Flavopiridol.

El FP también tiene la capacidad de unirse directamente al ADN, inhibiendo la síntesis de ARN y aumentando los niveles de p53. De este modo el FP estaría actuando como un intercalante del ADN y podría ser una de las explicaciones de porque esta droga puede matar células tumorales no cíclicas<sup>85, 86</sup>.

Se ha descrito a FP como un agente antitumoral debido a que induce arresto en el ciclo celular y apoptosis en varias células tumorales<sup>87</sup>. Ha sido demostrado que FP aumenta la actividad de otros agentes supresores del crecimiento, como TNF, doxorubicina y etopósido<sup>88</sup>.

El mecanismo por el cual FP induce apoptosis no ha sido del todo esclarecido. En los últimos años se observó que FP suprimía la expresión de genes como Bcl-2, Mcl-1, ciclina D1 y el factor vascular endotelial. La letalidad en células leucémicas humanas mediada por FP, esta asociado con una disminución de la expresión de ciertas proteínas

anti-apoptóticas, como Mcl-1 y XIAP<sup>89</sup>. Todos estos genes se sabe que están regulados por NF- $\kappa$ B. Ha sido demostrado que FP suprime la inflamación y regula el sistema inmune<sup>90</sup>, acorde con esto, recientemente se ha descrito que FP inhibe la activación de NF- $\kappa$ B inducida por distintos agentes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido okadaico, agentes inflamatorios como TNF, PMA y carcinógenos. Esto lo hace a través de la inhibición de la quinasa I $\kappa$ B $\alpha$  y la fosforilación de p65<sup>91</sup>.

Trabajos en células de leucemia crónica mieloide (K562), muestran que el FP no induce apoptosis, pero como se explicó anteriormente, en general se usa combinándolo con otras drogas o citoquinas que disparan apoptosis por las vías clásicas de activación<sup>92, 93</sup>.

#### 1.7.1.1. TRAIL

Usando bases de datos de secuencias conservadas contenidas en varios miembros de la familia TNF, fue identificado el ligando TRAIL o Apo-2<sup>94</sup>. TRAIL es una proteína de membrana tipo II, la cual posee una porción amino-terminal intracelular y una porción carboxi-terminal extracelular. Es clivado por cistein proteasas de la membrana, generando un ligando soluble a partir de monocitos y neutrófilos activados. El dominio extracelular es muy similar al de Fas ligando (28%) y al de TNF- $\alpha$  (23%). Su mayor función es inducir apoptosis y activar la transcripción de NF- $\kappa$ B.

Se observó que TRAIL induce muerte celular solo en células tumorales o transformadas, pero no en células normales, contrario a los otros miembros de la familia TNF, cuya expresión es poco regulada y transientemente expresado en células activadas. Este hallazgo parecía ser la solución al tratamiento de células tumorales *versus* normales, pero hoy en día es controversial el tratamiento con TRAIL, ya que las células hepáticas normales son sensibles a esta citoquina, provocando una potencial toxicidad en hepatocitos humanos<sup>95</sup>. Se ha encontrado que no todas las células tumorales son sensibles a TRAIL, por ejemplo varios melanomas, linfomas, carcinomas de colon y líneas leucémicas (K562 y HL-60) son resistentes<sup>96</sup>.

El ARNm de TRAIL fue detectado en un amplio rango de tejidos, incluyendo linfocitos periféricos, bazo, timo, próstata, ovario, intestino delgado, colon y placenta, pero no en cerebro, hígado o testículos<sup>94</sup>.

La verdadera función de TRAIL en condiciones fisiológicas normales no está todavía muy clara. TRAIL fue uno de los primeros candidatos en la selección negativa de timocitos inmaduros y se observó que en ratones mutantes para TRAIL presentan el timo agrandando, atribuido a la muerte deficiente por apoptosis de los timocitos. Los ratones TRAIL<sup>-/-</sup> muestran un aumento en timocitos inmaduros y fallan en inducir la apoptosis de las células T activadas tanto *in vitro* como *in vivo*, también tienen aumentada la susceptibilidad de desarrollar artritis y diabetes<sup>97</sup>. Estas evidencias no son del todo claras, debido a que otro trabajo donde usaron cuatro modelos diferentes de selección negativa en ratones, argumenta que TRAIL no tiene ningún rol en la selección temprana de los timocitos<sup>98</sup>. Nuevas evidencias atribuyen propiedades angiogénicas a TRAIL, contrarias a su rol antitumorigénico<sup>99</sup>.

#### 1.7.1.1.1. En búsqueda del receptor de TRAIL

A principios de 1997, usando la secuencia del dominio de muerte (DD) del receptor 1 de TNF (TNF-R1), se identificó el receptor DR4 (TRAIL-R1). Esta proteína de 468 aminoácidos, posee muchas de las características de los receptores de la familia de TNF. DR4 pertenece al tipo I de proteínas de membranas, contiene dos dominios extracelular ricos en cisterna, el dominio citoplasmático contiene DD similares a TNF-R1, DR3, Fas y CAR1. Interesantemente, análisis de *Northern blot* indican que el ARNm de DR4 es expresado en los mismos tejidos que el ARNm de TRAIL. Fueron encontradas varias mutaciones de DR4 en células tumorales como por ejemplo, un polimorfismo en el dominio de unión del ligando de DR4 que está ligada a la incidencia de cáncer de vejiga<sup>100</sup> y su expresión al pronóstico favorable de cáncer de colon<sup>101</sup>.

Luego de la identificación del receptor de DR4, otro grupo descubrió el receptor DR5 (TRAIL-R2/KILLER) con 58% de homología a DR4 y a diferencia de este último, DR5 presenta dos isoformas derivadas del *splicing* alternativo: la forma corta DR5A/TRICK2A y la larga DR5B/TRICK2B, sin aparente diferencia en la función<sup>73</sup> (Figura 6).

La sobre-expresión transiente de DR5 causa muerte celular espontánea debido a la agrupación de los dominios de muerte. Ha sido reportado un aumento en la regulación de DR5 como respuesta a tratamientos con drogas terapéuticas, que causan daño al nivel del ADN<sup>102</sup> y la pérdida de funcionalidad de DR5 en cuello, cabeza y

carcinomas gástricos, disminuyendo la actividad apoptótica mediada por una proliferación descontrolada<sup>103</sup>. Estas evidencias le confieren a DR5 el rol de regulador tumoral.

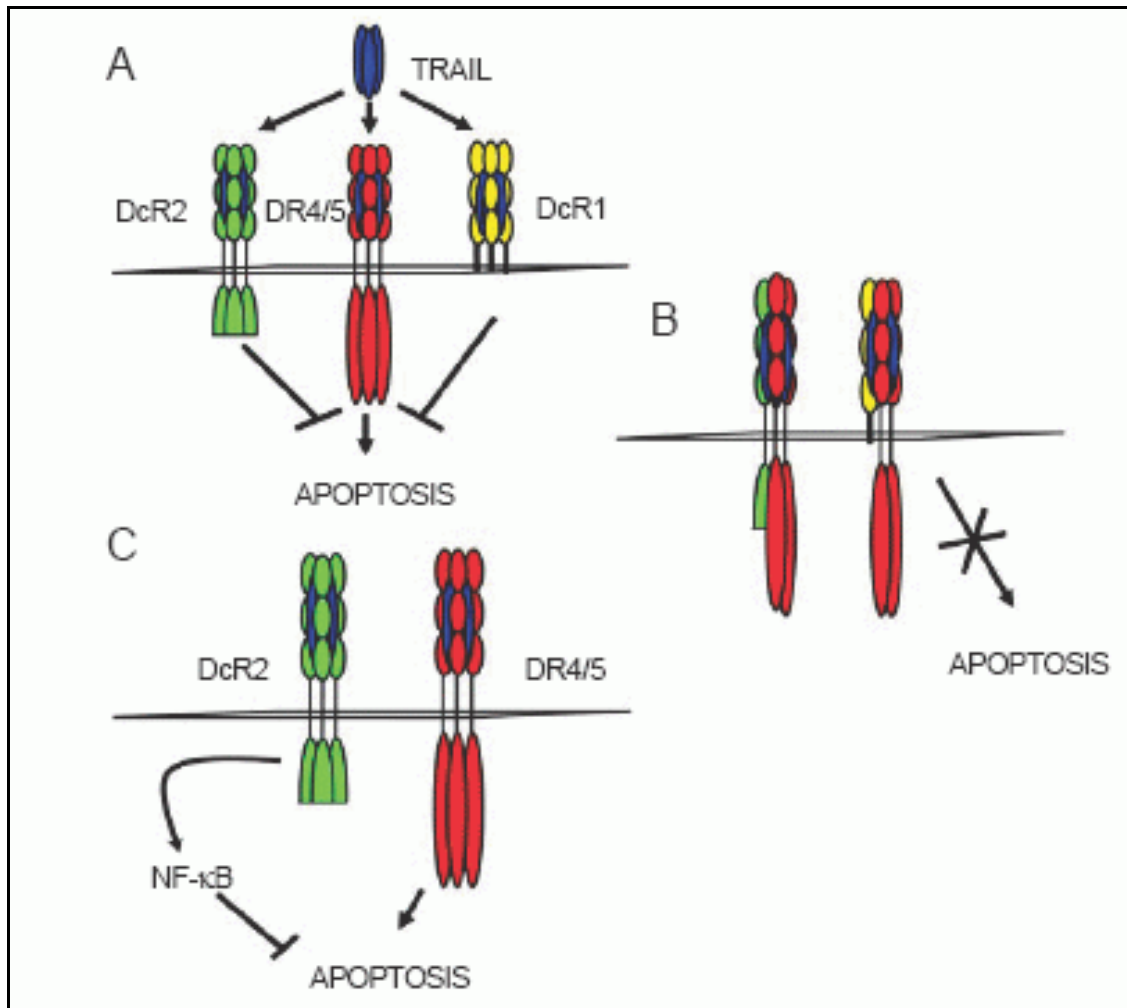
La diferencia en la sensibilidad a la citotoxicidad de TRAIL de las células tumorales *versus* células normales, podría deberse a las dos isoformas adicionales de receptores, DcR1 (TRID/TRAIL-R3) y DcR2 (TRAIL-R4)<sup>104, 105</sup>. Estos receptores poseen una alta homología con DR4 y DR5 en el dominio extracelular, pero en el dominio intracelular son muy diferentes. DcR2 contiene una porción truncada del dominio de muerte y luego de unirse al ligando no puede inducir apoptosis. DcR1 no posee el dominio citoplasmático de muerte, por lo tanto al unirse el ligando no puede inducir muerte celular<sup>106</sup> (Figura 6). Análisis de ARNm demostraron que el número de tejidos que expresan constitutivamente a DcR2 es tan amplio como el de DR4 y DR5, pero el rango de tejidos que expresan DcR1 es más limitado. Se describió un quinto receptor osteoprotegerina (OPG), que existe como dímero y es soluble<sup>107</sup>. Recientemente se ha encontrado que este receptor estaría asociado al desarrollo tumoral, por unión a TRAIL e inhibición de la apoptosis inducida por este ligando.

Una alta expresión del OPG endotelial correlaciona con un alto grado del tumor y vascularización, confiriéndole un rol en la angiogénesis y progresión tumoral. Sorpresivamente, OPG se encuentra ausente en células endoteliales de tumores benignos y tejidos normales<sup>108</sup>. Ratones deficientes de OPG, presentan defectos en células B, indicando un rol importante en el desarrollo y maduración de este tipo celular<sup>109</sup>.

Los cuatro primeros receptores se encontraron expresados en tejido normal como tumoral, la gran duda todavía es la diferencia en la sensibilidad tanto entre distintos tipos de células tumorales, como en células normales. Una de las primeras hipótesis planteadas fue que los receptores truncados actuaban como “decodificantes” de la señal apoptótica inducida por el ligando TRAIL, y este podría haber sido uno de los mecanismos de resistencia (Figura 6A). De acuerdo con esta hipótesis se transfectaron células sensibles a TRAIL con los receptores decodificantes DcR1 o DcR2, resultando en una reducción de la muerte celular inducida por TRAIL, y DcR2 parecía ser más protector que DcR1<sup>105</sup>. Luego, sorpresivamente análisis de *Northern blot* de varias líneas celulares revelaron que la expresión de los receptores decodificantes no coincidía con la sensibilidad o resistencia celular a la apoptosis inducida por TRAIL<sup>110</sup>. Una segunda hipótesis es que los receptores decodificantes son capaces de formar



complejos con DR4 y DR5, anulando la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y siendo ineficiente en inducir la apoptosis (Figura 6B).



**Figura 6.** Receptores TRAIL, modelo de los receptores “decodificantes”. (A) Teoría de competencia por el ligando por los receptores DcR1/2 y DR4/5. (B) Formación de los receptores mixtos entre DcR y DRs, bloquea la inducción de apoptosis. (C) La activación de NF-κB por DcR2 podría inducir señales anti-apotóticas; la señalización de NF-κB a través de los receptores de muerte podría regular positivamente DcR1. Kimberley, F., et al. 2004<sup>111</sup>.

Algunas evidencias muestran que como DcR2 no puede inducir apoptosis, éste podría activar a NF-κB, aumentando la transcripción de genes anti-apotóticos y de esta forma antagonizar la muerte celular<sup>105</sup>(Figura 6C).

Otra hipótesis planteada en 1997 y que sigue vigente, es una expresión diferencial de las proteínas intracelulares inhibitorias de la apoptosis. La activación del proceso apoptótico requiere de la unión al receptor de la proteína asociada al dominio de muerte Fas (FADD) o de la proteína asociada al dominio de muerte de TNF-R1 (TRADD) y de la proteína de interacción con el receptor (RIP), para luego activar a la caspasa 8 e inducir la activación del resto de la cascada apoptótica<sup>72</sup>(Figura 7).

Cuando se examinaron los niveles de los inhibidores de la apoptosis, se encontró que los melanomas resistentes a TRAIL contenían altos niveles de la proteína inhibitoria semejante a FLICE (FLIP). Los niveles de FLIP bajan cuando se crecen las células con Actinomicina D y se vuelven mas sensibles a TRAIL<sup>96</sup>. FLIP podría ser una de las moléculas que protegen a las células de la citoquina TRAIL. También se observó que células deficientes en FADD son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL. Ensayos de inmunoprecipitación de los componentes endógenos del DISC, en distintas líneas celulares, mostraron que FADD/caspasa 8 son reclutados por DR4 y DR5 en células que pierden la resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL<sup>112</sup>(Figura 7).

Ha sido demostrado que TRAIL es capaz de activar JNK vía MEKK, de manera caspasa-dependiente e independiente<sup>113</sup>. La inducción de JNK amplifica el efecto apoptótico de TRAIL, a través de la vía intrínseca. Hay evidencias de que la activación de JNK es iniciada por DR5 y no DR4 y está es la única evidencia que diferencia la capacidad de señalización entre los receptores con dominio de muerte<sup>114</sup>(Figura 7).

El tratamiento de tumores es mucho más efectivo al combinar TRAIL y un agente que cause daño al ADN. Tal como se señaló anteriormente, uno de los agentes sensibilizadores utilizados como intercalante del ADN, entre sus otras funciones, es el FP. Las células K562 son resistentes a la apoptosis inducida por FP o TRAIL, pero se observó al igual que en otras líneas leucémicas como U937 y Jurkat, cuando se combinan ambos estímulos hay un aumento en la sensibilidad a la apoptosis inducida por ambas vías<sup>92</sup>.

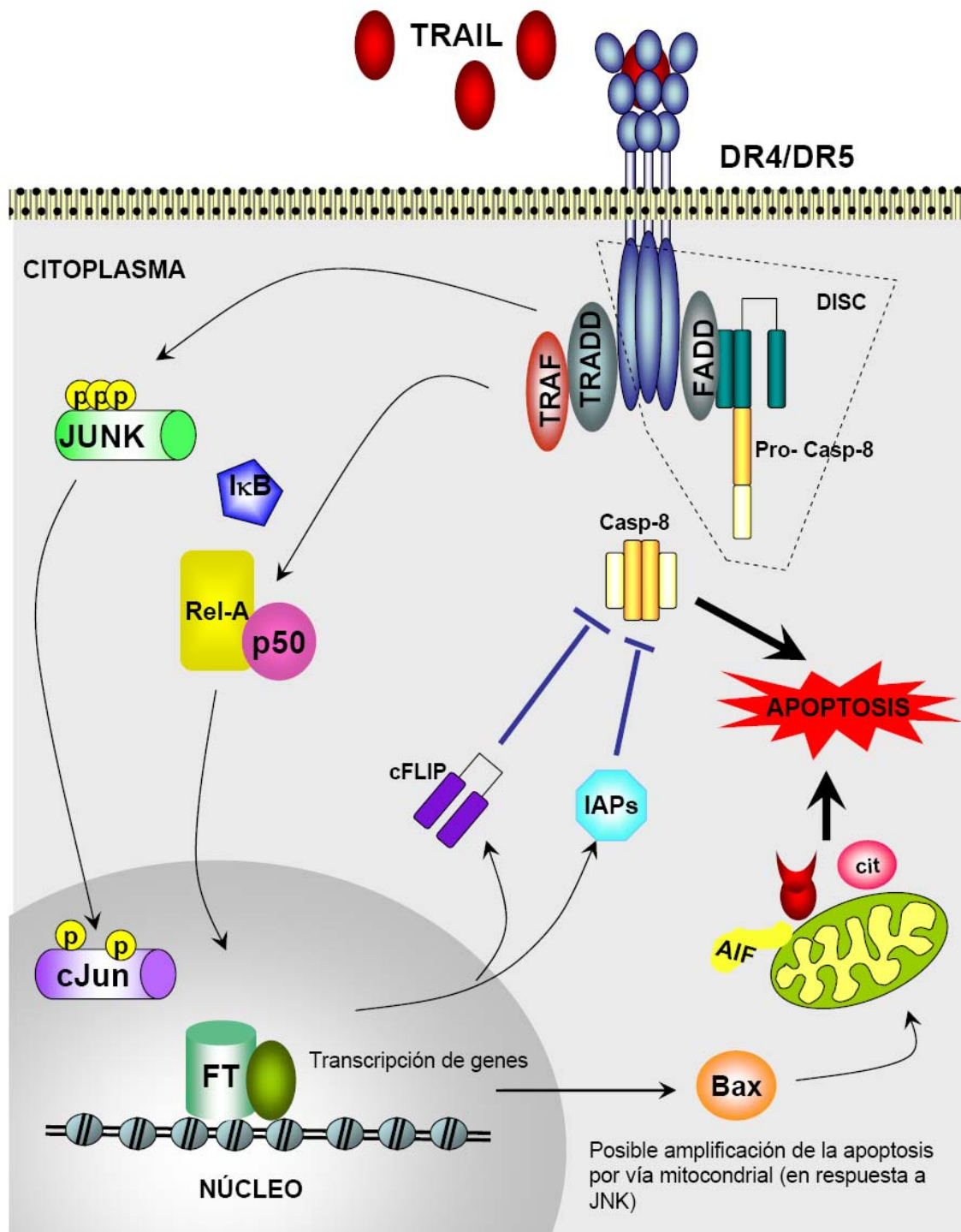


Figura 7. Señalización vía receptores DR4 y DR5.

## VIAS DE LAS MAPK Y AKT

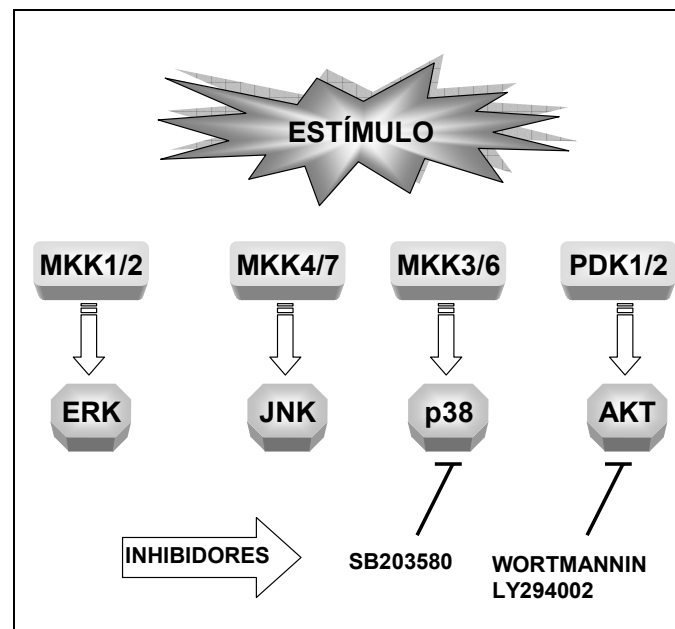
Existen muchas vías sensibles a la activación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por citoquinas inflamatorias, relacionada con la apoptosis y proliferación celular. Varios de estos procesos en la célula son mediados directa o indirectamente por las MAPKs<sup>115</sup>. Algunas de ellas están directamente relacionadas con la proliferación y supervivencia, mientras que otras se las asocia a señales pro-apoptóticas, como por ejemplo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa rápidamente a ERK2, mientras que activa moderadamente los niveles de p38 y JNK<sup>54, 59</sup>. En cambio la citoquina TRAIL induce la rápida activación de JNK, amplificando la apoptosis vía mitocondrial<sup>113</sup>. A continuación detallamos las cascadas de MAPK, cuya activación varía dependiendo del tipo celular y su entorno.

### **2. CASCADA DE SEÑALES MEDIADA POR PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)**

Las MAPKs son proteínas quinasas activadas por mitógenos que están involucradas en la transmisión intracelular de señales extracelulares. Las MAPK se activan por fosforilación dual de residuos de treonina y tirosina, los cuales se encuentran separados por un residuo, formando el motivo TXY, donde X representa distintos aminoácidos. La identidad del aminoácido ubicado entre la treonina y tirosina define las distintas subfamilias de MAPKs<sup>116</sup>. La familia de MAPKs está formada por 4 subfamilias: la familia de las proteínas quinasas activadas por señales extracelulares (Erk1 y Erk2)<sup>117</sup>. Ambas proteínas quinasas se activan por fosforilación del motivo consenso treonina-glutámico-tirosina (TEY) y por ser la primera subfamilia caracterizada es frecuentemente referida con el nombre de la gran familia (MAPKs)<sup>118</sup>. Estas proteínas se activan fuertemente por factores de crecimiento del tipo EGF (Factor de crecimiento epidérmico) o PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas); el segundo subgrupo de MAPKs corresponde a la familia de las proteínas quinasas capaces de fosforilar en forma específica el factor de transcripción c-jun es por eso que recibió el nombre de Jun-quinasa o JNK (quinasa N-terminal de c-Jun)<sup>119</sup>. Todas las JNKs son activadas por fosforilación dual de residuos de treonina-prolina-tirosina (TPY); el tercer subgrupo de MAPKs corresponde a la familia de proteínas quinasas p38 que resultaron ser homólogas de la MAPK de levaduras HOG-1<sup>120, 121</sup>. Estas

proteínas se activan por fosforilación dual de residuos treonina y tirosina en su motivo consenso treonina-glicina-tirosina (TGY). Las proteínas JNK y p38 son activadas principalmente por citoquinas proinflamatorias (como IL-1, TNF- $\alpha$ , TRAIL) y por señales de estrés como estrés osmótico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhibidores de la síntesis proteica (cicloheximida o anisomicina), y factores que dañan el ADN como la radiación y la luz UV. Es por eso que estos dos últimos subgrupos de MAPKs se los engloba bajo el nombre de SAPKs (Proteínas quinasas activadas por estrés)<sup>122</sup>. El último subgrupo de MAPKs corresponde a la familia de Erk5 la cual está siendo intensamente estudiada<sup>123</sup>. Más recientemente se han identificado otras dos MAPKs nuevas llamadas Erk7 y Erk8<sup>124, 125</sup>.

Cada familia está regulada por tres cascadas de proteínas análogas que se activan secuencialmente unas a otras por fosforilación dual de residuos de treonina y tirosina. La activación de estas proteínas es iniciada tanto por pequeñas proteínas que se unen a GTP o por proteínas adaptadoras, las cuales transmiten la señal directa o indirectamente a una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK). Luego, la señal es transmitida hacia abajo en la cascada por enzimas que se encuentran en la siguiente hilera, las cuales se conocen como MAPK quinasa (MAPKK) y finalmente la señal es transmitida a las MAPK las cuales al activarse son capaces de fosforilar a sus sustratos específicos (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de las cascadas de transducción de señales de la familia de proteínas MAPKs y AKT e inhibidores de las vía p38 y AKT utilizados en esta tesis.

Las MAPKs fosforilan a sus sustratos en residuos de serinas o treoninas presentes exclusivamente en motivos Ser-Pro o Thr-Pro<sup>117, 119</sup>. Entre los sustratos de las MAPKs se encuentran otras proteínas quinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto. La fosforilación específica dada por las MAPKs sobre sus sustratos les permite regular una gran variedad de eventos celulares que incluyen proliferación, diferenciación, desarrollo, apoptosis y la respuesta a estrés.

### **2.1. Familia de proteínas Erk1/2**

Erk1 (p42) y Erk 2 (p44) se expresan en distintos tipos celulares y están involucradas en la regulación de la meiosis, mitosis y las funciones post-mitóticas<sup>117, 126</sup>. También se vio que estas proteínas están involucradas en el aprendizaje y memoria del sistema nervioso central. Como se mencionó anteriormente muchos estímulos distintos son capaces de activar a Erk1 y Erk2 entre los que se encuentran factores de crecimiento, citoquinas, infecciones virales, ligandos que se unen a receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, agentes transformantes y carcinógenos.

La cascada de activación “clásica” de Erk1 y Erk2 está compuesta por una pequeña proteína G y tres quinasas sucesivas: Ras-Raf-MEK-Erk1/2<sup>127</sup>.

Erk juega un rol crítico en la supervivencia celular luego de un daño oxidativo<sup>128</sup>. Tratamientos oxidativos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, rápidamente activa a Raf-1, que fosforila a MKK/MEK. Interesantemente MEK1 es activada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y no MEK2, sugiriendo que solo MEK1 es sensible al estrés oxidativo<sup>129</sup>. Aunque el rol de esta quinasa es controversial y depende del tipo celular, distintos trabajos en células HEK293 observan que una activación sostenida de Erk activa caspasa 8 e induce apoptosis<sup>130</sup>, y en células renales (OK) se observó que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis activando Erk y caspasa 3<sup>131</sup>.

Erk también es capaz de fosforilar los coactivadores de la familia p160, aumentando su actividad transcripcional y en este caso estaría contribuyendo a la supervivencia celular<sup>132</sup>.

### **2.2. Familia de proteínas JNKs**

Las JNKs de mamíferos conocidas hasta el momento son codificadas por tres genes, jnk1, jnk2, y jnk3, los cuales dan lugar a productos proteicos de 46 y 54 kDa por

*splicing* alternativo. Como se mencionó anteriormente las proteínas JNKs son capaces de fosforilar específicamente el factor de transcripción c-jun el cual forma parte del complejo de transcripción AP-1<sup>133</sup>. La regulación del camino de transducción de señales que activa a JNK es extremadamente complicada y se encuentra influenciada por muchas MAPKKK distintas. Hasta el momento se encontraron 13 MAPKKK que pueden regular a las JNKs<sup>134</sup>. Esta diversidad de MAPKKK permite que una gran variedad de estímulos activen a esta quinasa. Las JNKs están involucradas en la regulación de la apoptosis y la respuesta inflamatoria<sup>135</sup>.

En trabajos con células Jurkat se encontró una correlación entre la activación persistente de JNK y el daño al ADN luego de una fuerte radiación<sup>136, 137</sup>. Se observó que varios estímulos que inducen apoptosis como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y TRAIL activan a JNK en distintos tipos celulares<sup>113, 138</sup>. Estos últimos datos contribuyeron con la hipótesis de JNK como una potencial molécula mediadora de señales apoptóticas.

### 2.3. Familia de proteínas p38

La familia de proteínas quinasa p38 está compuesta por cuatro isoformas de la proteína p38: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  (Erk6), y p38 $\delta$  (también conocidas como SAPK2a, 2b, 3 y 4 respectivamente). Las cuatro isoformas comparten entre un 60-70 % de identidad en sus secuencias aminoacídicas.<sup>139</sup> Todas las isoformas son fosforiladas y activadas fuertemente por la MAPKK, MKK6 *in vitro*. Otras MAPKK muestran una especificidad más restricta, por ejemplo MKK3 activa p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$ , y p38 $\delta$ , mientras que MKK4 sólo activa p38 $\alpha$ . Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran expresadas en la mayoría de los tejidos, mientras que las isoformas  $\gamma$  y  $\delta$ , tienen una expresión mucho más limitada. Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  pueden inhibirse con SB203580 y SB202190 respectivamente<sup>140</sup> (Figura 8).

Dentro de los sustratos de esta quinasa se encuentran factores de transcripción y proteínas quinasas. Hay por lo menos seis proteínas quinasas que pueden ser reguladas por p38. Dentro de este grupo se encuentran: MAPKAPK2 (proteína quinasa 2 activada por MAP); MAPKAPK3; MNK1 (quinasa 1 de interacción con MAPK); MNK2; PRAK y MSK (proteína quinasa activada por mitógenos o estrés).

La p38 quinasa está involucrada en la regulación de diversos procesos celulares como, apoptosis, regulación de la respuesta inmune en particular durante la inflamación,

y se encuentra mayormente asociada a la proliferación, diferenciación y supervivencia en distintos tipos celulares de vertebrados<sup>141, 142</sup>. También se encuentra relacionada con la activación de NF- $\kappa$ B, algunas evidencias muestran que TNF- $\alpha$  requiere de la actividad de p38 para inducir la transactivación de NF- $\kappa$ B<sup>76, 143</sup>.

En células HEK293 se describió que el shock osmótico y el arsénito inducen una fuerte activación de p38, pero no de NF- $\kappa$ B, en cambio el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de activar moderadamente a p38 y fuertemente a NF- $\kappa$ B, estos resultados indicarían que ambas moléculas son activadas por vías independientes y convergen en el núcleo, dependiendo el estímulo<sup>144</sup>.

#### **2.4. Localización subcelular de MAPKs**

Las MAPKs se localizan predominantemente en el citoplasma en células quiescentes. Sin embargo, la estimulación de las células con distintas señales provoca un aumento de estas proteínas en el núcleo. Esto se ha observado para Erk 1/2 y JNK<sup>145</sup>. Tanto, proteínas nucleares como citoplasmáticas son blanco de acción de las MAPKs. Estos datos apoyan la teoría de que las MAPKs pueden translocar al núcleo y que esta translocación estaría vinculada a su estado de activación. Hay evidencias que muestran que Erk1/2 es capaz de translocar al núcleo en forma de dímero y que el dímero fosforilado en treonina y tirosina constituiría la forma activa<sup>146</sup>.

Por otro lado nuevas evidencias muestran que la proteína MAPKAPK2 un sustrato de p38 $\alpha$  se localiza primariamente en el núcleo pero luego de una señal de estrés es capaz de translocar al citoplasma. Esta translocación permite el pasaje de p38 $\alpha$  al citoplasma y su permanencia en este compartimento celular está mediada por la interacción con MAPKAPK2 que actuaría también como proteína de anclaje de la misma en este caso<sup>147</sup>.

### **3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K Y ACTIVACIÓN DE AKT**

Muchas rutas de transducción de señales convergen o regulan la enzima PI3-quinasa. Diferentes estímulos como la activación de receptores del tipo tirosina quinasa, la activación de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G y



la activación de la proteína Ras pueden ser reclutadas en membrana y activar a PI3-quinasa. Una vez activa, esta enzima cataliza la fosforilación en la posición 3'-OH de los anillos porfirínicos de fosfatidilinositoles (PI) específicos, dando como productos de esta reacción fosfatidilinositol 3,4,-bisfosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Estos lípidos son potentes efectores reconocidos por proteínas que contienen dominios PH (dominios homólogos a *pleckstrin*), como es el caso del enzima serina/treonina quinasa PKB/Akt<sup>148</sup>. El dominio PH de Akt recluta a este enzima en la membrana mediante el reconocimiento de lípidos inositoles generados por la activación de PI3-quinasa. Este cambio de localización celular, permite que Akt sea fosforilado por enzimas de la familia PDKs (quinasa dependiente de fosfoinositol) en Tre-308 y Ser-473, activando de esta manera su actividad catalítica. La enzima Akt activada fosforila los aminoácidos serina o treonina de una multitud de proteínas que poseen la secuencia aminoacídica consenso RxRxxS/T en su estructura primaria; generando señales de citoprotección<sup>149</sup>.

Esta proteína inhibe la apoptosis fosforilando muchas proteínas de la maquinaria apoptótica que presentan la secuencia consenso RxRxxS/T, e interacciona directamente con Bad, caspasa 9, y factores de transcripción pertenecientes a la familia Forkhead y quinasas como IKK que regula a NF- $\kappa$ B, cada uno de los cuales desempeña una función crítica en el control de muerte celular<sup>149</sup>.

Varios oncogenes y genes supresores de tumor, son regulados por Akt. Por ejemplo Ras y Bcr/Abl, requieren de la activación de Akt para promover la oncogénesis<sup>150</sup>. La sobreexpresión de Akt promueve la oncogénesis. Por ejemplo, Akt2 ha sido encontrada amplificada con alta frecuencia en tumores de páncreas, mama y ovario<sup>151</sup>. Akt promueve la oncogénesis no solo por suprimir la apoptosis bajo ciertas circunstancias, también induce progresión del ciclo celular<sup>152</sup>.

El proceso de muerte y supervivencia celular está gobernado finalmente por el control de expresión de genes específicos en el núcleo celular. Este control lo ejercen familias de moléculas como los receptores nucleares y los factores de transcripción, en particular NF- $\kappa$ B, a los cuales nos referimos a continuación.

## 4. RECEPTORES NUCLEARES

### 4.1. Características generales de receptores nucleares

Los receptores nucleares son factores de transcripción inducibles por ligandos específicos, presentes en vertebrados, artrópodos y nematodos. Regulan numerosos eventos fisiológicos de alta complejidad, que terminan gatillando una serie de respuestas durante el desarrollo, controlan el mantenimiento de la homeostasis e inducen o inhiben la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Estas proteínas juegan un rol crucial en la vida del organismo<sup>153</sup>.

Los receptores nucleares son proteínas que regulan la transcripción uniéndose selectivamente a secuencias específicas de ADN, mayoritariamente como dímeros, a través de dos módulos característicos de dedos de zinc y una región de dimerización que determina si se forman homodímeros o heterodímeros. Poseen una función de activación (AF) que les confiere el potencial de transactivación a dominios heterólogos de unión al ADN.

Los ligandos específicos que se unen a estas proteínas en los dominios de unión del ligando (LBD) tienen la propiedad de inducir la transactivación intrínseca de estas moléculas. Entre los ligandos para receptores nucleares se encuentran esteroides, retinoides, vitamina D, hormona tiroidea, prostanoides y farnesoides. Debido a que esta familia de moléculas contiene receptores intracelulares, se convierten en mediadores directos de la acción de hormonas. Si bien algunos receptores se encuentran inicialmente en el citoplasma formando complejos con proteínas que actúan como chaperonas y subsecuentemente translocan al núcleo luego de la interacción con su ligando, algunos de ellos están prelocalizados en el núcleo, presumiblemente unidos al ADN<sup>154</sup>.

### 4.2. Tres grandes familias

Dentro de esta superfamilia de receptores nucleares se han identificado diferentes subfamilias: los receptores de tipo I (“clásicos” o “esteroideos”) incluyen aquellos para progesterona (PR), estrógenos (ER), andrógenos (AR), el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR); los receptores de tipo II incluyen aquellos para la hormona tiroidea (TR), ácidos *trans* retinoicos (RAR), ácido

9-*cis* retinoico (RXR) y vitamina D<sub>3</sub> (VDR); los receptores de tipo III incluyen los receptores huérfanos cuyos ligandos aún no han sido caracterizados<sup>155, 156</sup>. Los receptores de tipo I, en ausencia de ligando, están secuestrados y asociados con proteínas de shock térmico y, en este estado, no regulan la tasa de transcripción de sus promotores. En cambio, los receptores de tipo II son capaces de unirse al ADN en ausencia de ligando y generalmente ejercen un efecto de represión sobre sus promotores, un fenómeno conocido como silenciamiento<sup>157</sup>. Los receptores de tipo I se unen a secuencias palindrómicas, en forma de homodímeros, únicamente en presencia de ligando, mientras que los receptores de tipo II se unen constitutivamente a sus elementos de respuesta, que contienen repeticiones directas. Además, éstos exhiben patrones de dimerización promiscuos y muchos involucran heterodimerizaciones con RXR. Ese tipo de interacciones podría modular la gran amplitud de respuestas transcripcionales ante un determinado ligando específico<sup>158</sup>.

### 4.3. Estructura molecular

La estructura de los receptores nucleares comprende una serie de dominios altamente conservados: una función de activación en el extremo aminoterminal (dominio A/B o AF-1), un dominio de unión al ADN (LBD o C), una región bisagra (D) y un dominio de unión del ligando en el extremo carboxiterminal (LBD o E), donde también se encuentra una segunda función de activación (AF-2)<sup>159-161</sup>. Otras funciones fueron propuestas para el LBD, incluyendo la unión del ligando<sup>162</sup>, interacción con proteínas de choque térmico (hsp)<sup>163</sup> y localización nuclear<sup>164</sup>.

El proceso de activación por ligando requiere la activación del receptor por la hormona, un cambio en la estructura del receptor y una disociación de las hsp, translocación al núcleo (en el caso de GR, MR, AR y PR), la dimerización, y la unión del receptor a su secuencia específica en el ADN. El proceso por el cual los receptores, una vez activados y unidos a sus secuencias específicas, regulan la activación de la transcripción, está mucho menos caracterizada.

## 5. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-κB

El Factor Nuclear *kappa* B (NF-κB) es un factor de transcripción activable de eucariotas, expresado en un amplio número de tejidos, sobre todo de particular importancia para las células del sistema inmune. Fue descrito por primera vez en 1986 como un factor nuclear necesario para la transcripción de la cadena liviana kappa de las inmunoglobulinas en células B (de ahí viene su nombre) <sup>165</sup>. En células B maduras y en plasmocitos, NF-κB está localizado en el núcleo donde se une a una región de 10 pares de bases del *enhancer* intrónico kappa y activa la transcripción. Originalmente se pensaba que NF-κB no se producía en otras células que no fueran las células B, dado que no podía ser detectado en otras líneas celulares mediante ensayos de cambios de movilidad electroforética (EMSA o *gel shift*), usando el sitio de unión de la cadena liviana kappa. Más tarde se descubrió que la habilidad de unirse a estas secuencias estaba enmascarada por un inhibidor <sup>166, 167</sup>, y ahora se sabe que NF-κB preexiste en el citoplasma de la mayoría de las células en su forma inactiva, unido a su molécula inhibitoria. Luego de la señal apropiada, NF-κB es liberado de su inhibidor y transloca al núcleo donde es capaz de regular la actividad transcripcional de genes específicos <sup>168</sup>. Es de notar que NF-κB es un factor activable que responde a diversas señales, y el hecho de que no requiera de síntesis de proteína, permite a la señal ser transmitida rápidamente.

Actualmente es sabido que el factor de transcripción NF-κB regula positivamente la expresión de numerosos genes involucrados en respuestas inmune e inflamatoria en mamíferos, como citoquinas, moléculas de adhesión celular, factores del complemento e inmunoreceptores siendo clave para gatillar la primera línea de defensa contra las amenazas de la salud del organismo <sup>168</sup>. Está involucrado en numerosas respuestas biológicas, tal como se describe más adelante en esta introducción.

### 5.1. Estructura molecular de NF-κB

NF-κB existe en el citoplasma celular de la mayoría de los tipos celulares como homodímeros o heterodímeros de una familia de proteínas emparentadas <sup>169</sup>. Cada miembro de esta familia contiene una región amino terminal conservada de 300 aminoácidos llamada Dominio de Homología a rel (RHD), donde están presentes los dominios de unión al ADN, de dimerización, de interacción con distintos miembros de

proteínas de la familia I $\kappa$ B y la señal de localización nuclear (NLS) (Figura 8). Tanto los dominios amino-terminales como los carboxilo-terminales están involucrados en la unión de esta molécula al ADN<sup>170</sup>.

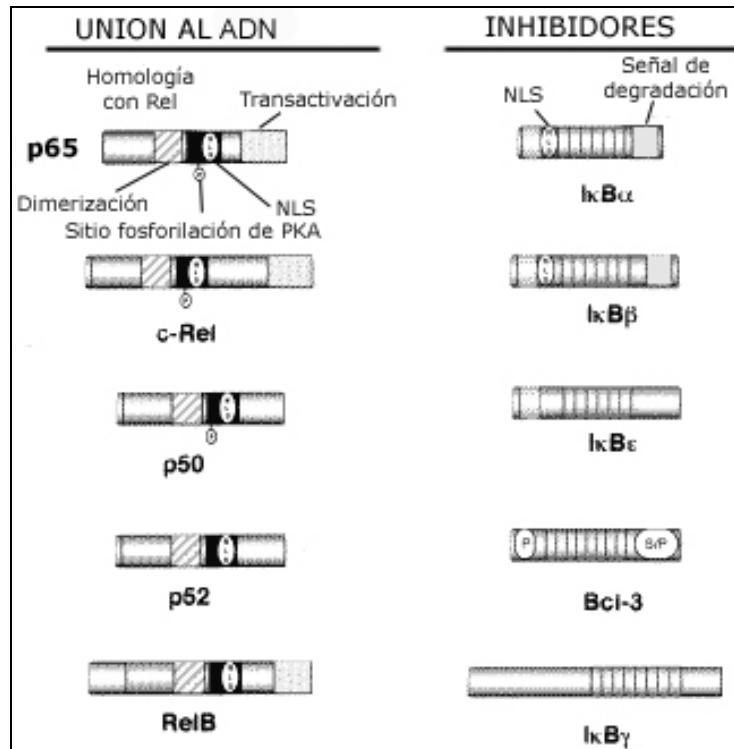
La primera molécula de NF- $\kappa$ B descrita fue el heterodímero formado por las subunidades p50 y p65<sup>171</sup>, siendo el dímero mas abundante, aunque ya se sabe que existe una gran diversidad de miembros. Hasta el momento fueron identificadas en células de mamíferos cinco proteínas que pertenecen a la familia de NF- $\kappa$ B: Rel-A, c-Rel, Rel-B, NF- $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100)<sup>172</sup> (Figura 4). Debido a que cada una de estas dos proteínas de la familia rel que forman el complejo hace contacto con la mitad del sitio de unión al ADN, las pequeñas variaciones en la secuencia consenso de 10 pares de bases ( $5'$ GGGGYNNCCY $3'$ ) confieren una preferencia específica por las combinaciones de rel seleccionadas para armar el dímero de NF- $\kappa$ B<sup>173</sup>. Aunque la mayoría de las combinaciones de proteínas que conforman el dímero NF- $\kappa$ B son transcripcionalmente activas, algunas combinaciones actúan como complejos inactivos o represivos de la transcripción. Por ejemplo las combinaciones p50/p65, p50/c-rel, p65/p65, y p65/c-rel son transcripcionalmente activas, mientras que los homodímeros p50/p50 y p52/p52 son transcripcionalmente represivos, debido a que éstas subunidades no contienen dominios de transactivación<sup>174-178</sup>.

La estructura general del dímero p50 forma una molécula tipo “mariposa” con el sitio de unión al ADN unido fuertemente en el centro, y los dominios tipo inmunoglobulinas formando las “alas” en la periferia<sup>179, 180</sup>.

## **5.2. Familia de inhibidores de la actividad NF- $\kappa$ B**

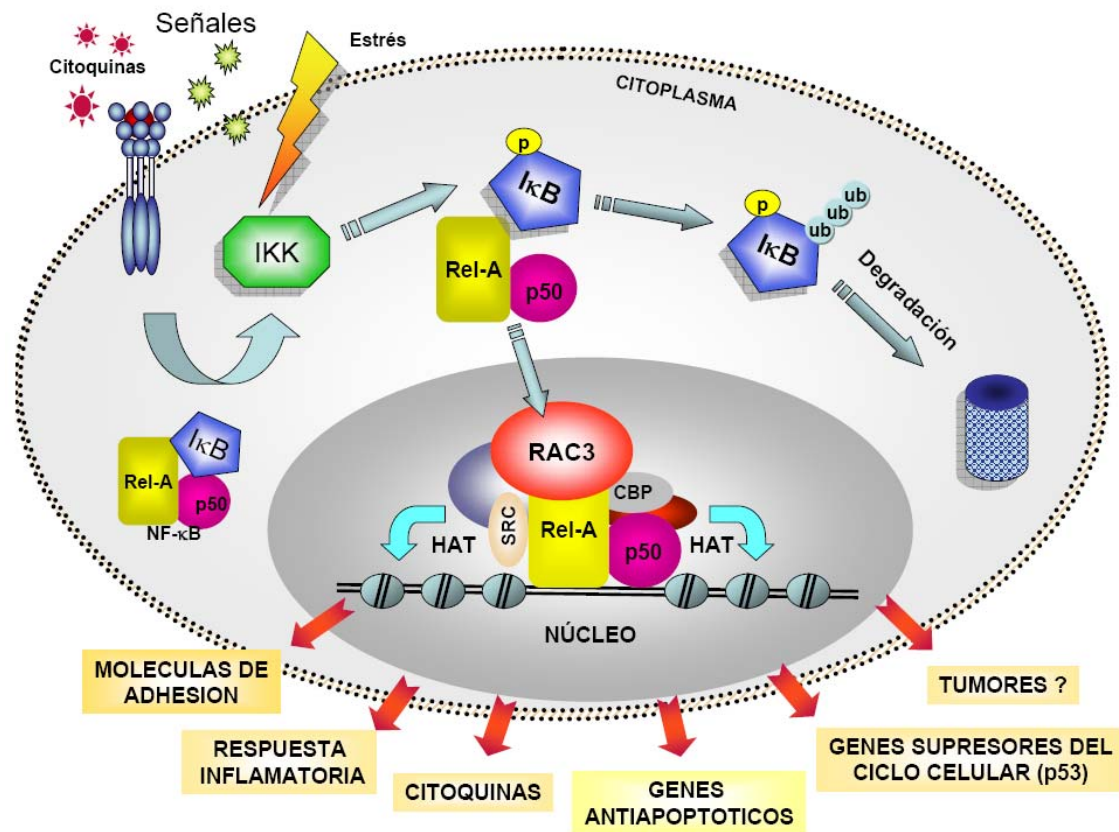
### *5.2.1. Estructura general de las proteínas I $\kappa$ B*

El mecanismo clásico de activación de NF- $\kappa$ B descrito hasta el momento sugiere que NF- $\kappa$ B está presente en el citoplasma celular en su forma inactiva, regulado por su factor inhibitorio I $\kappa$ B, el cual se une a NF- $\kappa$ B enmascarando el sitio de localización nuclear, y por lo tanto reteniéndola en el citoplasma de la célula<sup>167</sup> (Figura 10).



**Figura 9.** Familias de proteínas *NF-κB* e *IκB*. A la derecha, los factores de transcripción *NF-κB* comparten un dominio de aproximadamente 300 aminoácidos llamado el dominio de homología Rel, que media la unión al ADN, la dimerización y la interacción con sus inhibidores. La columna de la izquierda muestra la familia de inhibidores *IκB*, está compuesta por 5 miembros con dominios conservados: el dominio de translocación al núcleo y el dominio de degradación. Adaptado de DeLuca, C., et al., 1999<sup>181</sup>

*IκB* comprende una familia de moléculas inhibitorias, dentro de las cuales están incluidas *IκBα*, *IκBβ*, *IκBε*, *IκBγ*, *BCL-3* y los precursores p100 y p105<sup>182</sup> (Figura 9). La proteína inhibitoria mejor caracterizada es *IκBα*, ya que fue la primera en ser clonada<sup>183</sup>. *IκBα* es una proteína de unos 37 kDa que tiene una organización tripartita, también vista en *IκBβ*: un dominio amino-terminal que es fosforilado en respuesta a señales, un dominio central con cinco repeticiones de ankirina involucrado en la interacción entre proteínas, y un dominio carboxilo-terminal ácido que está unido al dominio de repeticiones de ankirina por un dominio vinculante, que es sensible a proteasas, que permanece protegido por la unión con p65<sup>184</sup>.



**Figura 10.** Rol de IKK y IκB en la activación de NF-κB por distintas señales. Reclutamiento de coactivadores involucrados en la modulación de la actividad de NF-κB e inducción de genes blancos.

### 5.2.2. Mecanismo de acción

Fisiológicamente la característica que define a IκBα es su capacidad de regular, en forma rápida y transitoria, la inducción de la actividad del NF-κB. Luego de la inducción de la cascada de activación de NF-κB, IκBα es fosforilado en las serinas 32 y 36, luego se ubiquitina en las lisinas 21 y 22, quedando así marcado para su degradación por el proteosoma 26S<sup>185</sup>. Este proceso deja descubierto el sitio de localización nuclear (NSL), posibilitando a NF-κB para que interactúe con la maquinaria de importación y translocación al núcleo, donde se une a secuencias consenso de determinados genes para activar su transcripción<sup>186</sup>. Una vez dentro del núcleo NF-κB debe acceder a los promotores y *enhancers* de los genes que regula (Figura 10).

La respuesta de NF- $\kappa$ B ocurre prácticamente en todas las células, la especificidad y la selectividad de este proceso es crucial para que NF- $\kappa$ B sea capaz de mantener la salud del organismo. En parte esto podría deberse a la activación diferencial de distintos complejos de NF- $\kappa$ B, que tienen diferentes especificidades de unión al ADN, lo que lleva a la modulación de distintos genes, y por lo tanto, a diversas acciones biológicas<sup>187</sup>.

Al inhibir la actividad de NF- $\kappa$ B también se regula negativamente su propia actividad, ya que NF- $\kappa$ B induce la transcripción de I $\kappa$ B<sup>188</sup>. Esta regulación ocurre a través de los sitios  $\kappa$ B que existen en el promotor de I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>189</sup>.

Las nuevas moléculas de I $\kappa$ B $\alpha$  sintetizadas son acumuladas en el citoplasma, pero también en el núcleo, donde regulan en forma negativa la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B. Este proceso se logra a través de la inhibición de la interacción de NF- $\kappa$ B con el ADN y la exportación de NF- $\kappa$ B nuevamente al citoplasma<sup>190</sup>. Esta función de I $\kappa$ B $\alpha$  se logra a través de un dominio llamado secuencia de exportación nuclear (NES) presente en la región C-terminal de I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>191</sup>. La secuencia NES está constituida por señales de transporte transferibles que son necesarias y suficientes para mediar un rápido y activo transporte del núcleo al citoplasma, a través de una proteína conocida como CRM1, la cual se la conoce como receptor de secuencias NES<sup>192, 193</sup>.

### 5.2.3. La quinasa IKK regula la actividad proteolítica de I $\kappa$ B

Según el modelo clásico, la activación de NF- $\kappa$ B se logra a través de la inducción de la degradación proteolítica de I $\kappa$ B en el citoplasma<sup>194</sup>. Sin embargo, el modelo clásico de activación de NF- $\kappa$ B está en discusión dado que existen trabajos donde sugieren que el complejo NF- $\kappa$ B:I $\kappa$ B es capaz de moverse del citoplasma al núcleo y *viceversa*, pudiendo existir degradación en el núcleo<sup>195-198</sup>. Determinadas señales extracelulares inician una cascada de señalización que llevan a la activación de la quinasa de I $\kappa$ B<sup>199</sup>. Esta quinasa es conocida como IKK, y juega un rol clave en el proceso de activación de NF- $\kappa$ B<sup>200</sup> (Figura 10).

IKK es un complejo compuesto por tres subunidades: IKK $\alpha$  (IKK1), IKK $\beta$  (IKK2) e IKK $\gamma$  (NEMO, IKKAP)<sup>201</sup>. IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  son las subunidades catalíticas del complejo, compartiendo un 52% de identidad de secuencia, y 65% de identidad en los dominios catalíticos. La tercera subunidad, IKK $\gamma$ /NEMO, es la subunidad regulatoria, y no está relacionada con las subunidades catalíticas<sup>202</sup>. Aunque estudios *in vitro*



demuestren especificidades similares por sus sustrato, la IKK $\beta$  es la quinasa de I $\kappa$ B más potente<sup>203</sup>.

Por medio de análisis de filtración por gel se determinó que la IKK es un gran complejo, de 700-9000 kDa de tamaño, lo que sugiere la presencia de componentes adicionales. Recientemente se determinó que Cdc37 y Hsp90, proteínas involucradas en procesos de maduración, activación y tráfico de proteínas involucradas en transducción de señales, ciclo celular, desarrollo y regulación transcripcional<sup>204</sup>, sirven como componentes adicionales del complejo de IKK<sup>205</sup>.

### 5.3. Activación de NF- $\kappa$ B

Uno de los aspectos más interesantes de NF- $\kappa$ B es que puede ser activado por una amplia variedad de estímulos asociados al estrés o al daño celular. Existen potentes inductores de la activación de NF- $\kappa$ B: citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina (IL)-1 $\beta$  y el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNF (TRAIL), productos bacterianos y virales como lipopolisacáridos (LPS), esfingomielinasa, RNA doble cadena, la proteína Tax del virus de la leucemia de células T de humanos (HTLV-1); estímulos proapoptóticos y necróticos como radicales libres de oxígeno, luz ultravioleta y radiación  $\gamma$ <sup>144, 206-209</sup>.

Aún no existe total acuerdo acerca de cómo los estímulos extracelulares e intracelulares disparan la activación de NF- $\kappa$ B, y en qué puntos las cascadas de señalización convergen.

Los mecanismos de activación explicados anteriormente son los aplicados a los activadores más potentes de NF- $\kappa$ B, sin embargo existen otras vías de activación: hipoxia y la exposición de las células a radiación de UV. En la primera se observa la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  por una tirosina quinasa (fosforilación en tirosina, no en serina) y su posterior interacción con la fosfo-inositol 3 quinasa (PI3K), sin la degradación por el proteosoma 26S<sup>210</sup>. En la segunda vía se observa la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  por el proteosoma 26S, pero es un proceso que no depende de la fosforilación de las serinas ni de la tirosina<sup>211</sup>. En ambos casos, la activación de NF- $\kappa$ B es considerablemente más lenta y débil que la activación por TNF- $\alpha$ , IL-1 o LPS.

#### 5.4. NF- $\kappa$ B regula un amplio número de genes

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B está involucrado en la inducción de numerosos genes, como muestra la tabla 4<sup>171</sup>.

<b>Tabla 4. Genes blanco de NF-<math>\kappa</math>B</b>		
<b>Clase de proteínas</b>	<b>Proteínas inducidas</b>	<b>Respuesta celular</b>
Citoquinas	IL-1, IL-2, IL-2R, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , INF $\beta$ , TRAIL <sup>181, 212-217</sup>	Activación de células del sistema inmune
Moléculas de adhesión	Fibronectina, VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1 <sup>218-221</sup>	Migración y reparación
Proteínas de fase aguda	Angiotensinógeno, proteína amiloide del suero, proteína C4 del complemento, factor B del complemento <sup>222-225</sup>	Inflamación
Proteínas Rel e I $\kappa$ B	p100, p105, Rel b, I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>183, 226-228</sup>	Regulación de la respuesta NF- $\kappa$ B
Proteínas inhibitorias de la apoptosis	Flia Bcl-2, IAPs, XIAP, TRAF1/2, Bcl-XL, c-FLIP <sup>229-232</sup>	Inhibición de la apoptosis
Proteínas pro-apoptóticas	Ligando de Fas y Fas (CD95), Bax <sup>42, 233</sup>	Apoptosis
Protooncogenes	c-myc, c-myb, c-Rel, p53 <sup>234-237</sup>	Tumorigénesis

En particular, NF- $\kappa$ B estimula la producción de citoquinas esenciales para la respuesta inmune: IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , linfotoxina e interferón  $\gamma$ . Estas citoquinas tienen múltiples efectos y contribuyen al proceso de inflamación<sup>238</sup>.

NF- $\kappa$ B juega un papel crucial en muchas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoidea y el asma. También está implicado en otras enfermedades como la arterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas<sup>239</sup> y cáncer<sup>240, 241</sup>. En células asociadas a estas enfermedades, NF- $\kappa$ B presenta localización nuclear constitutiva y está aumentada su actividad transcripcional. En la tabla 1 se enumeran algunas de las enfermedades asociadas a la actividad anormal de NF- $\kappa$ B.

### 5.5. Rol de NF- $\kappa$ B en la tumorigénesis

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

Se ha encontrado que la mayoría de los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B están sobre-expresados o mutados debido a diferentes procesos de translocación en diversos tipos de líneas celulares, leucemias o linfomas<sup>239, 242-244</sup>. Sin embargo, existen otras evidencias que vinculan a NF- $\kappa$ B con la transformación celular independientemente de los eventos de translocación cromosomal. NF- $\kappa$ B es activado por varias proteínas transformantes y, en algunos casos, es requerido para la transformación inducida por virus. Además, su rol como factor anti-apoptótico y regulador en la transición del ciclo celular contribuye a la progresión de la tumorigénesis. La actividad de NF- $\kappa$ B se ve aumentada en diversos tipos de cáncer humanos, como por ejemplo cáncer de mama<sup>245</sup>, próstata<sup>246</sup>, adenocarcinomas<sup>247</sup>, carcinoma de pulmón<sup>248</sup>, cáncer de tiroides<sup>249</sup>, leucemias linfoides T y B<sup>250, 251</sup>, melanomas<sup>252</sup>, cáncer de colon<sup>253</sup>, hepatocarcinoma<sup>254</sup>, leucemia aguda linfoblástica y leucémica mieloide crónica con mutación BCR-ABL<sup>255</sup>, y varios tumores inducidos por virus<sup>256, 257</sup>.

Algunos autores han mostrado que células provenientes de tumores de mama que no responden a tratamiento hormonal (con receptor de estrógeno negativo), dependen de NF- $\kappa$ B para su proliferación celular aberrante evitando la apoptosis<sup>258, 259</sup>. En estos tipos de tumores, a diferencia de los receptor de estrógeno positivos, existe una alta activación de NF- $\kappa$ B y además muestran un incremento en la expresión de p65 en comparación a las otras líneas tumorales<sup>260</sup>.

NF- $\kappa$ B contribuye a la tumorigénesis no solo inhibiendo la apoptosis, esta molécula es capaz de activar proto-oncogenes como c-Myc y ciclina D1<sup>261, 262</sup>. De esta manera, existe un estímulo directo en el cual está involucrado este factor de transcripción en la proliferación celular. También se plantea a NF- $\kappa$ B como el vínculo entre inflamación y cáncer, por ejemplo en trabajos donde estudian modelos de ratón que espontáneamente desarrollan carcinoma hepatocelular, este tipo de cáncer se encuentra asociado con inflamación. En estos estudios logran desactivar a NF- $\kappa$ B en los últimos estadios del desarrollo del tumor, y observan que hay apoptosis de los hepatocitos transformados del carcinoma hepatocelular, el cual no es capaz de progresar<sup>263</sup>.

Tanto la actividad de los receptores nucleares como los factores de transcripción es regulada finalmente por otra familia de moléculas que cooperan en su transactivación a nivel genómico, llamados coactivadores o coreguladores y a los cuales nos referimos a continuación

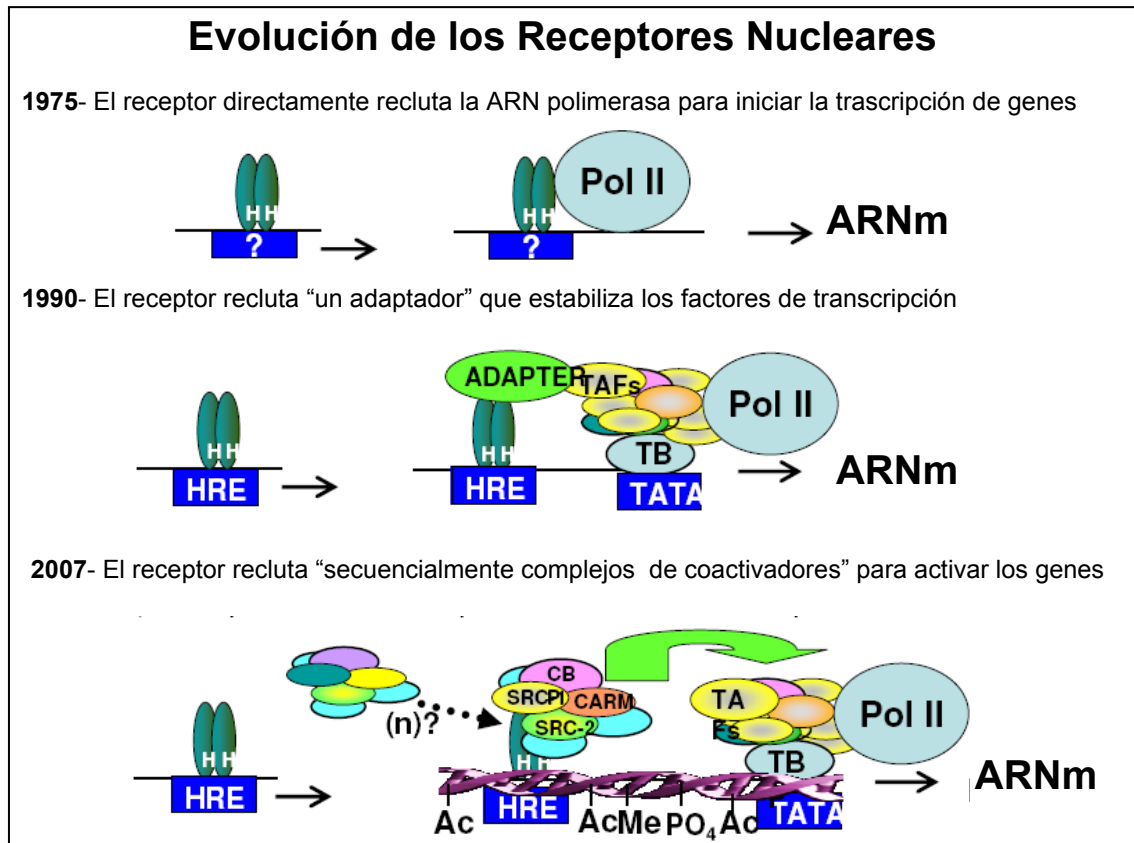
## 6. COREGULADORES

Hoy ya hace más de una década que se describió el primer coactivador de receptores nucleares. SRC-1 fue clonado y descrito como un nuevo tipo de factor de transcripción que no se une a ADN, pero puede unirse directa o indirectamente con los receptores nucleares (RNs) aumentando su actividad<sup>264</sup>.

Los coactivadores de receptores nucleares pertenecen a una clase de moléculas denominadas “coreguladores”. Definimos como coactivadores a las moléculas que pueden aumentar la actividad transcripcional y correpresores las moléculas que bajan esta actividad. Hay nuevas evidencias que indican que esta definición puede ser modificada por las distintas señales, el entorno celular y los genes correspondientes a cada coregulador.

En un principio se creía que los coactivadores eran simples “adaptadores” que estabilizaban la maquinaria general de transcripción al *box TATA*. Esta explicación fue probada y era incorrecta. Sobre la última década, la importancia mecanística de los coreguladores se ha expandido logarítmicamente y sabemos que realizan virtualmente “todo” sobre las reacciones necesarias para el control y el aumento en la expresión de genes (Figura 11).

Los coactivadores existen y funcionan en grandes complejos multiproteicos; estos complejos de coactivadores son reclutados a la secuencia blanco por los RNs<sup>265</sup>, y contienen varias actividades enzimáticas requeridas para la expresión de los genes. Las reacciones sobre la transcripción mediada por coactivadores, incluyen modificación y remodelamiento de la cromatina, iniciación de la transcripción, elongación de la cadena de ARN, *splicing* del ARN y finalización de la transcripción. Recientemente, los coactivadores han sido reportados como controladores de reacciones fuera del núcleo como la traducción del ARNm, funciones mitocondriales y en el tráfico intracelular<sup>266</sup>.



**Figura 11.** Evolución de los receptores nucleares en la transcripción. Adaptado de O'Malley, B., 2007<sup>268</sup>.

Los coactivadores cumplen varios roles en el proceso transcripcional, 1- como moléculas que influyen en puntos clave en diferentes estados de la transcripción, 2- como integradores de los factores de crecimiento y las señales hormonales esteroideas, 3- como agentes que influyen en la carcinogénesis<sup>269</sup>.

Recientemente se ha observado que estos coactivadores sufren modificaciones como fosforilaciones por las kinasas IKK $\alpha$ , ERK y CDK2, modulando la transcripción mediada por los RNs alterando la afinidad entre los distintos coactivadores y los receptores, influyendo sobre los factores de transcripción que son capaces de coactivar<sup>270-272</sup>. Otras modificaciones como acetilaciones y/o metilaciones, promueven la asociación dinámica entre los componentes del complejo de coactivadores<sup>273, 274</sup>.

Principales características de los coactivadores: 1- se unen a RNs directa o indirectamente, 2- no se unen directamente al ADN, 3- los ligandos agonistas promueven la unión del coactivador con los RNs, 4- los ligandos antagonistas inhiben la unión, 5- los coactivadores tienen la capacidad de revertir el silenciamiento de receptor-receptor, 6- la sobreexpresión de los coactivadores aumenta la actividad

transcripcional de los RNs y 7- cuando se introduce en la célula dominantes negativos de los coactivadores bloquean la dependencia endógena de los ligandos por los RNs.

Los reguladores fisiológicos frecuentemente son blancos de patologías y los coreguladores no son una excepción. Hay mas de 270 coreguladores descritos hasta el momento, cerca de 160 de ellos están asociados alguna patología, las más frecuentes son variedades de cáncer en las cuales los coreguladores pueden actuar como oncogenes o supresores tumorales, dependiendo de las señales y el contexto celular<sup>268</sup>. Por ejemplo, el aumento de los niveles de RAC3 en distintos tipos de cáncer<sup>275</sup>, la mutación en E6-AP en enfermedades hereditarias<sup>276</sup>, o el polimorfismo en PCG-1 involucrado en la diabetes tipo II<sup>277</sup>.

Si los coactivadores son los encargados de regular la transcripción, ¿quién regula su expresión o su actividad?

La mayoría de los coactivadores parecen ser regulados por modificaciones post-transduccionales que determinan la estabilidad o el control de su actividad mediante fosforilaciones. La regulación de los niveles celulares de los coactivadores no esta hoy en día muy claro, pero se ha descrito que en algunos casos la sobre-expresión se debe a amplificaciones génicas, aunque en otros casos no y uno de los mecanismos de regulación sería el control en los niveles de degradación<sup>275 278</sup>. En cuanto al control de su expresión, parecería depender también de coactivadores<sup>278</sup>.

## **6. COACTIVADORES DE RECEPTORES ESTEROIDEOS DE LA FAMILIA p160**

La familia de coactivadores de receptores esteroideos p160 (SRC) reúne un grupo de factores sumamente estudiados que funcionan a través de modificaciones enzimáticas, alterando directamente o indirectamente la estructura de la cromatina, y facilitando la iniciación de la transcripción por numerosos factores de transcripción. Sus tres miembros son: SRC-1<sup>264</sup>, el factor intermediario de la transcripción-2 (TIF2; conocido también como GRIP1, SRC-2, NCoA2)<sup>279, 280</sup> y el coactivador asociado al receptor de ácido retinoico-3 (RAC3: conocido también como SRC-3, AIB1, TRAM-1, P/CIP)<sup>275, 281-284</sup>. Estos tres miembros poseen una alta homología, y es por ello que se los agrupa dentro de la misma familia (Figura 12).

Existen reportes donde muestran la alteración en la expresión de coactivadores, aparentemente específica para determinados tipos celulares y tejidos. Por ejemplo, el estradiol disminuye la expresión del ARNm de SRC-1 y la T3 aumenta su expresión en células GH3 de pituitarias de ratas<sup>285</sup>. El ácido retinoico aumenta la expresión de RAC3 en células de tumor de mama A549 y MCF-7<sup>286-288</sup>. La estimulación de la PKA está asociada con la reducción de TIF2, pero no con su expresión<sup>289</sup>.

SRC-1 y TIF2 fueron identificados a través de ensayos de interacción con receptores esteroideos (PR, ER, TR y GR), y de ahí viene el nombre de la familia que los incluye. RAC3, por su parte, fue identificado en una región cromosómica amplificada de una línea celular derivada de cáncer de mama, y posteriormente caracterizado como coactivador de receptores nucleares homólogo a SRC-1 y TIF2<sup>275</sup>. Los tres miembros de la familia SRC son capaces de interactuar con los receptores nucleares de forma ligando dependiente, y aumentar en forma significativa los niveles de actividad transcripcional de los receptores nucleares en forma dosis dependiente<sup>290</sup>.

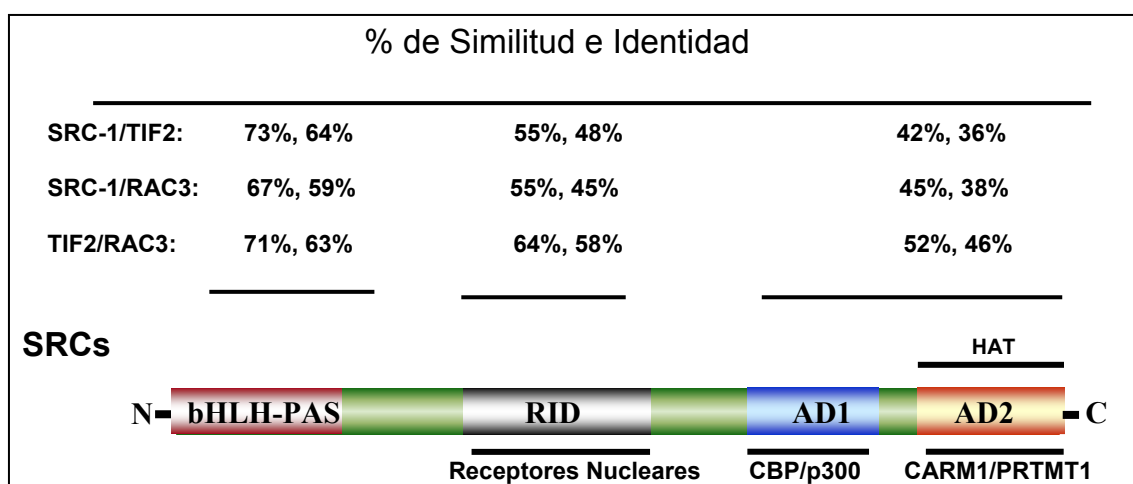
Además de servir como coactivadores de los receptores nucleares, nuestro grupo de trabajo y otros autores vimos que estas moléculas son capaces también de interactuar y promover significativamente la actividad transcripcional de otros factores de transcripción, como el factor de respuesta a suero (SRF)<sup>291</sup>, la proteína de activación-1 (AP-1)<sup>292</sup>, NF- $\kappa$ B<sup>293</sup>, y la proteína de unión a elementos regulatorios de cAMP (CREB)<sup>284</sup>. Cuando estos coactivadores son expresados en cultivos celulares, funcionan no sólo como coactivadores generales de los receptores nucleares, sino también como coactivadores de un número limitado de otros factores de transcripción.

### 7.1 Estructura general de SRCs

Las proteínas codificadas por la familia de genes de la familia de SRC, tanto en humanos como en roedores, tienen una masa molecular relativa de alrededor de 160 kDa, y entre ellos tienen una similitud de secuencia de 50-55%, y una identidad de secuencia de 43-48%. Los miembros de esta familia comparten una estructura común que incluye un dominio básico de hélice-vuelta-hélice en el extremo amino-terminal, un dominio de homología Per/ARNT/Sim (PAS), un dominio de activación transcripcional carboxilo-terminal, y una región central que contiene tres motivos de LXXLL (donde L es leucina y X es cualquier aminoácido) que interactúa con receptores nucleares<sup>158, 282, 284, 294</sup> (Figura 12).

Los SRCs tienen dos dominios de activación transcripcional (AD1 y AD2). La región AD1 es responsable de la interacción con el coactivador general de unión a CREB (CBP) y p300, pero no interacciona con los receptores nucleares<sup>295</sup>. La región AD2 es capaz de interactuar con metiltransferasas, las cuales provocan el remodelamiento de la cromatina en forma local y el ensamblado de la maquinaria de transcripción en el promotor<sup>296,297</sup> (Figura 12).

El motivo LXXLL dentro del RID forma una hélice-alfa anfipática que une la hendidura hidrofóbica de los LBD de los receptores nucleares luego de la unión del ligando<sup>298</sup>. Aunque mutaciones en alguno de los tres motivos de LXXLL (L1, L2 y L3) no produce la anulación de la interacción del SRC con los receptores nucleares, se vio que diferentes motivos de LXXLL y el contexto de la secuencia donde se encuentran estos motivos, contribuyen a la unión selectiva de diferentes receptores nucleares<sup>299</sup>.



**Figura 12.** Esquema de los SRCs con sus dominios conservados, básico de hélice-vuelta-hélice (bHLH); dominios homólogos a Per/ARNT/Sim (PAS); dominio de interacción con receptores nucleares (RID), dominio de activación transcripcional (AD1 y AD2), dominio de interacción con CBP (AD1) y dominio de transferencia de acetilo a las histonas o de unión a metilasas. Adaptado de Xu y Li, 2003<sup>273</sup>.

## 7.2 Mecanismos de acción

Está demostrado que SRC-1 y RAC3 contienen actividad histona acetil transferasa (HAT), presentes en los dominios carboxilo-terminales<sup>282, 300</sup>. A pesar de que estos dos coactivadores poseen actividad HAT, esta actividad es mucho más débil que aquella presente en CBP, p300 y p/CAF<sup>300, 301</sup>.



Los coactivadores de la familia p160 también son capaces de interactuar con coactivadores generales como CBP y p300<sup>284, 301</sup>, permitiendo a los receptores nucleares reclutar más enzimas con actividad HAT a la vecindad de los sitios blanco luego de la unión al ligando. Sumado a la actividad HAT, la metilación de proteínas mediada por coactivadores en la maquinaria de transcripción también contribuiría a la regulación de los receptores nucleares<sup>296</sup>. Por ejemplo, la metil transferasa de arginina asociada a coactivadores (CARM-1) se une a la región carboxilo-terminal de los coactivadores de la familia p160 y es capaz de metilar a la histona H3, aumentando de esta manera la activación transcripcional mediada por los receptores nucleares<sup>302</sup>.

Aunque los miembros de la familia de SRCs tienen cierta redundancia funcional, cada vez hay más evidencia que sugiere que los SRCs tienen roles diferentes en los procesos biológicos. A pesar de que los tres miembros de la familia p160 poseen propiedades similares en cuanto a interacción con receptores nucleares y el aumento de su transactivación, varios reportes sugieren que sus actividades no se superponen, y que existe una división entre las funciones de SRC-1 y TIF2 *versus* RAC3. El ARNm y los niveles de proteínas de RAC3 son mayores en líneas celulares de cáncer de mama como las BT-474, MCF-7 y ZR75 en comparación con otras líneas celulares<sup>275</sup>.

SRC-1 y TIF2 están expresados en bajos niveles en estas líneas celulares, lo que sugiere que RAC3 está específicamente involucrado en la patogénesis de estos tipos de tumores. Más aún, la viabilidad de ratones SRC-1<sup>-/-</sup> podría deberse en parte a la sobreexpresión compensatoria que se observa de TIF2 en algunos tejidos<sup>303</sup>. Los niveles de RAC3 no cambian en estos tejidos en comparación con los ratones salvajes, apoyando la idea de un rol funcional diferente de este coactivador *versus* TIF2 y SRC-1. Los ratones SRC-1<sup>-/-</sup> exhiben resistencia parcial a hormonas y una reducción en el crecimiento de órganos blanco de esteroides en respuesta a estimulación hormonal<sup>303</sup>. Mientras que la eliminación de TIF2 demuestra que juega un rol crítico en las funciones reproductivas del ratón<sup>304</sup>, los ratones RAC3<sup>-/-</sup> poseen retardo en el crecimiento, tamaño menor, función reproductiva reducida y una inhibición del desarrollo de la glándula mamaria<sup>305, 306</sup>.

SRC-1 y TIF2 poseen preferencias de unión a nueve diferentes receptores nucleares similares, pero estas preferencias no son idénticas. Por ejemplo, el AR se une perfectamente bien a TIF2, mientras que lo hace de manera muy débil a SRC-1<sup>307</sup>. Las preferencias de los receptores nucleares a diferentes coactivadores está vinculada con la estructura del dominio de unión al ligando de los receptores nucleares<sup>307-309</sup>. Por

ejemplo, el receptor de vitamina D y el ER $\beta$  interactúan con distintos motivos del dominio de interacción con los receptores nucleares del RAC3<sup>310</sup>, lo mismo ocurre con distintos dominios TIF2 y las afinidades que tienen los dominios de este coactivador para interactuar con el GR y el TR<sup>309</sup>.

Así como existen diferencias en cuanto a las afinidades por los diferentes receptores nucleares y diferencias en cuanto a la utilización de distintos dominios en los sitios de unión a los receptores nucleares en los coactivadores, también está demostrado que existe cierto orden por el cual los coactivadores van armando el complejo con los receptores nucleares. Está demostrado, por ejemplo, el efecto que tienen las interacciones iniciales entre coactivador y receptor en el ensamblado del complejo coactivador en el promotor del virus de tumor mamario murino (MMTV): luego del tratamiento con esteroides, tanto el PR como el GR son reclutados al promotor MMTV, y se produce la posterior inducción de la transcripción. Se vio que el PR recluta preferencialmente a SRC-1 y CBP, mientras que el GR se asocia preferencialmente con TIF2, quien luego recluta a pCAF<sup>311</sup>.

Se sugiere que los distintos SRCs juegan roles diferenciales en procesos biológicos y esta diferencia funcional puede resultar en parte por el reclutamiento preferencial de coactivadores. El contenido de coactivadores en cada tipo celular podría ser clave en el control de distintas funciones biológicas y podría contribuir a la resistencia a terapias anti-tumorales.

### 7.3. SRC-1

SRC-1 fue identificada en 1995 a través de ensayos de doble híbrido en levaduras interactuando y promoviendo la actividad transcripcional del PR. Mediante ensayos de *Northern blot* de tejidos humanos y líneas celulares se determinó que se expresa como dos ARNm de 5,5 y 7,5 kb en una variedad de tejidos<sup>264</sup>.

Localizado en el cromosoma 2 (p23) en humanos, y en el cromosoma 12 (A2-3) en ratón<sup>312, 313</sup>, el gen que codifica para el coactivador SRC-1 codifica para una proteína ampliamente expresada en muchos tejidos y tipos celulares. La expresión de SRC-1 fue detectada por ensayos de *Northern blot* en tejidos de cerebro, músculo esquelético, pulmón, riñón, pituitaria, estómago, bazo, testículos, corazón, páncreas, hígado, hipotálamo, glándula adrenal y glándula tiroidea<sup>285</sup>. La proteína de SRC-1 fue identificada en testículos, cerebro, pulmón, hígado y corazón<sup>303</sup>. El fenotipo de ratones

*knock out* para el gen de SRC-1 está caracterizado por la viabilidad y fertilidad de ambos sexos, sin embargo, se observa una significativa disminución de crecimiento de órganos blanco de hormonas esteroideas, como la próstata, testículos y glándula mamaria, en respuesta a estimulación hormonal<sup>303, 314</sup>.

### 7.3.1. SRC-1 juega un rol importante en el desarrollo y función del cerebro

La regulación negativa de SRC-1 por infusión de oligonucleótidos antisentido en el hipotálamo de ratas femeninas, tratado con andrógenos en estado neonatal, reduce significativamente el volumen del SDN y bloquea el comportamiento defeminizado. De la misma manera, ratas macho tratadas con el antisentido de SRC-1 en etapa neonatal, muestran niveles más altos de comportamiento femenino. Estos resultados sugieren que SRC-1 juega un rol importante en el desarrollo del SND y la defeminización comportamental mediado por el ER durante la diferenciación sexual en el desarrollo del cerebro<sup>315</sup>.

### 7.3.2. Rango de acción de SRC-1

Varios estudios indican que SRC-1 es capaz de mediar las interacciones funcionales entre los dominios AF-1 y AF-2 de los receptores esteroideos, lo que indicaría que el ensamblado del complejo de iniciación de la transcripción podría estar asistida por este coactivador<sup>295</sup>. Este coactivador posee un amplio rango de especificidad para el aumento de activación de la transcripción de los receptores nucleares dependientes de ligando. Entre estos receptores se encuentran el receptor de progesterona, el receptor de glucocorticoides, el receptor de estrógeno, el receptor de la hormona tiroidea (TR), los receptores de ácido trans retinoico (RXR)<sup>264</sup>, el factor nuclear 4 de hepatocitos (HNF-4)<sup>316</sup> y el receptor de proliferación de peroxisoma activado (PPAR $\gamma$ )<sup>317</sup>.

En ratones SRC-1<sup>-/-</sup> se observa una resistencia parcial a la hormona tiroidea (TH) ya que los niveles de hormona tiroidea T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y tirotropina (TSH) están significativamente aumentados en el suero con respecto a los ratones normales. Estos resultados demuestran que SRC-1 es requerido para la regulación negativa de TSH por T<sub>3</sub>, apoyando la hipótesis de que la resistencia a TH en humanos puede ser causada por

defectos en coactivadores del TR, como SRC-1<sup>318</sup>. El rol de SRC-1 en la función de PPAR $\gamma$  dependería del tejido, ya que en hígado, los genes regulados por el factor de transcripción PPAR $\gamma$  no requerirían de su función<sup>319</sup>, pero en grasa parda, el PPAR $\gamma$  gatilla el reclutamiento de un complejo coactivador que contiene PCG-1, SRC-1 y CBP/p300, necesarios para su activación<sup>320</sup>. La inactivación de SRC-1 impide la actividad termogénica de PGC-1 en la grasa parda, disminuye el gasto de energía, y provoca obesidad si se trata al animal con una dieta rica en grasas<sup>321</sup>.

Además de estos receptores nucleares, es notable la capacidad de SRC-1 en la activación de otros factores de transcripción no relacionados con los receptores nucleares como AP-1<sup>322</sup> y NF- $\kappa$ B<sup>323</sup>.

De acuerdo con los modelos previamente establecidos, existe un antagonismo mutuo entre GR y NF- $\kappa$ B que explica la actividad inmunosupresora de los glucocorticoides. Uno de los modelos establece una interacción física entre ambas moléculas y el secuestro en el citoplasma de estos factores<sup>324</sup>. El otro modelo plantea la inducción del gen inhibidor de NF- $\kappa$ B, el I $\kappa$ B por GR<sup>325</sup>. La gran promiscuidad de SRC-1 llevó a algunos autores al estudio del rol de esta molécula en funciones antagónicas, y se planteó un modelo de competencia entre GR y NF- $\kappa$ B por la unión de coactivadores que se encuentran en cantidades limitantes. Similares resultados fueron obtenidos por nuestro grupo en el estudio del coactivador RAC3<sup>293</sup>.

#### **7.4. TIF2: Factor Intermediario de la Transcripción**

TIF2 fue identificado por primera vez en 1996, en ensayos de doble híbrido de levadura, asociado al dominio de unión a hormona del receptor de glucocorticoides<sup>326</sup>. El gen que codifica para TIF2 está localizado en el cromosoma humano 8 (q21), y su ARNm detectado en numerosos tejidos: placenta, testículos, cerebro, hígado, corazón y útero<sup>288, 303, 327</sup>. La proteína TIF2 fue detectada en testículos, pulmón, cerebro, hígado y corazón, mediante ensayos de *Western blot*<sup>284</sup>. Mediante ensayos de inmunohistoquímica, fueron detectados diferentes niveles de TIF2 inmunoreactivo en células epiteliales de varios tejidos, entre ellos el tracto gastrointestinal, el páncreas, el riñón, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, pulmón y glándula adrenal. La proteína TIF2 es también expresada en células del estroma del colon, del útero y en

glándula mamaria. No se detectó a TIF2 en hepatocitos, glándula tiroide ni músculo estriado mediante ensayos de inmunohistoquímica<sup>328</sup>.

#### 7.4.1 Estructura general

Esta molécula posee dos dominios de activación autónomos AD1 y AD2 capaces de estimular la transcripción. Posee un único dominio de interacción con receptores nucleares (RID), compuesto por tres módulos que contienen el motivo LXXLL. La actividad del dominio AD1 estaría mediada por CBP, mientras que el dominio AD2 es independiente de la interacción con CBP<sup>280</sup>. En 1998 el grupo dirigido por Gronemeyer demostró que un péptido conteniendo el RID del TIF-2 es capaz de inhibir la actividad dependiente de ligando de numerosos receptores nucleares, demostrando de esta manera que la actividad AF2 de los receptores nucleares es dependiente del TIF-2 endógeno o de otros coactivadores que reconozcan una superficie similar en los dominios LBD de los receptores nucleares<sup>280</sup>.

#### 7.4.2 Rol fisiológico

Los ratones TIF2<sup>-/-</sup> muestran crecimiento somático normal, sin embargo la fertilidad está disminuida en forma significativa tanto en machos como en hembras. La hipofertilidad en machos se debe a la disminución en el número de espermatozoides, maduración defectuosa del acrosoma, espermátida y degeneración testicular dependiente de la edad. Los defectos en la fertilidad masculina podrían estar originados en las células de Sertoli, ya que TIF2 está expresado en los testículos, y más específicamente en este tipo celular. La ausencia de TIF2 en este tipo celular lleva a la acumulación de lípidos, apoptosis germinal, y desprendimiento de las células germinales de las células de Sertoli<sup>304</sup>. La hipofertilidad en ratones TIF2<sup>-/-</sup> femeninos se debe a la hipoplasia de la placenta causada por la falta de TIF2 en células estromales que llevan al desarrollo de la placenta<sup>304</sup>. Los ratones TIF2<sup>-/-</sup> no presentan un comportamiento sexual diferente al de los ratones normales, sin embargo, en ratas, cuando son tratadas con oligonucleótidos antisentido para TIF2 en el hipotálamo, estas ratas hembras presentan un bloqueo en el comportamiento sexual<sup>329</sup>.

### 7.4.3 TIF2 es clave en el metabolismo de los lípidos

Esta demostrado que TIF2 juega un rol importante en el metabolismo de los lípidos y el balance energético<sup>321</sup>. En tejido adiposo blanco, TIF2 funciona como coactivador para PPAR $\gamma$ . En ratones TIF2<sup>-/-</sup>, el tejido adiposo blanco expresa niveles de transcripción superiores de leptina y niveles inferiores de genes involucrados en la antilipólisis y reabsorción de ácidos grasos. Entre estos genes están las perilipinas, la proteína de unión a ácidos grasos aP2, lipasa de lipoproteína y el PPAR $\gamma$ , provocando niveles de lipólisis mayores y un bajo potencial para el almacenamiento de los ácidos grasos. En el tejido de grasa parda, SRC-1 es mejor coactivador que TIF2 en cuanto a la estabilización del complejo formado por PPAR $\gamma$  y PGC-1 para la activación de la transcripción. La ausencia de TIF2 en grasa parda provoca un aumento en la expresión de la proteína desacoplada-1, PGC-1 y acetil coenzima A oxidasa, provocando niveles más altos de liberación de energía debido al aumento de oxidación de ácidos grasos y el desacoplamiento de la respiración. Como resultado, los ratones TIF2<sup>-/-</sup> muestran una mayor temperatura corporal bajo condiciones de frío, menos acumulación de grasas, bajos niveles de glicemia y triglicéridos, y una mayor sensibilidad a insulina. Estos ratones son más aptos para protegerse contra la obesidad inducida por una dieta rica en grasa o la hiperfagia<sup>321</sup>.

### 7.4.4 Rango de acción

TIF2 es capaz de interactuar de forma hormona dependiente con el receptor de glucocorticoides, el receptor de estrógeno, el receptor de mineralocorticoides, el receptor tiroideo, el receptor de la vitamina D y el receptor del ácido retinoico. TIF-2 es una proteína de un peso molecular de 160 kDa, que según estudios hechos *in vitro*, es capaz de asociarse a los dominios LBD de varios receptores dependientes de ligando. Por otro lado, estudios hechos *in vivo*, demuestran que esta proteína es capaz de asociarse con RAR $\alpha$ , el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona en presencia de hormona, pero no es capaz de asociarse en presencia de antagonistas hormonales<sup>279, 326, 327</sup>. También puede asociarse con ROR $\alpha$ , un receptor con un rol importante en el desarrollo del cerebro, el crecimiento celular, la diferenciación, el metabolismo de lípidos, el mantenimiento de la homeostasis y la oncogénesis<sup>330</sup>.

Li y colaboradores demostraron que en células de tumor mamario humano T47D, el GR recluta preferentemente a TIF2 entre los coactivadores de la familia p160, mientras que el PR interactúa con SRC-1<sup>311</sup>.

Está demostrada la participación de estas moléculas en el desarrollo de leucemias, tal es el caso de TIF2 y CBP, en los cuales se observan eventos de translocación y fusión génica a otras proteínas clave en leucemia mieloide aguda (AML)<sup>331, 332</sup>. Se ha visto que en determinados pacientes con AML existen mutaciones que provocaron la fusión entre una proteína llamada MOZ a TIF2. Se sugiere que TIF2 haría de puente para interactuar con otros coactivadores, como CBP, y de esta manera, la expresión de los genes regulados por MOZ se vería aumentada por cambios conformacionales en la cromatina de sus genes blanco, dando lugar al fenotipo AML<sup>333</sup>. También está demostrado que la fusión MOZ-TIF2 actúa como dominante negativo para la actividad transcripcional de los factores dependientes de CBP, como el factor de supresión tumoral p53<sup>334</sup>.

La expresión de TIF2 y CBP es mayor en carcinomas intraductales que en glándula mamaria normal, mientras que los niveles del correpresor NCoR son menores en carcinomas invasivos que en carcinomas intraductales, sugiriendo que podrían ocurrir cambios en el patrón de expresión de correguladores durante la progresión del cáncer<sup>335</sup>.

### 7.5. RAC3: su descubrimiento y caracterización

RAC3 fue descubierto por primera vez en el año 1997 por varios investigadores, lo cual derivó en que tome diferentes nombres al mismo tiempo. Li et al. mediante el sistema de doble híbridos de levadura, clonó el coactivador asociado al receptor del ácido retinoico RAC3 (*RAR-associated coactivator-3*) y se demostró que podía interactuar con múltiples receptores nucleares y aumentar la actividad transcripcional del receptor de andrógeno (RAR) y progesterona<sup>281</sup>. Torchia et al. aisló a p/CIP (*p300/CBP cointegrator-associated protein*) que se encontraba interactuando con el C-terminal de CBP y con RE<sup>284</sup>. Usando RAR $\beta$  como cebo en el sistema simple híbrido de levaduras, Chen et al. identificó a ACTR (*activator of thyroid and retinoic acid receptor*) y demostró que interactúa con los receptores nucleares, CBP y p/CAF<sup>282</sup>. Este estudio mostró que ACTR posee actividad histona acetil transferasa. Recorriendo una *Library* de expresión de ADNc del receptor tiroideo  $\beta$ 1 (RT), Takeshita et al. aisló

un clon que codificaba para TRAM-1 (*thyroid receptor activator molecule-1*) y demostró que interaccionaba con RT y otros receptores de manera ligando dependiente<sup>283</sup>. Basado en la interacción con los dominios de unión al ligando (LBD) de RE $\alpha$ , Suen et al. identificó a SRC-3 (*steroid receptor coactivator-3*) y demostró que tenía mayor afinidad con RE $\alpha$  que el RE $\beta$ <sup>336</sup>. Aznick, et al. observó a este coactivador amplificado en cáncer de ovario y mama, por esta razón también se lo denomina AIB1 (*Amplified in Breast cancer 1*)<sup>275</sup>.

El coactivador RAC3 juega un rol importante en varios procesos biológicos involucrados en proliferación celular, migración, diferenciación, crecimiento somático, maduración sexual, reproducción femenina, vasoprotección y cáncer.

Localizado en el cromosoma humano 20 (q12)<sup>313</sup>, este coactivador presenta un amplio rango de expresión. Basado en ensayos de *Northern blot* la expresión del gen para RAC3 fue localizado en placenta, páncreas, pulmón, riñón, cerebro, hígado, útero, pituitaria, glándula mamaria y testículos<sup>282, 283, 288, 303</sup>. La proteína se encontró expresada en testículos, pulmón, hígado, cerebro, corazón y glándula mamaria<sup>284, 306</sup>.

RAC3 es un coactivador de receptores esteroideos pero no interacciona solamente con el receptor de progesterona, el receptor de estrógeno y el receptor de tiroides<sup>337, 338</sup>, nuestro grupo ha demostrado que también lo hace con NF- $\kappa$ B<sup>293</sup>. En éstos últimos años, también se encontró que interacciona con otros factores de transcripción como AP-1<sup>322</sup>, STAT<sup>339</sup> y E2F1<sup>340</sup> de manera independiente a hormonas.

Recientemente RAC3 ha recibido mayor atención, porque existen muchas evidencias que demuestran que la sobre-expresión de este coactivador podría promover la iniciación y/o progresión de la carcinogénesis, afectando varias vías importantes de señalización<sup>341</sup>. De hecho, nuestro grupo ha planteado esta hipótesis desde el descubrimiento de su interacción con NF- $\kappa$ B. Estos hallazgos nos inducen a sospechar que RAC3 podría contribuir en el desarrollo tumoral independientemente de hormonas esteroideas o RNs.

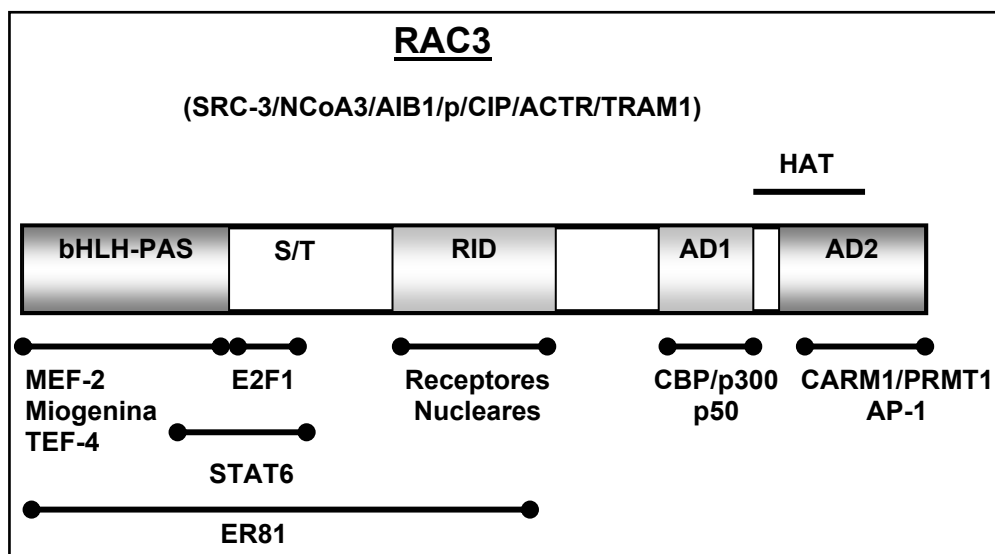
### 7.5.1. Estructura molecular

RAC3 es una proteína que posee un peso molecular de 160 kDa, con 40% de similitud con los otros miembros de la familia SRC (Fig. 2). A través del dominio N-terminal básico de hélice-vuelta-hélice-Per/ARNT/Sim (bHLH-PAS), dominio



conservado en el resto de los miembros SRC, puede interactuar con Miogenina, MEF-2C y el factor activador transcripcional (TEF)<sup>342, 343</sup>. Posee una región rica en serina y treonina que puede interactuar con activadores de la transcripción como E2F1<sup>340</sup> y STAT<sup>339</sup> (Figura 13).

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



**Figura 13.** Diagrama esquemático de la estructura y los dominios funcionales de RAC3. Las líneas con extremo redondo indican la zona de interacción de RAC3 con distintas proteínas. En la barra se muestran los dominios: básico de hélice-vuelta-hélice (bHLH); dominios homólogos a Per/ARNT/Sim (PAS); S/T, región rica en serina y treonina; dominio de interacción con receptores nucleares (RID), dominio de activación transcripcional (AD1 y AD2). Región con actividad histona acetil transferasa (HAT). Adaptado de Yan, J. et al., 2006<sup>341</sup>.

Posee dos dominios de activación transcripcional intrínsecos (AD1 y AD2), localizados en el C-terminal. AD1 contiene múltiples LXXLL que son los responsables de la interacción con histonas acetil transferasas como CBP, por este dominio también puede interactuar con la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B<sup>293, 341</sup>. RAC3 tiene una potente actividad histona acetiltransferasa, se une directamente a receptores nucleares estimulando su actividad transcripcional en forma hormona dependiente. Además, es capaz de reclutar a los coactivadores generales CBP y p/CAF, formando un complejo

multiproteico de coactivación<sup>282</sup>. El dominio AD2 puede interactuar con la proteína arginina metiltransferasa (PRMT), CARM1 y PRMT1<sup>296, 297</sup>, como con el factor de transcripción AP-1<sup>322</sup> (Figura 13).

### 7.5.2. Rol de RAC3 en tumorigénesis

Una característica notable de RAC3 es que se encuentra amplificado y/o sobre-expresado en varios tumores hormono dependientes, como tumor de mama, ovario<sup>275</sup>, próstata<sup>344</sup> y meningioma<sup>345</sup>. En biopsias de tumor mamario, RAC3 se encontró aumentado por amplificación génica en 5%-10% y sobre-expresado en 30%-60% de los casos<sup>346</sup>.

Más aún, el ARNm de RAC3 está sobreexpresado en varios tipos de tumores de mama<sup>275</sup>, sin embargo, sólo el 10% de tumores de mama presentan niveles elevados de proteína RAC3<sup>346</sup>. La sobre-expresión de RAC3 en tumores de mama invasivos está correlacionado con altos niveles del receptor del factor-2 de crecimiento epidérmico (HER2)/neu<sup>347, 348</sup>. En pacientes tratados con el antagonista de estrógeno tamoxifeno, se observa un alto nivel de expresión de RAC3 y poca reversión del tumor, y por esto se lo asocia con la resistencia a esta droga, y a una peor tasa de supervivencia del paciente. Aquellos pacientes con niveles altos de RAC3 y HER2 muestran la peor respuesta a la terapia con tamoxifeno<sup>348</sup>. En cáncer de próstata, los niveles de expresión de RAC3 correlacionan significativamente con el grado del tumor, la recurrencia y menor sobrevida<sup>349</sup>. También fue encontrada sobre-expresada en biopsias de tumor de mama una variante de *splicing* de RAC3 de 130kDa, que tiene truncado el N-terminal perdiendo las secuencias bHLH y parte del dominio PAS. Esta variante es mas fuerte como coactivador de receptores esteroideos *in vitro* que la forma completa de RAC3<sup>350</sup>.

Es de destacar que RAC3 interactúa con los receptores de estrógeno en forma ligando dependiente, y la actividad transcripcional de dicho receptor se ve aumentada cuando se transfectan células con este coactivador<sup>275</sup>, por lo que estos autores sugieren que éste podría contribuir al desarrollo de cáncer en aquellos tejidos donde se exprese en alto título, y particularmente al cáncer dependiente de esteroides. RAC3 también estaría involucrado en la tumorigénesis de la glándula mamaria por la expresión del virus tumoral v-HA-ras de tumor mamario, en células epiteliales, dado que en ratones RAC3<sup>-/-</sup> estos tumores están suprimidos<sup>351</sup>. Estos descubrimientos indican que al menos RAC3 junto con otros coactivadores, podrían jugar un rol permisivo en la iniciación y

progresión en tumores hormono dependientes, probablemente activando los receptores esteroideos.

Por estudios recientes se encontró a RAC3 sobre-expresado en tumores de mama, que no poseen receptores de estrógeno o progesterona<sup>347</sup>. Esto indicaría que RAC3 actúa vía otros factores de transcripción durante la tumorigénesis.

Consistente con estos resultados y nuestros resultados previos respecto a su acción sobre NF- $\kappa$ B, RAC3 está involucrado en varios tipos de tumores hormono independiente, como cáncer de páncreas<sup>168</sup>, gástrico<sup>352</sup>, carcinoma colorectal<sup>353</sup> y hepatocelular<sup>354</sup>. Un elevado número de copias de RAC3 fueron detectadas en el 37% de los casos con adenocarcinoma pancreático<sup>355</sup>. Sin ir más lejos, los niveles de RAC3 están asociados a la metástasis y la recurrencia del tumor en el cáncer gástrico y hepatocelular. Tomando estos datos clínicos podemos decir que RAC3 juega un rol importante en tumores hormono independientes.

### *7.5.3. Modelo de ratón transgénico*

Para determinarse si RAC3 podría ser un posible oncogen, M. Brown y colegas<sup>356</sup> generaron ratones transgénicos que sobre-expresa RAC3, bajo el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Estos animales tuvieron una incidencia de tumor del 76% en la etapa adulta. Desarrollaron tumores en las glándulas mamarias, pituitaria, útero y pulmón, coincidiendo con la alta expresión ectópica de RAC3 en estos órganos.

Por otro lado, en el suero de estos ratones, se encontró altos niveles de IGF-1, y un aumento en la actividad de la vía PI3K/AKT, sugiriendo que esta señal es importante para la inducción de la tumorigénesis mediada por RAC3. La mayoría de los tumores mamarios fueron invasivos y muchos adenocarcinomas dieron metástasis. Finalmente la génesis del tumor mamario fue independiente a la formación de adenomas pituitarios, de la reproductividad del ratón y de los niveles de actividad del receptor de estrógenos, sugiriendo que la inducción de tumor de mama por RAC3 no fue dependiente de hormonas. En este trabajo, se demuestra que la sobre-expresión de RAC3 es suficiente para causar carcinoma mamario y otros tumores, siendo en este caso RAC3 un oncogen<sup>356</sup>.

#### 7.5.4. Modelo de ratón deficiente en RAC3

En ratones RAC3<sup>-/-</sup> machos, la función reproductiva está levemente reducida, mientras que en ratones hembra el desarrollo y las funciones del sistema reproductivo son anormales. En primer lugar, los niveles de estrógenos están reducidos en hembras RAC3<sup>-/-</sup>, lo que causa un retraso en el desarrollo pubertal claramente evidenciado por un retraso en la abertura de la vagina y en el desarrollo de las glándulas mamarias. Además, el desarrollo alveolar de las glándulas mamarias en respuesta a estímulos combinados de estrógeno y progesterona, disminuye significativamente en hembras RAC3<sup>-/-</sup>, sugiriendo que RAC3 estaría involucrado en la proliferación celular estimulada por progesterona y diferenciación glandular durante el desarrollo alveolar de mama<sup>306</sup>. También la depleción de RAC3 suprime significativamente la tumorigénesis mamaria inducida por v-H-ras o el carcinógeno químico 7,12-dimetilbezo-antraceno (DMBA)<sup>357</sup>.

#### 7.5.5. Mecanismos de acción de RAC3

Es claro, que la sobre-expresión de RAC3 aumenta la expresión de Ciclina D1 (CD1), aumentando la proliferación celular. Pero no estaba claro aun el mecanismo por el cual en presencia de estrógeno, RAC3 mediante el receptor de estrógeno aumenta la proliferación, ya que el promotor de CD1 no posee secuencias respondedoras a estrógeno. Esto podría deberse a que el RE se una a otros sitios regulatorios, como SP1 o sitios CREB<sup>358</sup>. De acuerdo a resultados obtenidos por nuestro laboratorio, hemos demostrado que los estrógenos requieren de NF-κB activo para inducir la expresión de ciclina. De acuerdo con nuestras observaciones, ER, RAC3 y NF-κB forman un complejo que se une a secuencias específicas de unión a NF-κB en el promotor de ciclina D1, y de esta manera aumentar su expresión<sup>359</sup>.

Por otros mecanismos independientes a hormonas, se observó que RAC3 es requerido por el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1) para la proliferación, supervivencia, señalización y expresión de genes en tumores mamarios<sup>360</sup>. RAC3 es capaz de regular la transcripción de IGF/AKT, uniéndose a los promotores de IRS-2 o IGF-1 a través de AP-1, de manera independiente de hormonas<sup>292</sup>.

Todavía no están del todo claros los mecanismos bioquímicos por los cuales RAC3 ejerce su efecto coactivador. Algunos trabajos postulan mecanismos de acción a

través de diversas señales que terminan modificando la molécula. Por ejemplo, se encontró a RAC3 asociado con la quinasa IKK<sup>361</sup>. Hasta el momento se han caracterizado seis sitios de fosforilación de RAC3 y demostrado que diferentes señales producen diferentes patrones de fosforilación de RAC3<sup>362</sup>. Estas fosforilaciones de RAC3 serían requeridas para una óptima interacción con los activadores transcripcionales y otros coactivadores, como CBP, histona acetil transferasas o CARM1 metiltransferasa<sup>363</sup>. Esto se debería a que distintas combinaciones de sitios fosforilados serían responsables de la función diferencial de distintos factores de transcripción, y por lo tanto, cumpliendo diferentes funciones fisiológicas. Estos autores demuestran que múltiples quinasas están involucradas en la fosforilación de sitios específicos de RAC3 como p38 MAPK, JNK, IKKs y PKA<sup>362</sup>. De acuerdo a observaciones hechas por el grupo de O'Malley, RAC3 es un sustrato de la IKK, y su localización sub-celular depende de su fosforilación<sup>361</sup>.

#### *7.5.6. Localización sub-celular*

Hay evidencias que demuestran que las modificaciones post-transduccionales y la función de RAC3 son reguladas por factores de crecimiento y citoquinas. Bajo condiciones normales de crecimiento, RAC3 esta mayormente localizada en el núcleo. Mientras que en células RAT-1 deprivadas de suero, RAC3 fue encontrado principalmente en el citoplasma, cuando se agrega insulina al medio éste se transloca al núcleo. Esta re-distribución puede ser bloqueada por el agregado de altas concentraciones de ácido okadaico, el cual inhibe las fosfatasas 1 y 2A<sup>305</sup>. Estas observaciones sugieren que la localización subcelular de RAC3 es regulada por receptores tirosina quinasa asociados a membrana como el receptor de insulina. La fosforilación de RAC3 por IKK promueve la localización nuclear<sup>361</sup>.

El dominio bHLH de RAC3 contiene secuencias de localización nuclear (NLS), los mutantes para bHLH fallan en la translocación y esto además correlaciona con la inhibición en la degradación por el proteasoma, sugiriendo que esta degradación es en el núcleo<sup>364</sup>.

Se postula que diferentes MAPKs regulan el tráfico de SRCs, a través de diferentes cascadas de señalización que terminan activando el transporte diferencial de los SRCs del citoplasma al núcleo<sup>343</sup>.

### 7.5.7. *RAC3* interviene en la proliferación de manera independiente de hormonas

Esta demostrado que los factores de crecimiento, como la insulina y el factor de crecimiento insulina-*like* (IGF-1), pueden estimular el crecimiento celular y los miembros de la vía PI3K importantes para el control del crecimiento celular<sup>365 366, 367</sup>. Los miembros que regulan positivamente esta vía incluyen al receptor de insulina, el sustrato del receptor, PI3K, AKT<sup>368</sup> y mTOR y sus blancos como la quinasa S6 (S6K) y el factor de iniciación 4E (eIF4E)<sup>369</sup>. Entre los reguladores negativos están la fosfatasa PTEN y esclerosis tuberosa (TSC)<sup>370</sup>. Algunos de estos factores han sido encontrados amplificados, sobre-expresados o mutados en pacientes con distintos tipos de cáncer, inclusive de mama y próstata<sup>371</sup>.

Los ratones *RAC3*<sup>-/-</sup> son mas pequeños que los salvajes, esto sugiere que *RAC3* es requerido para el crecimiento normal. Se observó que decrece significativamente los niveles de IGF-1 y falla su respuesta, en cambio los niveles de la mayoría de los receptores nucleares aparecen intactos, indicando que el rol de *RAC3* en el crecimiento somático no es mediante los receptores nucleares, sino a través de otros mecanismos de trans-activación aún no esclarecidos<sup>305</sup>.

La sobreexpresión de *RAC3* induce crecimiento, aumentando el tamaño celular, en cambio su disminución, afecta al crecimiento y baja la actividad de AKT y sus efectores mTOR y S6K<sup>372</sup>.

Por medio de análisis por *microarray* se determinó que la sobre-expresión de *RAC3* induce el aumento de multiples componentes de la vía de señalización IGF/AKT, regulando la expresión a nivel transcripcional y traduccional de los miembros IGF-I, IGF-II, IRS-1, IRS-2, PI3KCA, AKT1 y de Bcl-2. Esto se debe a que *RAC3* es reclutado a los promotores de estos genes. Por ejemplo, el reclutamiento de *RAC3* a los promotores de IRS-2 y IGF-I requiere de la presencia de c-Fos, una subunidad del complejo AP-1, sugiriendo que esta actividad sobre AP-1 podría contribuir a la carcinogénesis de manera independiente a hormonas<sup>292</sup>.

El factor de transcripción E2F regula la progresión del ciclo celular, modulando la expresión de proteínas requeridas para G1/S y síntesis del ADN. En G0 y principio de la fase G1, Rb se encuentra unido a E2F inhibiendo su actividad transcripcional, cuando Rb es fosforilado, deja libre a E2F para la transcripción<sup>373</sup>. *RAC3* interacciona directamente con E2F1 aumentando la transcripción de los genes del ciclo celular, como

ciclina E1, ciclina A2, cdk2 y el mismo E2F1<sup>374</sup>. Éste sería otro mecanismo por el cual el coactivador contribuye al desarrollo tumoral, promoviendo la progresión del ciclo celular.

Uno de los aspectos más importantes en el control de la actividad de receptores nucleares, factores de transcripción y quinasas es el control de su localización subcelular. Esto determinaría su posibilidad de interactuar específicamente con otras moléculas y sustratos específicos y finalmente, la respuesta celular ante señales determinadas, pudiendo resultar por ejemplo, en la muerte celular, así como en supervivencia, proliferación o diferenciación.

## TRÁFICO INTRACELULAR

### 8. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas de choque térmico (Hsps) son una familia de proteínas expresadas constitutivamente en altas cantidades, hecho que se ve incrementado cuando una célula está sujeta a condiciones de estrés físico (temperatura elevada, shock osmótico o de pH, irradiación por rayos UV) o fisiológicas (isquemia-peperfusión, carencia nutritiva, infecciones virales, hemorragias, fiebre elevada). En estas condiciones la expresión de algunos genes se apaga, mientras que la de unos pocos se estimula en un fenómeno denominado respuesta al choque térmico (heat shock response) o al estrés<sup>375</sup>.

#### 8.1. Regulación de la expresión de las HSPs

La respuesta de choque térmico, fue descubierta en 1964 en *Drosophila* exponiendo a moscas a temperaturas subletales<sup>376</sup>, está caracterizada por la transcripción preferencial de un reducido grupo de genes que codifican para proteínas específicas, las Hsp (heat shock proteins, o proteínas de choque térmico), igualmente denominadas proteínas de estrés.

Los genes *hsp* están regulados por una familia de factores de transcripción llamados HSFs. En vertebrados se han descrito 4 factores de transcripción pertenecientes a la familia de la HSFs, de los cuales el factor HSF-1 es el miembro más predominante<sup>377</sup>. Bajo condiciones normales, los factores HSF-1 existen inactivos en el citoplasma o en el núcleo como monómeros<sup>378</sup>. Se reportó que esta represión a varios niveles es mantenida por la interacción de factores HSF-1 unidos a complejos multichaperona conteniendo Hsp90 o a chaperonas individuales, estando este incapacitado de unirse al ADN en forma estable<sup>379</sup>. La activación de HSF-1 está caracterizada por una hiperfosforilación en múltiples serinas<sup>212</sup>. Ante condiciones de estrés, el complejo se disocia, las proteínas HSF-1 forman trímeros los cuales translocan al núcleo donde son fosforilados por proteínas de la familia de la proteinquinasa C (PKC). Una vez activados, los factores HSF-1 ganan la capacidad de unirse al ADN en forma específica a su elemento “enhancer” de respuesta a choque térmico (HRE)<sup>380</sup>. En estas condiciones en las que las proteínas se encuentran mal plegadas, comienzan a aparecer en la superficie de las mismas sitios que no se encuentran expuestos en estados nativos y sí lo están en estados no nativos, residuos hidrofóbicos o cargados que a su vez, posibilitan la interacción con otros residuos hidrofóbicos o cargados provenientes de otras proteínas mal plegadas formando de esta manera, agregados proteicos. Estos agregados son altamente deletéreos para la célula. Las chaperonas y en especial las HSPs tienen la capacidad de reconocer estos sitios expuestos en las proteínas. Como resultado de la activación en la expresión de las Hsp, éstas se unen a las proteínas desnaturalizadas preservándolas hasta la finalización del estrés, promoviendo por un lado, la rápida degradación de las proteínas dañadas con su posterior eliminación de la célula o permitiendo su re-solubilización e induciendo en esas células una tolerancia al estrés<sup>381</sup>. Esta exposición de residuos hidrofóbicos o cargados no se da solamente durante instancias de estrés, también ocurren fisiológicamente en el transcurso de la síntesis de polipéptidos, ensamble de péptidos o de su transporte a través de membranas, o en los cambios estructurales producidos durante el funcionamiento normal de complejos proteicos. Las HSPs están altamente conservadas dentro de los tres dominios filogenéticos (Bacteria, Archea y Eucarya) lo que sugiere un papel vital de éstas y otras chaperonas moleculares. Las proteínas de choque térmico son clasificadas en familias como HSP seguidas de un número que indica su peso molecular aparente en kDa determinados por SDS-PAGE<sup>382</sup> (Tabla 5).



Durante la apoptosis las chaperonas juegan un rol importante, por ejemplo Hsp70 y Hsp27 son capaces de inhibir la apoptosis, interaccionando con factores proapoptóticos como p53, c-myc y AIF<sup>66</sup>, bloqueando la muerte inducida por Fas y la activación de caspasa-9 por citocromo c<sup>383, 384</sup>. En cambio Hsp60 y Hsp10, pueden interaccionar con caspasa 3 acelerando la apoptosis<sup>385</sup>.

<b>Tabla 5. Principales chaperonas y co-chaperonas</b>	
<b>Chaperonas</b>	<b>Funciones</b>
<b>Hsp100</b>	Esenciales para la supervivencia celular bajo condiciones extremas y en la adquisición de termotolerancia, promoviendo la desagregación de las proteínas ante el calor <sup>386</sup> .
<b>Hsp90</b>	Proteína expresada constitutivamente. Se estimula su expresión en condiciones de estrés. Chaperona ATP-dependiente importante en la recuperación de proteínas mal plegadas, y en la maduración, transporte intracelular y actividades regulatorias de los receptores nucleares de hormonas así como también de factores de transcripción y proteínas quinasas involucradas en la transducción de señales y el control de la expresión génica. Cumple estas funciones celulares formando heterocomplejos proteína·Hsp90 en una maquinaria multiproteica junto a la Hsp70. También se reportó su importancia en la restitución del estado competente de proteínas mutadas <sup>382, 387</sup> .
<b>Hsp70</b>	Su expresión se induce en condiciones de choque térmico, jerárquicamente implicada en el replegado de proteínas (complejo Hsp70-sustrato) luego de un estrés en su forma ATP-dependiente. Interactúa con Hsp90 y es esencial para el ensamblado de los heterocomplejos proteína·Hsp90 <sup>114</sup> .
<b>Hsp40</b>	De expresión constitutiva, pero estimulada en condiciones de estrés. Interacciona con proteínas mal plegadas. Presenta el polipéptido a replegar a la Hsc70/Hsp70. Estimula la hidrólisis del ATP asociado a la Hsc70/Hsp70. Componente de los heterocomplejos proteína·Hsp90 <sup>388</sup> .
<b>Hip</b>	Co-chaperona estabilizante de la forma ADP de la Hsc70/Hsp70. Componente de los heterocomplejos proteína·Hsp90 <sup>389</sup> .
<b>Hop</b>	Une vía sus dominios TPR independientes las Hsc70/Hsp70 con Hsp90, para la conformación de los heterocomplejos proteína·Hsp90 <sup>390</sup> .

## 8.2. Hsp90

La proteína de choque térmico Hsp90 es una de las proteínas más abundantes en células no estresadas (1-2% del total de proteínas citosólicas)<sup>391, 392</sup>. Dentro de las HSPs; Hsp90 tiene una actividad altamente selectiva en células estresadas y no estresadas, donde esta chaperona es responsable de procesos esenciales en el control del crecimiento y diferenciación celular. Si bien es importante en la recuperación de proteínas mal plegadas, actualmente se cree que Hsp90 se une principalmente más a una

gama restringida de sustratos, que indiscriminadamente a cualquier proteína mal plegada, especializándose en estabilizar regiones metaestables, tales como bolsillos moleculares dónde se unen ligandos, manteniéndolos en una posición “receptora” que a su vez impida el colapso o agregación de estas proteínas sustratos (a veces denominadas proteínas “clientes”)<sup>393</sup>. Su accionar se centra en la maduración, transporte intracelular y actividades regulatorias de los receptores nucleares de hormonas así como también de factores de transcripción y proteínas quinasas involucradas en la transducción de señales y el control de la expresión génica, ciclo celular, apoptosis, cáncer, respuesta al estrés, inmunidad en plantas, desarrollo y hasta evolución<sup>387, 392, 394</sup>. La proteína Hsp90 demostró tener un papel crítico en evitar la entrada a la vía de degradación a proteínas quinasas de cdc2, Mik1 y Swe1 en *Sacharomyces cerevisiae spp.*, siendo importante en la regulación del ciclo celular de la levadura<sup>395</sup>. Mutaciones puntuales en la proteína Hsp90 de *Drosophila melanogaster* en homocigosis demostraron ser letales, indicando un requerimiento de Hsp90 para el desarrollo en este organismo<sup>396</sup>.

En mamíferos, cerca de 100 proteínas “clientes” están reguladas por Hsp90. En la mayoría de los casos estas proteínas sustrato fueron identificadas por experimentos de co-inmunoadsorción, co-existiendo en heterocomplejos citosólicos con Hsp90. Estos heterocomplejos sustrato·hsp90 se forman en un proceso dependiente de ATP, por acción de una maquinaria chaperona basada en un complejo multiproteína Hsp90/Hsp70, el cual hasta ahora es conocido como ubicuo entre las células de los reinos animal y vegetal<sup>387</sup>.

Hsp90 es una chaperona cuya funcionalidad es dependiente de ATP y de su actividad ATPasa. La unión de Hsp90 a sus sustratos puede ser selectivamente inhibida por antibióticos del grupo de las anasamicinas-benzoquinonas (geldanamicina y sus derivados) y radicicol, las cuales se unen a la proteína interactuando con su bolsillo de unión a ATP con mucha más afinidad que la que tiene por el propio ATP<sup>397</sup>.

### 8.2.1. Hsp90 y proteínas clientes

Las proteínas “clientes” de Hsp90 incluyen, las quinasas de tirosinas transmembrana HER-2/neu, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), MET y el receptor del factor de crecimiento similar de insulina-1 (IGF-1R), proteínas de señalización metaestables (Akt, Raf-1 e IKK), proteínas de señalización mutadas (p53, Kit, Fit3 y v-src), proteínas de señalización quiméricas (NPM-ALK, Bcr-Abl),

receptores de esteroides (receptores de andrógenos, estrógenos, glucocorticoides) y reguladores del ciclo celular (cdk4, cdk6)<sup>398, 399</sup>. Es interesante que para la activación de NF- $\kappa$ B sea necesario Hsp90, que controla la biosíntesis de IKK y la inducibilidad de su actividad enzimática<sup>400</sup>.

Los complejos quinasas·Hsp90 selectivamente unen Cdc37, tal es el ejemplo de src, cdk4 y raf<sup>401</sup>, mientras que los complejos de factores de transcripción·Hsp90 unen principalmente inmunofilinas con dominios TPR (repeticiones de tetratricopeptidos)<sup>402</sup>. Esta selección se da porque las proteínas quinasas se unen mediante su dominio catalítico con Cdc37<sup>403</sup> y a su vez, se observó que los complejos receptores de esteroides·Hsp90 unen inmunofilinas TPR que directamente se unen al mismo tiempo con los mismos factores de transcripción del complejo<sup>404</sup>.

### 8.2.2. Hsp90, cancer y tratamiento

En células o tejidos de un amplio número de tumores se han encontrado expresión atípica de los niveles de una o más Hsp. La expresión de Hsp por ejemplo en cáncer de mama o gástrico está asociado con un mal pronóstico y resistencia a quimioterapias o radioterapias<sup>405</sup>. Por ejemplo, en líneas leucémicas y células de leucemia aguda de pacientes se ha encontrado una alta expresión de Hsp90, asociado con un aumento en la proliferación celular<sup>406</sup>.

En el caso de células tumorales se encontraron complejos super-chaperona donde Hsp90 interactúa con proteínas “clientes” oncogénicas involucradas en transducción de señales, regulación del ciclo celular y apoptosis<sup>407</sup>, por ejemplo v-src, c-Raf-1, c-erbB2, met, CDK4, p53, Bcr-Abl, y los receptores de esteroides<sup>398, 408, 409</sup>.

Así fue como despertó un gran interés la proteína Hsp90 como blanco de drogas, debido a su capacidad de unir específicamente y ser inhibida por el antibiótico natural de la clase de benzoquinonas ansamicinas, la geldanamicina (GA)<sup>397</sup>. El radicicol se une al N-terminal de Hsp90, inhibiendo su actividad y suprime la transformación por los oncogenes Src y Ras<sup>410</sup>.

### 8.3. Dominios TPR y proteínas con dominios TPR

Se demostró que las proteínas contenedoras de dominios con repeticiones de tetratricopéptidos (TPR) están involucradas en procesos reguladores del ciclo celular,

control de la transcripción, importación de proteínas y transducción de señales<sup>411</sup>. Los dominios TPR contienen entre 1 a 16 repeticiones en tandem de 34 residuos aminoacídicos. Las proteínas TPR mejor estudiadas y caracterizadas hasta el momento, son aquellas involucradas en la maduración de los heterocomplejos Hsp90. Esta lista incluye a la protein-fosfatasa 5 (PP5)<sup>412</sup>, Hop<sup>413</sup> y las inmunofilinas Cyp40<sup>414</sup>, FKBP51<sup>415</sup> y FKBP52<sup>416</sup>. Estas proteínas poseen entre uno y tres dominios TPR.

#### 8.4. Inmunofilinas

La isomerización trans/cis de uniones péptido-prolina es un paso limitante en el plegamiento de proteínas<sup>417</sup>. Las enzimas catalizadoras de este paso se denominan peptidil-prolil-cis/trans isomerasas (PPIasas). Hasta el momento se caracterizaron tres subfamilias de este tipo de enzima: FKBP, ciclofilinas y parvulinas<sup>418</sup>. Las FKBP y las ciclofilinas, son inhibidas por drogas inmunosupresivas y por esto son denominadas inmunofilinas<sup>418</sup>. Se encontraron en complejos con Hsp90 a las PPIasas de peso molecular de 40-54 kDa, las denominadas PPIasas (FKBP51, FKBP52, Cyp40 y los homólogos en levaduras Cpr6 y Cpr7). Las ciclofilinas (Cyps) se unen a ciclosporina A<sup>419</sup>, mientras que las proteínas FKBP se unen a macrólidos como FK506<sup>420</sup>.

Una vez que una proteína, factor de transcripción o receptor, es activado en la membrana plasmática o el citoplasma y habilitado para transmitir una “señal” en el núcleo celular, se hace necesaria la presencia de mecanismos que permitan este transporte. Los receptores de esteroides mostraron ser estupendos modelos para estudiar este tipo de movimiento intracelular. Los heterocomplejos·Hsp90 que unieron receptores de hormonas esteroideas se unen a una o varias inmunofilinas (FKBP52, FKBP51, o Cyp-40) o bien a la proteína homóloga a inmunofilinas PP5, a través del dominio TPR que estas contienen<sup>387</sup>. Estos receptores de esteroides continuamente se mueven del citoplasma a núcleo y viceversa, a través del sistema de microtúbulos, siendo la unión de los mismos al heterocomplejo·Hsp90 y a la inmunofilina la que permite este tráfico<sup>402</sup>. El papel de las inmunofilinas es la de conectar a la proteína cliente unida al heterocomplejo·Hsp90 con la dineína citoplásmica, el complejo proteico responsable del movimiento retrogrado hacia el núcleo<sup>402</sup>. Las inmunofilinas se unen directamente con la cadena intermedia del complejo dineína a través de su dominio PPIasa<sup>421</sup>. La proteína fosfatasa PP5 fue recuperada del heterocomplejo·Hsp90 asociado

a GR tanto en el núcleo como en el citoplasma<sup>422</sup>, y posteriormente se observó que se une a Hsp90 por sus dominios TPR, compitiendo con las otras inmunofilinas<sup>423</sup>.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Conceptos destacados de la introducción y construcción de la hipótesis**

En base a todo lo expuesto en esta introducción, existen varios mecanismos y numerosas cascadas de señales que controlan la vida y muerte celular y la alteración de muchos de ellos afectan el destino de la célula pudiendo ocasionar por ejemplo, el desarrollo de tumores en el caso de una apoptosis disminuída, o bien enfermedades degenerativas en el caso de una apoptosis aumentada.

En el caso particular de tumores, los mecanismos mas importantes que contribuyen a su desarrollo están relacionados al aumento de la proliferación celular conjuntamente con un aumento en el acúmulo de mutaciones que afectan genes relacionados con el control del ciclo celular, la supervivencia, la migración, la dependencia de factores de crecimiento, el propio control de la expresión génica y muchas de las cascadas de señales y la actividad de factores de transcripción aquí descritos. En conjunto, todo aquello que contribuye al fenotipo de una célula casi inmortal. En este sentido, resulta importante descubrir los mecanismos y señales por los cuales algunos tipos celulares resultan altamente resistentes a la apoptosis y podrían contribuir al desarrollo de un tumor y el desarrollo de estrategias para aumentar la sensibilidad a la muerte de aquellas células resistentes.

También hemos destacado en esta introducción que existe una familia de moléculas como los coactivadores de receptores nucleares de la familia p160, y en particular RAC3 que originalmente fueron considerados en cuanto a su importancia en el desarrollo de tumores hormono-dependientes, dado que fueron encontrados sobre-expresados en tumor de mama, ovario y próstata. Por otro lado, de acuerdo a su actividad y tal como fueron descubiertos, se los consideraba precisamente reguladores de la actividad de receptores nucleares, como los de hormonas esteroideas. De acuerdo con ésto, se consideraba que el mecanismo por el cual estas moléculas contribuían al desarrollo tumoral estaba restringido al aumento de las señales proliferativas inducidas por hormonas esteroideas.

La contribución de otros investigadores y nuestro propio grupo en el estudio de estas moléculas y su interacción con otros factores de transcripción disparó la idea sobre la posible participación de los coactivadores p160 en el desarrollo de otros tipos de tumor.

Por el año 2000 nuestro grupo descubrió que RAC3 es además un coactivador de NF- $\kappa$ B que como se ha descrito en la introducción de este trabajo participa en el

control de numerosas funciones biológicas en todos los tejidos y tiene un rol anti-apoptótico además de una participación directa en el desarrollo de muchos tipos de tumor.

Es decir, que si existía sobre-expresión de RAC3 en otros tipos de tumor no relacionados estrictamente a un control hormonal, era factible que el coactivador tuviera un rol importante en tumorigénesis, pero no relacionado a hormonas esteroideas, sino, posiblemente por otras cascadas de señales como por ejemplo la vía NF- $\kappa$ B.

En este contexto, otros grupos describieron posteriormente y en paralelo al desarrollo de esta tesis, una sobre-expresión de coactivadores p160 en diversos tipos de tumor como colon, gástrico, hepático y pancreático. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el coactivador estaba contribuyendo a la tumorigénesis en cada caso no fue del todo esclarecido.

### **La hipótesis**

Nuestra hipótesis principal al inicio de este trabajo de tesis fue que uno de los mecanismos moleculares por los cuales RAC3 podría estar contribuyendo al desarrollo tumoral es la protección de apoptosis, fundamentalmente por un aumento en la actividad NF- $\kappa$ B. En consecuencia se desprende, que una sobreexpresión de coactivador por transfección con vectores adecuados de células que normalmente expresan cantidades limitantes de coactivador deberían hacerse más resistentes a la apoptosis que las células conteniendo sus niveles normales naturales de ese tipo celular.

De acuerdo con esta hipótesis es que se plantearon los objetivos de trabajo que se describen a continuación.

### **Objetivo principal:**

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la posible participación de coactivadores de la familia p160 en el control de apoptosis inducida por señales de membrana o por la cascada mitocondrial en distintas líneas celulares.

Para el desarrollo de este objetivo se trabajó con dos líneas celulares como las células HEK293 que corresponden a células de riñón embrionario humano con mínima



capacidad de inducción de tumor en ratones *nude* y las células K562 que corresponden a células de leucemia mieloide crónica humana.

Las células HEK293 fueron utilizadas en el modelo de inducción de apoptosis por vía mitocondrial y las células K562 en el modelo de inducción de apoptosis por la vía de membrana.

**Objetivos particulares:**

- Determinar el rol del coactivador RAC3 en la apoptosis inducida por vía de membrana o mitocondrial en distintos tipos celulares.
- Determinar si la regulación de la expresión de genes pro- y anti- apoptóticos es dependiente de los niveles de expresión de coactivador.
- Determinar si la sobre-expresión de RAC3 tiene algún efecto en la activación de MAPKs, AKT y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
- Determinar la posible participación de RAC3 en la translocación nuclear del factor inductor de la apoptosis (AIF).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. CULTIVO DE CÉLULAS

Las células embrionarias de riñón humano HEK293 fueron crecidas en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) alta glucosa (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA). La línea leucémica mieloide crónica K562 (ATCC) fue crecida en RPMI 1640 (GIBCO). La línea de tumor de mama T47D fue crecida en medio F12 (GIBCO).

Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y gentamicina (500 µg/ml). Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las líneas HEK293 y T47D fueron mantenidas en placas plásticas estériles de 10 cm y repicadas con tripsina (0,25% p/v y 1 mM EDTA en PBS), cada 3 días aproximadamente.

La línea K562 fue mantenida en botellas plásticas estériles de 50 ml y repicadas a una densidad  $1 \times 10^5$  células/ml cada 3 días aproximadamente.

## 2. VECTORES DE EXPRESION Y PLÁSMIDOS REPORTEROS

Se utilizó como "vector vacío" el plásmido pCMX y el vector de expresión constitutiva para el coactivador RAC3 fue pCMX-HA-RAC3, ambos fueron gentilmente cedidos por el Dr. R. Evans, The Salk Institute, San Diego, CA, USA.

Los vectores de expresión para los coactivadores SRC-1 (pCR3.1-SRC-1) y CBP (pVL-CBP) fueron cedidos por el Dr. Rainer Lanz, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA.

El vector de expresión para la proteína β-galactosidasa (RSV-β-gal) se utilizó para normalizar los datos de unidades relativas obtenidos en la medición de la actividad luciferasa.

El vector p-Silencer 1.0-U6 de Ambion. Se utilizó para clonar el oligo RNAi-RAC3, que se detalla a continuación.

## 3. CONSTRUCCION DE RNA DE INTERFERENCIA ANTI RAC3

Para la construcción del RNAi anti-RAC3 se seleccionaron las secuencias según el programa Ambion, que se encuentra en la página web <http://www.ambion.com>.

La secuencia fue seleccionada en base a las mejores características indicadas por Ambion y a lo reportado previamente<sup>372</sup>.

**Secuencia blanco 36:** AAAGACTCCTTAGGACCGCTT

### Buscador Blast

Posición en el gen: 413

Contenido de GC: 47.6%

Cadena en sentido RNAi: AGACUCCUUAGGACCGCUUtt

Cadena anti-sentido: AAGCGGUCCUAAGGAGUCUtt

Para *pSilencer* 1.0-U6 se sintetizaron los siguientes oligos:

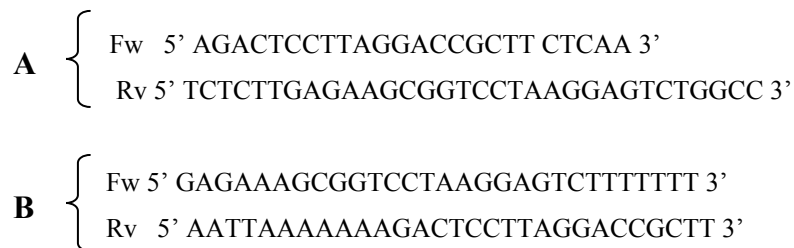
### Cadena sentido

5'-AGACTCCTTAGGACCGCTT CTCAAGAGA AAGCGGTCCTAAGGAGTCTTT TTTT-3'

### Cadena anti-sentido

5'-AATTAATAAAGACTCCTTAGGACCGCTTTCTCTTGAGAAGCGGTCCTAAGGAGTCT  
GGCC-3'

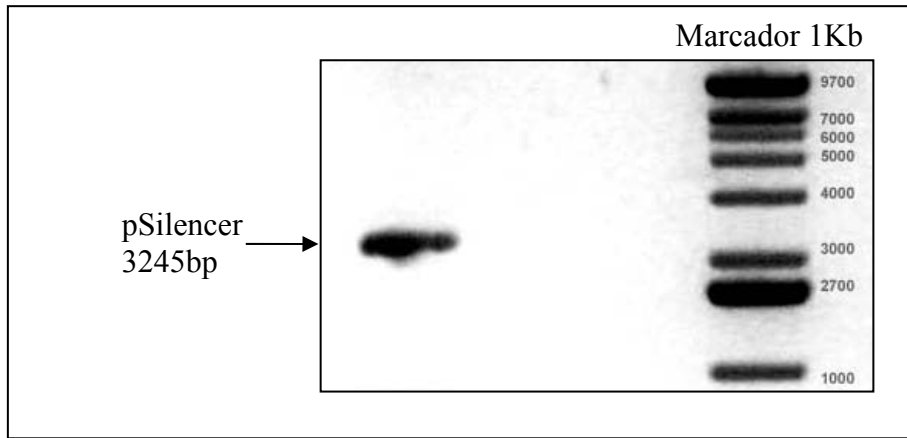
Fueron sintetizados en 4 oligos entre 24 y 32 bases.



Los oligonucleótidos sintetizados fueron tratados con Polinucleótido Kinasa (PNK) toda la noche a 37°C, la cual luego se inactivó a 65°C por 30 min.

Se agregó a cada uno la cadena complementaria correspondiente y se realizó el *annealing* en el Termociclador para PCR con una solución de 50 mM de NaCl, por 15 min a 95°C y luego se dejó decaer 1°C por min hasta 4°C finales.

El plásmido *pSilencer* fue previamente cortado con las enzimas de restricción EcoRI y ApaI, en *Buffer multicore*. El plásmido se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1%. Luego se cortó la banda de gel correspondiente al plásmido linearizado (Figura 14) y se purificó por columnas de Qiagen.



**Figura 14.** Plásmido pSilencer cortado con EcoRI y ApaI. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb y se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión 1%.

Se ligaron 50 ng de plásmido con 0,3 picomoles de los oligos A y B a 4°C toda la noche (Figura 15).

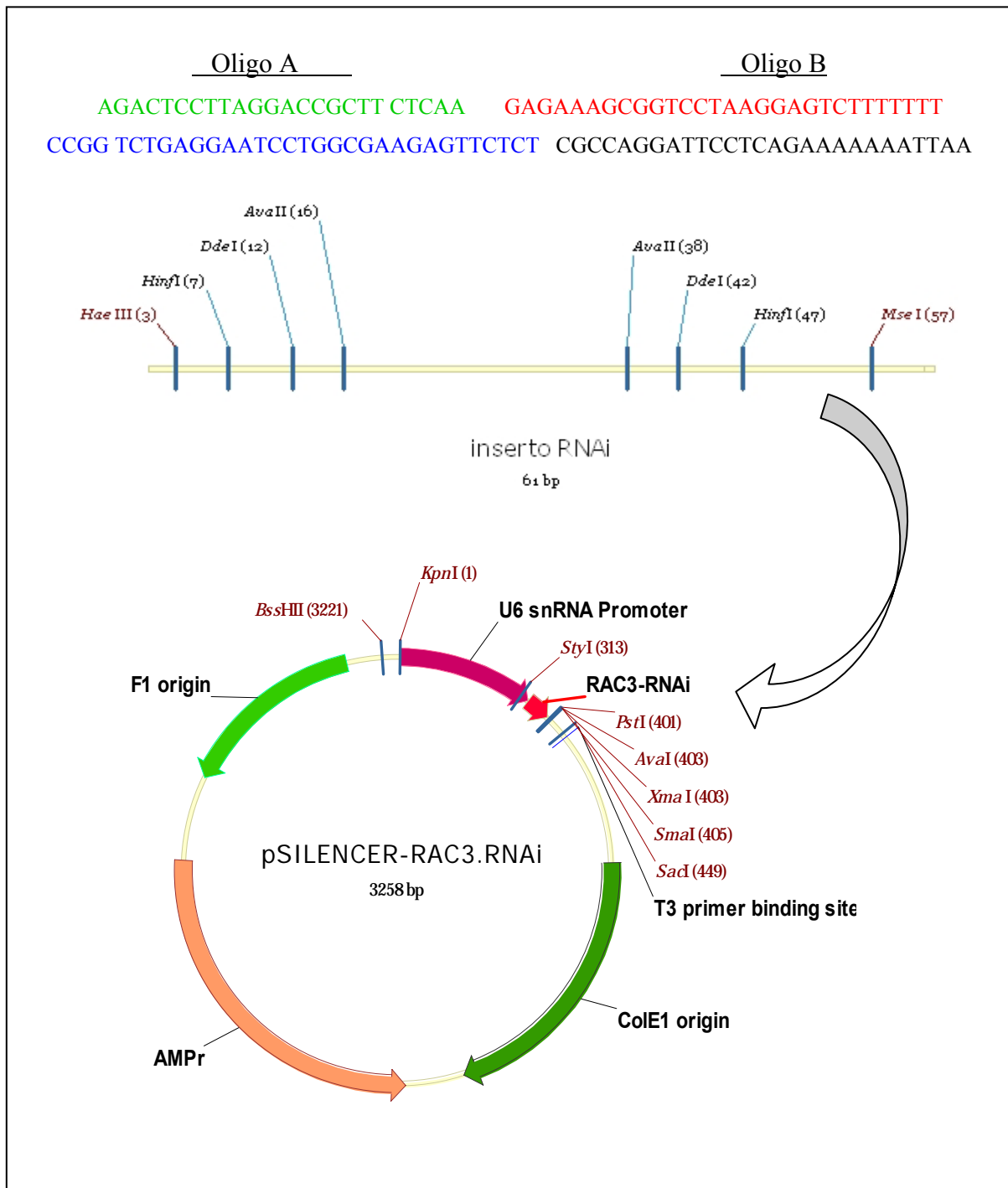
#### Triple Ligación.

Vector pSilencer previamente cortado	1 $\mu$ l
Oligo A	2 $\mu$ l
Oligo B	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
Buffer 10X	2 $\mu$ l
Ligasa T4 (Promega)	1 $\mu$ l
Volumen Final	20 $\mu$ l

### **3.1. Transformación de bacterias**

Para la preparación del plásmido RAC3-RNAi, así como para la preparación de los plásmidos utilizados en este trabajo, se transformaron 100  $\mu$ l de bacterias quimiocompetentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con 10  $\mu$ l de la mezcla de ligación, o el ADN de interés en cada caso.

Se incubaron las bacterias primero con el ADN 15 min en hielo, luego se incubó el microtubo a 42°C por 90 segundos. Se agregó 1 ml de LB sin antibiótico, con el fin de que exprese la resistencia a ampicilina que posee el plásmido y se incubó durante 45 min a 37°C.



**Figura 15.** Ligación del inserto RAC3-RNAi en el plásmido pSilencer.

Se sembraron 100 µl del LB con las bacterias en una placa de Petri con LB-agar suplementado con Ampicilina 0,1 mg/ml, para seleccionar solo las bacterias transformadas.

El cultivo se incubó toda la noche a 37°C. Fueron picadas 14 colonias al azar y se crecieron en 5 ml de medio LB con ampicilina, durante 12 horas con agitación a 37°C, para luego proceder con la purificación y chequeo del plásmido a pequeña escala.

## SOLUCIONES UTILIZADAS

LB (Luria-Bertani)

10 g/l Tristona  
5 g/l Extracto de Levadura  
5 g/l NaCl

LB-agar

LB + 15 g/l de agar

**3.2. Preparación de ADN a pequeña escala**

Se utilizó el método de lisis alcalina, modificado de *Birnboim y Doly, 1979*.

Las bacterias en LB fueron centrifugadas 1 min a 10.000 rpm, el *pellet* se resuspendió en 200  $\mu$ l de *solución I* durante 5 min a Temperatura ambiente. Se agregaron 400  $\mu$ l de *solución II* preparada fresca y se incubó 5 min en hielo. Luego se agregaron 300  $\mu$ l de *solución III*, se mezcló por inversión y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó 15 min a 10.000 rpm. Al sobrenadante se le agregó 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l final de RNAsa y se incubó 5 min a temperatura ambiente.

Luego se agregó un volumen de Fenol: 25/cloroformo: 24/isoamílico: 1. Vortex y se centrifugó 5 min a 10.000 rpm. Se extrajo la fase acuosa y se agregó 0,7 volúmenes de Isopropanol y se incubó 10 min a -20°C. Luego se centrifugó 10 min a 10.000 rpm. El precipitado se lavó con 100  $\mu$ l de etanol 70% v/v. Se centrifugó 10 min a 10.000rpm. Luego de secar el precipitado se resuspendió en 15  $\mu$ l de Buffer TE.

## SOLUCIONES UTILIZADAS

Solución I (Resuspensión)

50 mM Glucosa  
50 mM Tris-HCl pH: 8  
10 mM EDTA pH: 8  
5 ng/ml lisozima

Solución II (Lisis)

1% SDS  
20 mM NaOH

Solución III (Neutralizante)

3 M Acetato de Potasio pH: 5,5

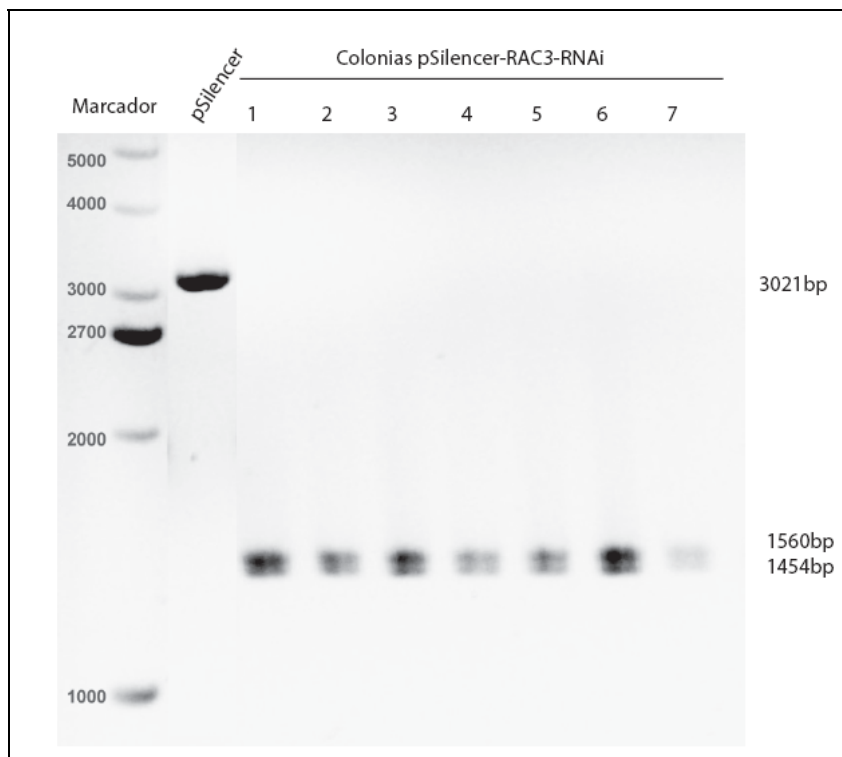
### 3.3. Mapeo de clones positivos

Con el objeto de identificar los clones positivos para RAC3-RNAi, las preparaciones fueron analizadas usando la enzima de restricción *AvaII*. Los fragmentos se corrieron en un gel de agarosa 1% y se visualizaron bajo luz UV, resultando los siguientes fragmentos que fueron calculados con el Programa Vector NTI suite 9.

pSilencer sin inserto: 3021bp + 222 bp

pSilencer con inserto: 1560bp + 1454bp + 222bp + 22bp

Todas las colonias fueron positivas (Figura 16), se eligieron dos al azar y se enviaron a secuenciar.



**Figura 16.** Calle 1: Plásmido pSilencer. Calles 2-8: plásmidos pSilencer-RAC3-RNAi purificados de 7 colonias distintas. Todos los plásmidos se cortaron con la enzima de restricción *AvaII*. Se corrieron en un gel de agarosa 1%, con el marcador de peso molecular 1Kb como referencia.



### **3.4. Purificación de plásmido a gran escala**

Los plásmidos utilizados para transfectar líneas celulares en cultivo fueron preparados por medio del sistema de maxipreparaciones de QIAGEN. Se siguieron todos los pasos que indica el manual de instrucciones del proveedor, utilizando las columnas QIAGEN-tip 500, que rinden aproximadamente 500 µg de ADN, que fueron resuspendidos en 500 µl de buffer TE.

### **3.5. Cuantificación del ADN plasmídico**

El ADN disuelto en TE o agua, fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (Metrolab). Las concentraciones se calcularon multiplicando el valor de absorbancia obtenido a 260 nm por el factor de dilución y por la constante de absorptividad molar.

También se calculó la relación de la absorbancia a 280/260 nm, para verificar su pureza.

### **3.6. Geles nativos de agarosa**

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TAE 1X al 1% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron entre 5-10 V/cm.

Las muestras para sembrar se resuspendieron en buffer de siembra preparado con glicerol 30% v/v, azul de bromofenol y xilen cianol. Los geles fueron visualizados bajo luz UV y fotografiados con cámara digital (Kodak).

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS**

##### **TAE 11**

5 g/l Tris-base

1 ml Acético glaciado

1 ml EDTA 0,5 M pH 8

## 4. TRANFECCION DE CÉLULAS EN CULTIVO

### 4.1. Transfección transitoria por el método de cloruro de calcio

El modelo de transfección transiente que se utilizó en muchos de los experimentos en éste trabajo de tesis fue en células HEK293, dado que éstas células tienen una eficiencia de transfección del 95%. Por esta razón, puede asumirse que cuando se analizan cambios en los niveles de proteínas específicas ó la viabilidad en respuesta a altos o bajos niveles de expresión de los genes transfectados, están refiriéndose a más del 90% de la población celular.

La mezcla de transfección se prepara en el momento y en el flujo laminar.

La preparación consta de una mezcla que posee el ADN/CaCl<sub>2</sub> (tubo A) y una solución de buffer fosfato (tubo B). Se incorporó gota a gota la mezcla del tubo A sobre el tubo B, en permanente agitación para favorecer la formación de precipitados pequeños de ADN/CaPO<sub>4</sub>. La mezcla de transfección se dejó 30 min a temperatura ambiente. Luego se agregó sobre las células en medio de cultivo y a las 5 horas se cambió el medio por medio fresco.

#### MEZCLA DE TRANSFECCIÓN 10X

##### Tubo A: ADN/CaCl<sub>2</sub>

5 µg/ml ADN plasmídico total

250 mM CaCl<sub>2</sub>

##### Tubo B: HeBs 2X pH 7,12

50 mM HEPES

280 mM NaCl

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

En los ensayos de sobre-expresión o inhibición de coactivadores, se sembraron  $8 \times 10^5$  células/placa de 10cm, con 9 ml de medio DMEM alta Glucosa. A las 24 horas se agregó 1 ml de la mezcla de transfección y 24 horas post-transfección, los cultivos fueron estimulados según se indica en cada caso en la sección de resultados, luego se hicieron extractos proteicos para ensayo de *Western blot*. En el caso de los ensayos de

supervivencia, 24 horas post-transfección las células se repicaron a placas de 96 pocillos a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo en 100  $\mu$ l de medio.

En los ensayos reporteros las células HEK293 se sembraron en placas de 24 pocillos, a una densidad  $5 \times 10^4$  células en 500  $\mu$ l de medio por pocillo. A las 24 horas se transfectaron con 200 ng de ADN (150 ng de RAC3 o pCMX, 40 ng del vector  $\kappa$ B-luciferasa y 10 ng del vector RSV- $\beta$ -Galactosidasa) por pocillo. A las 24 horas post-transfección se aplicaron los estímulos según se indican en cada caso.

#### 4.2. Transfección mediante electroporación y generación de clones estables

Las células leucémicas K562 presentan una muy baja eficiencia de transfección y el método más indicado es el protocolo recomendado por AMAXA Biosystems para transfección de K562 por electroporación.

Para todos los ensayos que no sean de genes reporteros se requiere que la población celular sea representativa del cambio introducido por transfección, dada la baja eficiencia de transfección de las células K562, se trabajó con clones de expresión estable que fueron seleccionados con el antibiótico G418 luego de la electroporación.

Se siguió paso a paso el protocolo de electroporación recomendado para K562 por Nucleofector kit V para líneas celulares (AMAXA Biosystems). Las células se transfectaron con el vector pCMX-RAC3 o pSilencer-RAC3-RNAi y su respectivo vector vacío como control (pCMX o pSilencer), más el vector PCR3.1 con resistencia a Neomicina, en una relación 20:1 y una concentración de ADN final de 1  $\mu$ g. Se resuspendieron  $5 \times 10^6$  células en 400  $\mu$ l de solución V (Nucleofector) junto a 1  $\mu$ g de ADN en las cubas aptas para electroporación. Se seleccionó el programa T-16 recomendado para K562 en el electroporador (AMAXA). Luego se agregó medio rico en suero y se sembraron las células en placa de 6 pocillos.

Luego de 20 horas post-transfección se cambió el medio y 24 horas después se realizó un recuento de células vivas con el colorante de exclusión azul de tripán, obteniendo el 60% de supervivencia. Las células transfectadas se seleccionaron mediante la utilización del antibiótico G418 a una concentración de 400  $\mu$ g/ml final.

Se generaron clones con RNA de interferencia anti RAC3, clones que sobre-expresan RAC3 y clones con el vector vacío correspondiente a cada plásmido.

## 5. ENSAYOS DE APOPTÓISIS Y SUPERVIVENCIA

### 5.1. Drogas y tratamientos

En los ensayos de supervivencia realizados en HEK293, se cultivaron  $1,5 \times 10^4$  células en placa de 96 pocillos, previamente transfectadas de manera transitoria con los vectores de expresión pCMX-RAC3 o pCMX. A las 24 horas se las estimuló con  $H_2O_2$  a distintas concentraciones (0,5-2 mM) por 8-12 y 24 horas.

El ensayo con inhibidores de de-acetiladas de histonas, se realizó utilizando Tricostatina A (TSA) a una concentración final de 1,6 nM por 24 horas combinado o no con  $H_2O_2$ .

En los ensayos con los inhibidores de MAPKs y AKT, fueron las células incubadas durante 30min, previo al estímulo con  $H_2O_2$  con: 100 nM de Wortmannin (Sigma) o 50  $\mu$ M de LY294002 (Calbiochen) o 20  $\mu$ M SB203580 (Sigma) o 200  $\mu$ M-1 mM de sulfasalazina (IVAX) o 0,1% DMSO como control.

Los clones de células K562 con RNAi, fueron estimulados con TRAIL (25-100 ng/ml) por 4-8-16 y 24 horas. Los clones que sobre-expresan RAC3 fueron estimulados con TRAIL 100 ng /ml combinado con el inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas Flavopiridol en una dosis de 150 nM por 4-8-16 y 24 horas.

### 6.2. Tinción de células supervivientes con cristal violeta

Monocapas de células HEK293 crecidas en placas de 96 pocillos fueron fijadas con una solución 0,2% Glutaraldehído/ 2% Formaldehído durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se tiñó con 0,5%v/v de cristal violeta en 50% de metanol. Luego de sucesivos lavados con agua, se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de Elisa.

### 6.3. Detección de célula apoptóticas

La determinación de células HEK293 apoptóticas se realizó con el kit Apo-Assay (Biocolor). La técnica se basa en la asimetría de la membrana lipídica, cuando las células entran en la etapa temprana de la apoptosis, la fosfatidilserina que se encuentra en contacto con el citoplasma en condiciones basales, queda expuesta al exterior (*flip-flop*) y el colorante del kit puede entrar al interior celular, tiñendo las células apoptóticas

de color rojo. Esto no ocurre si la muerte es por necrosis. Las células fueron observadas por microscopía y se efectuó conteo de células rojas en no menos de 4 campos distintos con 300 células cada uno.

#### **6.4. Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo**

En algunos experimentos de viabilidad de células K562 se determinó el número de células muertas por citometría de flujo. Se cuantificaron las células apoptóticas combinando un intercalante del ADN como el Ioduro de Propidio (IP) con Annexina V que se une a la fosfatidil-serina de la membrana plasmática. Se recolectaron 500  $\mu\text{l}$  de células a los tiempos indicados en cada experimento en la sección resultados. Luego se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en buffer unión (10 mM HEPES/ NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  de la solución ( $1 \times 10^5$  cel/ml) a tubos para citómetro y se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de de Annexina V-FITC y 10  $\mu\text{l}$  de IP. Se incubaron las células 15 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz, luego se agregó 200  $\mu\text{l}$  del buffer de unión antes de ser analizadas en el citómetro.

En ensayos independientes se utilizó la marcación con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Pharmigen) donde la célula apoptótica es permeable a la entrada de este colorante. Se incubaron  $2 \times 10^5$  células con 10  $\mu\text{l}$  de 7-AAD a  $37^\circ\text{C}$  por 20 min protegidas de la luz y se analizaron 10000 células por muestra en el citómetro Becton Dickinson FACScan utilizando los programas apropiados para cada marcación. Las células viables son Annexina, IP y 7-AAD negativas.

#### **6.5. Detección de pérdida de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por citometría de flujo.**

El fluorocromo lipofílico DiOC6 se incorpora en mitocondrias con elevado potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Sin embargo, cuando la mitocondria padece una pérdida de potencial de membrana, se produce una pérdida del fluorocromo y por consecuencia una pérdida de fluorescencia detectada por el citómetro de flujo.

A los intervalos indicados en la sección de resultados, se colectaron  $2 \times 10^5$  células, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 40 nM de DiOC6 por 20 min a

37°C protegido de la luz. Se analizaron 10000 células por citometría de flujo (Becton Dickinson).

## 7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS

### 7.1. Cosecha de células y preparación de extractos

Células HEK293 que previamente fueron transfectadas de manera transitoria con los plásmidos reporteros y estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM por 8 horas, se lavaron con PBS dos veces. Se agregaron 100 µl de *Reporter Lysis Buffer* (Promega) a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Se lisaron las células durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se colectó el lisado en microtubos, para centrifugarlos 5 min a 10.000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se separaron 15 µl en un microtubo para medir actividad luciferasa y 50 µl en placa de 96 pocillos para medir actividad β-galactosidasa.

### 7.2. Detección de la actividad luciferasa

El ensayo de actividad de la enzima luciferasa se realizó agregando 50 µl de reactivo *Luciferasa Assay System* (Promega) a los 15 µl de extracto celular o 15µl de buffer como control (blanco). Rápidamente se colocó el microtubo en el luminómetro (Triathler, Hidex) y se tomó la lectura a los 30 segundos para cada tubo. Siempre se protegió el ensayo de la luz directa.

La Unidades Relativas de Luminiscencia (URL) corresponden a las cuentas por segundo. Para el análisis de los datos se normalizaron los valores de actividad luciferasa con los valores obtenidos de la actividad β-galactosidasa.

### 7.3. Medición de la actividad β-galactosidasa

Para medir la actividad β-galactosidasa presente en los 50µl de extracto tomado, se agregó 50 µl de Buffer β-Gal que contiene el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido). Se incubó entre 30 a 60 min a 37°C protegido de la luz. Una vez que la mezcla viró a color amarillo, se frenó la reacción con 150µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de Elisa.

**SOLUCION UTILIZADA****Buffer  $\beta$ -Gal 2X**

0,2 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1 M	$\beta$ -mercapto-etanol
1,33 mg/ml	ONPG

**8. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD QUINASA**

La actividad de las MAPKs y AKT, se analizó utilizando la técnica de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra las quinasas activas fosforiladas y no fosforiladas.

**8.1. Estímulos**

Se plaqueron  $5 \times 10^4$  células HEK293 en placa de 6 pocillos. Luego de 24 horas post-transfección con los vectores RAC3 o pCMX, se estimularon las células por 30-60 y 120 min con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM.

Para estudiar la dosis inhibitoria de la actividad de p38 (SB203580) y AKT (LY294002 y Wortmannin), se las trató, previo al estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por 30 min con SB203580 entre 10-20  $\mu$ M, LY294002 entre 25-50  $\mu$ M y Wortmannin entre 50-100 nM.

**8.2. Preparación de extracto celular para quinasas**

Luego de los estímulos, se lavaron dos veces las células con PBS frío con 1 mM de PMSF. Luego se lisaron utilizando buffer de lisis para quinasas durante 30 min en hielo. Se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 10000 rpm. Se trasvasó el sobrenadante a nuevos microtubos para luego tratarlos con cracking buffer y sembrarlos en geles de poliacrilamida 12%.

## SOLUCIÓN UTILIZADA

### Buffer de Lisis

25 mM	HEPES pH 7.5
0,3 M	NaCl
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	EDTA
1% v/v	Triton X-100
1 mM	DTT
0,5%	Vanadato de Sodio
1 mM	PMSF
20 µg/ml	Leupeptina
0,5 mM	Fluoruro de Sodio

## 9. ENSAYO DE WESTERN BLOT

### 9.1. Preparación de extractos celulares

Las proteínas totales de HEK293 se obtuvieron a partir de una placa de 10 cm al 80% de confluencia. En el caso de la línea K562, se obtuvieron a partir de 20 ml de una suspensión de  $4 \times 10^5$  células/ml en el momento del estímulo.

Las células se colectaron (en frío) y se las centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Se hicieron 2 lavados con PBS y luego se las incubó 15 min en hielo con Buffer de Lisis.

Se centrifugó a 4°C a 10000 rpm por 10 min, el sobrenadante se trasvasó a nuevos microtubos. Luego se midió la concentración de proteínas y se desnaturalizó la muestra a 95°C por 5 min con *Laemmli buffer* 5X. Se sembraron las muestras en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### 9.2. Preparación de extractos nucleares y citoplasmáticos de células en cultivo

Con el objetivo de estudiar los niveles de las proteínas en los distintos compartimientos celulares mediante la técnica de *Western blot*, se extrajeron proteínas nucleares y citoplasmáticas utilizando dos protocolos para cada caso.



Se utilizaron cultivos de células con un 80% de confluencia al momento de la extracción. Todos los pasos se realizaron en hielo y centrifuga refrigerada.

Las células se colectaron y se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min. Luego se hicieron dos lavados con PBS frío. Se agregó 1 ml de buffer Hipotónico y se incubó 5 min en hielo, se homogeneizó con pipeta y un tip amarillo para favorecer la ruptura del citoplasma, quedando los núcleos intactos.

Se centrifugó 10 min a 1500 rpm y se separó el sobrenadante (fracción citoplasmática) en un nuevo microtubo, que se centrifugo 5 min a 10000 rpm para eliminar los detritos celulares. Se guardó el sobrenadante a -20°C para su posterior analisis en geles de poliacrilamida.

El *pellet* (núcleos) se lavó 3 veces con PBS. Se incubaron los núcleos con Buffer de Lisis durante 30 min en hielo. Luego se centrifugó 5 min a 10000 rpm. Se descartó el *pellet* y el sobrenadante se guardó a -20°C para su posterior análisis en geles de poliacrilamida.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### Buffer Hipotónico

10 mM	Tris-HCl pH 6.7
0,2 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT
0,5 mM	PMSF

##### Buffer de Lisis

20 mM	Tris-HCl pH 6.7
70 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10%	Glicerol
1%	Triton X-100
0,5%	NP-40
1 mM	DTT
0,5 mM	PMSF

### 9.3. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford.

Se tomaron 2  $\mu$ l de muestra y se diluyó en 798  $\mu$ l de agua, se agregó 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford 5X (BioRad). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La concentración se determinó por interpolación en una curva estándar de BSA (0,1-10 $\mu$ g).

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

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron utilizando minigeles entre 6-12% de acrilamida con SDS.

Se sembraron entre 10-20  $\mu$ l de muestra en *Laemmli buffer* y en la primer calle el marcador de peso molecular (Full range Rainbow, Amersham) como referencia.

Se corrió en cubas para minigeles (C.B.S. Scientific Co.) a 100V utilizando buffer de corrida 1X (25 mM TRIS, 193 mM Glicina y 200 ml Metanol/ litro).

### 9.5. Transferencia a membranas

Una vez terminada la corrida, los geles se lavaron durante 20 min en buffer de transferencia. Se utilizaron membranas de difluoruro de polivinilo PVDF (BioRad), previamente activadas en metanol 100% durante 1 min. La transferencia se realizó en frío durante 2-3 horas a 100V en buffer de transferencia.

Una vez terminada la transferencia, se tiñó la membrana con rojo ponceau, para controlar la adecuada transferencia de las proteínas.

### 9.6. Ensayo de *Western blot*

Las membranas fueron incubadas con 5% leche en polvo descremada (Molico) en T-TBS por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno para quitar el exceso de leche.

Con el anticuerpo primario se incubaron 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (de acuerdo a lo previamente establecido como óptimo para cada anticuerpo) diluido en T-TBS 0,5% BSA. Se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con T-TBS, para quitar el exceso del anticuerpo.

Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la proteína HRP (peroxidasa de rabanito) por 45 min a temperatura ambiente. Luego se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con T-TBS y un último lavado con TBS (sin Tween 20).

La membrana se cubrió con la solución de luminol, luego se colocó en un chasis y por encima de la membrana la película radiográfica (AGFA). Se expuso durante 1-15 min en oscuridad y se utilizó el kit de revelado (Kodak).

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### Buffer de Lisis

50 mM Tris pH 7.5

15 mM HEPES

0,3 M NaCl

2 mM EDTA

1 % Triton X-100

1 mM DTT

0,5 mM PMSF

##### Laemmli buffer 5X

0,3 M Tris pH 6.8

10 % SDS

25 % glicerol

0,05 % Bromo fenol azul

10 %  $\beta$ -mercaptoetanol

##### Buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS)

25 mM Tris Base

250 mM Glicina

0,1 % SDS

Rojo ponceau

0,1 % Rojo Ponceau

0,5 % Acido acético

T-TBS

20 mM Tris pH 7.6

9 g/l NaCl

0,05 % Tween 20

Buffer de transferencia

125 mM Tris

965 mM Glicina

**10. ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN**

Con el objetivo de determinar si dos proteínas interaccionan directa o indirectamente se utilizaron células HEK293 que fueron crecidas en una placa de 10 cm al 80% de confluencia. Se colectaron las células, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y luego se lavaron con PBS dos veces.

Se lisaron las células con buffer RIPA 10 min en hielo y luego de centrifugar 10 min a 10000 rpm, se trasvasó el sobrenadante a nuevos microtubos. Se tomaron 200 µl de lisado para incubar con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora en agitación a 4°C. Luego se agregó 10 µl de proteína G-Sepharosa (Amersham). Se incubó durante 1 hora y media a 4°C con agitación. Luego se centrifugó a 4°C por 5 min a 3000 rpm y el *pellet* (proteína de interés unida al anticuerpo y éste a la proteína G) se lavó 4 veces con 500 µl de buffer RIPA para eliminar las uniones inespecíficas.

Las muestras se desnaturalizaron con *Laemeli buffer 5X* y se sembraron en gel SDS-PAGE para su posterior análisis mediante *Western blot* utilizando los anticuerpos específicos para la detección de las proteínas de interés.

**SOLUCION UTILIZADA****Buffer RIPA modificado**

50 mM	Tris-HCl pH 7.4
1 %	NP-40
0,25 %	Deoxicolato de Sodio
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0,5 mM	PMSF

**11. ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO**

El coactivador RAC3, la proteína pro-apoptótica AIF y la proteína de choque térmico Hsp90 fueron analizadas en cuanto a su localización sub-celular por inmunofluorescencia y para el estudio de colocalización se utilizó microscopía confocal.

En placas de 24 pocillos se colocaron cubres de vidrios estériles (Fisherbrand), luego se sembraron  $5 \times 10^4$  células en 500  $\mu$ l de medio de cultivo por pocillo. Luego de 24 horas las células se estimularon según se indica en cada caso en la sección resultados. Post-estímulo las células se fijaron con una solución de 1% Glutaraldehído y 0,2% de Formaldehído. Los vidrios (con las células adheridas) se lavaron 3 veces con PBS. Luego se las permeabilizó con 0,2% de Tritón X-100 en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados con PBS para quitar el detergente y luego se bloquearon con 3% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS para retirar el exceso de BSA. Se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario disuelto en 3% BSA/PBS y se hicieron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a FITC o TRITC (Jackson) por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente 3 veces con PBS para quitar el exceso de anticuerpo y los vidrios fueron montados con una solución 50% glicerol en PBS.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas usando un microscopio Zeiss modelo Pascal Axiplan y analizadas con el programa de análisis de imágenes Carl Zeiss LSM5.

Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas usando un microscopio Nikon acoplado a una cámara digital (Nikon).

## 12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DR4 Y DR5

Con el objetivo de analizar los cambios en los niveles de expresión de los receptores de TRAIL (DR4 y DR5) en células K562 salvajes respecto a los clones con RNAi, se utilizó para cada receptor la marcación con anticuerpos específicos acoplado a un fluoróculo.

Luego de estimular células K562 con 25 ng/ml de TRAIL a distintos tiempos, como se indica en la sección de resultados, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS, a las cuales se agregó 1,5  $\mu$ g de anticuerpo anti- DR4 o DR5 acoplado a FITC (Alexis) y como control se utilizó un anticuerpo IgG1 inespecífico de ratón. Se incubaron las células con el anticuerpo durante 30 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 600 rpm por 5 min. Se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS cada uno y se resuspendieron las células en 300  $\mu$ l de PBS para ser analizadas en el citómetro de flujo. Un corrimiento de la curva hacia la derecha, significa un aumento en la cantidad de fluorescencia, o sea un aumento en los niveles de receptores.

## 13. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA

Para la detección de la hemoglobina, o sea de célula que adquirieron morfología eritroide en el caso de células K562, que son capaces de diferenciarse a eritrocitos, se utilizó el método de detección de la actividad peroxidasa, en el cual la peroxidasa oxida a la bencidina en presencia de  $H_2O_2$ , formándose un color oscuro en el sitio de la actividad de la enzima.

Brevemente se diluyeron 4 mg de bencidina (Sigma) en 800  $\mu$ l de Ácido Acético al 15%. En el momento de la reacción se agregó 200  $\mu$ l de  $H_2O_2$  10 volúmenes. Luego se tomó 50  $\mu$ l de una suspensión de  $2 \times 10^5$  células/ml en PBS y se adicionó 20  $\mu$ l de la solución de bencidina. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y luego se observaron las células al microscopio de contraste de fase. Las células positivas se tiñeron de azul.

## 14. ANTICUERPOS UTILIZADOS

Para los ensayos de *Western blot*, co-inmunoprecipitación e inmunohistoquímica se utilizaron los siguientes anticuerpos:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Especie</b>	<b>PM (kDa)</b>
SRC1	Santa Cruz(SC)	cabra	160
RAC3	SC	conejo	160
TIF2	SC	conejo	160
Caspase 7	Pharmigen	ratón	35-32-20
Caspase 9	SC	conejo	37-46-48
Caspasa 8	Alexis	ratón	43-55
Caspase 3/ CPP32	Transduction Lab	ratón	32
PARP(c-2-10)	BioMol	ratón	85-116
AIF (E-1)	SC	ratón	57-67
Cytochrom c (A-8)	SC	ratón	15
Bid (FL-195)	SC	conejo	15-22
Mcl-1 (S-19)	SC	conejo	37
SMAC/DIABLO	Upstate	ratón	25
IAP-1	SC	conejo	70
IAP-2	SC	conejo	68
XIAP/hILP	BD	ratón	53
Bcl-xL (S-18)	SC	conejo	32
Bax	SC	conejo	21-24
Bcl-2	Dako	ratón	28
Mcl-1 (S-19)	SC	conejo	37
E2F	SC	ratón	55
FADD	SC	conejo	24
FLIP	SC	conejo	55-28
AKT1(B1)	SC	ratón	60
p-AKT (Ser473)-R	SC	conejo	60
JNK1/2 (FL)	SC	conejo	46-54
p-JNK (G-7)	SC	ratón	46-54
ERK1/2 (K-23)	SC	conejo	44
p-ERK(E-4)	SC	ratón	42-44
p38	SC	ratón	43
pp38	Cell Signaling	conejo	43
Tubulina	Oncogen	ratón	57
Hsp 90	Dr. Echeverria	conejo	90
FKBP52	Dr. Galigniana	conejo	52
Dineína	Dr. Galigniana	ratón	73
DR4	Alexis	ratón	
DR5	Alexis	ratón	
Secundarios para IF			
FITC	Jacson	Conejo/ratón	
TRIC	Jacson	Conejo/ratón	

# **RESULTADOS**



## 1. RAC3 PROTEGE DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PERÓXIDO EN CÉLULAS HEK293

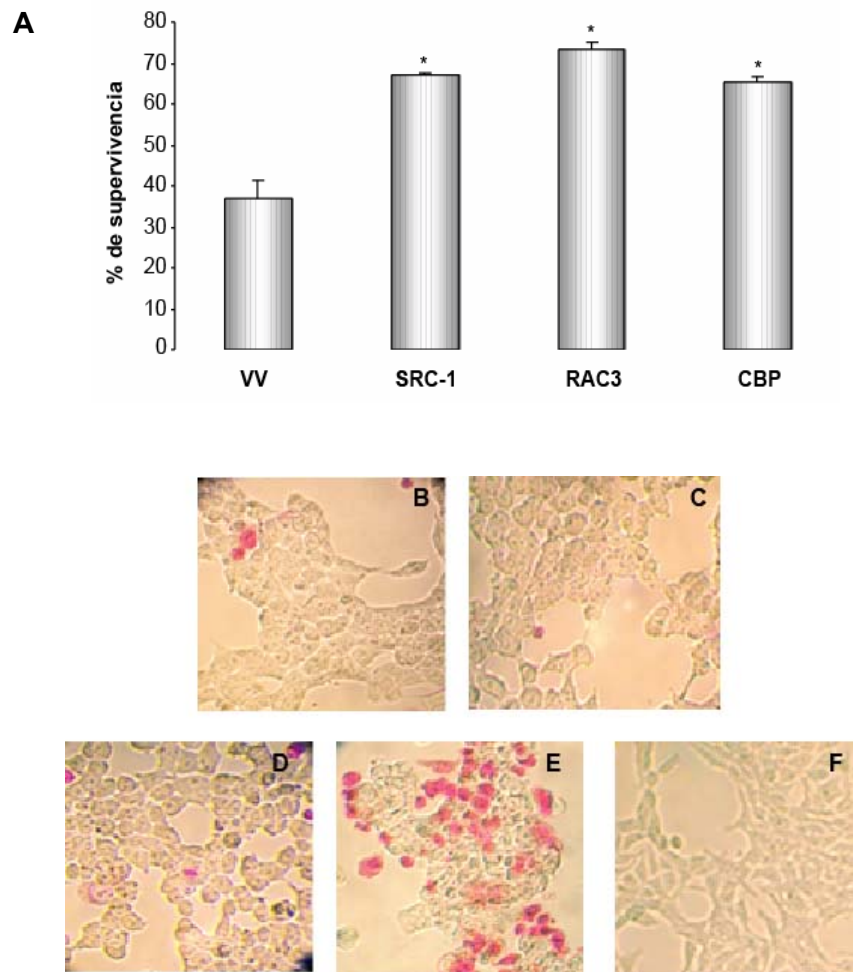
### 1.1. La sobre-expresión de coactivadores de la familia p160 y CBP protege a células HEK293 de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno

Con el fin de determinar el rol de los coactivadores de receptores nucleares con actividad HAT en la sensibilidad a la apoptosis, células HEK293 fueron transfectadas transientemente (con una eficiencia mayor al 90%, ver materiales y métodos) con los vectores de expresión constitutiva para los coactivadores: SRC-1, RAC3, CBP y el vector vacío pCMX (control). Estas células, al igual que la mayoría de las células normales, tienen niveles de expresión casi indetectables de coactivadores de la familia p160.

Como se describió en la introducción, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis por activación de la vía mitocondrial, despolariza la membrana mitocondrial y provoca la liberación de factores anti- y pro-apoptóticos que contribuyen a la activación de caspasas finalizando en la muerte celular<sup>8, 424</sup>.

En estos experimentos las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos y estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una dosis 2 mM por 16 horas. Como podemos observar en la figura 17A, la dosis de peróxido utilizada indujo en células transfectadas con vector vacío un 64±3 % de muerte celular respecto de células no estimuladas. Si bien los ensayos cuantitativos de estos experimentos fueron realizados por tinción con cristal violeta de las monocapas de células sobrevivientes y determinación de absorbancia a 570 nm, el uso de otra tinción específica permitió confirmar que la muerte inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en esta dosis ocurre por apoptosis. Para la detección específica de células apoptóticas fueron teñidas de rojo utilizando el kit APO-Assay (Biocolor) (Figura 17B)

De acuerdo con estos experimentos la sobre-expresión de los coactivadores disminuyó significativamente la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si se compara con células llevando vector vacío (Figura 17B). Estas observaciones sugieren que los coactivadores con actividad HAT poseen un efecto protector en células HEK293 ante la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



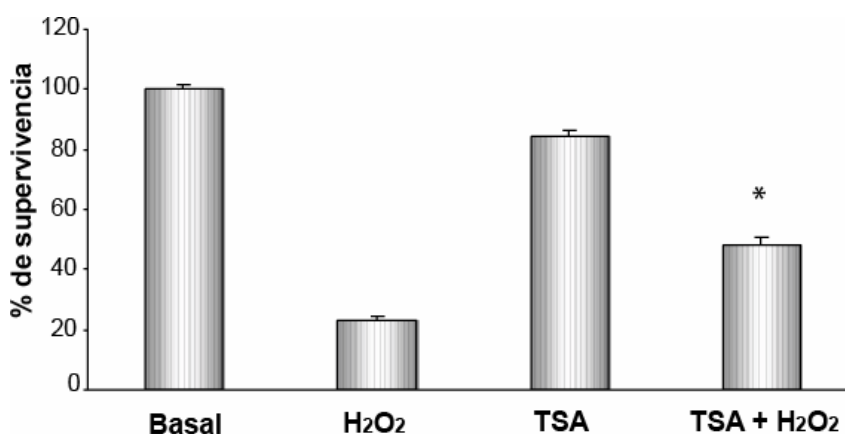
**Figura 17.** Protección de la apoptosis por los coactivadores de receptores nucleares. (A) Células HEK293 fueron transfectadas transientemente con los vectores de expresión indicados en la figura y fueron estimuladas por 16 horas con 2 mM de  $H_2O_2$ . Tinción con cristal violeta de células sobrevivientes y determinación de la absorbancia a 570nm. Cada medición se realizó por triplicado  $\pm$  ES. El porcentaje de las células sobrevivientes fue determinado respecto a la condición basal. \* $p < 0,001$  respecto al control (Test de Tukey). (A) RAC3, (B) SRC-1, (C) CBP, (D) Vector vacío (VV) y (E) Basal. Fueron estimuladas por 12 horas con 2 mM de  $H_2O_2$ . Se utilizó el kit APO-Assay (Biocolor) para detectar las células apoptóticas (células rojas).

## 1.2. La inhibición de la actividad de-acetilasa por TSA en células HEK293 disminuye la sensibilidad a la apoptosis.

Debido a que RAC3 y SRC-1 de la familia p160 poseen actividad acetiltransferasa<sup>282, 300</sup>, decidimos determinar si la acetilación está involucrada en la disminución de la sensibilidad a apoptosis en células HEK293, utilizando  $H_2O_2$  como

estímulo. Se estimularon las células durante una hora con un inhibidor de las de-acetiladas de histonas, como es la Tricostatina A (TSA)<sup>425</sup>, luego se trataron con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas y se tiñeron las células supervivientes con cristal violeta. Se midió la absorbancia a 570 nm y como se observa en la figura 18 hay una disminución del 20% de la apoptosis en células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y TSA, comparadas con las tratadas solamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La inhibición con TSA de las de-acetiladas de histonas, protege a la célula de la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados podrían sugerir que uno de los posibles mecanismos involucrados en la disminución de la sensibilidad a la apoptosis por los coactivadores, podría ser la acetilación de distintos factores contribuyendo a su actividad.



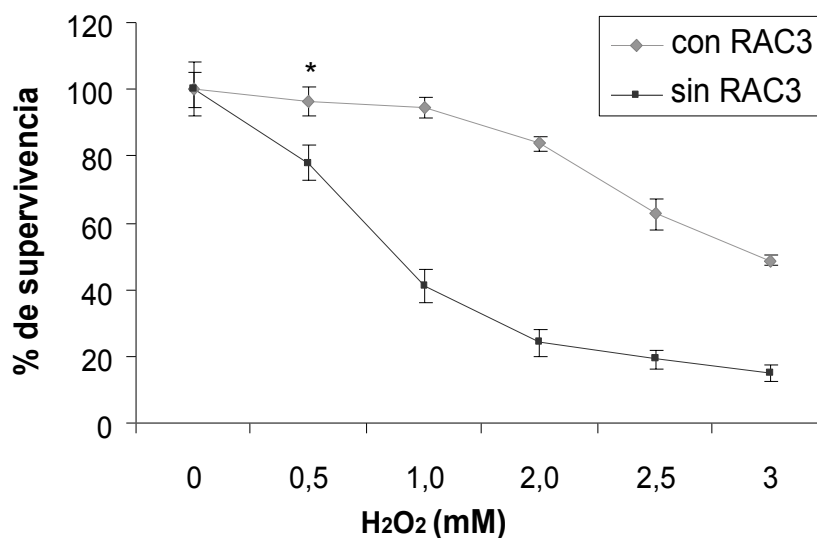
**Figura 18.** El aumento en la actividad acetilasa disminuye la sensibilidad a apoptosis. Células HEK293 fueron incubadas por 1 hora con TSA 1,6 nM, luego estimuladas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas. Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Se midió la absorbancia a 570 nm de por lo menos tres experimentos independientes  $\pm$ ES. \* $p < 0,001$  respecto a las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Test de Tukey)

### 1.3. La sobre-expresión de RAC3 disminuye la sensibilidad a apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en HEK293

De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una protección de la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células HEK293 que sobre-expresan coactivadores. En particular, RAC3 ha tomado relevancia en diversos procesos biológicos y se destaca de los otros coactivadores por su rol oncogénico<sup>356</sup>. Este coactivador es blanco de numerosos

estudios relacionados con la incidencia y progresión tumoral. Nosotros y otros autores hemos descrito a RAC3 como coactivador del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual entre otras funciones, tiene un rol anti-apoptótico<sup>293, 426</sup>.

Para confirmar el rol de RAC3 en la supervivencia de esta línea celular, transfectamos transientemente con el vector de expresión constitutiva pCMX-RAC3 células HEK293, cuyos niveles limitantes de coactivador son casi indetectables por la técnica de *Western blot*<sup>293, 427</sup> (Figura 20F). Luego de 24 horas post-trasfección, se estimularon las células con distintas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la figura 19, que corresponde al porcentaje de células supervivientes teñidas con cristal violeta, puede observarse una significativa protección de la apoptosis inducida por distintas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células que sobre-expresan el coactivador RAC3, comparadas con las células control, que fueron transfectadas con el vector vacío pCMX.



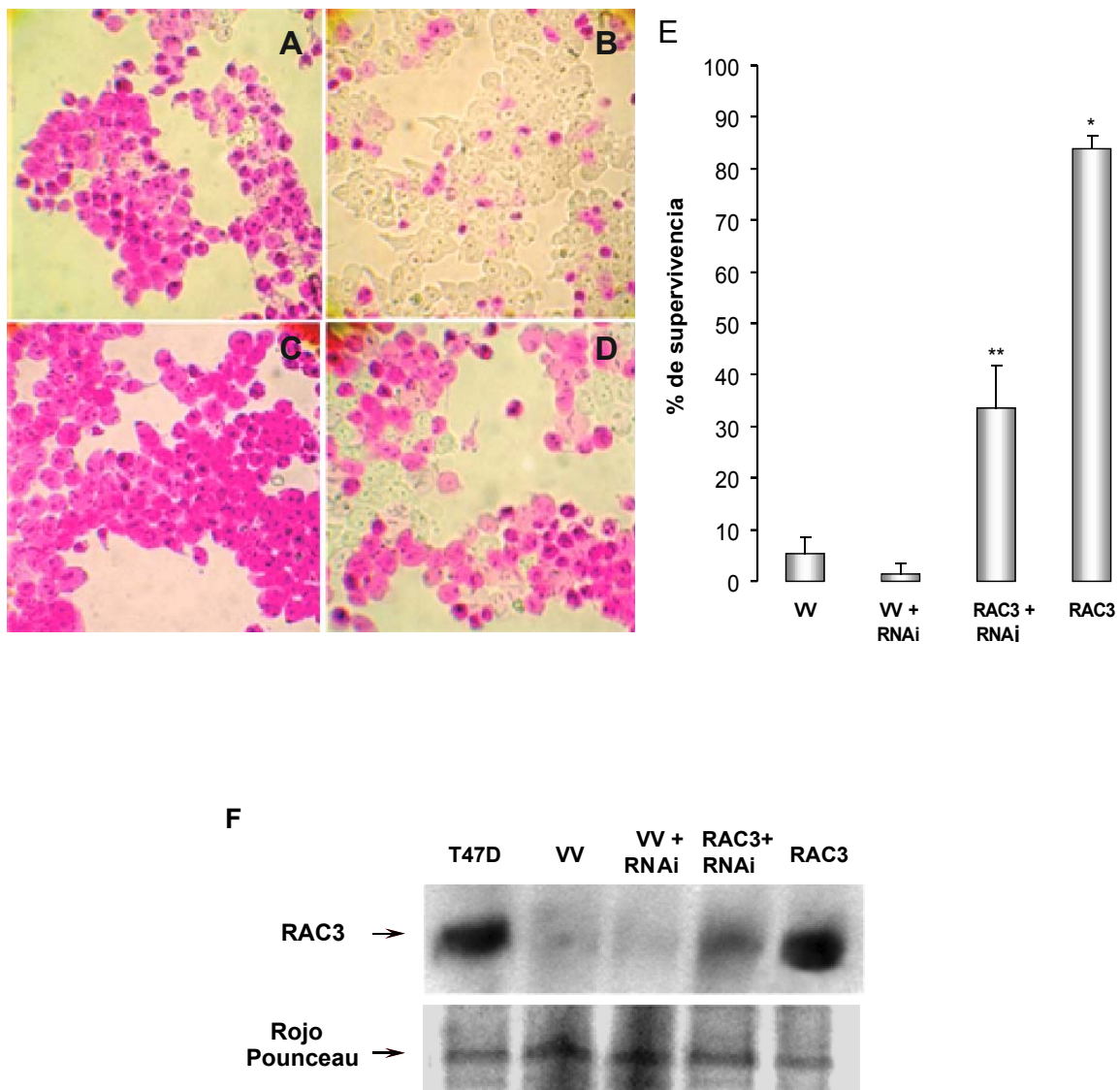
**Figura 19.** La sobre-expresión de RAC3 en HEK293 disminuye la sensibilidad a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Células HEK293 que sobre-expresan transitoriamente RAC3, se estimularon con distintas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas. Se tiñeron las células vivas con cristal violeta y se midió la absorbancia a 570 nm de por lo menos tres experimentos independientes  $\pm$  ES. Se analizaron los datos con el Test de Tukey y resultó al menos para la dosis mas baja de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> \*p<0,001 respecto al sin RAC3.

Con el fin de confirmar que la protección a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se debe solamente a la sobre-expresión de RAC3, decidimos construir un ARN de interferencia (RNAi) contra el coactivador (detallado en materiales y métodos) y de esta

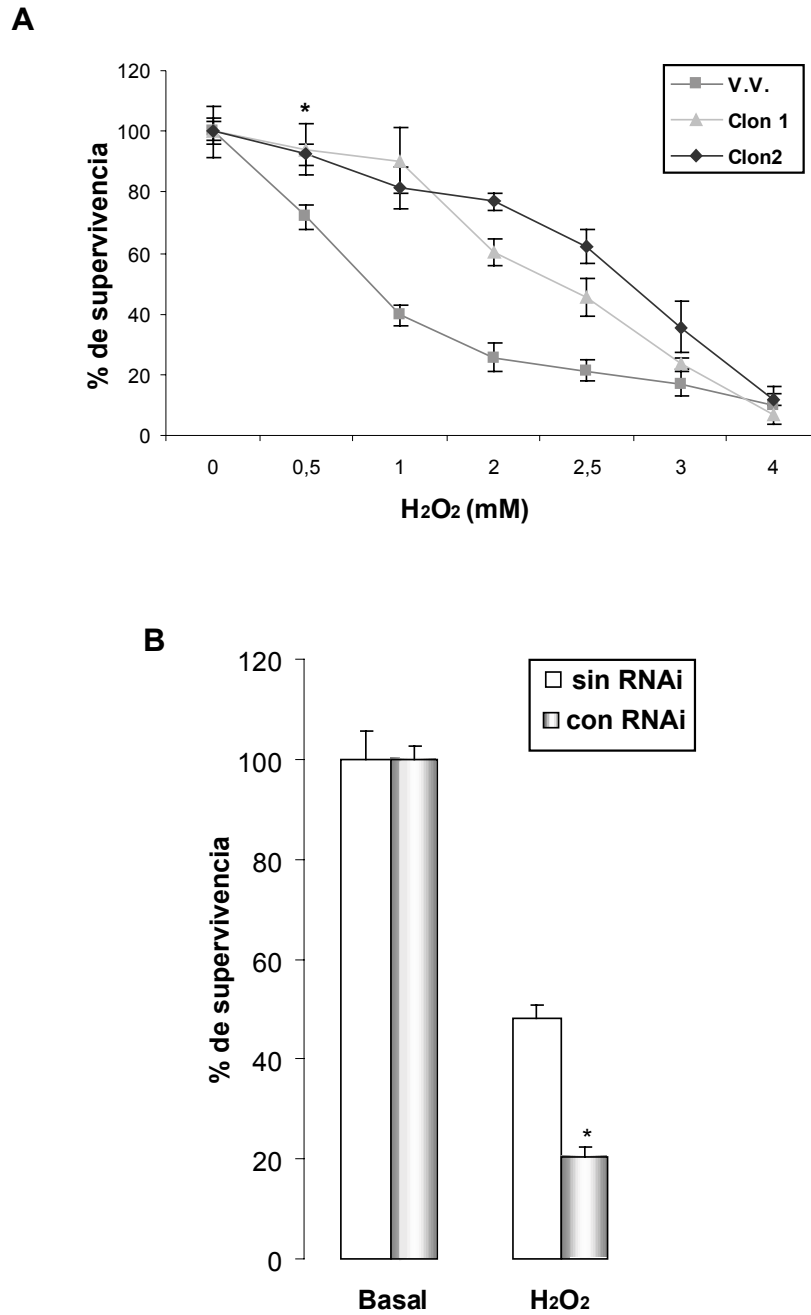
forma bajar los niveles endógenos y los sobre-expresados transitoriamente en células HEK293. Las células fueron transfectadas transientemente con los vectores de expresión para RAC3 o vector vacío, con o sin RNAi, luego de 24 horas, las células fueron expuestas a 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas. Las células apoptóticas se tiñeron de rojo (kit Biocolor), como se puede observar en la figura 20A-D y se cuantificaron por conteo al microscopio. Observamos una protección del 80% en células que sobre-expresan RAC3 respecto al vector vacío y claramente se revierte esta protección, cuando transfectamos con RNAi anti-RAC3 (Figura 20E). Mediante la técnica de *Western blot*, podemos observar los niveles de la proteína RAC3 en células de tumor de mama T47D, utilizadas como un control positivo, dado que sobre-expresan naturalmente éste coactivador<sup>428</sup>, *versus* HEK293 transfectadas con vector vacío, que poseen niveles casi indetectables y cuando transfectamos con el vector de expresión para RAC3 observamos un aumento de la proteína y una disminución de ésta con RNAi, como se puede observar en la figura 20F.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobre-expresión constitutiva de RAC3, se hicieron clones estables de células HEK293 que sobre-expresan este coactivador tal como se indica en Materiales y Métodos. Se aislaron varios clones resistentes a G418 y en la figura 21 se muestran dos clones representativos (clon 1 y 2). Las células transfectadas con vector vacío y con RAC3 fueron tratadas con distintas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas, como muestra la figura 21A, estos resultados demuestran una clara protección de la apoptosis en células con altos niveles del coactivador RAC3 comparado con las células control. Para revertir este efecto, procedimos a transfectar de forma transiente con el vector RNAi contra RAC3 los clones con alto niveles del coactivador. La figura 21B muestra que la disminución de RAC3 aumenta significativamente la apoptosis inducida por 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos demuestran claramente que RAC3 sobre-expresado en forma constitutiva, al igual que lo observado en ensayos de transfección transitoria, tiene un rol protector de la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células HEK293.



**Figura 20.** Aumento la apoptosis inducida por  $H_2O_2$  en células con bajos niveles de RAC3. Células HEK293 transfectadas transientemente con los vectores de expresión para: (A) Vector vacío, (B) RAC3, (C) Vector vacío más RNAi y (D) RAC3 más RNAi. Post-transfección las células fueron estimuladas por 24 horas con 2 mM de  $H_2O_2$ . (E) Análisis cuantitativo de células apoptóticas (rojas), se contaron no menos de 300 células por campo y se cuantificaron en tres campos diferentes para cada caso. Las barras representan el porcentaje de células supervivientes. Por medio de análisis con test de Tukey, de por lo menos tres experimentos independientes resulto un  $*p < 0,001$  respecto al vector vacío y un  $**p < 0,001$  respecto a células que sobre-expresan RAC3. (F) *Western blot* de células T47D (control) y HEK293 transfectadas transientemente con los vectores que se indica en la figura.



**Figura 21.** Clones estables que sobre-expresan RAC3, son más resistentes a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Curva de supervivencia de clones 1 y 2 con alto nivel de RAC3 versus vector vacío. Fueron estimulados por 24 horas a las dosis indicadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*p<0,001 al menos en la menor dosis respecto al control. (B) Diagrama de barras del clon 1, las células fueron transfectadas transientemente con RNAi o vector vacío. Se estimularon por 24 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*p<0,001 respecto a las células sin RNAi. En ambos casos se tiñeron las células supervivientes con cristal violeta y se midió la absorbancia a 570 nm de por lo menos tres experimentos independientes ± ES. Los valores se analizaron por el Test de Tukey.

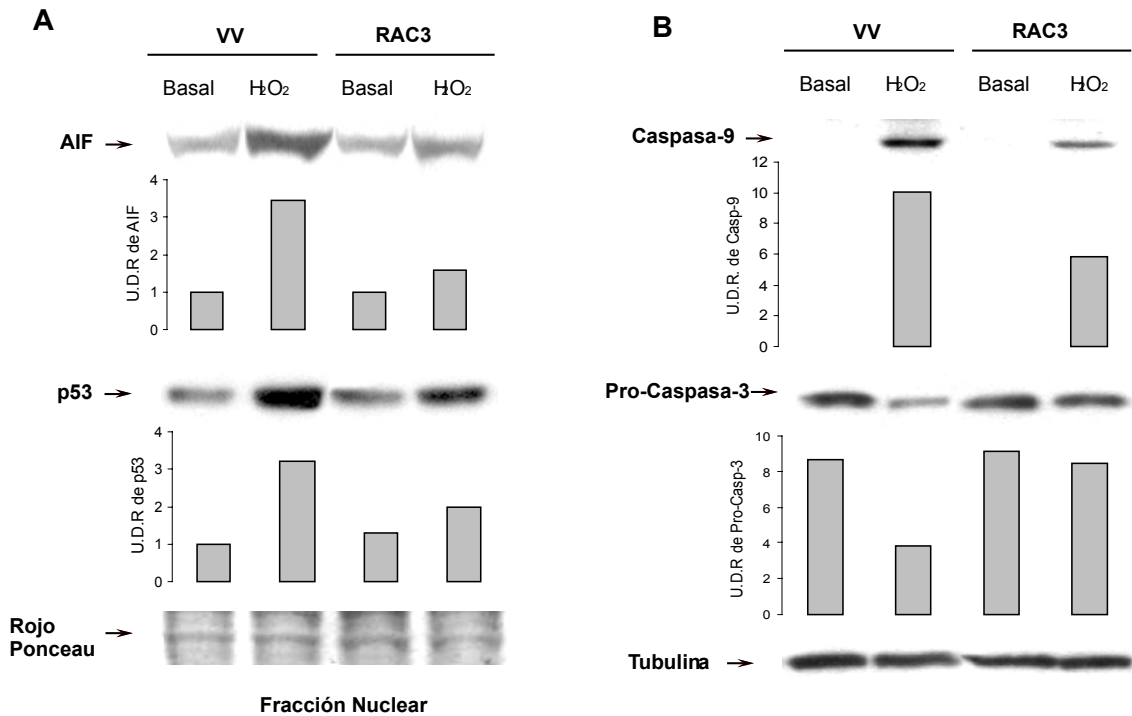
#### **1.4. La sobre-expresión de RAC3 disminuye la activación de caspasas y la localización de AIF y p53 al núcleo.**

Ha sido reportado que el peróxido de hidrógeno induce apoptosis por vía mitocondrial y promueve la liberación de numerosos factores pro- y anti-apoptóticos<sup>45, 429</sup>. Tal es el caso de AIF, que ante una señal de estrés que dispare la vía mitocondrial, se transloca al núcleo para clivar el ADN<sup>43</sup>. El gen supresor tumoral p53 también es activado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se transloca al núcleo para activar genes que frenan el ciclo celular<sup>36</sup>. Una vez desencadenada la vía mitocondrial y liberado el citocromo c, se produce la activación de caspasa 9 y la posterior activación de caspasa 3<sup>430</sup>.

Se analizó el efecto de la sobre-expresión de RAC3 en la activación de dichas moléculas. Para ésto se transfectaron transientemente células HEK293 con el vector de expresión pCMX-RAC3 o el vector vacío pCMX, después de 24 horas se estimularon con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas y se hicieron extractos de proteínas nucleares. Mediante la técnica de *Western blot* observamos un aumento en la localización de AIF y p53 en núcleo en células control respecto de las que expresan altos niveles del coactivador, tal como se observa en la figura 22A. De modo similar se estudió el efecto en la activación de caspasas en extractos de proteínas totales. Tal como se muestra en la figura 22B, se detectó un aumento de caspasa 9 y una disminución de la pro-caspasa 3 en células llevando vector vacío respecto de las que sobre-expresan RAC3.

Estas observaciones sugieren que el mecanismo por el cual el coactivador RAC3 protege a las células de la apoptosis involucra al menos, una disminución de la translocación de AIF y p53 al núcleo, y una disminución de la activación de caspasa 9.





**Figura 22.** Disminución de la activación de caspasas y de la localización nuclear de AIF y p53 por sobre-expresión de RAC3. Células HEK293 transfectadas transientemente con los vectores RAC3 y vacío. Fueron estimuladas por 24 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) *Western blot* anti- AIF y p53 de extractos de proteínas nucleares. (B) En extracto de proteínas totales, mediante la técnica de *Western blot* se detectaron los niveles de caspasa 9 y pro-caspasa 3.

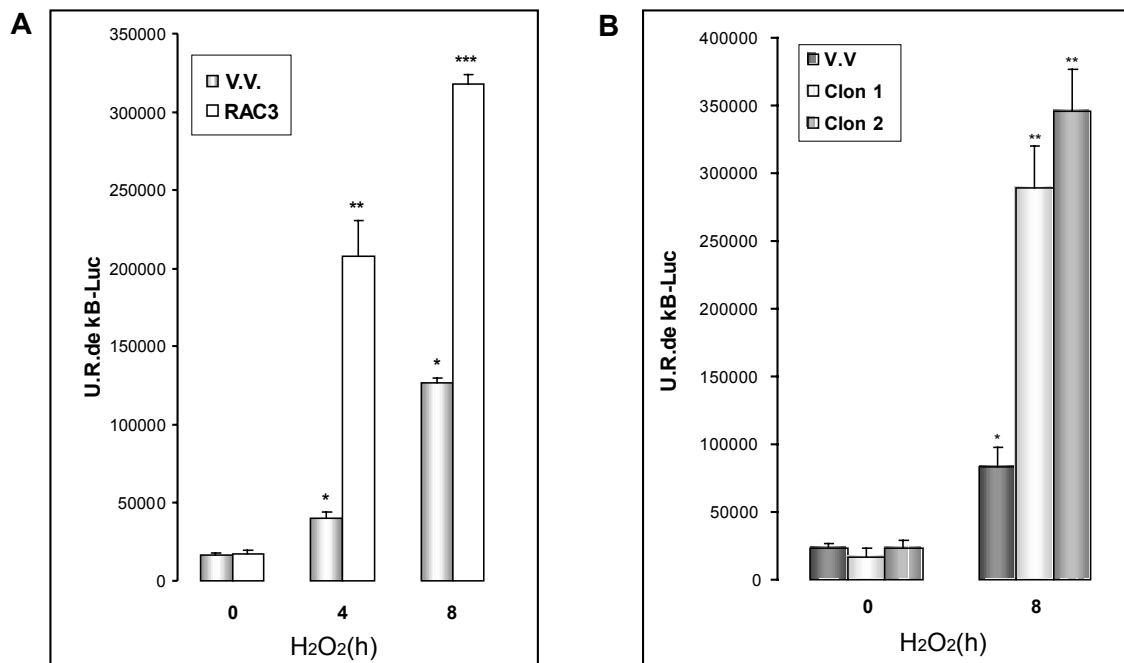
### 1.5. La sobre-expresión de RAC3 aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B y regula los niveles de expresión de sus genes blanco

Como hemos demostrado previamente nosotros y otros autores, RAC3 es coactivador de NF- $\kappa$ B<sup>293</sup>. Este factor de transcripción regula la expresión de numerosos genes, entre ellos genes pro- y anti-apoptóticos, como son los IAPs y la familia de Bcl-2 y una señal de estrés como el peróxido de hidrógeno es capaz de activar a NF- $\kappa$ B<sup>51, 144</sup>. Con el objeto de determinar la posible participación de este factor de transcripción en la protección de apoptosis mediada por RAC3, se analizó la actividad de NF- $\kappa$ B en células llevando altos o bajos niveles de RAC3. Para ésto, se transfectaron transitoriamente células HEK293 con el plásmido reportero  $\kappa$ B-luc (expresa luciferasa, bajo el control de un promotor que contiene elementos respondedores a NF- $\kappa$ B), junto a un plásmido que

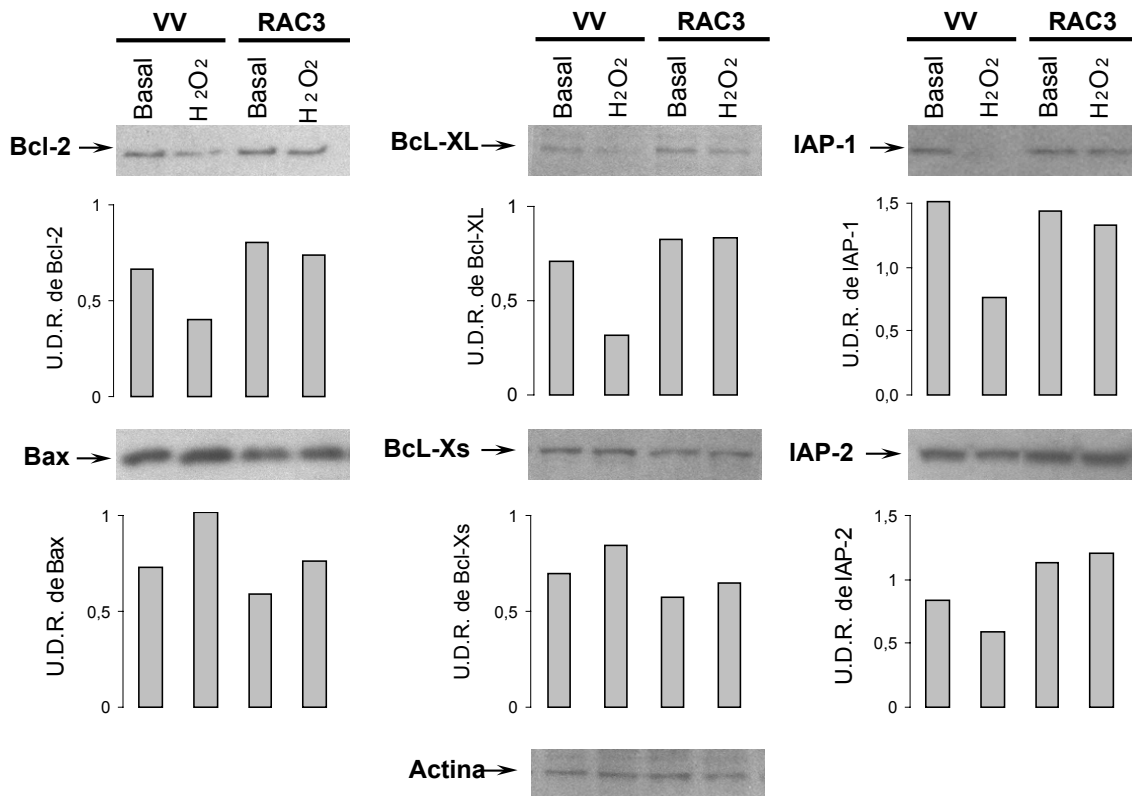
expresa  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección y los vectores pCMX-RAC3 o pCMX (control).

La sobre-expresión de RAC3 produjo un aumento significativo de la actividad NF- $\kappa$ B inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con respecto a las células control, tanto en células transfectadas transitoriamente como en los clones estables, como podemos observar en la figura 23A-B. Estos resultados sugieren que los cambios en los niveles de expresión de RAC3 podrían ocasionar un cambio en la expresión de los genes blanco anti-apoptóticos de NF- $\kappa$ B. Para ello se analizó mediante la técnica de *Western blot* los niveles de varios genes blanco de NF- $\kappa$ B en células con altos niveles de RAC3 *versus* control, en presencia de 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observó, como indica la figura 23C que la sobre-expresión de RAC3 aumenta moderadamente aunque de modo significativo los niveles de proteínas anti-apoptóticas: Bcl-2, Bcl-x1, cIAP-1 y c-IAP-2.

Estas observaciones sugieren que RAC3 a través de NF- $\kappa$ B, estaría regulando los niveles de expresión de genes anti-apoptóticos y refuerza la hipótesis planteada del rol anti-apoptótico del coactivador de receptores nucleares actuando como coactivador de este factor de transcripción.



C



**Figura 23.** Rol de RAC3 en la actividad transcripcional de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y sus genes blancos. (A) Células HEK293 transfectadas transitoriamente con los vectores:  $\kappa\text{B-luc}$ ,  $\beta$ -galactosidasa y RAC3 o pCMX (VV). Fueron estimuladas con 1mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tiempos indicados. Posteriormente se midieron las unidades relativas de luciferasa, normalizadas con los valores tomados de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados obtenidos en el luminómetro son las medidas de tres experimentos independientes  $\pm$  ES. \* $p < 0,001$  respecto al VV, 0 horas (basal); \*\* $p < 0,001$  respecto a VV 4 horas y \*\*\* $p < 0,01$  respecto a VV 8 horas (Test de Tukey) (B) Se transfectaron transientemente clones estables que sobre-expresan RAC3 con el vector  $\kappa\text{B-Luc}$  y  $\beta$ -galactosidasa. Luego se estimularon por 8 horas con 1mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Análisis de los datos idem B. \* $p < 0,001$  respecto a VV 0 horas y \*\* $p < 0,001$  respecto a VV 8 horas. (C) *Western blot* contra las proteínas indicadas. Células HEK293 que sobre-expresan o no RAC3, fueron estimuladas por 8 horas con 2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los gráficos de barra muestran las U.D.R. obtenidas con el programa Imagen J.

## 1.6. Rol de RAC3 en la regulación de la actividad de MAPKs y AKT

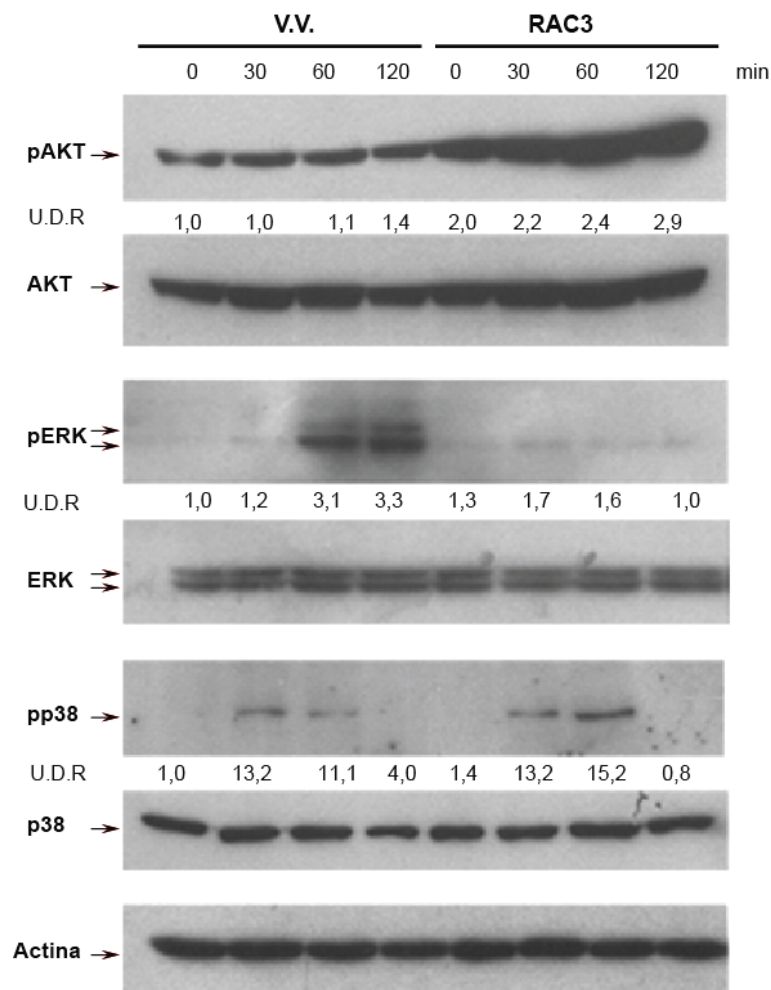
Existen numerosas evidencias que demuestran la participación de MAPK y AKT en el control del ciclo celular y supervivencia<sup>141</sup>. Con el objeto de determinar si la sobre-expresión de RAC3 afecta la actividad de las distintas quinasas, mediante la técnica de *Western blot* se analizó el patrón de expresión de AKT, ERK1/2 y p38, así como las quinasas activas mediante anticuerpos específicos para la quinasa fosforilada. En estos experimentos, se trabajó con extractos celulares totales de células HEK293 transfectadas transientemente con el vector de expresión para RAC3 o con vector vacío. Tal como se muestra en la figura 24, podemos observar que los niveles de la quinasa total (sin fosforilar) permanecieron constantes durante los distintos estímulos con peróxido de hidrógeno y en presencia o no del coactivador, en cambio, las quinasas fosforiladas cambiaron su patrón. La activación de AKT aumentó considerablemente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células que sobre-expresan RAC3 respecto de células llevando vector vacío. Este aumento fue claramente mayor a partir de los 30 minutos hasta los 120 minutos inclusive. Resultados similares, pero menos pronunciados se observaron en la activación de la quinasa p38: a los 60 minutos de estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las células con alto nivel de RAC3 mostraron un aumento de fosfo-p38 respecto a las células con bajo nivel. Sin embargo, el peróxido activó considerablemente a ERK1/2 luego de 60-120 minutos en las células transfectadas con vector vacío, en cambio las células que sobre-expresan RAC3 no mostraron ningún efecto en el patrón de fosforilación.

Estos resultados demuestran que la sobre-expresión de RAC3 en HEK293 aumenta la activación de NF-κB (Figura 23), de AKT y p38 en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminuye la activación de ERK1/2 (Figura 24). Estos eventos podrían estar contribuyendo a la disminución de la sensibilidad a la apoptosis por la sobre-expresión de coactivador.

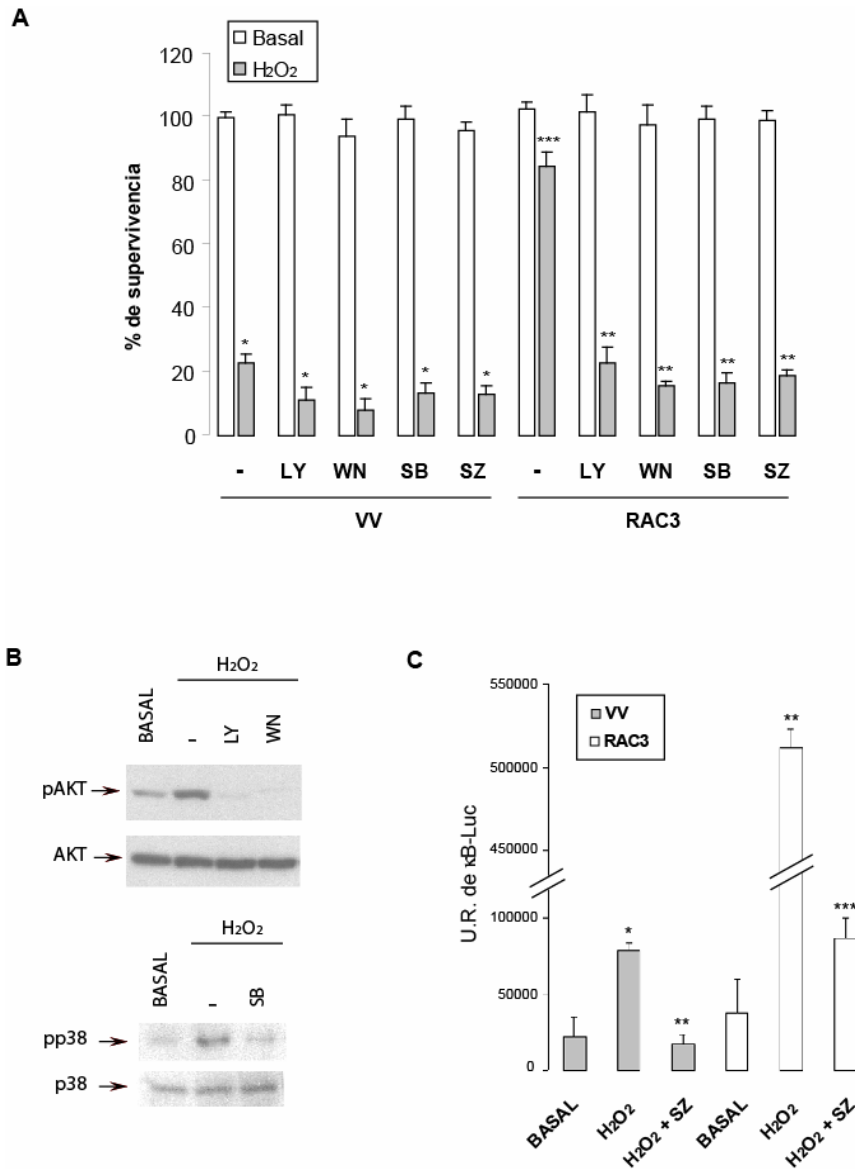
Dado que los resultados obtenidos sugieren la participación de las cascadas de señales de p38, AKT y NF-κB en la acción protectora de RAC3, se quiso determinar si la inhibición de estas cascadas tenía algún efecto en la acción anti-apoptótica de RAC3. Para estos estudios las células que sobre-expresan o no RAC3 fueron incubadas con los distintos inhibidores previo al estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y luego se determinó el nivel de muerte celular. Para inhibir p38 se utilizó el inhibidor SB202190; para inhibir la vía de AKT se utilizó wortmannin o LY294002 que son inhibidores de PI3K y para inhibir la

actividad de NF- $\kappa$ B se pre-incubaron las células con sulfasalazina<sup>76, 80</sup>. Luego de 30 minutos de incubar las células con los inhibidores se estimularon con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se muestra en la figura 25A, todos los inhibidores inhibieron significativamente el efecto protector de RAC3, no afectando los niveles basales, demostrando que estas vías de señalización son necesarias para el rol protector de RAC3.

La efectividad de las dosis de inhibidores empleada fue confirmada por la técnica de *Western blot* para AKT y p38 y por ensayos reporteros para la actividad NF- $\kappa$ B (Figura 25B).



**Figura 24.** La sobre-expresión de RAC3 modula la actividad de AKT, ERK y p38. Células transfectadas transientemente con el vector RAC3 o vector vacío, fueron estimuladas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los tiempos indicados. Mediante la técnica de *Western blot* se analizó la activación de las quinasas utilizando anticuerpos específicos. Las unidades relativas (U.R.D) se calcularon a partir la intensidad de la banda quinasa activa *versus* quinasa total en el programa Imagen J.



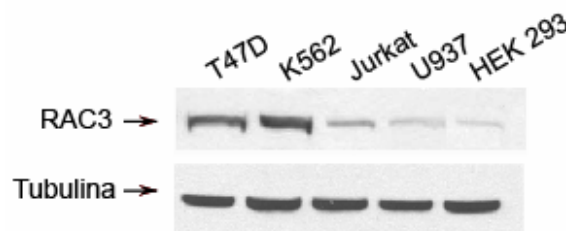
**Figura 25.** La activación de las vías AKT, p38 y NF- $\kappa$ B son necesarias para la correcta protección de la apoptosis por RAC3. (A) Células transfectadas transientemente con los vectores de expresión RAC3 o pCMX (VV), fueron pre-incubadas por 30 minutos con los siguientes inhibidores: 20  $\mu$ M de SB202190 (SB), 100 nM de wortmannin (WN), 50  $\mu$ M de LY294002 (LY) y 400  $\mu$ M de sulfasalazina (SZ). Luego se estimularon por 24 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las células sobrevivientes fueron teñidas con cristal violeta y se determinó la absorbancia a 570 nm. Cada valor corresponde al promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  ES, el porcentaje fue determinado respecto al basal. \* $p < 0,01$  respecto al tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con vector vacío, \*\* $p < 0,001$  respecto al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células que sobre-expresan RAC3, y \*\*\* $p < 0,001$  respecto al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con VV (Test de Tukey). (B) *Western blot* de células transfectadas transientemente con el vector RAC3 o vector vacío, se pre-incubaron por 30 minutos con los inhibidores para: p38 con 20  $\mu$ M de SB202190 (SB) y para AKT con 100 nM de wortmannin (WN) o 50  $\mu$ M de LY294002 (LY), luego se estimularon las células con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min. (C) Ensayo reportero de células con o sin RAC3, se pre-incubaron con 400  $\mu$ M

de sulfasalazina (SZ) y luego con 1 mM por 8 horas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las unidades de luminiscencia relativa (U.R.) de  $\kappa$ B-luciferasa fueron normalizadas con los valores correspondientes al ensayo de  $\beta$ -galactosidasa.

## 2. LA DISMINUCIÓN DE RAC3 ENDÓGENO EN LA LÍNEA MIELOIDE LEUCÉMICA K562, LAS SENSIBILIZA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TRAIL

### 2.1. Las células K562 expresan altos niveles endógenos de RAC3

RAC3 se encuentra sobre-expresado en varios tumores hormono-dependientes y no dependientes<sup>275, 344, 352, 354</sup>. El objetivo original de los estudios en la línea celular K562 era determinar si los efectos de RAC3 observados en las células HEK293 se reproducían en estas células tumorales. Por lo tanto, antes de comenzar con los experimentos de transfección, se procedió a determinar los niveles de RAC3 en estas células. Para ello, se utilizó como control positivo de expresión de RAC3 la línea de tumor de mama T47D y como control de baja expresión del coactivador la línea HEK293. Mediante el análisis de los niveles de proteína en ensayos de *Western blot*, pudimos observar, sorprendentemente, que la línea leucémica mieloide crónica K562 posee altos niveles del coactivador RAC3 si se compara con otras líneas leucémicas como la línea Jurkat, de leucemia linfoblástica aguda de tipo T y la línea U937, derivada de linfoma humano histiocítico tipo monocítico y mas aún, son similares a aquellos detectados en las células T47D, como se indica en la figura 26.



**Figura 26.** Niveles del coactivador RAC3 en distintas líneas celulares. Western blot anti-RAC3 en extractos totales de células T47D, K562, Jurkat, U932 y HEK293.

## 2.2. La inhibición de RAC3 sensibiliza las células K562 a la apoptosis inducida por TRAIL

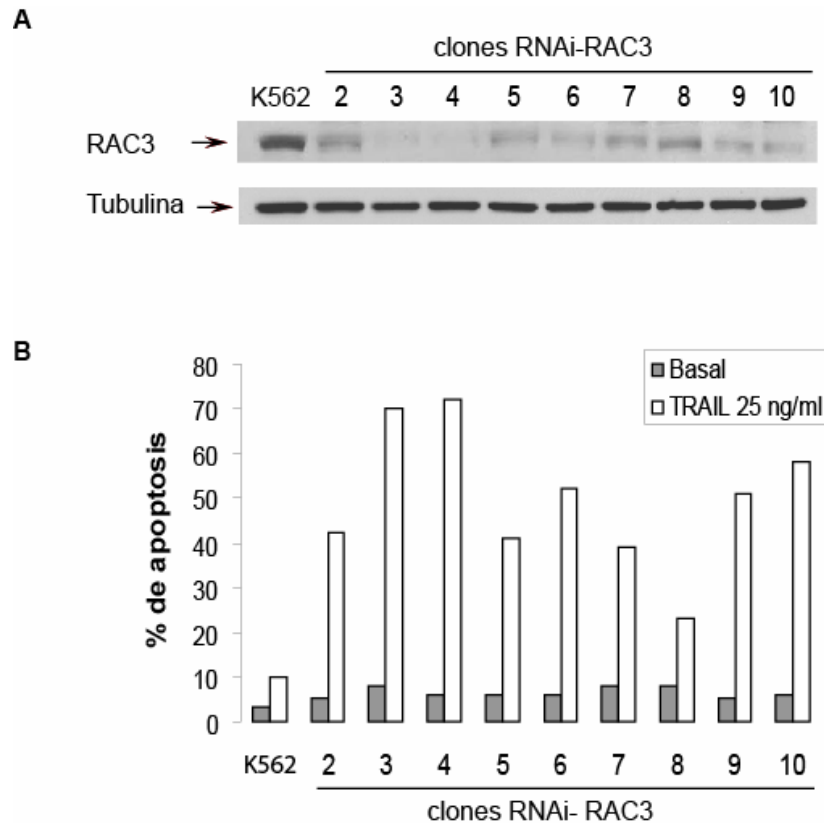
Ha sido descrito que las células K562 son resistentes al tratamiento con TRAIL, a diferencia de otras células tumorales. Esta citoquina de la familia del TNF, puede inducir apoptosis por activación del DISC y la posterior activación de las caspasas efectoras. Dependiendo del tipo celular, hay activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y c-Jun que regulan genes anti-apoptóticos, como FLIP o pueden amplificar la señal pro-apoptótica a través de genes que activan la vía mitocondrial (figura 7)<sup>111</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos, decidimos investigar que rol tiene RAC3 en la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL en la línea tumoral leucémica K562. Dado que estas células resultaron sobre-expresar el coactivador, para el estudio de su rol en apoptosis se procedió a disminuir los niveles de RAC3 endógeno mediante RNAi contra RAC3.

En esta línea celular la eficiencia de transfección es muy baja y por lo tanto debe trabajarse con clones. Por lo tanto, se seleccionaron varios clones resistentes a neomicina con el antibiótico G418 y mediante *Western blot* se analizaron los niveles de RAC3 de cada clon, los cuales fueron comparados con la línea K562 salvaje. Observamos que el RNAi-RAC3 produjo una clara disminución de los niveles de expresión de coactivador en los distintos clones seleccionados (Figura 27A). Se trataron los clones con 25ng/ml TRAIL y observamos que todos los clones presentan un aumento en la apoptosis dependiendo de los niveles de RAC3 que poseen, mientras que las células salvajes son resistentes, tal como se indica en la figura 27B.

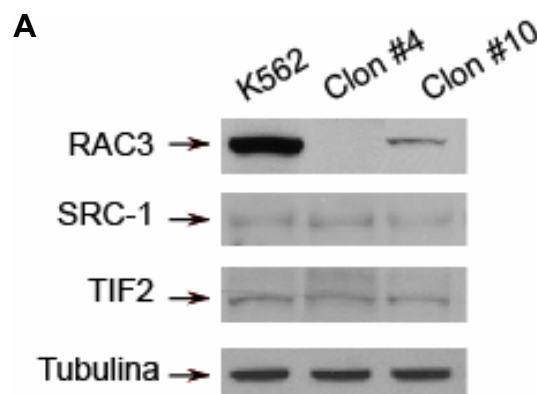
Elegimos para trabajar dos clones de la población, uno con niveles casi indetectables por *Western blot* de RAC3 (clon #4) y otro con niveles medios del coactivador (clon #10), se estudio en éstos clones si la disminución de RAC3 podría afectar a los otros coactivadores de la familia p160, como se observa en el figura 28A no se ven afectados los niveles de SRC-1 como los de TIF2 en los clones con bajos niveles de RAC3.

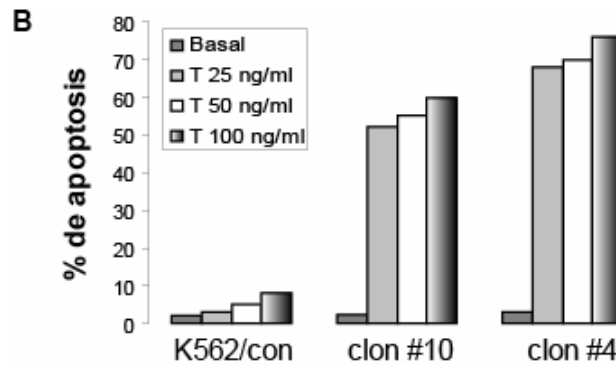




**Figura 27.** La disminución de RAC3 por RNAi, sensibiliza a las células K562 a la apoptosis inducida por TRAIL. (A) Western blot anti-RAC3 de células K562 salvajes y clones estables transfectados con RNAi-RAC3. (B) Análisis de la sensibilidad a apoptosis en los clones de RNAi-RAC3 luego de estimular con TRAIL 25 ng/ml por 16 horas. Se tiñeron con 7-AAD y se detectaron las células apoptóticas por citometría de flujo.

Una disminución del coactivador aumenta considerablemente la apoptosis en los clones #4 y #10 comparado con las K562 control a las 16 horas de tratamiento con 25-100 ng/ml de TRAIL, como indica la figura 28B. Decidimos trabajar con la dosis mas baja que induce apoptosis (25 ng/ml), de esta manera podremos estudiar el efecto de los niveles de RAC3 en la apoptosis.



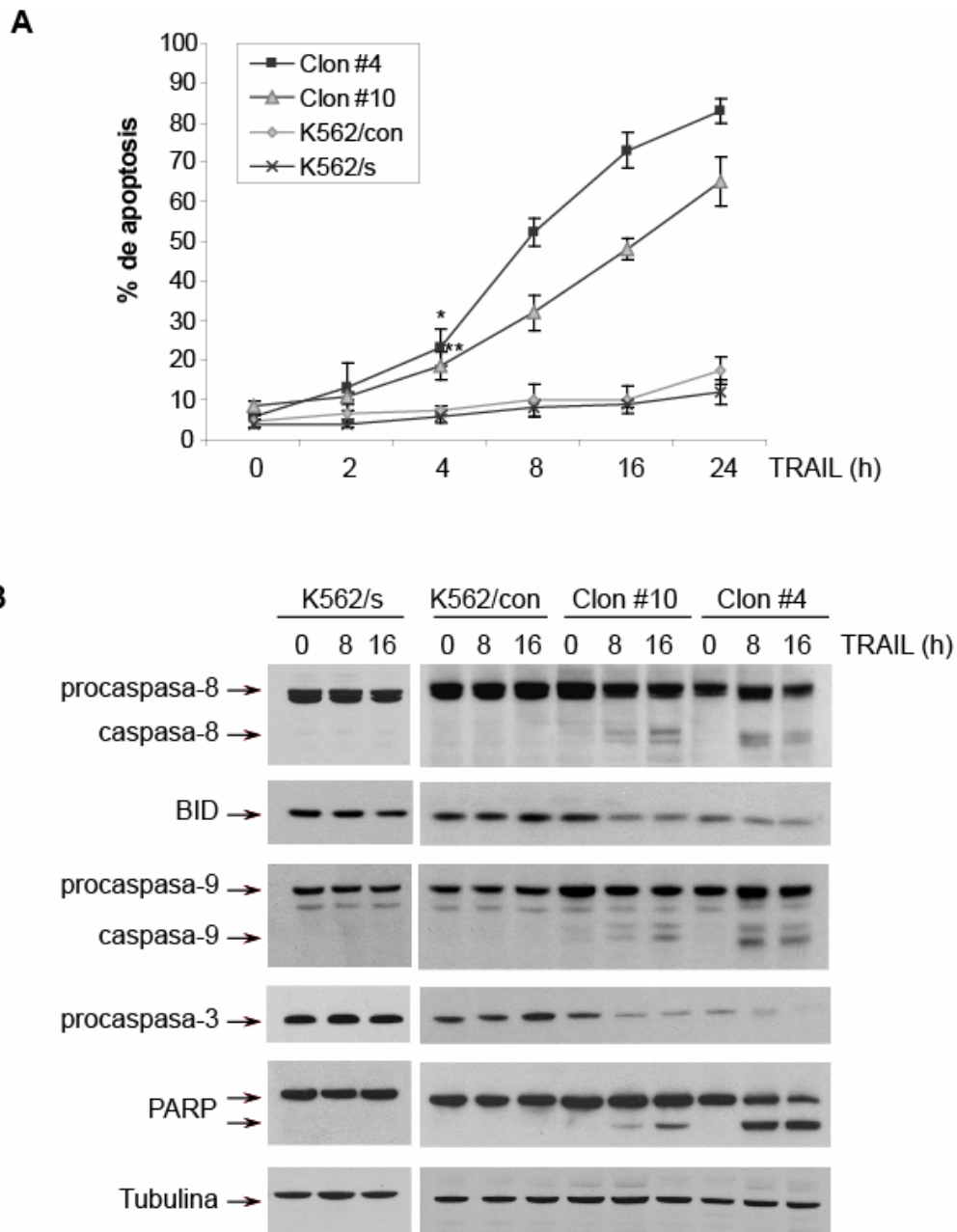


**Figura 28.** La disminución de RAC3 no afecta a los otros coactivadores de la familia p160. (A) Análisis de los niveles de los coactivadores RAC3, SRC-1 y TIF2 por medio de *Western blot* de K562 salvajes y clones transfectados de manera estable con RAC3-RNAi (clon #4 y #10). (B) Células K562 control y clones #4 y #10 con RAC3-RNAi, fueron tratados por 16 horas con distintas dosis de TRAIL y las células apoptóticas fueron identificadas mediante la tinción con 7-AAD y análisis en citometría de flujo.

### 2.3. Mayor activación de caspasas y aumento del clivaje de Bid y PARP en clones estables con bajos niveles de RAC3

Mediante análisis por citometría de flujo, previa tinción con Ioduro de propidio y Anexina V observamos a distintos tiempos un claro aumento de la apoptosis en clones #4 y #10 con RAC3-RNAi comparados con las K562 salvajes y el control luego de ser tratados con 25ng/ml de TRAIL a distintos tiempos (figura 29A). Este aumento en la sensibilidad a apoptosis inducida por TRAIL en ambos clones con bajos niveles de RAC3 produce la activación de caspasas involucradas en la vía extrínseca, como la caspasa 8 y de su sustrato Bid, el cual actúa como conector entre la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis<sup>431</sup>. De esta manera, podemos observar mediante la técnica de *Western blot* una clara activación de caspasa 8, disminución de Bid, activación de caspasa 9, degradación de la caspasa 3 y clivaje de PARP ante una disminución de RAC3 comparado con las células salvajes y control, luego de estimular con 25ng/ml de TRAIL a distintos tiempos (Figura 29B).

Estos resultados refuerzan la hipótesis de la inducción de apoptosis mediante TRAIL en células mieloides leucémicas con muy bajo RAC3 (clon #4) y medianos niveles de RAC3 (clon #10) comparadas con las K562 salvajes, y que la activación de los receptores de muerte por TRAIL esta disparando la activación de caspasas involucradas en la apoptosis por vía mitocondrial y esta sensibilidad varia según los niveles de RAC3 en células mieloides leucémicas.



**Figura 29.** Aumento de la apoptosis y activación de caspasas, Bid y PARP por TRAIL en células con bajo RAC3. (A) Células mieloide leucémicas salvajes (K562/s), clones #4 y #10 y su respectivo control con vector vacío (K562/con) fueron estimulados a distintos tiempos con 25 ng/ml de TRAIL. Luego se incubaron con ioduro de propidio y anexina V, para ser analizadas por citometría de flujo. Los resultados son las medidas de tres experimentos independientes  $\pm$  ES. \* $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,05$  respecto al control, 4 horas con TRAIL (Test de Tukey). (B) *Western blot* de extractos totales de células K562/s, K562/con y clones #4 y #10, luego de ser estimuladas con 25 ng/ml de TRAIL por 8 y 16 horas.

#### **2.4. TRAIL induce la activación de la vía mitocondrial en células con bajos niveles de RAC3**

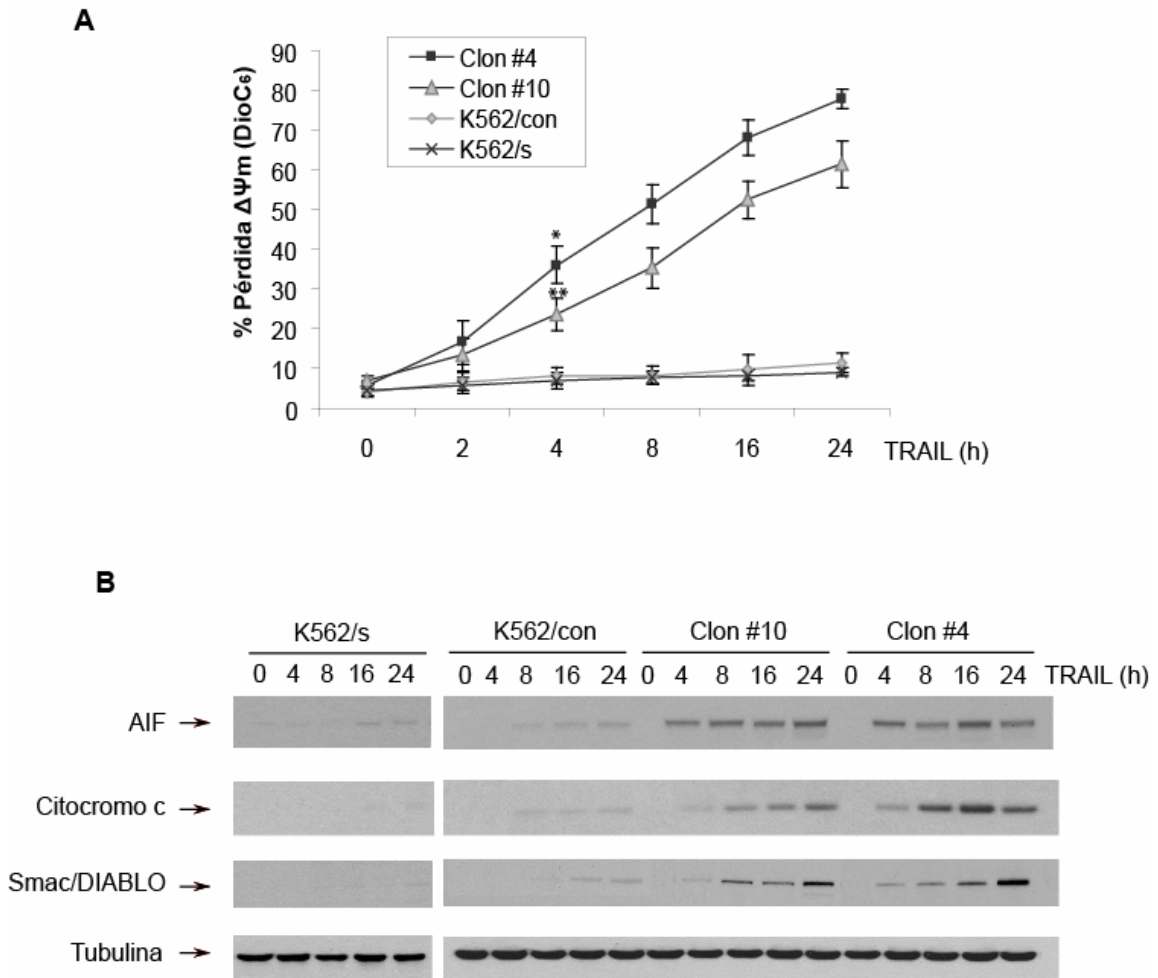
Se ha descrito que la citoquina TRAIL puede activar la vía extrínseca por los receptores de membrana con participación de la vía mitocondrial<sup>431</sup>(Figura 7). Decidimos estudiar que pasaba con la membrana mitocondrial y los factores involucrados en esta vía. Para ello estimulamos las células K562 con 25 ng/ml de TRAIL por 2, 4, 8, 16 y 24 horas, luego se incubaron con el fluorocromo lipofílico DiOC<sub>6</sub> (40nM) para estudiar la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) por disminución de la incorporación del fluorocromo. La figura 30A muestra mediante el análisis por citometría de flujo un claro aumento en la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  en los clones #4 y # 10 comparado con su respectivo control y las células salvajes.

Cuando la membrana mitocondrial se ve afectada, se produce la liberación de numerosos factores desde la mitocondria al citoplasma<sup>31, 41</sup>, decidimos estudiar la fracción citoplasmática (S100) de ambos clones y de células controles por *Western blot*. Hay un claro aumento de AIF, citocromo c y Smac/DIABLO en la fracción citoplasmática de los clones #4 y #10 respecto al control y las K562 salvajes, post-estimulo con TRAIL a distintos tiempos, como se indica en la figura 30B.

Observamos que el aumento en la pérdida de potencial de membrana, acompañado con un aumento en la liberación de factores pro-apoptóticos desde la mitocondria varían según la expresión de RAC3, indicando que la disminución de éste coactivador y posterior estímulo con TRAIL induce apoptosis en células K562 por ambas vías extrínseca como intrínseca.

#### **2.5. Aumento en la expresión de DR4 y DR5 por disminución del coactivador RAC3**

Muchas células son naturalmente sensibles a TRAIL, esto podría deberse a un aumento en los receptores de muerte DR4 y DR5<sup>432, 433</sup>, se ha descrito que la sensibilidad en varios de estos tipos celulares correlaciona directamente con la cantidad de receptores expresados, mientras que las K562 poseen 13,1% de la expresión de DR5 las células Jurkat y U937 poseen mas del 95% , y su sensibilidad a la apoptosis es de 12,3% en las K562 y alrededor del 80% en las Jurkat y U937<sup>434</sup>.



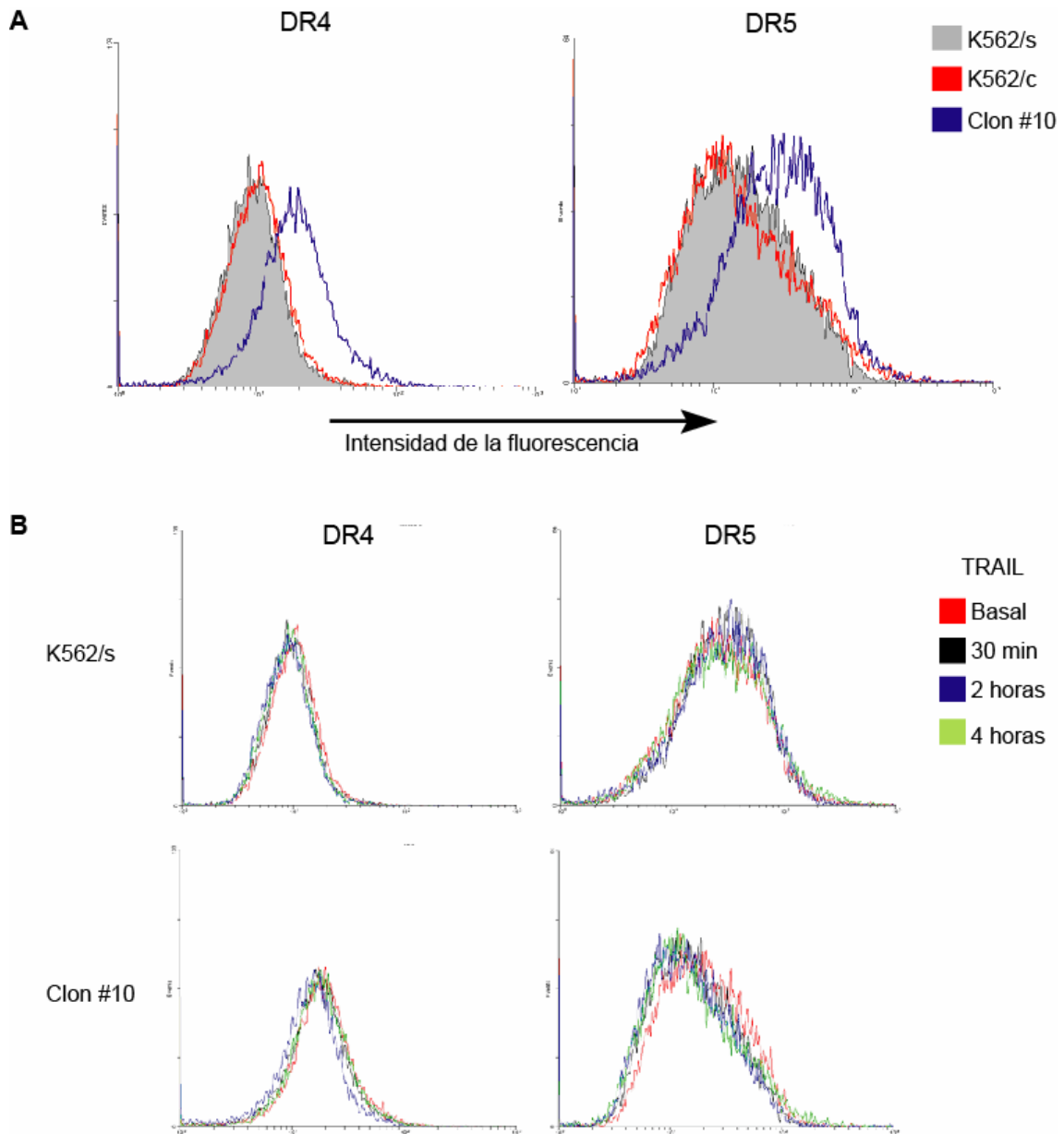
**Figura 30.** TRAIL induce daño mitocondrial y liberación de factores pro-apópticos desde la mitocondria al citoplasma en células con bajos niveles de RAC3 (A) Células mieloide leucémicas salvajes (K562/s), clones #4 y #10 y su respectivo control con vector vacío (K562/con) fueron estimulados a distintos tiempos con 25 ng/ml de TRAIL. La pérdida de  $\Delta\Psi_m$  fue determinada por disminución de la incorporación a la membrana mitocondrial del fluorocromo DiOC<sub>6</sub>, y posterior análisis de citometría de flujo. Los resultados son las medidas de tres experimentos independientes  $\pm$  ES. \* $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,05$  respecto al control, 4 horas con TRAIL (Test de Tukey). (B) Western blot de extractos citoplasmáticos (S100) de células K562/s, K562/con y clones #4 y #10, luego de ser estimuladas con 25 ng/ml de TRAIL por 4, 8, 16 y 24 horas.

Decidimos estudiar los niveles de los receptores DR4 y DR5 en uno de los clones con RAC3-RNAi por citometría de flujo, utilizando anticuerpos fluorescentes específicos para cada uno de los receptores, como muestra la figura 31A una disminución del coactivador aumenta los niveles de ambos receptores comparado con los niveles basales de DR4 y DR5 en K562 salvajes y control. Tratamos el clon #10 y las K562 salvajes con 25 ng/ml de TRAIL a distintos tiempos, pero no observamos ninguna diferencia en los niveles de los receptores (figura 31B).

## **2.6. La disminución de RAC3 afecta la actividad de NF- $\kappa$ B y de algunos de sus genes blanco**

Como ya hemos descrito previamente, RAC3 es coactivador del factor de transcripción anti-apoptótico NF- $\kappa$ B<sup>293</sup>. En orden de determinar si la actividad de NF- $\kappa$ B se ve afectada en los clones con bajo niveles del coactivador RAC3, analizamos mediante la técnica de ELISA los niveles de NF- $\kappa$ B nuclear unidos a una secuencia blanco. Se estimularon las células con 25 ng/ml de TRAIL por 1 hora, luego se hicieron extractos nucleares de ambos clones y sus respectivos controles. Como indica la figura 32A, la actividad basal de ambos clones está significativamente inhibida por el vector RAC3-RNAi comparadas con las células K562 salvajes y el control presenta niveles altos de activación, esto podría estar vinculado a que éstas células son Bcr-Abl positivas y esta translocación se encuentra asociada a una aumento constitutivo de la actividad de NF- $\kappa$ B<sup>255</sup>. La disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B en las condiciones basales es proporcional a los niveles de RAC3 en los clones, en cambio en presencia de TRAIL, los clones presentan un aumento mayor de la actividad respecto a los controles, que no varían significativamente ante un estímulo. Estudiamos el efecto de la citoquina TNF- $\alpha$  que se encuentra ampliamente distribuido por todo el cuerpo y es un importante mediador de diversas señales entre ella la activación de NF- $\kappa$ B<sup>435</sup>, pero no observamos mayores cambios que con TRAIL (figura 32A).

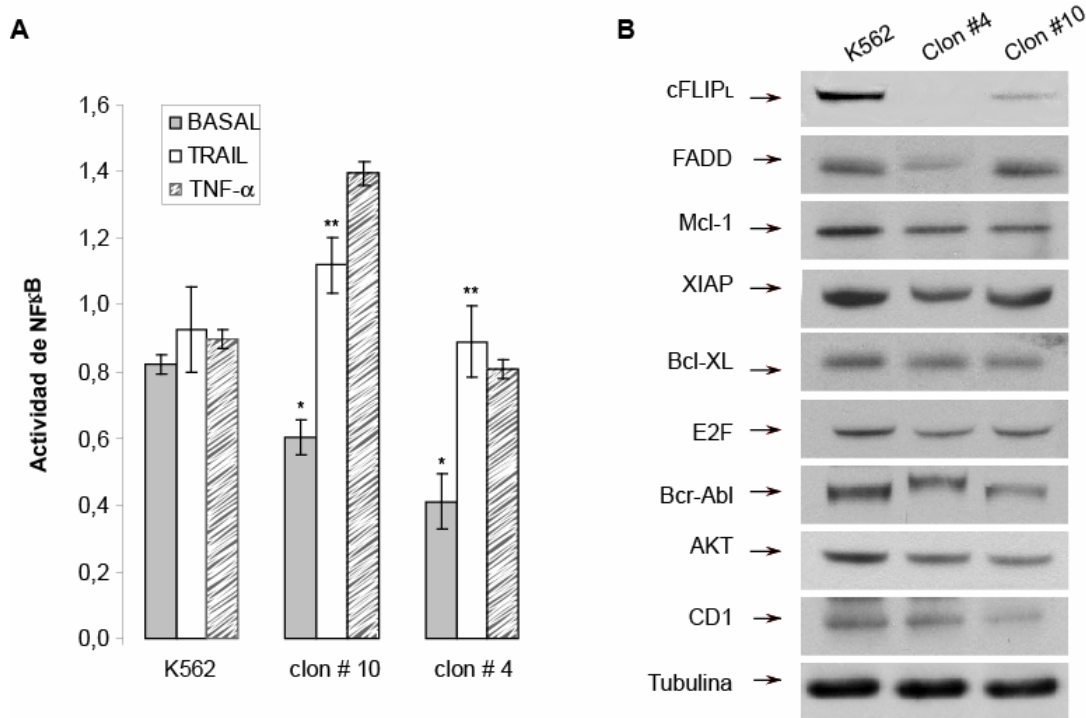
Estudios recientes mostraron que un aumento en la sensibilidad de células tumorales de colon humano tratadas con TRAIL, involucra una disminución de la expresión de la proteína inhibitoria FLICE (FLIP)<sup>436</sup>, esta proteína interfiere con la formación del DISC y es un potente inhibidor de la inducción de la apoptosis por los receptores de TRAIL<sup>437</sup>.



**Figura 31.** La disminución de *RAC3* aumenta la expresión de los receptores DR4 y DR5. (A) Análisis por citometría de flujo de los niveles de los receptores DR4 y DR5 en células K562 salvajes, el clon #10 y su respectivo control (K562/con). Previamente las células fueron incubadas con anticuerpos fluorescentes específicos contra DR4 y DR5. (B) Células K562 salvajes y el clon #10 fueron tratadas con 25 ng/ml de TRAIL por 30 minutos, 2 y 4 horas. Se midió la expresión de los receptores como en (A).

La expresión de FLIP y otros genes como XIAP, Mcl-1, Bcl-XL, esta regulada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>232, 438-440</sup> y RAC3 es coactivador de NF- $\kappa$ B. Decidimos estudiar si la disminución de RAC3 tiene algún efecto en los niveles basales de cFLIP<sub>L</sub> y de otros genes como FADD, Mcl-1, XIAP, Bcl-XL, el factor de transcripción E2F<sup>441</sup>, y genes relacionados con la proliferación como Bcr-Abl, Akt y Ciclina D1, como se muestra en la figura 32b mediante la técnica de *Western blot*, hay una dramática disminución de los niveles basales de cFLIP<sub>L</sub> y una disminución moderada del resto de las proteína estudiadas en los clones con baja expresión del coactivador RAC3 comparados con las células K562 salvajes.

Conjuntamente la disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B y de los niveles de cFLIP<sub>L</sub> y proteínas relacionadas con la proliferación y protección de la apoptosis en clones con bajos niveles del coactivador refuerzan el concepto del rol protector de RAC3 en al apoptosis.



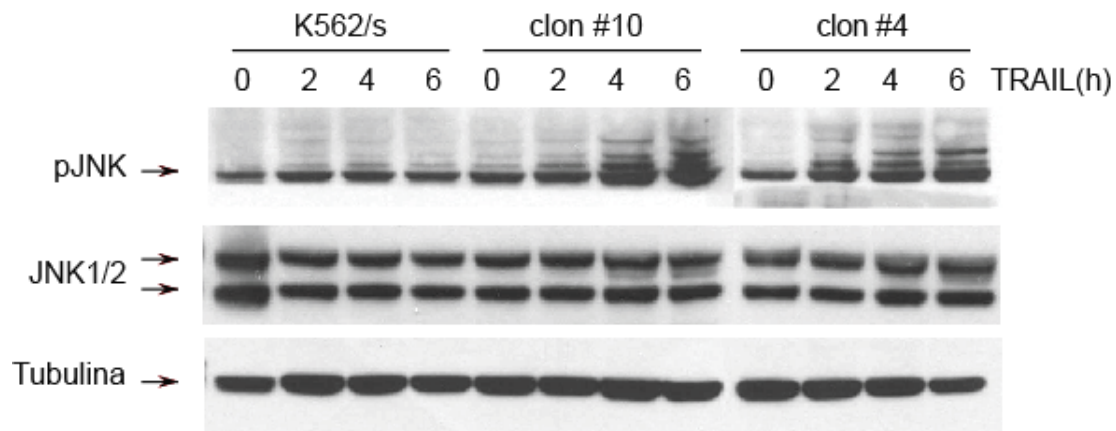
**Figura 32.** Modulación de la actividad de NF- $\kappa$ B y de los niveles proteínas relacionadas con proliferación y apoptosis ante una disminución de RAC3. (A) Células K562 salvajes y clones con RAC3-RNAi fueron estimulados por 1 hora con TRAIL 25 ng/ml y TNF- $\alpha$  20 ng/ml, luego se colectaron y se prepararon extractos nucleares. La unión al ADN de NF- $\kappa$ B se analizó mediante el kit de Elisa (TransAM). Los datos representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes, \* $p < 0,01$  respecto a la condición basal de K562 salvajes, \*\* $p < 0,001$  respecto al basal de cada clon con RNAi. (B) *Western blot* contra las proteínas indicadas de extractos totales basales de células K562 salvajes y clones #4 y #10.



## 2.7. Modulación en la actividad de JNK

Como ya hemos descrito anteriormente, las quinasas juegan un rol importante en la señalización durante la apoptosis. Estudios previos demuestran que TRAIL induce activación de JNK, de manera dependiente o independiente de caspasa, amplificando la inducción de apoptosis por vía mitocondrial<sup>113</sup>. Consistente con esto, determinamos los niveles de activación de en células con bajos niveles de RAC3 comparadas con las células K562 salvajes. Para ello, se estimularon con TRAIL por 2, 4 y 6 horas y se analizaron mediante *Western blot* los niveles de JNK totales y fosforilado.

Observamos que hay un aumento significativo en la activación de JNK en ambos clones respecto a las células salvajes, como se muestra en la figura 33. Una activación de JNK en forma sostenida estaría asociada a señales apoptóticas<sup>136, 137</sup>. Estos resultados refuerzan la hipótesis planteada, dónde una disminución de RAC3 aumenta la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL.

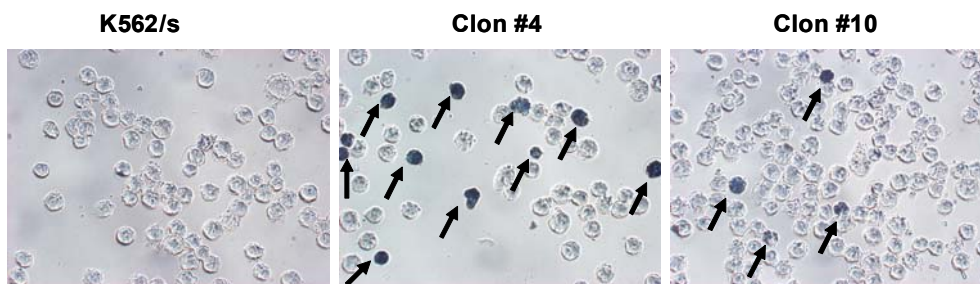


**Figura 33.** Aumento de la actividad de JNK en células con bajos niveles de RAC3. Células K562 salvajes y clones #4 y #10 que poseen bajos niveles de RAC3, fueron estimuladas a los tiempos indicados con 25 ng/ml de TRAIL. Luego mediante *Western blot* y anticuerpos específicos anti- quinasas total y fosforilada se analizó la activación de JNK.

## 2.8. Rol de RAC3 en la diferenciación de células de leucemia mieloide crónica

Como hemos descrito en la introducción, NF- $\kappa$ B juega un rol importante en la respuesta inmune y la apoptosis<sup>195</sup>, pero también se encuentra implicado en la diferenciación celular, incluyendo la eritropoiesis<sup>442</sup>. NF- $\kappa$ B normalmente se encuentra silenciando los genes involucrados en la eritropoiesis como c-myc<sup>443</sup> y c-myb<sup>444</sup>. Recientemente se ha descrito que una disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B está relacionada con la diferenciación de células K562 a eritrocitos<sup>445</sup>. Más aún, existen evidencias de que una activación de la vía NF- $\kappa$ B provoca la regulación negativa del promotor de la  $\alpha$ -globina<sup>445</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, una disminución de RAC3 produce una disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B (Figura 32). Se decidió entonces estudiar si esa disminución promovía la diferenciación celular. En estos estudios, las células llevando altos o bajos niveles de RAC3 fueron cultivadas en las mismas condiciones y sin tratamiento alguno que involucre la activación de una cascada de señalización en particular. De acuerdo con nuestras observaciones, en ambos clones llevando bajos niveles de RAC3 pudimos observar células diferenciadas, cuyo fenotipo eritroide fue detectado a través de la síntesis de hemina por medio de la reacción de la peroxidasa con bencidina (descrito en materiales y métodos). En la figura 34 que corresponde a imágenes de microscopía de campo claro, pueden observarse las células eritroides teñidas de azul (positivas a bencidina) que fueron detectadas en clones #4 y #10, mientras que en las células K562 salvajes no se observaron células positivas. Estos resultados sugieren la participación de RAC3 en el proceso de diferenciación eritroide de las células K562.



**Figura 34.** La disminución de RAC3 induce la diferenciación de las K562 a eritrocitos. Se realizó la prueba de bencidina en células K562 y los clones #4 y #10, las células positivas a la reacción se tiñeron de color azul. Luego se observaron al microscopio con campo claro y se muestra una foto representativa de más de 4 campos que fueron analizaron.

## 2.10. RAC3 tiene un rol protector en la apoptosis inducida por TRAIL y Flavopiridol en células K562

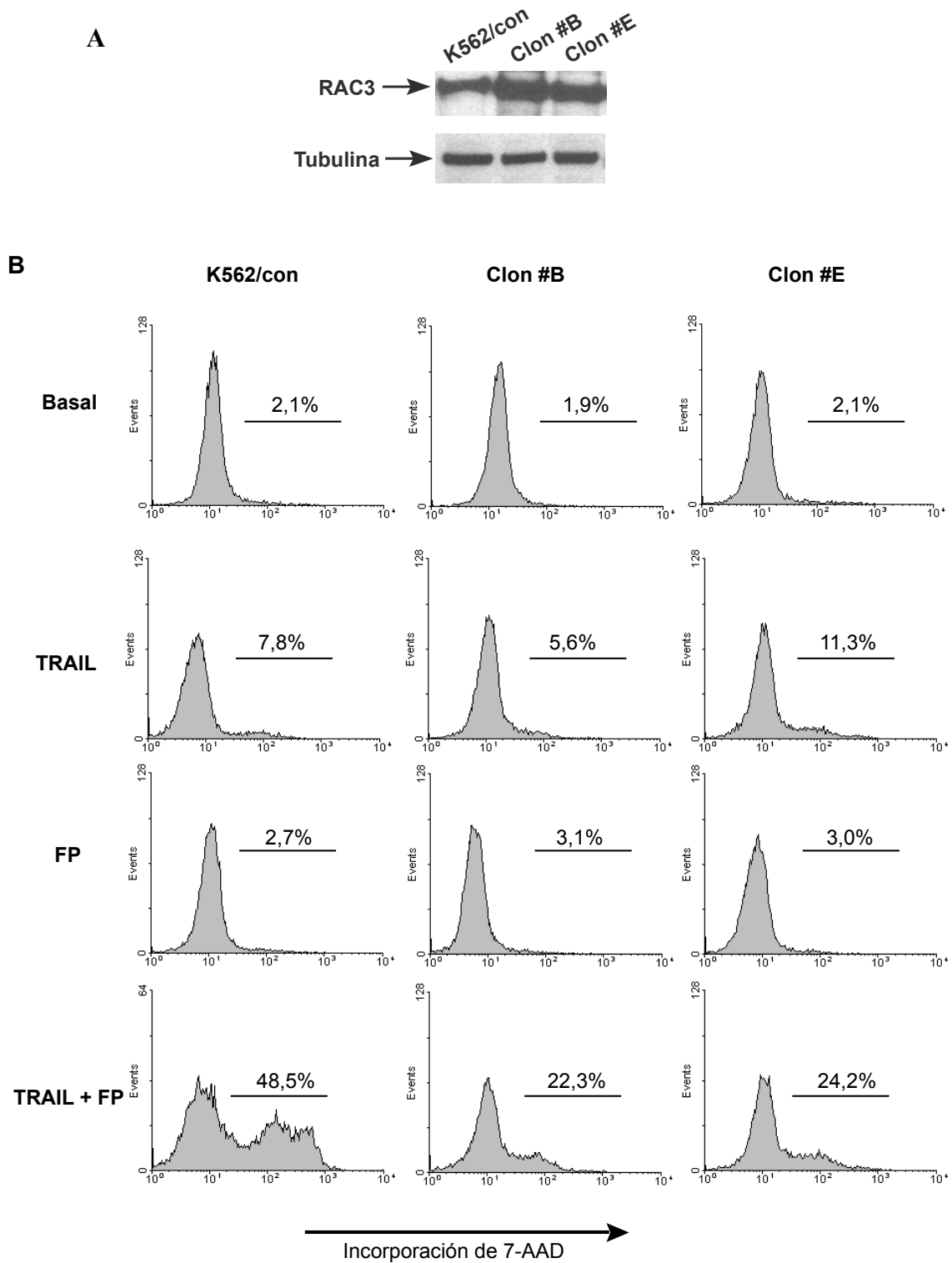
Si bien las células K562 son naturalmente resistentes a la muerte inducida por TRAIL<sup>446</sup>, ha sido demostrado previamente y tal como se describe en la introducción de este trabajo, que el agregado de Flavopiridol actúa como un agente sensibilizador en la inducción de apoptosis por TRAIL de esta línea celular, donde se activan las cascadas de señales de membrana y mitocondrial<sup>92</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, el alto nivel de expresión de RAC3 sería responsable de la resistencia de las células K562 a TRAIL y por otro lado, también es claro que tiene un rol protector de la apoptosis inducida tanto por vía de membrana como mitocondrial. Surge entonces la pregunta de cual es el rol de RAC3 en la apoptosis inducida en particular por el tratamiento simultáneo con TRAIL y Flavopiridol de las células K562, que también activa ambas cascadas e induce muerte a pesar de los altos niveles de expresión de RAC3. ¿Tiene RAC3 un rol anti-apoptótico pero su señal protectora resulta insuficiente en este entorno de señales? ¿Es pro-apoptótico en este modelo? ¿No tiene ningún rol?

Con el objeto de responder a estos interrogantes se procedió a analizar el efecto de un aumento de RAC3 a niveles aún mayores en células leucémicas. Se transfectaron por electroporación células K562 con el vector de expresión constitutiva pCMX-RAC3 y como control se utilizó el vector vacío pCMX. Se seleccionaron con G418 varios clones con altos niveles de RAC3 y se eligieron para estos estudios los clones #B y #E. Los niveles de expresión de RAC3 fueron determinados mediante *Western blot* (Figura 35A).

Para determinar las posibles diferencias entre los clones con muy altos niveles de expresión de RAC3 y las células control en la sensibilidad a la apoptosis inducida por el tratamiento simultáneo con TRAIL y FP, todos los cultivos fueron estimulados con 100 ng/ml de TRAIL y 150 nM de FP por 24 horas. La figura 35B muestra claramente que existe una inhibición significativa de la apoptosis en los clones que sobre-expresan RAC3 respecto de las células control. También puede observarse, y como era de esperar, que cada droga por separado no indujo apoptosis en ésta línea celular.

En otros experimentos se analizaron los niveles de activación de caspasas, clivaje de Bid y PARP mediante *Western blot*.



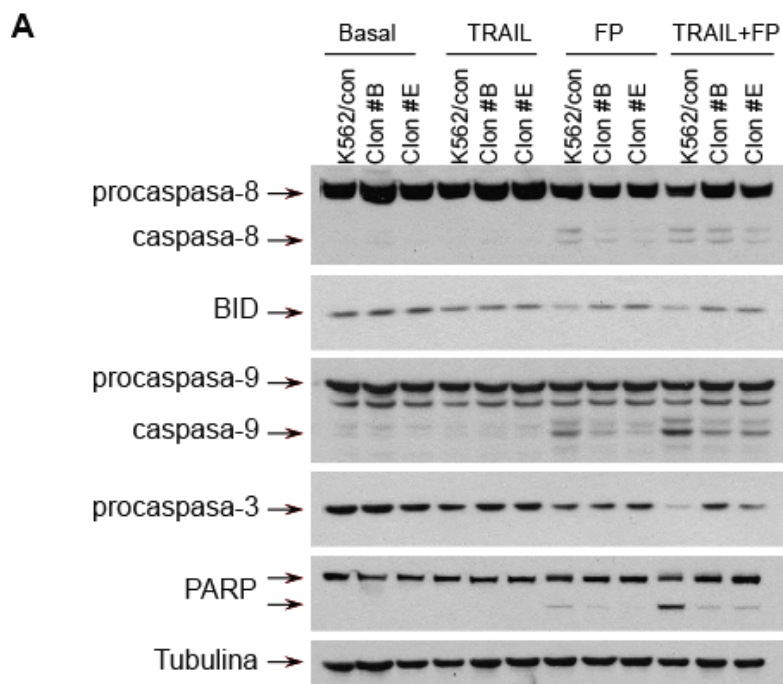
**Figura 35.** La sobre-expresión de RAC3 en células leucémicas K562 protege de la apoptosis inducida por TRAIL y FLavopiridol. (A) Análisis de los niveles de RAC3 mediante *Western blot* en clones #B y #E que sobre-expresan RAC3 y su respectivo control con vector vacío, K563/con. (B) Se estimularon los clones y las K562/con durante 24 horas con 100 ng/ml de TRAIL y/o 150 nM de Flavopiridol (FP). Luego se analizaron las células apoptóticas mediante incorporación de 7-AAD, por citometría se flujo. En la figura se señaló el porcentaje de apoptosis correspondiente a cada medición

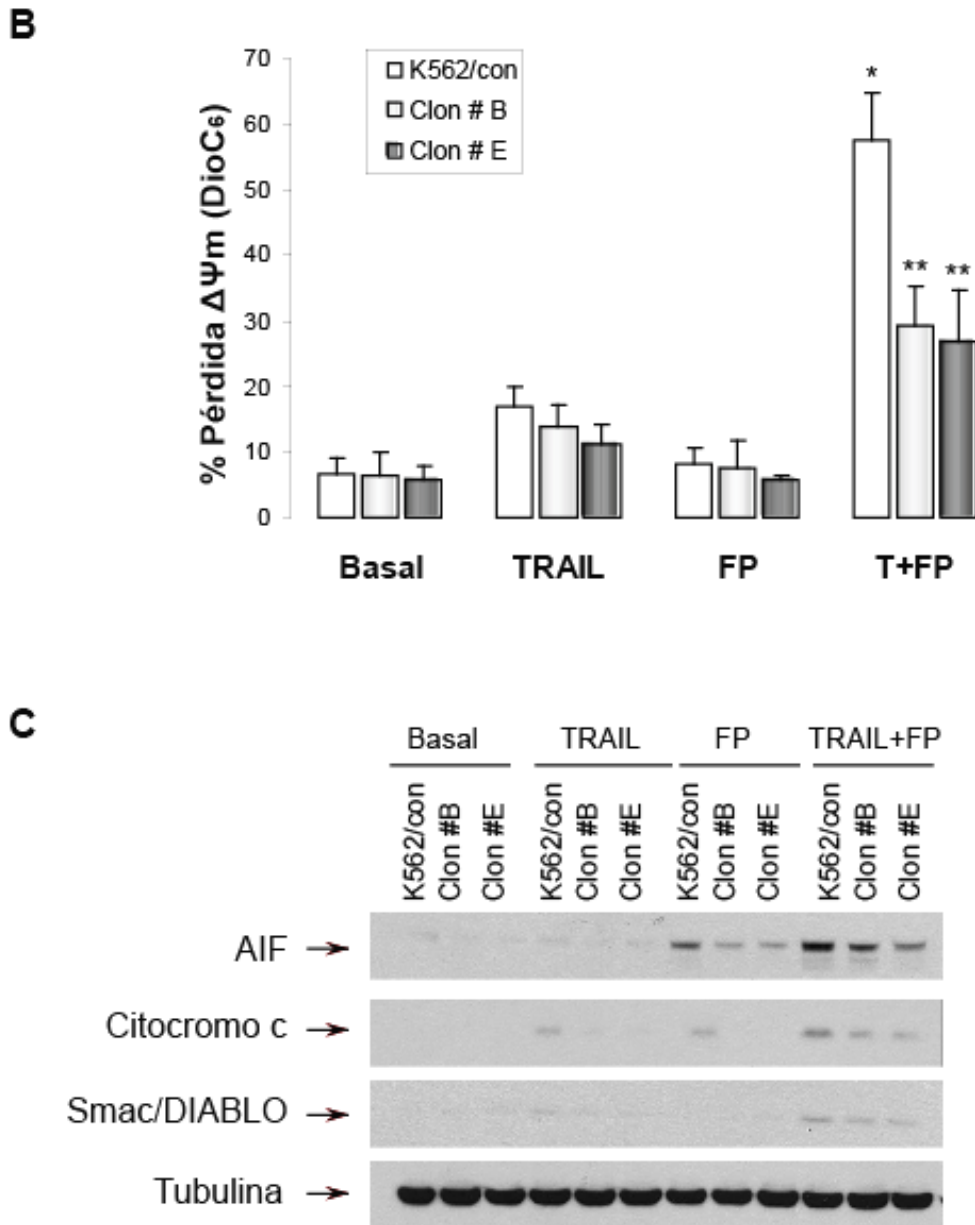
Según se muestra en la figura 36A, existe un aumento de la activación de estas proteínas en las células control cuando se las estimula simultáneamente con TRAIL y FP durante 24 horas respecto a los clones que sobre-expresan RAC3. Nuevamente, el tratamiento con cada una de estas drogas por separado no indujo la activación de esta cascada apoptótica.

Para confirmar la participación de la vía mitocondrial, se determinó la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En la figura 36B pueden observarse los resultados obtenidos: una disminución significativa de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en los clones con alto RAC3 respecto de células control.

Según los resultados obtenidos en los modelos experimentales ya descritos, se determinó que RAC3 inhibe la translocación desde la mitocondria al citoplasma de los factores pro-apoptóticos AIF, citocromo c y Smac/DIABLO. Como se muestra en la figura 36C, se obtuvieron resultados similares en este modelo de inducción de apoptosis por TRAIL y Flavopiridol.

Estos resultados demuestran que RAC3 tiene un rol protector de la apoptosis, aún en este modelo en el cual las células son sensibles a la muerte. El hecho de que una sobre-expresión de RAC3 a niveles aún mayores que los endógenos pueda inhibir la apoptosis inducida por TRAIL y Flavopiridol en tratamiento simultáneo sugiere que la acción protectora de RAC3 resulta insuficiente en células tipo salvaje. De aquí se desprende que la sensibilidad a apoptosis, sería consecuencia de un equilibrio entre los niveles de expresión de RAC3 y la intensidad/agresividad del estímulo pro-apoptótico.





**Figura 36.** Disminución de la activación de caspasas, de  $\Delta\Psi_m$ , y de la translocación de factores pro-apoptóticos desde la mitocondria al citoplasma en clones que sobre-expresan RAC3. (A) Western blot contra las proteínas indicadas, de extractos totales de células K562 control y los clones #B y #E, previamente estimulados por 24 horas con 100 ng/ml de TRAIL y/o 150 nM de FP. (B) Análisis de la  $\Delta\Psi_m$  por medio de citometría de flujo en K562/con y clones, luego de 24 horas de estímulo con TRAIL y/o FP. Los resultados son la medida de triplicados  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. \* $p < 0,001$  respecto a K562/con basal y \*\* $p < 0,001$  respecto a K562/con estimuladas con TRAIL y FP. (C) Fracción citoplasmática S100 y posterior análisis mediante Western blot contra las proteínas indicadas. Las células fueron estimuladas con TRAIL y/o FP por 24 horas.

### 3. LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE RAC3 Y FORMACIÓN DEL HETEROCOMPLEJO RAC3-AIF-HSP90

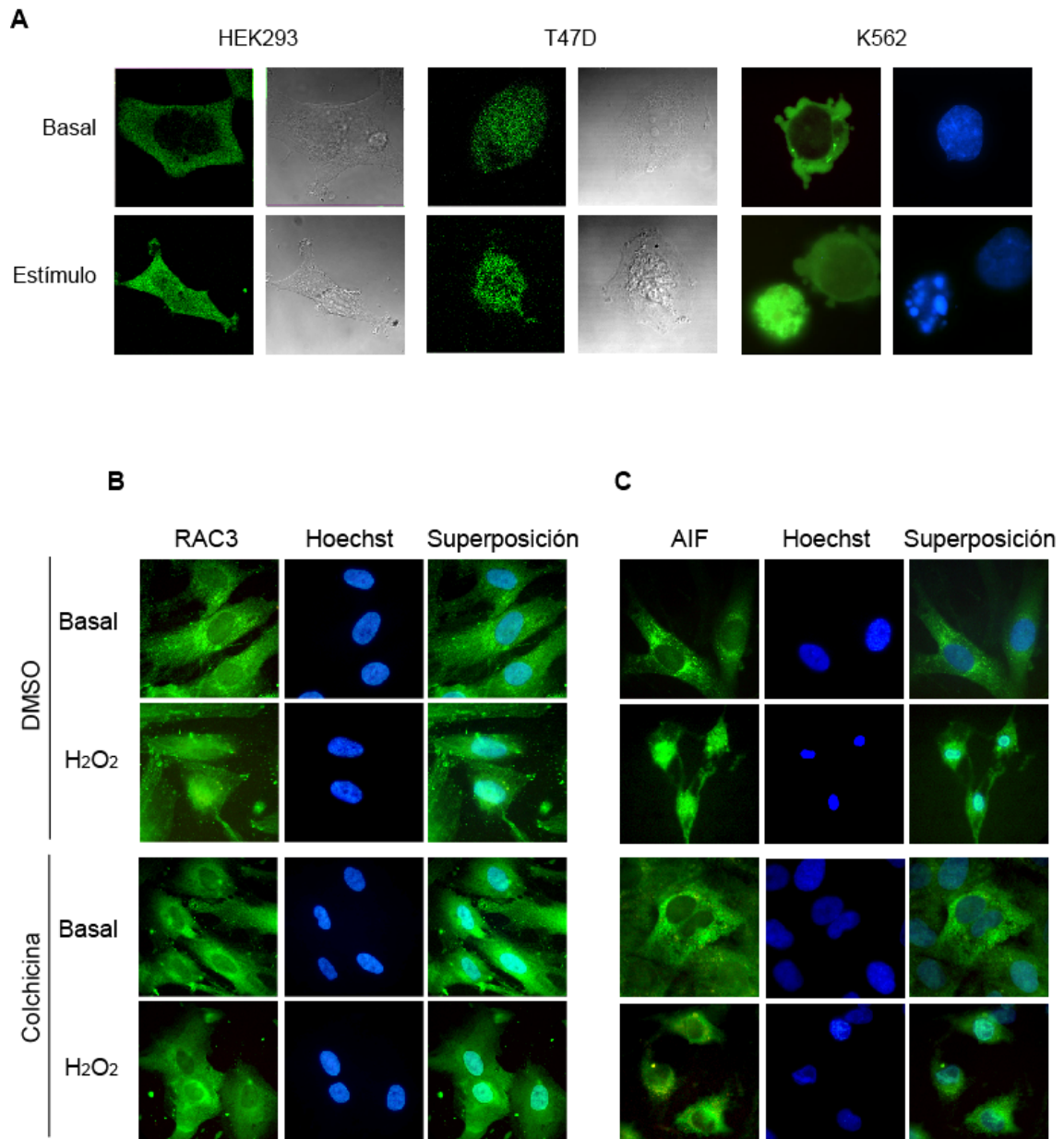
#### 3.1. Localización sub-celular de RAC3 en distintas líneas celulares

En este trabajo hemos encontrado algunos efectos de RAC3 que serían dependientes de sus niveles de expresión y probablemente no directamente relacionados con su función nuclear como coactivador. Tal es el caso del cambio en los niveles de activación de quinasas y de los niveles de AIF en núcleo. Los resultados aquí obtenidos sugieren la participación del coactivador en acciones citoplasmáticas.

Se analizó la localización sub-celular de RAC3 en condiciones basales y luego del estímulo con peróxido de hidrógeno en HEK293 y T47D, o con TRAIL y FP en K562. En estos estudios, las células HEK293 fueron transfectadas con el vector de expresión de RAC3, de modo de detectar claramente a esta molécula, dados los bajos niveles de expresión de esta línea celular.

Tal como se muestra en la figura 37A, en células HEK293 y K562, en condiciones basales, RAC3 fue detectado principalmente en el citoplasma, mientras que en las células T47D su distribución fue homogénea en núcleo y citoplasma. Estas observaciones estarían de acuerdo con el concepto de que la localización de RAC3 depende del tipo celular. Más allá de estas diferencias, en respuesta a los distintos estímulos inductores de apoptosis, RAC3 fue claramente detectado en núcleo (Figura 37A).

Para determinar si ésta translocación podría estar asociada a la maquinaria de los microtúbulos, se estudió el efecto de un inhibidor de la polimerización de los microtúbulos, como es la colchicina<sup>447</sup>. En la figura 37B puede observarse que luego de estimular células HEK293 tratadas con 1  $\mu$ M de colchicina por 1 hora y luego con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la translocación de RAC3 se vió completamente inhibida, indicando que requiere de la polimerización de los microtúbulos para su transporte al núcleo. Resultados similares fueron obtenidos cuando se analizó la localización sub-celular de AIF y su translocación post-estímulo al núcleo, indicando claramente que también depende de los microtúbulos (Figura 37C).



**Figura 37.** Localización sub-celular de RAC3 en distintas líneas celulares e inhibición de su translocación al núcleo por inhibición de la polimerización de los microtúbulos (A) Células HEK293 y T47D fueron expuestas a 2 y 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente por 8 horas y luego analizadas por microscopía confocal. El panel de la izquierda muestra de color verde a RAC3 y el panel de la derecha el campo claro correspondiente a cada célula. Células K562 fueron expuestas a 100 ng/ml de TRAIL y 150nM de FP por 16 horas y analizadas por microscopía de fluorescencia, mostrando en el panel derecho la tinción del ADN por Hoechst. (B) RAC3 y (C) AIF fueron determinados por microscopía de fluorescencia en células HEK293, previamente tratadas durante 1 hora con 1 μM de colchicina y luego por 8 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



### **3.2. RAC3 se encuentra físicamente asociado con AIF en un complejo proteico que contiene Hsp90, la inmunofilina (FKBP52) y la proteína asociada a microtúbulos dineína**

De acuerdo a los resultados obtenidos, en todos los modelos de apoptosis analizados y en ambas líneas celulares uno de los eventos más llamativos y que resulta difícil de explicar a través de una regulación de la actividad de caspasas o genes de la familia Bcl-2 o IAP por RAC3 es la inhibición de la localización nuclear de AIF, la cual, podría deberse a una inhibición de la liberación desde la mitocondria al citoplasma, el aumento en su degradación, o bien, la inhibición de su translocación a núcleo.

Se ha descrito previamente que la chaperona Hsp70 interacciona específicamente con AIF antagonizando su efecto pro-apoptótico<sup>66, 448</sup>. Además Hsp70 generalmente se encuentra asociada a Hsp90, la cual está involucrada en la función y tráfico de proteínas junto a inmonofilinas y la proteína motora asociada a microtúbulos dineína<sup>387, 421</sup>.

Por lo reportado previamente y los resultados obtenidos sobre el rol de RAC3, la localización sub-celular y el requerimiento de la maquinaria asociada a microtúbulos para su transporte al núcleo, se estudió la posible interacción de RAC3 con AIF y el heterocomplejo Hsp90-inmunofilina-dineína. Para ésto, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y se utilizó como modelo de estudio el de las células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RAC3 y estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la figura 38 pueden observarse los resultados obtenidos. Según nuestros estudios, existe una interacción física entre RAC3, AIF y Hsp90. Además, pudo detectarse que todas éstas proteínas se encontraban asociadas físicamente al complejo integrado al menos por la inmunofilina FKBP52 y la proteína asociada a microtúbulos dineína (figura 38). Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente respecto a la interacción entre Hsp90, FKBP52 y dineína, dónde en este complejo la inmunofilina actúa como un adaptador entre la proteína cargo que es transportada vía microtúbulos por la proteína motora dineína<sup>449</sup>.

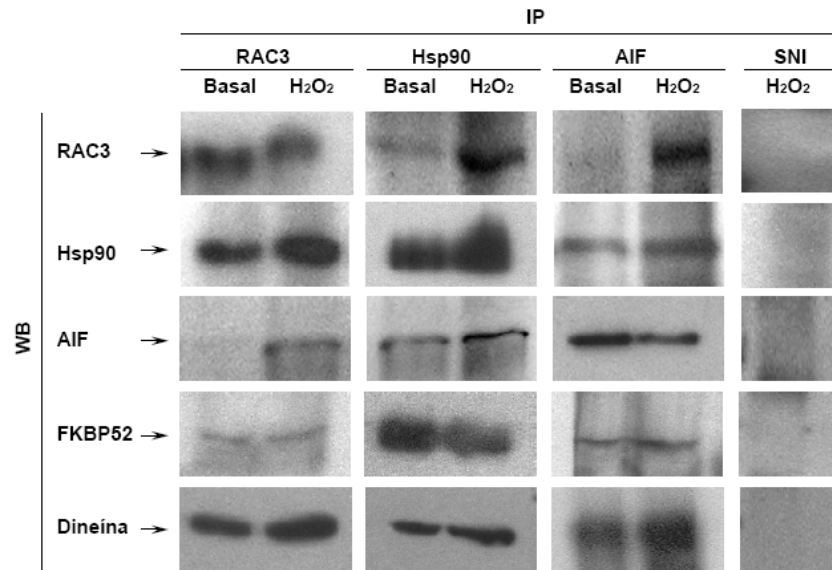
Estas observaciones fueron confirmadas, además, por microscopía confocal en células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RAC3, utilizando anticuerpos específicos para la detección de RAC3, AIF y Hsp90 y realizando ensayos

de colocalización por pares con dos fluorocromos diferentes. Los resultados obtenidos pueden observarse en las figuras 39A y C.

En la figura 39A se observa en color amarillo la colocalización de RAC3 y AIF. De acuerdo con nuestras observaciones, ambas moléculas fueron capaces de interactuar en el citoplasma luego de ser estimuladas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a tiempos tempranos, previo a que la apoptosis sea evidente y una vez que AIF ha sido liberado de la mitocondria y se encuentra disponible en el citoplasma celular para su encuentro con RAC3. Tal como se muestra en la imagen, esta interacción se sostuvo al menos, hasta las 8 horas post-estimulación a nivel citoplasmático y en la periferia del núcleo, tiempo en el cual ambas moléculas alcanzaron la localización nuclear en las células apoptóticas, aunque ya no colocalizaban en este compartimiento. Resultados similares fueron obtenidos en las células T47D, donde, si bien en condiciones basales RAC3 se encuentra homogéneamente distribuido, las moléculas disponibles en citoplasma también son capaces de interactuar con AIF una vez liberado de mitocondria y a tiempos tempranos post estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 39B).

De la misma manera se analizó la interacción entre AIF y Hsp90, donde pudo observarse claramente la colocalización citoplasmática, al menos, hasta los tiempos en que comenzaron a detectarse células apoptóticas (figura 39C). A las 8 horas, en algunas células que ya podían observarse claramente apoptóticas, se produjo el ingreso de AIF al núcleo, como era de esperarse. En cuanto a Hsp90, su localización permaneció citoplasmática.

De acuerdo con estos resultados, y aquellos obtenidos por ensayos de co-inmunoprecipitación, AIF, RAC3 y Hsp90 pueden formar parte de un mismo complejo, a su vez, asociado a la maquinaria motora dependiente del citoesqueleto. Los estudios de microscopía confocal sugieren que este complejo comenzaría a armarse luego del estímulo que induce la liberación de AIF desde la mitocondria al citoplasma, donde residen las otras moléculas en condiciones basales o a tiempos tempranos del inicio de la señal apoptótica. Más tarde, en las células que ingresaron en apoptosis, todo el complejo estaría disociado. RAC3 y AIF se disociarían entre sí y de Hsp90 al ingresar al núcleo celular, mientras que Hsp90 y probablemente otros componentes de la maquinaria motora permanecen con localización citoplasmática.



**Figura 38.** Interacción física entre RAC3-AIF-Hsp90 y proteínas de la maquinaria de transporte. Extractos totales de células HEK293 estimuladas por 8 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se inmunoprecipitaron (IP) y revelaron mediante *Western blot* (WB) las proteínas indicadas. SIN, corresponde al inmunoprecipitado de suero no inmune.

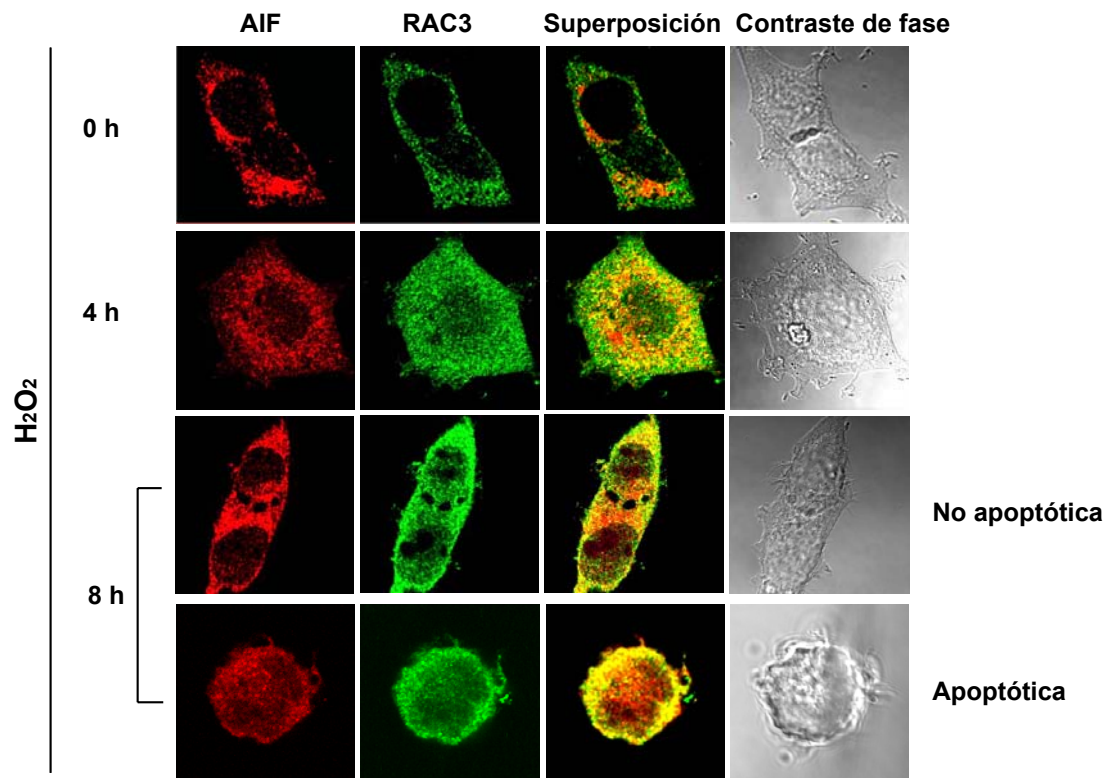
### 3.3. La sobre-expresión de RAC3 inhibe la translocación nuclear de AIF

De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, RAC3 y AIF serían parte de un mismo complejo asociado a la maquinaria motora dependiente de los microtúbulos.

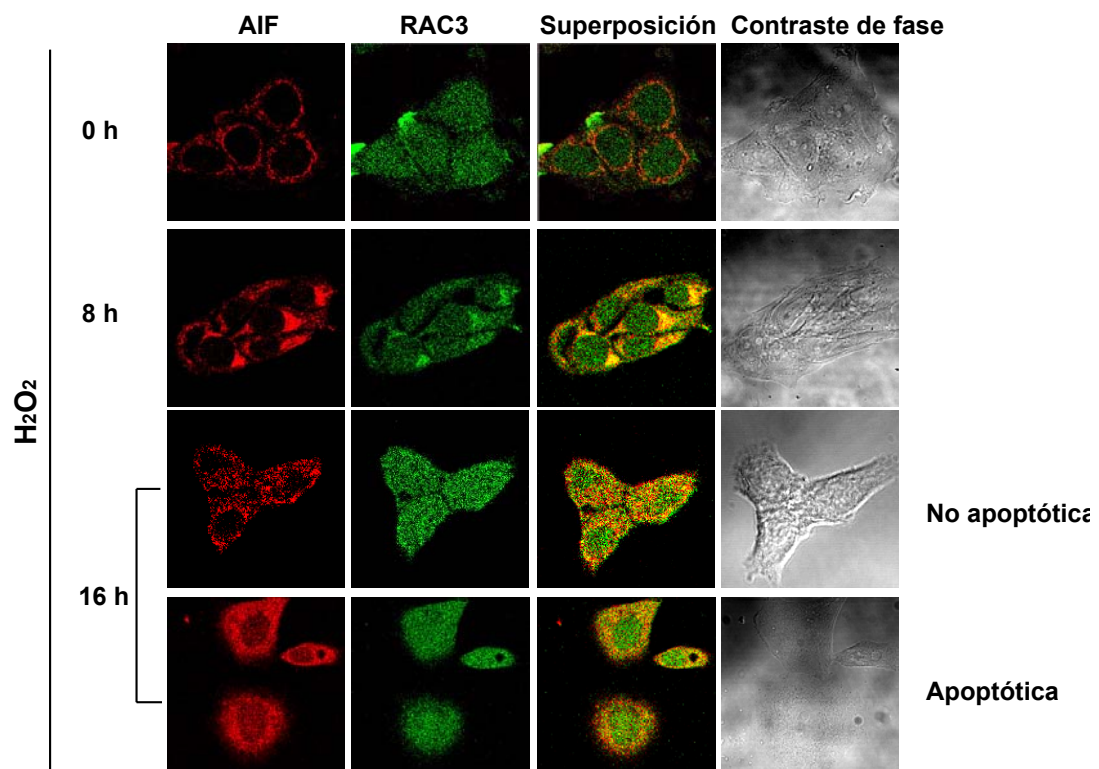
Se realizó un estudio cinético de la localización de AIF en células HEK293 estimuladas o no con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y llevando niveles normales o aumentados de RAC3. La localización sub-celular de AIF se realizó por inmunofluorescencia. En la figura 40 puede observarse que en condiciones basales AIF fue detectado en citoplasma, lo cual es congruente con su localización en la mitocondria y su translocación al núcleo fue claramente detectada a las 4 horas luego del estímulo con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al sobre-expresar el coactivador RAC3 y aún a las 8 horas luego del estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observamos que la translocación de AIF al núcleo se vió claramente disminuída en estas células en comparación con las células control transfectadas con el vector vacío (Figura 40).

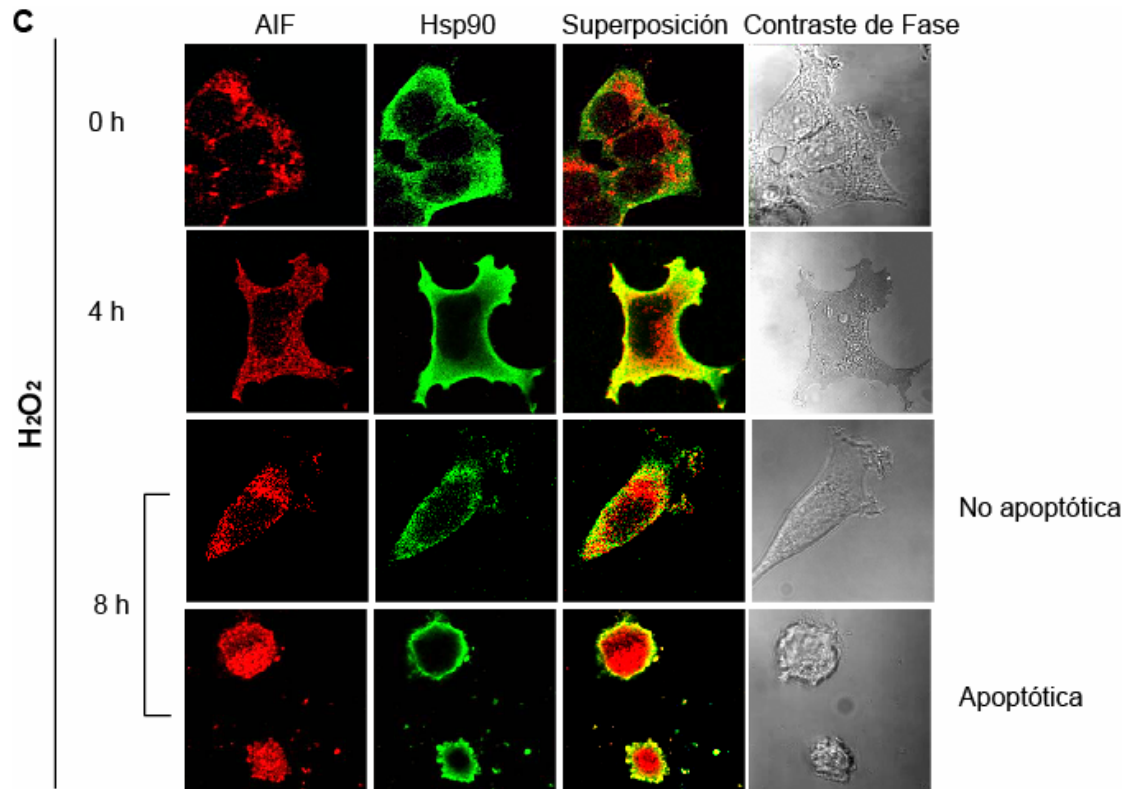
Nuestros resultados sugieren que la sobre-expresión de RAC3 a través de su asociación física con AIF y la maquinaria motora del citoesqueleto, inhibe por un mecanismo molecular aún no esclarecido, la translocación de AIF al núcleo y éste sería uno de los mecanismos por los cuales el coactivador contribuye a la protección de apoptosis y el desarrollo tumoral.

A

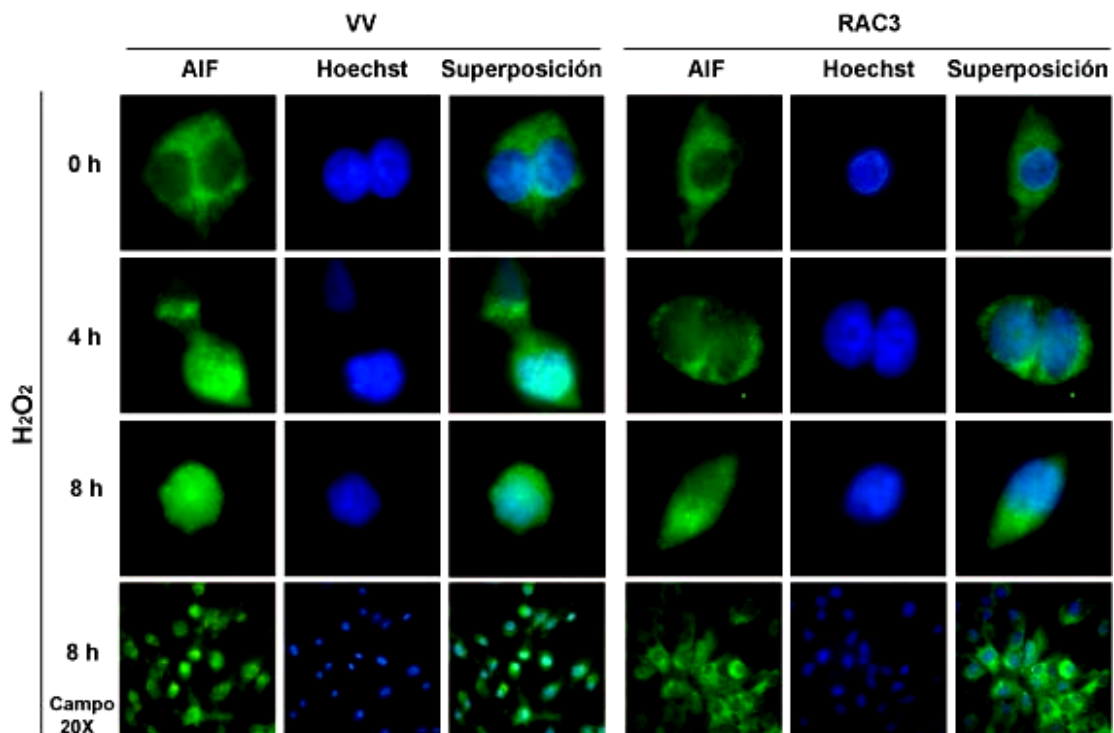


B





**Figura 39.** Colocalización entre *RAC3*, *AIF* y *Hsp90*. (A) Microscopía confocal de células HEK293, luego de ser estimuladas por 4 y 8 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donde se muestra en verde a *RAC3* y rojo a *AIF*. (B) Idem, pero muestra células T47D que fueron estimuladas por 8 y 16 horas con 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) Células HEK293 fueron estimuladas por 4 y 8 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se muestra en verde a *Hsp90* y rojo a *AIF*.



**Figura 40.** *Disminución de la translocación de AIF al núcleo en células que sobre-expresan RAC3.* La translocación de AIF fue determinada por inmunofluorescencia en células HEK293 transfectadas transientemente con el vector de expresión para RAC3 y el vector vacío pCMX (VV). Previamente las células fueron estimuladas por 4 y 8 horas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el núcleo se detecto mediante tinción con Hoechst.

# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir:

1. Los coactivadores con actividad acetil transferasa protegen de la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
2. La sobre-expresión del coactivador RAC3, protege de la apoptosis inducida por distintas señales que disparan tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca, en una línea celular mínimamente tumoral como las HEK293 y en la línea tumoral K562.
3. La disminución de la expresión de RAC3, aumenta la apoptosis inducida por ambas vías.
4. Las células de leucemia mieloide crónica poseen altos niveles del coactivador RAC3.
5. El hecho de que la línea K562 resulte naturalmente resistente a la apoptosis inducida por TRAIL y se vuelva sensible cuando los niveles de RAC3 son disminuidos sugiere que la sobre-expresión de esta molécula es un factor clave en la determinación del destino vida/muerte celular, fundamentalmente, a través de la regulación en los niveles de expresión del número de receptores para TRAIL.
6. La variación en los niveles de expresión de coactivador RAC3 contribuye a la regulación de la actividad de NF-κB.
7. Altos niveles de RAC3 estarían contribuyendo a la protección de apoptosis a través de la regulación de la actividad de quinasas, aumentando significativamente la actividad de aquellas involucradas en la protección de apoptosis, como Akt y p38 y disminuyendo la actividad de aquellas involucradas en cascadas pro-apoptóticas, como ERK1/2 y JNK.
8. La localización sub-celular de RAC3 en condiciones basales es principalmente citoplasmática, aunque depende del tipo celular y se transloca al núcleo por asociación con los microtúbulos cuando las células son estimuladas.
9. La sobre-expresión de RAC3 disminuye la translocación al núcleo de AIF y una disminución del coactivador la aumenta.



10. AIF forma parte de un complejo conteniendo RAC3-Hsp90 y la maquinaria de transporte asociada a citoesqueleto conformada por lo menos por la inmunofilina FKBP52 y la proteína de transporte dineína.

A partir de estas observaciones se desprende:

*A-La sobre-expresión de RAC3 en distintas líneas celulares protege de la apoptosis inducida por ambas vías, no sólo actuando como coactivador a nivel nuclear sino teniendo un rol citoplasmático, participando en las cascadas de muerte celular.*

*B- Los coactivadores de la familia p160 tendrían un rol adicional no relacionado a su acción nuclear en la acetilación de histonas y remodelado de la cromatina, participando posiblemente en el control del tráfico intracelular.*

*C-El hecho de que una línea leucémica se vuelva sensible a la inducción de apoptosis sólo reduciendo los niveles de un coactivador, refuerza la idea de que RAC3 podría constituir un blanco de acción en terapias antitumorales no estrictamente relacionadas a la acción de hormonas esteroideas.*

## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

Existen dos mecanismos básicos por los cuales las señales pueden contribuir al crecimiento tumoral, tales como: un aumento en la proliferación y/o una reducción en la tasa de muerte celular<sup>450, 451</sup>. Como hemos mencionado en la introducción, los coactivadores de receptores nucleares de la familia p160 juegan un rol importante en la proliferación y en numerosos procesos biológicos<sup>269</sup>. Mediante su actividad transferasa de acetilos a histonas o a distintas moléculas<sup>282, 300, 452</sup>, estos coactivadores podrían estar contribuyendo de esta forma a un aumento en la expresión de distintos genes, vía el aumento en la actividad no solo de los receptores nucleares, sino también de los factores de transcripción, tal es el caso de RAC3, que como hemos descrito previamente es además un coactivador de NF- $\kappa$ B<sup>293, 359</sup>.

Hasta el momento no se a descrito el rol de éstos coactivadores en la regulación de la apoptosis. En este trabajo de tesis observamos que la sobre-expresión de los coactivadores de receptores nucleares que poseen actividad HAT y que además son capaces de reclutar CBP, protegen a la células de la apoptosis inducida tanto por señales de membrana como por la vía mitocondrial.

Como hemos descrito en la introducción de este trabajo, los coactivadores de la familia p160 fueron originalmente encontrados sobre-expresados en varios tumores fundamentalmente relacionados al control por hormonas esteroideas, tales como cáncer de mama y ovario<sup>275, 346</sup>, carcinoma de endometrio<sup>453</sup> y cáncer de próstata<sup>344, 349</sup>. Esto no resultó particularmente sorprendente, dado que estas moléculas originalmente fueron identificadas como coactivadores de receptores esteroideos. Posteriormente se demostró el rol de estas moléculas sobre varios factores de transcripción, tal es el caso de NF- $\kappa$ B como fue demostrado por nuestro grupo para el coactivador RAC3<sup>293</sup>. Estos resultados fueron de suma importancia, dado que NF- $\kappa$ B es un factor clave en procesos anti-apoptóticos y oncogénicos, y regula numerosos genes involucrados en el ciclo celular y proliferación<sup>262, 454, 455</sup>. Paralelamente y con posterioridad a estos hallazgos, también fue descrita una sobre-expresión de RAC3 en otros tipos de tumores no estrictamente relacionados al control por hormonas esteroideas, como por ejemplo: cáncer de páncreas<sup>168, 355</sup>, cáncer gástrico<sup>352</sup>, carcinoma colorectal<sup>353</sup> y hepatocelular<sup>354</sup>.

Conjuntamente, estas observaciones sugieren que los coactivadores p160 juegan un rol en la oncogénesis, posiblemente a través de mecanismos no relacionados con la

actividad de los receptores nucleares o estímulos dependientes de hormonas<sup>346, 456</sup>. De hecho, es posible que los coactivadores de receptores nucleares y CBP pudieran contribuir al desarrollo tumoral en ausencia de hormonas a través de mecanismos que afecten señales de supervivencia las cuales intervienen en la decisión sobre la muerte celular.

Evidencias previas sugieren una potencial redundancia en la función entre los miembros de la familia p160<sup>284</sup>. Si bien nuestras observaciones sugieren que cada miembro de ésta familia y CBP, poseen un rol similar en la inhibición de la muerte celular cuando son sobre-expresados en células HEK293, el mecanismo molecular empleado por cada coactivador para ejercer su rol cito-protector aún no ha sido determinado y solo hemos analizado en detalle la participación de RAC3.

Es sabido que la efectividad de la quimioterapia en el tratamiento de ciertas patologías tumorales depende fundamentalmente de la sensibilidad de los distintos tipos celulares presentes en el tumor a la droga empleada. La línea humana de leucemia mieloide crónica es resistente a varias drogas pro-apoptóticas. Este efecto ha sido atribuido, entre otros, a una disminución de la expresión de receptores de muerte y a la alta expresión de los transportadores multidroga, responsables de la resistencia (MDR)<sup>457</sup>. Debido a esto, muchas drogas quimioterapéuticas no son efectivas y es necesario el desarrollo de nuevas estrategias específicas para tratar las células tumorales. Este es el caso de la citoquina TRAIL, la cual se está utilizando en estudios pre-clínicos y clínicos tempranos en pacientes con patologías tumorales hematológicas y tumores sólidos<sup>458-461</sup>. Interesantemente, este agente es capaz de matar un amplio número de células tumorales humanas, y no es citotóxico para células normales<sup>462, 463</sup>. Esta selectividad aparentemente se debe a la función fisiológica de TRAIL en la respuesta inmune, mediando la destrucción de células neoplásicas<sup>458, 464</sup> y también se ha observado que depende del tipo y la diferenciación celular<sup>446</sup>. En este trabajo hemos observado que la línea de leucemia crónica mieloide K562, posee niveles altos del coactivador RAC3 respecto a otras líneas celulares y posee niveles similares a aquellos presentes en células tumorales de mama<sup>275, 428</sup>. La línea K562 es resistente al tratamiento con TRAIL y tal como se explicó en la introducción de esta tesis, una de las formas de sensibilizar estas células a la apoptosis por esta señal, es el tratamiento simultáneo con agentes sensibilizadores como el Flavopiridol<sup>446</sup>. Aunque el mecanismo de resistencia a TRAIL no está bien claro, en este trabajo se demuestra que las células

claramente se sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL a través de una disminución en los niveles de RAC3 por RNAi.

Se ha demostrado previamente que ratones mutantes para RAC3 presentan un retardo en el crecimiento, el tamaño es menor y tienen reducida la función reproductora al igual que el desarrollo mamario<sup>305, 306</sup>. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo: cuando disminuimos RAC3 en células leucémicas se produce un claro aumento en la apoptosis. En cambio, cuando sobre-expresamos el coactivador en células HEK293 y K562, observamos una disminución de la apoptosis bajo distintos estímulos.

De acuerdo a los estímulos utilizados en este trabajo: el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el tratamiento simultáneo de TRAIL con Flavopiridol, en ambos casos se induce apoptosis con participación de la vía mitocondrial, activando caspasas y factores pro-apoptóticos que se translocan desde la mitocondria al núcleo<sup>8, 430</sup>. En células que sobre-expresan RAC3 observamos una disminución de la activación de caspasas y de la translocación de factores como AIF, citocromo c y Smac/DIABLO desde la mitondria al citosol, tanto por inducción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en HEK293 como con el tratamiento simultáneo con Flavopiridol y TRAIL en K562.

Consistente con los mecanismos descritos, TRAIL activa tanto la vía de membrana como la mitocondrial<sup>465</sup>, cuando las células K562 con bajos niveles de RAC3 son estimuladas, observamos una disminución de la activación de caspasas y factores pro-apoptóticos, como la disminución en el  $\Delta\Psi_m$  y la liberación de moléculas pro-apoptóticas de la mitocondria.

Dado que RAC3 es coactivador de NF- $\kappa$ B, un posible mecanismo en la atenuación de la muerte celular podría ser el aumento en la trans-activación y en la expresión de genes anti-apoptóticos blanco de este factor de transcripción. De acuerdo con esto, analizamos la actividad de NF- $\kappa$ B cuando se sobre-expresa o disminuye RAC3 en distintas líneas celulares y con distintos estímulos y observamos que los niveles de activación de NF- $\kappa$ B están vinculados directamente con los niveles de RAC3. Paralelamente y como consecuencia del aumento en la actividad NF- $\kappa$ B, también se vió incrementada la expresión de genes anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y IAPs, blanco de este factor.

Interesantemente, encontramos que las células K562 tipo salvaje presentan altos niveles de actividad basal de NF- $\kappa$ B. Esto último podría deberse a los altos niveles de

RAC3 que hemos descrito en éstas células o bien, también podría ser consecuencia de los mecanismos regulatorios dependientes de la actividad Bcr-Abl, una mutación que origina el cromosoma Filadelfia, característico de esta línea celular<sup>255, 466</sup> y que se manifiesta con una actividad tirosin-quinasa constitutiva. Por otro lado, y como era de esperar, la alta actividad basal de NF- $\kappa$ B en las células K562 tipo salvaje fue acompañada por una baja sensibilidad a la activación de este factor por TRAIL, mostrándose como una actividad refractaria. Sin embargo, cuando los niveles endógenos de RAC3 fueron disminuidos, las células se volvieron sensibles a la activación de NF- $\kappa$ B por TRAIL.

Este cambio en la respuesta, podría no solo ser consecuencia de la alta actividad basal de NF- $\kappa$ B en células tipo salvaje respecto de los clones con RAC3 disminuido, sino también, del cambio en la expresión de receptores para TRAIL que se observó en ambos tipos celulares.

En los clones con RAC3 disminuido, además de un incremento en la expresión de receptores de TRAIL, también se observó una clara disminución de los niveles basales de c-FLIP<sub>L</sub>. Este último resultado estaría de acuerdo con otros trabajos en melanomas resistentes a TRAIL, que contienen altos niveles de la proteína inhibitoria FLIP, dónde observaron que los niveles de FLIP bajan cuando se crecen las células con Actinomicina D y se vuelven mas sensibles a TRAIL<sup>96</sup>. FLIP podría ser una de las moléculas que protegen a las células de la citoquina TRAIL y RAC3 podría estar modulando su expresión. De esta manera, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sugieren que la ausencia de sensibilidad de las células K562 al estímulo de TRAIL podría estar estrictamente relacionado a la sobre-expresión de RAC3 que naturalmente presenta esta línea.

La familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) juega un rol central en la regulación de la proliferación, ciclo celular, diferenciación y apoptosis<sup>117, 118, 467</sup>. Dentro de esta familia se encuentran ERK, activada predominantemente por mitógenos, JNK y p38, activadas preferentemente por citoquinas pro-inflamatorias y estrés oxidativo<sup>134, 468</sup>. El rol de estas quinasas en apoptosis es controvertido y depende del tipo celular y contexto de señales<sup>76, 469, 470</sup>. Por otro lado, la vía de los inositoles PI3K/AKT es crucial en la proliferación celular e inhibición de apoptosis y su activación constitutiva está implicada en distintas neoplasias<sup>365, 471</sup>.

Ha sido demostrado que TRAIL es capaz de activar JNK vía MEKK, de manera caspasa-dependiente e independiente<sup>113, 472</sup>. La inducción de JNK amplifica el efecto apoptótico de TRAIL, a través de la vía intrínseca<sup>473, 474</sup>. Hay evidencias que la activación de JNK es iniciada por DR5 y no DR4, esta es la única evidencia que diferencia la capacidad de señalización entre los receptores con dominio de muerte<sup>114</sup>. Estas observaciones estarían de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, dado que observamos un claro aumento de la fosforilación de JNK en células con bajos niveles de RAC3 y que en consecuencia tienen aumentado el número de receptores para TRAIL.

En las células que sobre-expresan RAC3 encontramos un significativo aumento de la actividad de AKT y disminución de la sensibilidad a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas observaciones estarían de acuerdo con otros trabajos previos, donde se observó por ejemplo que una sobre-expresión de RAC3 podría estar regulando el tamaño y crecimiento celular de manera independiente a los esteroides, a través del aumento de la actividad de AKT<sup>372, 475</sup>. Por otro lado, de acuerdo con otros estudios *in vivo*, se observó que la sobre-expresión de RAC3 induce desarrollo aberrante de la glándula mamaria, adenocarcinoma mamario, y una alta frecuencia de otros tumores. Estos tumores muestran aumentados los niveles de IGF-I y aumentada la activación de la vía IGF-IR/PI3K/AKT<sup>356</sup>. Conjuntamente estos hallazgos sugieren que el efecto citoprotector de RAC3 podría deberse en parte a la activación de la vía AKT.

Los resultados obtenidos indican que la activación de la quinasa p38, así como la activación de la vía PI3K/AKT son requeridas para el rol protector de RAC3. Éstas observaciones están de acuerdo con una predominancia de la ruta anti-apoptótica a través de un aumento de la actividad de NF-κB, y de la acción de éstas quinasas sobre el factor de transcripción<sup>76</sup>.

En cuanto a la activación de ERK, su actividad en apoptosis es controvertida<sup>56, 128, 130, 138, 476</sup>. De acuerdo con nuestros estudios, se observó una disminución de la actividad de ERK en las células con alto RAC3, lo que está de acuerdo con otros trabajos que relacionan la activación de ERK con una actividad pro-apoptótica<sup>59, 470</sup> que puede ser activada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>129, 477-480</sup>.

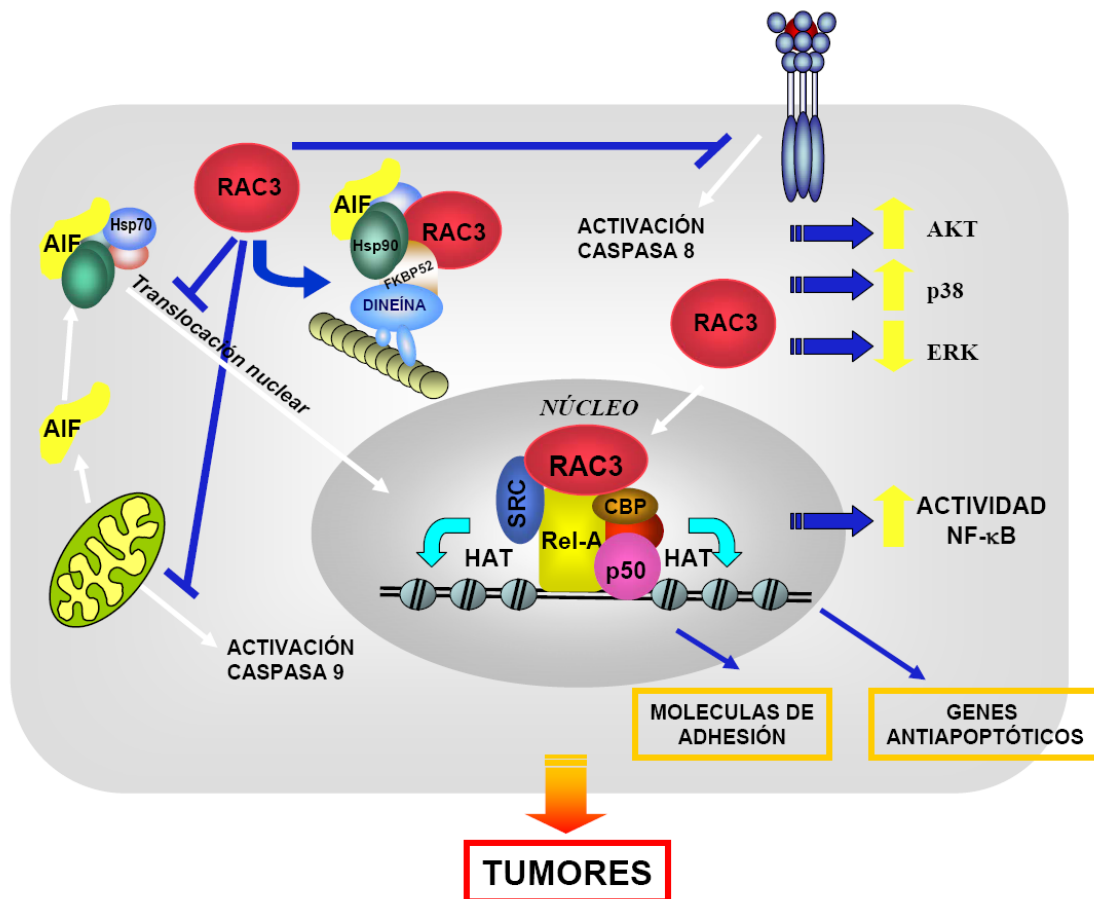
Respecto a la localización subcelular de los coactivadores de la familia p160, todavía no está del todo claro, dependiendo del tipo celular RAC3 se puede localizar en el citoplasma, o en el núcleo y citoplasma simultáneamente<sup>343, 481</sup>. Sin embargo, ha sido

demostrado previamente que la fosforilación de este coactivador por la IKK es determinante para que la mayor parte de RAC3 transloque al núcleo para ejercer su rol como coactivador de receptores nucleares. Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, RAC3 es sustrato de otras actividades enzimáticas y tanto IKK como otras cascadas de señal pueden ser disparadas por múltiples estímulos que pueden depender de las condiciones de cultivo de las células, componentes del medio como por ejemplo la presencia de insulina y el entorno en general. Esto podría explicar las diferencias observadas en condiciones consideradas “basales” para distintas líneas celulares. En cuanto a su tráfico intracelular, de acuerdo a nuestros resultados, RAC3 utiliza para moverse la maquinaria de los microtúbulos.

Ha sido bien descrito el rol de los coactivadores p160 en promover la actividad transcripcional y la expresión de genes. Los resultados obtenidos sugieren que la sobreexpresión de RAC3 podría ejercer una función adicional a la ya conocida función nuclear. Esto incluye alteraciones en el tráfico intra-celular de proteínas pro-apoptóticas, como la inhibición de la translocación al núcleo de AIF, así como la activación de caspasa 9, aunque en este último caso, esto podría ser consecuencia del cambio en los niveles de expresión de genes de la familia Bcl-2 y IAP. Nuestros resultados sugieren que RAC3 podría ejercer ciertas actividades no clásicas de los coactivadores de receptores nucleares, las cuales están involucradas en el control de la muerte celular, a través del control en la translocación nuclear de ciertas proteínas o alternativamente, modulando acciones citoplasmáticas. Aunque no hay demasiadas evidencias sobre el mecanismo en el tráfico sub-celular de AIF y nosotros aún no determinamos el mecanismo específico por el cual RAC3 inhibe la translocación nuclear de este factor en presencia de peróxido, en este trabajo demostramos que ambas moléculas forman parte de un mismo complejo que contiene a la chaperona Hsp90 y la inmunofilina FKBP52, el cual está asociado a la proteína motora dineína y microtúbulos que constituyen la maquinaria de tráfico intra-celular<sup>387, 421</sup>. Respecto a estas observaciones, podemos especular que los altos niveles de RAC3 podrían inhibir la translocación de AIF al núcleo al interferir con la estructura del complejo proteico, a través, por ejemplo de una titulación o disminución de alguno de los componentes que son necesarios para la translocación nuclear o bien por el reclutamiento de moléculas que cooperan con la retención en el citoplasma. De acuerdo a lo último planteado, ha sido demostrado por otros autores que la interacción de AIF con Hsp70 antagoniza la acción pro-apoptótica de esta proteína<sup>66, 448</sup>.



En conclusión, los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran que la sobre-expresión de RAC3 tiene un rol protector en la protección de apoptosis. En particular, observamos que esta acción protectora ocurre ante distintas señales que inducen muerte celular, tanto en células tipo normal como tumorales. Los resultados aquí mostrados sugieren que el rol citoprotector de RAC3 podría deberse a mecanismos distintos a los ya conocidos como coactivador nuclear y además, no relacionados a la acción de hormonas esteroideas (Figura 41). Estas acciones estarían contribuyendo al desarrollo tumoral y a la resistencia a distintas drogas anti-tumorales. Finalmente, nuestras observaciones sugieren que RAC3 podría constituir a futuro un probable blanco terapéutico no solo en tumores hormono-dependientes sino en otros no relacionados a hormonas y que tengan sobre-expresión de este coactivador.



**Figura 41.** Esquema del modelo molecular del rol cito-protector de RAC3 cuando se encuentra sobre-expresado.

## PUBLICACIONES

**Los contenidos de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones:**

- **Coló, GP.**, Rubio, MF., Nojek, IM., Werbajh SE, Echeverria, PC., Alvarado, CV., Nahmod, VE., Galigniana, MD., and Costas, MA. *The p160 nuclear receptor coactivator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmatic action.* Oncogene, doi: 10.1038 (2007).
  
- **Coló, GP.**, Rosato, RR., Grant, S., and Costas, MA. *RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis.* FEBS Letters, 581(26):5075-81 (2007).
  
- **Coló, GP.**, Rubio, MF., Alvarado, CV., and Costas, MA. *RAC3 nuclear receptor coactivator has a protective role in the apoptosis induced by several stimuli.* Medicina, 67(5): 465-8 (2007).

# **ABREVIATURAS**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
AIF: Factor Inductor de Apoptosis  
AP-1: Proteína Activadora-1  
ARN: Ácido Ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ATP: Adenosina Trifosfato  
CRM1: Proteína Receptora de Secuencias NES  
DIABLO: Proteína de Bajo Punto Isoeléctrico de Unión Directa a IAP  
EMSA: Ensayo de cambio de movilidad electroforética  
Erk1/2: Proteínas quinasas activadas por señales extracelulares  
FADD: Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte  
FP: Flavopiridol  
GA: Geldanamicina  
GC: Glucocorticoides  
HSF: “Heat shock factor” factor de choque térmico.  
HSP: “Heat Shock Protein”  
I $\kappa$ B: Inhibidor de NF- $\kappa$ B  
IAP: Proteína Inhibidora de Apoptosis  
IKK: quinasa de I $\kappa$ B  
IL: Interleuquina  
I $\kappa$ B: Inhibidor de NF- $\kappa$ B  
JNK: quinasa de c-Jun  
kDa: kilodalton  
MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos  
MEK: quinasa de MAPK regulada por estímulos extracelulares  
mg: miligramo  
 $\mu$ g: microgramo  
min: minutos  
ml: mililitro  
 $\mu$ l: microlitro  
mM: milimolar  
 $\mu$ M: micromolar  
NES: Señal de Exportación Nuclear

NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear *kappa* B

NLS: Señal de Localización Nuclear

nM: nanomolar

p38: p38 quinasa

PAGE: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

PBS: Solución Salina de Buffer Fosfato

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PI3K: Fosfatidil-Inositol-3 Quinasa

PM: Peso Molecular

pM: picomolar

RAC3: Coactivador asociado al Receptor del Ácido Retinoico 3

RIP: Proteína que Interactúa con Receptor

RNAi: ARN de interferencia

ROS: Especies de Oxígeno Reactivo

SAPKs: Proteínas quinasas activadas por estrés

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

Smac: Segundo Activador de Caspasas Derivado de Mitocondria

SRC-1: Coactivador de Receptores Esteroideos

TIF2: Factor Intermediario de la Transcripción 2

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TNFR: Receptor de TNF

TRADD: Proteína con Dominio de Muerte Asociada al Receptor de TNF

TRAF: Factor Asociado al Receptor de TNF

TRAF: Proteína Asociada al Receptor de TNF

TRAIL: Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado a TNF

TRAILR: Receptor de TRAIL

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Lockshin, R. A. & Beaulaton, J. Programmed cell death. *Life Sci* 15, 1549-65 (1974).
2. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57 (1972).
3. Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12 (1998).
4. Voelkel-Johnson, C., Entingh, A. J., Wold, W. S., Gooding, L. R. & Laster, S. M. Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol* 154, 1707-16 (1995).
5. Boldin, M. P. et al. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-8 (1995).
6. Kitajima, I. et al. Ceramide-induced nuclear translocation of NF-kappa B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF-alpha in murine clonal osteoblasts. *Bone* 19, 263-70 (1996).
7. Nakajima, W. & Tanaka, N. Synergistic Induction of Apoptosis by p53-inducible Bcl-2 Family Proteins Noxa and Puma. *J Nippon Med Sch* 74, 148-57 (2007).
8. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6 (2000).
9. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-90 (1999).
10. Thornberry, N. A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-11 (1997).
11. Nicholson, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-42 (1999).
12. Slee, E. A. et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-92 (1999).
13. Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424 (1999).
14. Hofmann, K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci* 55, 1113-28 (1999).
15. Enari, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50 (1998).
16. Rudel, T. & Bokoch, G. M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-4 (1997).
17. Shi, J. & Wei, L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 55, 61-75 (2007).
18. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-30 (1998).
19. Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-8 (1998).
20. Oltvai, Z. N., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-19 (1993).
21. Cory, S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 13, 513-43 (1995).
22. Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39, 615-47 (2003).
23. Cory, S. & Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-56 (2002).

24. Antonsson, B. & Martinou, J. C. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256, 50-7 (2000).
25. Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B. & Hardwick, J. M. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 379, 554-6 (1996).
26. Chittenden, T. et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J* 14, 5589-96 (1995).
27. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-13 (1997).
28. Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51 (1997).
29. Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. & Nunez, G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-91 (1998).
30. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-56 (1999).
31. Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M. & Matsuyama, S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1366, 127-37 (1998).
32. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S. J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17, 3878-85 (1998).
33. Nechushtan, A., Smith, C. L., Lamensdorf, I., Yoon, S. H. & Youle, R. J. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153, 1265-76 (2001).
34. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6 (1998).
35. Ip, Y. T. & Davis, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-19 (1998).
36. Levine, A. J., Finlay, C. A. & Hinds, P. W. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* 116, S67-9, 1 p following S69 (2004).
37. Alarcon-Vargas, D. & Ronai, Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23, 541-7 (2002).
38. Selivanova, G. & Wiman, K. G. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 26, 2243-54 (2007).
39. Kaufmann, S. H. & Earnshaw, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256, 42-9 (2000).
40. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-33 (2001).
41. Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. & Di Lisa, F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264, 687-701 (1999).
42. Bauer, M. K., Schubert, A., Rocks, O. & Grimm, S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol* 147, 1493-502 (1999).
43. Susin, S. A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-6 (1999).
44. Gutteridge, J. M. & Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899, 136-47 (2000).
45. Sen, C. K. & Packer, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 10, 709-20 (1996).
46. Trump, B. F. & Berezsky, I. K. The role of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 4, 227-32 (1992).
47. Rahman, I. & MacNee, W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 53, 601-12 (1998).



48. Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C. & Curran, T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J* 11, 3323-35 (1992).
49. Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. & Finkel, T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296-9 (1995).
50. Lander, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* 11, 118-24 (1997).
51. Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K. & Hirata, H. Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett* 519, 231-7 (2002).
52. Rahman, I., Marwick, J. & Kirkham, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 68, 1255-67 (2004).
53. Allen, R. G. & Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28, 463-99 (2000).
54. Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. & Holbrook, N. J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271, 4138-42 (1996).
55. Nomura, Y. et al. Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Biochem* 350, 196-201 (2006).
56. Wang, J. et al. HCMV infection attenuates hydrogen peroxide induced endothelial apoptosis--involvement of ERK pathway. *FEBS Lett* 580, 2779-87 (2006).
57. Han, H. et al. HERG K channel conductance promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in HEK293 cells: cellular mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 14, 121-34 (2004).
58. Lennon, S. V., Martin, S. J. & Cotter, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24, 203-14 (1991).
59. Park, B. G., Yoo, C. I., Kim, H. T., Kwon, C. H. & Kim, Y. K. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* 215, 115-25 (2005).
60. Miramar, M. D. et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 276, 16391-8 (2001).
61. Klein, J. A. et al. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-74 (2002).
62. Joza, N. et al. Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol* 25, 10261-72 (2005).
63. Yu, S. W. et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-63 (2002).
64. Susin, S. A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-80 (2000).
65. Vahsen, N. et al. Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene* 25, 1763-74 (2006).
66. Ravagnan, L. et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-43 (2001).
67. Delettre, C. et al. AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J Biol Chem* 281, 6413-27 (2006).
68. Smith, C. A., Farrah, T. & Goodwin, R. G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-62 (1994).
69. Krammer, P. H. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 71, 163-210 (1999).

70. Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M. M., Zingler, K. & Young, J. A. CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell* 87, 845-55 (1996).
71. Chinnaiyan, A. M. et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-2 (1996).
72. Pan, G. et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-3 (1997).
73. Walczak, H. et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 16, 5386-97 (1997).
74. Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G. & Ibanez, C. F. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* 16, 4999-5005 (1997).
75. Larrick, J. W. & Wright, S. C. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *Faseb J* 4, 3215-23 (1990).
76. Franco, D. L., Nojek, I. M., Molinero, L., Coso, O. A. & Costas, M. A. Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 1090-8 (2002).
77. Wang, C. Y., Mayo, M. W. & Baldwin, A. S., Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274, 784-7 (1996).
78. Costas, M. A., Muller Igaz, L., Holsboer, F. & Arzt, E. Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1499, 122-129 (2000).
79. Costas, M. et al. Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis. *J Clin Invest* 98, 1409-16 (1996).
80. Wahl, C., Liptay, S., Adler, G. & Schmid, R. M. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 101, 1163-74 (1998).
81. Weber, C. K., Liptay, S., Wirth, T., Adler, G. & Schmid, R. M. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology* 119, 1209-18 (2000).
82. De Azevedo, W. F., Jr. et al. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2735-40 (1996).
83. Zhai, S., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A. & Figg, W. D. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann Pharmacother* 36, 905-11 (2002).
84. Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V. & Plunkett, W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 106, 2513-9 (2005).
85. Bible, K. C. et al. Flavopiridol binds to duplex DNA. *Cancer Res* 60, 2419-28 (2000).
86. Byrd, J. C. et al. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood* 92, 3804-16 (1998).
87. Brusselbach, S., Nettelbeck, D. M., Sedlacek, H. H. & Muller, R. Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug Flavopiridol in endothelial cells. *Int J Cancer* 77, 146-52 (1998).
88. Cartee, L. et al. Protein kinase C-dependent activation of the tumor necrosis factor receptor-mediated extrinsic cell death pathway underlies enhanced apoptosis in human myeloid leukemia cells exposed to bryostatin 1 and flavopiridol. *Mol Cancer Ther* 2, 83-93 (2003).
89. Rosato, R. R. et al. Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions. *Mol Cancer Ther* 6, 692-702 (2007).
90. Arguello, F. et al. Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity In vivo against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood* 91, 2482-90 (1998).

91. Takada, Y. & Aggarwal, B. B. Flavopiridol inhibits NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2, and matrix metalloprotease-9. *J Biol Chem* 279, 4750-9 (2004).
92. Rosato, R. R., Dai, Y., Almenara, J. A., Maggio, S. C. & Grant, S. Potent antileukemic interactions between flavopiridol and TRAIL/Apo2L involve flavopiridol-mediated XIAP downregulation. *Leukemia* 18, 1780-8 (2004).
93. Almenara, J., Rosato, R. & Grant, S. Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Leukemia* 16, 1331-43 (2002).
94. Wiley, S. R. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-82 (1995).
95. Zheng, S. J., Wang, P., Tsabary, G. & Chen, Y. H. Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. *J Clin Invest* 113, 58-64 (2004).
96. Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H. & Kubin, M. Z. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 161, 2833-40 (1998).
97. Lamhamedi-Cherradi, S. E., Zheng, S. J., Maguschak, K. A., Peschon, J. & Chen, Y. H. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol* 4, 255-60 (2003).
98. Cretney, E. et al. Normal thymocyte negative selection in TRAIL-deficient mice. *J Exp Med* 198, 491-6 (2003).
99. Secchiero, P. et al. Evidence for a proangiogenic activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Neoplasia* 6, 364-73 (2004).
100. Hazra, A. et al. Death receptor 4 and bladder cancer risk. *Cancer Res* 63, 1157-9 (2003).
101. Strater, J. et al. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. *Clin Cancer Res* 8, 3734-40 (2002).
102. Wen, J. et al. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 96, 3900-6 (2000).
103. Pai, S. I. et al. Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res* 58, 3513-8 (1998).
104. Degli-Esposti, M. A. et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-70 (1997).
105. Degli-Esposti, M. A. et al. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-20 (1997).
106. Marsters, S. A. et al. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7, 1003-6 (1997).
107. Emery, J. G. et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273, 14363-7 (1998).
108. Cross, S. S. et al. Osteoprotegerin (OPG)--a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int J Cancer* 118, 1901-8 (2006).
109. Yun, T. J. et al. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol* 166, 1482-91 (2001).
110. Griffith, T. S. & Lynch, D. H. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 10, 559-63 (1998).
111. Kimberley, F. C. & Screaton, G. R. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 14, 359-72 (2004).
112. Sprick, M. R. et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609 (2000).

113. Muhlenbeck, F. et al. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* 273, 33091-8 (1998).
114. Muhlenbeck, F. et al. The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *J Biol Chem* 275, 32208-13 (2000).
115. Martindale, J. L. & Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192, 1-15 (2002).
116. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-80 (1999).
117. Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-35 (1995).
118. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40 (2001).
119. Derijard, B. et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-37 (1994).
120. Cano, E. & Mahadevan, L. C. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20, 117-22 (1995).
121. Martin-Blanco, E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 22, 637-45 (2000).
122. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-52 (2000).
123. Wu, Y. Y. & Bradshaw, R. A. Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line. *J Biol Chem* 271, 13023-32 (1996).
124. Abe, M. K. et al. ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J Biol Chem* 276, 21272-9 (2001).
125. Abe, M. K. et al. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 277, 16733-43 (2002).
126. Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367, 704-11 (1994).
127. Howe, L. R. et al. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71, 335-42 (1992).
128. Guyton, K. Z., Spitz, D. R. & Holbrook, N. J. Expression of stress response genes GADD153, c-jun, and heme oxygenase-1 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and O<sub>2</sub>-resistant fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 20, 735-41 (1996).
129. Abe, M. K. et al. Hydrogen peroxide activates extracellular signal-regulated kinase via protein kinase C, Raf-1, and MEK1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 562-9 (1998).
130. Cagnol, S., Van Obberghen-Schilling, E. & Chambard, J. C. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 11, 337-46 (2006).
131. Lee, J. S., Kim, S. Y., Kwon, C. H. & Kim, Y. K. EGFR-dependent ERK activation triggers hydrogen peroxide-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *Arch Toxicol* 80, 337-46 (2006).
132. Smith, C. L. & O'Malley, B. W. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25, 45-71 (2004).
133. Kyriakis, J. M. et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-60 (1994).
134. Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-2 (2002).
135. Davis, R. J. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 19, 470-3 (1994).
136. Chen, Y. R., Meyer, C. F. & Tan, T. H. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271, 631-4 (1996).

137. Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J. & Tan, T. H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 271, 31929-36 (1996).
138. Conde de la Rosa, L. et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol* 44, 918-29 (2006).
139. Enslen, H., Brancho, D. M. & Davis, R. J. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo J* 19, 1301-11 (2000).
140. Eckert, R. L. et al. p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J Invest Dermatol* 120, 823-8 (2003).
141. Ono, K. & Han, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13 (2000).
142. Zechner, D. et al. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 273, 8232-9 (1998).
143. Vanden Berghe, W. et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273, 3285-90 (1998).
144. Wesselborg, S., Bauer, M. K., Vogt, M., Schmitz, M. L. & Schulze-Osthoff, K. Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 272, 12422-9 (1997).
145. Lenormand, P. et al. MAP kinases: activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 28, 237-44 (1993).
146. Khokhlatchev, A. V. et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-15 (1998).
147. New, L., Jiang, Y. & Han, J. Regulation of PRAK subcellular location by p38 MAP kinases. *Mol Biol Cell* 14, 2603-16 (2003).
148. Wymann, M. P. & Pirola, L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436, 127-50 (1998).
149. Datta, S. R., Brunet, A. & Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-27 (1999).
150. Skorski, T. et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *Embo J* 16, 6151-61 (1997).
151. Bellacosa, A. et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64, 280-5 (1995).
152. Ahmed, N. N., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Chan, T. O. & Tsichlis, P. N. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3627-32 (1997).
153. Moras, D. & Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-91 (1998).
154. Freedman, L. P. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97, 5-8 (1999).
155. Giguere, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20, 689-725 (1999).
156. Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-50 (1995).
157. Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-86 (1994).
158. McKenna, N. J., Lanz, R. B. & O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-44 (1999).

159. Danielian, P. S., White, R., Lees, J. A. & Parker, M. G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* 11, 1025-33 (1992).
160. Ham, J. & Parker, M. G. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1, 503-11 (1989).
161. Godowski, P. J., Picard, D. & Yamamoto, K. R. Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* 241, 812-6 (1988).
162. Dobson, A. D. et al. Mutational analysis of the chicken progesterone receptor. *J Biol Chem* 264, 4207-11 (1989).
163. Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M. & Pratt, W. B. Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. *J Biol Chem* 265, 12778-81 (1990).
164. Picard, D. & Yamamoto, K. R. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Embo J* 6, 3333-40 (1987).
165. Sen, R. & Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-16 (1986).
166. Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53, 211-7 (1988).
167. Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242, 540-6 (1988).
168. Baeuerle, P. A. & Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-79 (1994).
169. Baldwin, A. S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-83 (1996).
170. Muller, C. W., Rey, F. A., Sodeoka, M., Verdine, G. L. & Harrison, S. C. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373, 311-7 (1995).
171. Kopp, E. B. & Ghosh, S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 58, 1-27 (1995).
172. May, M. J. & Ghosh, S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19, 80-8 (1998).
173. Kunsch, C., Ruben, S. M. & Rosen, C. A. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 4412-21 (1992).
174. Brown, A. M. et al. Function of NF-kappa B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF-kappa B/Rel subunits. *Mol Cell Biol* 14, 2926-35 (1994).
175. Hansen, S. K., Baeuerle, P. A. & Blasi, F. Purification, reconstitution, and I kappa B association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol Cell Biol* 14, 2593-603 (1994).
176. Hansen, S. K., Guerrini, L. & Blasi, F. Differential DNA sequence specificity and regulation of HIV-1 enhancer activity by cRel-RelA transcription factor. *J Biol Chem* 269, 22230-7 (1994).
177. Kang, S. M., Tran, A. C., Grilli, M. & Lenardo, M. J. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science* 256, 1452-6 (1992).
178. Plaksin, D., Baeuerle, P. A. & Eisenbach, L. KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *J Exp Med* 177, 1651-62 (1993).
179. Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S. & Sigler, P. B. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 373, 303-10 (1995).

180. Baltimore, D. & Beg, A. A. DNA-binding proteins. A butterfly flutters by. *Nature* 373, 287-8 (1995).
181. DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., Wainberg, M. & Hiscott, J. NF-kappaB activation and HIV-1 induced apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 235-53 (1999).
182. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60 (1998).
183. Haskill, S. et al. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 65, 1281-9 (1991).
184. Jaffray, E., Wood, K. M. & Hay, R. T. Domain organization of I kappa B alpha and sites of interaction with NF-kappa B p65. *Mol Cell Biol* 15, 2166-72 (1995).
185. Chen, Z. et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-97 (1995).
186. Alkalay, I. et al. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10599-603 (1995).
187. Perkins, N. D. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1433-48 (1997).
188. Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G. & Siebenlist, U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2532-6 (1993).
189. de Martin, R. et al. Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B. *Embo J* 12, 2773-9 (1993).
190. Arenzana-Seisdedos, F. et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 15, 2689-96 (1995).
191. Arenzana-Seisdedos, F. et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110 ( Pt 3), 369-78 (1997).
192. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-60 (1997).
193. Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F. & Dargemont, C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 278, 141-4 (1997).
194. Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. & Ghosh, G. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276, 45225-35 (2001).
195. Karin, M. & Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-7 (2002).
196. Sachdev, S., Hoffmann, A. & Hannink, M. Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol* 18, 2524-34 (1998).
197. Johnson, C., Van Antwerp, D. & Hope, T. J. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J* 18, 6682-93 (1999).
198. Rodriguez, M. S., Thompson, J., Hay, R. T. & Dargemont, C. Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274, 9108-15 (1999).
199. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. & Karin, M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388, 548-54 (1997).
200. Mercurio, F. et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278, 860-6 (1997).

201. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-63 (2000).
202. Ghosh, S. & Karin, M. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96 (2002).
203. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91, 243-52 (1997).
204. Pratt, W. B., Silverstein, A. M. & Galigniana, M. D. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal* 11, 839-51 (1999).
205. Chen, G., Cao, P. & Goeddel, D. V. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9, 401-10 (2002).
206. Baeuerle, P. A. & Baichwal, V. R. NF- $\kappa$ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 65, 111-37 (1997).
207. Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. & Herrlich, P. UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol Cell Biol* 9, 5169-81 (1989).
208. Uckun, F. M. et al. Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 252-6 (1993).
209. Harper, N., Farrow, S. N., Kaptein, A., Cohen, G. M. & MacFarlane, M. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF- $\kappa$ B activation by inhibition of apical caspases. *J Biol Chem* 276, 34743-52 (2001).
210. Imbert, V. et al. Tyrosine phosphorylation of I  $\kappa$ B- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B without proteolytic degradation of I  $\kappa$ B- $\alpha$ . *Cell* 86, 787-98 (1996).
211. Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H. J. & Herrlich, P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- $\kappa$ B by UV. *Embo J* 17, 5170-81 (1998).
212. Cotto, J. J., Kline, M. & Morimoto, R. I. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem* 271, 3355-8 (1996).
213. Serfling, E. et al. Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *Embo J* 8, 465-73 (1989).
214. Libermann, T. A. & Baltimore, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10, 2327-34 (1990).
215. Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A. & Jongeneel, C. V. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 171, 35-47 (1990).
216. Messer, G., Weiss, E. H. & Baeuerle, P. A. Tumor necrosis factor beta (TNF- $\beta$ ) induces binding of the NF- $\kappa$ B transcription factor to a high-affinity kappa B element in the TNF- $\beta$  promoter. *Cytokine* 2, 389-97 (1990).
217. Baetu, T. M., Kwon, H., Sharma, S., Grandvaux, N. & Hiscott, J. Disruption of NF- $\kappa$ B signaling reveals a novel role for NF- $\kappa$ B in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J Immunol* 167, 3164-73 (2001).
218. Lee, B. H., Park, S. Y., Kang, K. B., Park, R. W. & Kim, I. S. NF- $\kappa$ B activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 1218-24 (2002).
219. Iademaro, M. F., McQuillan, J. J., Rosen, G. D. & Dean, D. C. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 267, 16323-9 (1992).
220. Whelan, J. et al. An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids Res* 19, 2645-53 (1991).



221. Bunting, K. et al. Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-kappa B transcription factor c-Rel. *J Immunol* 178, 7097-109 (2007).
222. Brasier, A. R., Ron, D., Tate, J. E. & Habener, J. F. A family of constitutive C/EBP-like DNA binding proteins attenuate the IL-1 alpha induced, NF kappa B mediated trans-activation of the angiotensinogen gene acute-phase response element. *Embo J* 9, 3933-44 (1990).
223. Edbrooke, M. R. et al. Constitutive and NF-kappa B-like proteins in the regulation of the serum amyloid A gene by interleukin 1. *Cytokine* 3, 380-8 (1991).
224. Yu, D. Y., Huang, Z. M., Murakami, S., Takahashi, M. & Nonaka, M. Specific binding of a hepatoma nuclear factor to the NF.kappa B/H2TF1 recognition motif found in the C4 promoter, but not in the Slp promoter. *J Immunol* 143, 2395-400 (1989).
225. Nonaka, M. & Huang, Z. M. Interleukin-1-mediated enhancement of mouse factor B gene expression via NF kappa B-like hepatoma nuclear factor. *Mol Cell Biol* 10, 6283-9 (1990).
226. Lombardi, L. et al. Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. *Nucleic Acids Res* 23, 2328-36 (1995).
227. Ten, R. M. et al. The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. *Embo J* 11, 195-203 (1992).
228. Bren, G. D. et al. Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB. *Oncogene* 20, 7722-33 (2001).
229. Catz, S. D. & Johnson, J. L. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20, 7342-51 (2001).
230. Schwenzler, R. et al. The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 274, 19368-74 (1999).
231. You, M., Ku, P. T., Hrdlickova, R. & Bose, H. R., Jr. ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol* 17, 7328-41 (1997).
232. Turner, D. J. et al. Bile salts induce resistance to apoptosis through NF-kappaB-mediated XIAP expression. *Ann Surg* 245, 415-25 (2007).
233. Irie, S. et al. Identification of two Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) promoters in human cancer cells. *DNA Seq* 11, 519-26 (2001).
234. Duyao, M. P., Kessler, D. J., Spicer, D. B. & Sonenshein, G. E. Binding of NF-KB-like factors to regulatory sequences of the c-myc gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 166, 211-20 (1990).
235. Toth, C. R., Hostutler, R. F., Baldwin, A. S., Jr. & Bender, T. P. Members of the nuclear factor kappa B family transactivate the murine c-myc gene. *J Biol Chem* 270, 7661-71 (1995).
236. Hannink, M. & Temin, H. M. Structure and autoregulation of the c-rel promoter. *Oncogene* 5, 1843-50 (1990).
237. Wu, H. & Lozano, G. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* 269, 20067-74 (1994).
238. Kishimoto, T., Taga, T. & Akira, S. Cytokine signal transduction. *Cell* 76, 253-62 (1994).
239. Kaltschmidt, B., Uherek, M., Volk, B., Baeuerle, P. A. & Kaltschmidt, C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2642-7 (1997).
240. Gilmore, T. D., Koedood, M., Piffat, K. A. & White, D. W. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 13, 1367-78 (1996).
241. Luque, I. & Gelinas, C. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 8, 103-11 (1997).
242. Rayet, B. & Gelinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-47 (1999).

243. McKeithan, T. W. et al. BCL3 rearrangements and t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies: a molecular and cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 64-72 (1997).
244. Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr. & Sledge, G. W., Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* 17, 3629-39 (1997).
245. Sovak, M. A. et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 100, 2952-60 (1997).
246. Huang, S., Pettaway, C. A., Uehara, H., Bucana, C. D. & Fidler, I. J. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 20, 4188-97 (2001).
247. Dejardin, E. et al. Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene* 18, 2567-77 (1999).
248. Mukhopadhyay, T., Roth, J. A. & Maxwell, S. A. Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 11, 999-1003 (1995).
249. Visconti, R. et al. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene* 15, 1987-94 (1997).
250. Bargou, R. C. et al. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 87, 4340-7 (1996).
251. Furman, R. R., Asgary, Z., Mascarenhas, J. O., Liou, H. C. & Schattner, E. J. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 164, 2200-6 (2000).
252. Devalaraja, M. N., Wang, D. Z., Ballard, D. W. & Richmond, A. Elevated constitutive IkappaB kinase activity and IkappaB-alpha phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO-alpha transcription. *Cancer Res* 59, 1372-7 (1999).
253. Lind, D. S. et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 130, 363-9 (2001).
254. Tai, D. I. et al. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 89, 2274-81 (2000).
255. Reuther, J. Y., Reuther, G. W., Cortez, D., Pendergast, A. M. & Baldwin, A. S., Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 12, 968-81 (1998).
256. Tai, D. I. et al. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 31, 656-64 (2000).
257. Nasti, G., Vaccher, E., Errante, D. & Tirelli, U. Malignant tumors and AIDS. *Biomed Pharmacother* 51, 243-51 (1997).
258. Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. & Pardee, A. B. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8542-7 (2000).
259. Biswas, D. K. et al. The nuclear factor kappa B (NF-kappa B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10386-91 (2001).
260. Cogswell, P. C., Guttridge, D. C., Funkhouser, W. K. & Baldwin, A. S., Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 19, 1123-31 (2000).
261. Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-66 (1999).
262. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. & Baldwin, A. S., Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-99 (1999).

263. Pikarsky, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461-6 (2004).
264. Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-7 (1995).
265. Hager, G. L., Elbi, C. & Becker, M. Protein dynamics in the nuclear compartment. *Curr Opin Genet Dev* 12, 137-41 (2002).
266. Wu, Z. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-24 (1999).
267. Yu, C. et al. An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell* 25, 765-78 (2007).
268. O'Malley, B. W. Coregulators: from whence came these "master genes". *Mol Endocrinol* 21, 1009-13 (2007).
269. Lonard, D. M. & O'Malley, B. W. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* 30, 126-32 (2005).
270. Wu, J. T. & Kral, J. G. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 123, 158-69 (2005).
271. Narayanan, R., Adigun, A. A., Edwards, D. P. & Weigel, N. L. Cyclin-dependent kinase activity is required for progesterone receptor function: novel role for cyclin A/Cdk2 as a progesterone receptor coactivator. *Mol Cell Biol* 25, 264-77 (2005).
272. Lopez, G. N., Turck, C. W., Schaufele, F., Stallcup, M. R. & Kushner, P. J. Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem* 276, 22177-82 (2001).
273. Xu, J. & Li, Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17, 1681-92 (2003).
274. Lee, D. Y., Teyssier, C., Strahl, B. D. & Stallcup, M. R. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* 26, 147-70 (2005).
275. Anzick, S. L. et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-8 (1997).
276. Matsuura, T. et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 15, 74-7 (1997).
277. Lin, J., Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361-70 (2005).
278. Lonard, D. M. & O'Malley, B. W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 125, 411-4 (2006).
279. Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M. J. & Stallcup, M. R. GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17, 2735-44 (1997).
280. Voegel, J. J. et al. The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J* 17, 507-19 (1998).
281. Li, H., Gomes, P. J. & Chen, J. D. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8479-84 (1997).
282. Chen, H. et al. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-80 (1997).
283. Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S. & Chin, W. W. TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 272, 27629-34 (1997).
284. Torchia, J. et al. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-84 (1997).

285. Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P. M. & Chin, W. W. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139, 2493-500 (1998).
286. Lauritsen, K. J., List, H. J., Reiter, R., Wellstein, A. & Riegel, A. T. A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 21, 7147-55 (2002).
287. Thenot, S., Charpin, M., Bonnet, S. & Cavailles, V. Estrogen receptor cofactors expression in breast and endometrial human cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 156, 85-93 (1999).
288. Li, H. & Chen, J. D. The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *J Biol Chem* 273, 5948-54 (1998).
289. Borud, B. et al. The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. *Mol Endocrinol* 16, 757-73 (2002).
290. Xu, J. & O'Malley, B. W. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord* 3, 185-92 (2002).
291. Kim, H. J., Kim, J. H. & Lee, J. W. Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations. *J Biol Chem* 273, 28564-7 (1998).
292. Yan, J. et al. Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway. *Cancer Res* 66, 11039-46 (2006).
293. Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R. & Costas, M. A. RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett* 485, 195-9 (2000).
294. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. & Parker, M. G. A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-6 (1997).
295. Onate, S. A. et al. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273, 12101-8 (1998).
296. Chen, D. et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-7 (1999).
297. Koh, S. S., Chen, D., Lee, Y. H. & Stallcup, M. R. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem* 276, 1089-98 (2001).
298. Shiau, A. K. et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-37 (1998).
299. Leo, C. & Chen, J. D. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1-11 (2000).
300. Spencer, T. E. et al. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-8 (1997).
301. Liu, Z., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12426-31 (2001).
302. Chen, D., Huang, S. M. & Stallcup, M. R. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* 275, 40810-6 (2000).
303. Xu, J. et al. Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* 279, 1922-5 (1998).
304. Gehin, M. et al. The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol* 22, 5923-37 (2002).
305. Wang, Z. et al. Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13549-54 (2000).

306. Xu, J. et al. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6379-84 (2000).
307. Ding, X. F. et al. Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol* 12, 302-13 (1998).
308. Nolte, R. T. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-43 (1998).
309. Darimont, B. D. et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* 12, 3343-56 (1998).
310. Leo, C., Li, H. & Chen, J. D. Differential mechanisms of nuclear receptor regulation by receptor-associated coactivator 3. *J Biol Chem* 275, 5976-82 (2000).
311. Li, X., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* 23, 3763-73 (2003).
312. Carapeti, M., Aguiar, R. C., Chase, A., Goldman, J. M. & Cross, N. C. Assignment of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene to human chromosome band 2p23. *Genomics* 52, 242-4 (1998).
313. Ning, G., Jurecic, V., Baldini, A. & Xu, J. Structure and chromosomal locations of mouse steroid receptor coactivator gene family. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 481-6 (1999).
314. Yuan, Y. & Xu, J. Loss-of-function deletion of the steroid receptor coactivator-1 gene in mice reduces estrogen effect on the vascular injury response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1521-7 (2007).
315. Auger, A. P., Tetel, M. J. & McCarthy, M. M. Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7551-5 (2000).
316. Wang, J. C., Stafford, J. M. & Granner, D. K. SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem* 273, 30847-50 (1998).
317. Zhu, Y., Qi, C., Calandra, C., Rao, M. S. & Reddy, J. K. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr* 6, 185-95 (1996).
318. Weiss, R. E. et al. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J* 18, 1900-4 (1999).
319. Qi, C. et al. Mouse steroid receptor coactivator-1 is not essential for peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1585-90 (1999).
320. Puigserver, P. et al. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 286, 1368-71 (1999).
321. Picard, F. et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 111, 931-41 (2002).
322. Lee, S. K. et al. Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem* 273, 16651-4 (1998).
323. Na, S. Y. et al. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem* 273, 10831-4 (1998).
324. Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A. & Baldwin, A. S., Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15, 943-53 (1995).

- 
325. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A. & Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-90 (1995).
326. Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L. & Stallcup, M. R. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4948-52 (1996).
327. Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. & Gronemeyer, H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* 15, 3667-75 (1996).
328. Puustinen, R., Sarvilinna, N., Manninen, T., Tuohimaa, P. & Ylikomi, T. Localization of glucocorticoid receptor interacting protein 1 in murine tissues using two novel polyclonal antibodies. *Eur J Endocrinol* 145, 323-33 (2001).
329. Apostolakis, E. M., Ramamurphy, M., Zhou, D., Onate, S. & O'Malley, B. W. Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol Endocrinol* 16, 1511-23 (2002).
330. Atkins, G. B. et al. Coactivators for the orphan nuclear receptor RORalpha. *Mol Endocrinol* 13, 1550-7 (1999).
331. Goodman, R. H. & Smolik, S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-77 (2000).
332. Deguchi, K. et al. MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell* 3, 259-71 (2003).
333. Carapeti, M., Aguiar, R. C., Goldman, J. M. & Cross, N. C. A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood* 91, 3127-33 (1998).
334. Kindle, K. B. et al. MOZ-TIF2 inhibits transcription by nuclear receptors and p53 by impairment of CBP function. *Mol Cell Biol* 25, 988-1002 (2005).
335. Kurebayashi, J. et al. Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res* 6, 512-8 (2000).
336. Suen, C. S. et al. A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem* 273, 27645-53 (1998).
337. Ying, H. et al. Dual functions of the steroid hormone receptor coactivator 3 in modulating resistance to thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 25, 7687-95 (2005).
338. Han, S. J. et al. Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 20, 45-55 (2006).
339. Arimura, A., vn Peer, M., Schroder, A. J. & Rothman, P. B. The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *J Biol Chem* 279, 31105-12 (2004).
340. Louie, M. C., Zou, J. X., Rabinovich, A. & Chen, H. W. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 24, 5157-71 (2004).
341. Yan, J., Tsai, S. Y. & Tsai, M. J. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 27, 387-94 (2006).
342. Belandia, B. & Parker, M. G. Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem* 275, 30801-5 (2000).
343. Chen, S. L., Wang, S. C., Hosking, B. & Muscat, G. E. Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells. *Mol Endocrinol* 15, 783-96 (2001).
344. Gnanapragasam, V. J., Leung, H. Y., Pulimood, A. S., Neal, D. E. & Robson, C. N. Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br J Cancer* 85, 1928-36 (2001).

345. Carroll, R. S. et al. Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res* 6, 3570-5 (2000).
346. List, H. J., Reiter, R., Singh, B., Wellstein, A. & Riegel, A. T. Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 68, 21-8 (2001).
347. Bouras, T., Southey, M. C. & Venter, D. J. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res* 61, 903-7 (2001).
348. Osborne, C. K. et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 353-61 (2003).
349. Zhou, H. J. et al. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res* 65, 7976-83 (2005).
350. Reiter, R., Wellstein, A. & Riegel, A. T. An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer. *J Biol Chem* 276, 39736-41 (2001).
351. Liao, L. et al. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 3-14 (2002).
352. Sakakura, C. et al. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* 89, 217-23 (2000).
353. Xie, D. et al. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 36, 777-83 (2005).
354. Wang, Y. et al. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer* 95, 2346-52 (2002).
355. Ghadimi, B. M. et al. Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol* 154, 525-36 (1999).
356. Torres-Arzuayus, M. I. et al. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* 6, 263-74 (2004).
357. Kuang, S. Q. et al. Mice lacking the amplified in breast cancer 1/steroid receptor coactivator-3 are resistant to chemical carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 65, 7993-8002 (2005).
358. Castro-Rivera, E., Samudio, I. & Safe, S. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem* 276, 30853-61 (2001).
359. Rubio, M. F. et al. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene* 25, 1367-77 (2006).
360. Oh, A. et al. The nuclear receptor coactivator AIB1 mediates insulin-like growth factor I-induced phenotypic changes in human breast cancer cells. *Cancer Res* 64, 8299-308 (2004).
361. Wu, R. C. et al. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* 22, 3549-61 (2002).
362. Wu, R. C. et al. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* 15, 937-49 (2004).
363. Wu, R. C., Smith, C. L. & O'Malley, B. W. Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev* 26, 393-9 (2005).
364. Li, C. et al. Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. *Mol Cell Biol* 27, 1296-308 (2007).
365. Crackower, M. A. et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110, 737-49 (2002).

366. Stocker, H. & Hafen, E. Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev* 10, 529-35 (2000).
367. Kozma, S. C. & Thomas, G. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* 24, 65-71 (2002).
368. Bodine, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3, 1014-9 (2001).
369. Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. & Blenis, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16, 1472-87 (2002).
370. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-57 (2002).
371. Pollak, M. N. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* 262, 84-98; discussion 98-107, 265-8 (2004).
372. Zhou, G., Hashimoto, Y., Kwak, I., Tsai, S. Y. & Tsai, M. J. Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol Cell Biol* 23, 7742-55 (2003).
373. Harbour, J. W. & Dean, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-409 (2000).
374. Louie, M. C., Revenko, A. S., Zou, J. X., Yao, J. & Chen, H. W. Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol Cell Biol* 26, 3810-23 (2006).
375. Gething, M. J. & Sambrook, J. Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45 (1992).
376. Ritossa, F. M. Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Exp Cell Res* 35, 601-7 (1964).
377. Tanabe, M., Nakai, A., Kawazoe, Y. & Nagata, K. Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3. *J Biol Chem* 272, 15389-95 (1997).
378. Shi, Y., Mosser, D. D. & Morimoto, R. I. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 12, 654-66 (1998).
379. Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F. & Voellmy, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-80 (1998).
380. Schiller, P. et al. Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human HSP70 gene. *J Mol Biol* 203, 97-105 (1988).
381. Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N. & Cotto, J. J. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 32, 17-29 (1997).
382. Lindquist, S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55, 1151-91 (1986).
383. Garrido, C. et al. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J* 13, 2061-70 (1999).
384. Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. & Kroemer, G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 433-42 (2001).
385. Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D. P. & Orrenius, S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *Embo J* 18, 2040-8 (1999).
386. Welch, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063-81 (1992).
387. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 111-33 (2003).
388. Johnson, J. L. & Craig, E. A. An essential role for the substrate-binding region of Hsp40s in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 152, 851-6 (2001).



389. Hohfeld, J., Minami, Y. & Hartl, F. U. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83, 589-98 (1995).
390. Blatch, G. L., Lassel, M., Zetter, B. R. & Kundra, V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene* 194, 277-82 (1997).
391. Buchner, J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 24, 136-41 (1999).
392. Young, J. C., Moarefi, I. & Hartl, F. U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154, 267-73 (2001).
393. Wegele, H., Muller, L. & Buchner, J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151, 1-44 (2004).
394. Mayer, M. P. & Bukau, B. Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Curr Biol* 9, R322-5 (1999).
395. Goes, F. S. & Martin, J. Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1. *Eur J Biochem* 268, 2281-9 (2001).
396. Yue, L. et al. Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in *Drosophila* spermatogenesis. *Genetics* 151, 1065-79 (1999).
397. Stebbins, C. E. et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-50 (1997).
398. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-60 (1997).
399. Kamal, A., Boehm, M. F. & Burrows, F. J. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol Med* 10, 283-90 (2004).
400. Broemer, M., Krappmann, D. & Scheidereit, C. Requirement of Hsp90 activity for I $\kappa$ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- $\kappa$ B activation. *Oncogene* 23, 5378-86 (2004).
401. Stancato, L. F. et al. Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p53 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* 268, 21711-6 (1993).
402. Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Harrell, J. M. & DeFranco, D. B. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16, 857-72 (2004).
403. Stepanova, L., Leng, X., Parker, S. B. & Harper, J. W. Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* 10, 1491-502 (1996).
404. Silverstein, A. M. et al. Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J Biol Chem* 274, 36980-6 (1999).
405. Fuller, K. J. et al. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer* 30A, 1884-91 (1994).
406. Yufu, Y., Nishimura, J. & Nawata, H. High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk Res* 16, 597-605 (1992).
407. Pearl, L. H. & Prodromou, C. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol* 10, 46-51 (2000).
408. Hartmann, R. R., Rimoldi, D., Lejeune, F. J. & Carrel, S. Cell differentiation and cell-cycle alterations by tyrosine kinase inhibitors in human melanoma cells. *Melanoma Res* 7 Suppl 2, S27-33 (1997).
409. Blagosklonny, M. V., Toretsky, J. & Neckers, L. Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53. *Oncogene* 11, 933-9 (1995).
410. Sharma, S. V., Agatsuma, T. & Nakano, H. Targeting of the protein chaperone, HSP90, by the transformation suppressing agent, radicicol. *Oncogene* 16, 2639-45 (1998).
411. D'Andrea, L. D. & Regan, L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28, 655-62 (2003).

412. Das, A. K., Cohen, P. W. & Barford, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J* 17, 1192-9 (1998).
413. Scheufler, C. et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210 (2000).
414. Taylor, P. et al. Two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains. *Structure* 9, 431-8 (2001).
415. Sinars, C. R. et al. Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 868-73 (2003).
416. Wu, B. et al. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8348-53 (2004).
417. Kim, P. S. & Baldwin, R. L. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biochem* 51, 459-89 (1982).
418. Gotherl, S. F. & Marahiel, M. A. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55, 423-36 (1999).
419. Jin, L. & Harrison, S. C. Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13522-6 (2002).
420. Kissinger, C. R. et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378, 641-4 (1995).
421. Galigniana, M. D. et al. Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* 41, 13602-10 (2002).
422. Chen, M. S., Silverstein, A. M., Pratt, W. B. & Chinkers, M. The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J Biol Chem* 271, 32315-20 (1996).
423. Silverstein, A. M. et al. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* 272, 16224-30 (1997).
424. Dumont, A. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18, 747-57 (1999).
425. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. & Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265, 17174-9 (1990).
426. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. & Baldwin, A. S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-3 (1998).
427. Sheppard, K. A. et al. Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 273, 29291-4 (1998).
428. Rey, J. M. et al. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. *J Mol Endocrinol* 24, 433-40 (2000).
429. Chen, M., Zsengeller, Z., Xiao, C. Y. & Szabo, C. Mitochondrial-to-nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in cardiac myocytes during oxidant stress: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cardiovasc Res* 63, 682-8 (2004).
430. Katoh, I., Tomimori, Y., Ikawa, Y. & Kurata, S. Dimerization and processing of procaspase-9 by redox stress in mitochondria. *J Biol Chem* 279, 15515-23 (2004).

431. Suliman, A., Lam, A., Datta, R. & Srivastava, R. K. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122-33 (2001).
432. Morgan, M., Williams, B. A., Blay, J. & Hoskin, D. W. Chemosensitization of T-47D breast carcinoma cells to TRAIL and Fas receptor-induced killing. *Anticancer Res* 22, 673-6 (2002).
433. Guo, F. et al. Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* 64, 2580-9 (2004).
434. Ma, Y. F., Zhang, J., Zhao, Y. P., Yang, D. L. & Chen, Y. H. [Correlation between sensitivity to TRAIL and expression level of DR5 on surface of tumor cells.]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 26, 528-30 (2004).
435. Osborn, L., Kunkel, S. & Nabel, G. J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2336-40 (1989).
436. Hietakangas, V. et al. Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 23, 1278-91 (2003).
437. Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H. & Kirchhoff, S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 8247-54 (2001).
438. Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. & Wajant, H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-73 (2001).
439. Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. & Cheng, G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9136-41 (1999).
440. Gao, N., Dai, Y., Rahmani, M., Dent, P. & Grant, S. Contribution of disruption of the nuclear factor-kappaB pathway to induction of apoptosis in human leukemia cells by histone deacetylase inhibitors and flavopiridol. *Mol Pharmacol* 66, 956-63 (2004).
441. Cheng, S., Hsia, C. Y., Leone, G. & Liou, H. C. Cyclin E and Bcl-xL cooperatively induce cell cycle progression in c-Rel<sup>-/-</sup> B cells. *Oncogene* 22, 8472-86 (2003).
442. Zhang, M. Y., Sun, S. C., Bell, L. & Miller, B. A. NF-kappaB transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood* 91, 4136-44 (1998).
443. Lee, H. et al. Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line. *J Exp Med* 181, 1169-77 (1995).
444. Suhasini, M., Reddy, C. D., Reddy, E. P., DiDonato, J. A. & Pilz, R. B. cAMP-induced NF-kappaB (p50/relB) binding to a c-myb intronic enhancer correlates with c-myb up-regulation and inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Oncogene* 15, 1859-70 (1997).
445. Liu, J. J., Hou, S. C. & Shen, C. K. Erythroid gene suppression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 278, 19534-40 (2003).
446. Hao, X. S., Hao, J. H., Liu, F. T., Newland, A. C. & Jia, L. Potential mechanisms of leukemia cell resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis* 8, 601-7 (2003).
447. Brown, D. L. & Bouck, G. B. Microtubule biogenesis and cell shape in *Ochromonas*. II. The role of nucleating sites in shape development. *J Cell Biol* 56, 360-78 (1973).
448. Gurbuxani, S. et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22, 6669-78 (2003).
449. Galigniana, M. D., Harrell, J. M., O'Hagen, H. M., Ljungman, M. & Pratt, W. B. Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *J Biol Chem* 279, 22483-9 (2004).
450. Merlino, G. Regulatory imbalances in cell proliferation and cell death during oncogenesis in transgenic mice. *Semin Cancer Biol* 5, 13-20 (1994).
451. McDonnell, T. J. Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia. *Mol Carcinog* 8, 209-13 (1993).

- 
452. Wang, Y. H., Tsay, Y. G., Tan, B. C., Lo, W. Y. & Lee, S. C. Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *J Biol Chem* 278, 25568-76 (2003).
453. Glaeser, M., Floetotto, T., Hanstein, B., Beckmann, M. W. & Niederacher, D. Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas. *Horm Metab Res* 33, 121-6 (2001).
454. Beg, A. A. & Baltimore, D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-4 (1996).
455. Hinz, M. et al. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19, 2690-8 (1999).
456. Cavarretta, I. T. et al. Reduction of coactivator expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits ERalpha transcriptional activity and MCF-7 proliferation. *Mol Endocrinol* 16, 253-70 (2002).
457. Lehne, G., De Angelis, P., den Boer, M. & Rugstad, H. E. Growth inhibition, cytokinesis failure and apoptosis of multidrug-resistant leukemia cells after treatment with P-glycoprotein inhibitory agents. *Leukemia* 13, 768-78 (1999).
458. Smyth, M. J. et al. Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6 (2003).
459. Kelley, S. K. & Ashkenazi, A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 4, 333-9 (2004).
460. Kaufmann, S. H. & Steensma, D. P. On the TRAIL of a new therapy for leukemia. *Leukemia* 19, 2195-202 (2005).
461. Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J. & Okumura, K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95, 777-83 (2004).
462. Ashkenazi, A. et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-62 (1999).
463. Ravi, R. et al. Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. *Cancer Res* 64, 9105-14 (2004).
464. Takeda, K. et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195, 161-9 (2002).
465. Rosato, R. R., Almenara, J. A., Dai, Y. & Grant, S. Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2, 1273-84 (2003).
466. Braun, T. et al. Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies. *Cell Death Differ* 13, 748-58 (2006).
467. Su, B. & Karin, M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 8, 402-11 (1996).
468. Roux, P. P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-44 (2004).
469. Downward, J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 49-54 (1998).
470. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. & Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-31 (1995).
471. Martelli, A. M. et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 911-28 (2006).
472. Varfolomeev, E. et al. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280, 40599-608 (2005).
473. Tournier, C. et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-4 (2000).

- 
474. Jurewicz, A., Matysiak, M., Andrzejak, S. & Selmaj, K. TRAIL-induced death of human adult oligodendrocytes is mediated by JNK pathway. *Glia* 53, 158-66 (2006).
  475. Horiguchi, K., Arai, S., Nishihara, T. & Nishikawa, J. AIB1 promotes DNA replication by JNK repression and AKT activation during cellular stress. *J Biochem (Tokyo)* 140, 409-19 (2006).
  476. Zhou, Y., Wang, Q., Evers, B. M. & Chung, D. H. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res* 58, 1192-7 (2005).
  477. Ishikawa, Y. & Kitamura, M. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 58, 1078-87 (2000).
  478. Glotin, A. L. et al. Sustained versus transient ERK1/2 signaling underlies the anti- and proapoptotic effects of oxidative stress in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 4614-23 (2006).
  479. Perry, G. et al. Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport* 10, 2411-5 (1999).
  480. Medina, M. G. et al. Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *Embo J* 24, 1706-16 (2005).
  481. Grenier, J. et al. Differential recruitment of p160 coactivators by glucocorticoid receptor between Schwann cells and astrocytes. *Mol Endocrinol* 20, 254-67 (2006).