

Tesis Doctoral

Transducción de señales disparada por oncogenes del Virus Herpes asociado al Sarcoma de Kaposi. Regulación de la transcripción por factores asociados al promotor de H01

Sapochnik, Daiana A.

2017-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sapochnik, Daiana A.. (2017-03-30). Transducción de señales disparada por oncogenes del Virus Herpes asociado al Sarcoma de Kaposi. Regulación de la transcripción por factores asociados al promotor de H01. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sapochnik, Daiana A.. "Transducción de señales disparada por oncogenes del Virus Herpes asociado al Sarcoma de Kaposi. Regulación de la transcripción por factores asociados al promotor de H01". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-30.



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Transducción de Señales disparada por oncogenes del Virus
Herpes asociado al Sarcoma de Kaposi. Regulación de la
transcripción por factores asociados al promotor de HO1.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires
en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Daiana A. Sapochnik

Director de tesis y Consejero de estudios: Omar A. Coso

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias
(IFIBYNE – CONICET), Departamento de Fisiología,
Biología Molecular y Celular, FCEyN - UBA.

Fecha de Defensa: 30 de Marzo de 2017.

Resumen en Español

Resumen en Español

Transducción de Señales disparada por oncogenes del Virus Herpes asociado al Sarcoma de Kaposi. Regulación de la transcripción por factores asociados al promotor de Hemooxigenasa-1.

El constitutivamente activo y oncogénico receptor acoplado a proteína G (KSHV-GPCR o vGPCR) es expresado por el genoma viral en células infectadas por el virus asociado al Sarcoma de Kaposi (KSHV).

La enzima Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es una enzima que se encuentra altamente expresada en lesiones de Sarcoma de Kaposi (KS) en humanos y está involucrada en el desarrollo de KS.

HO-1 además regula positivamente la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) favoreciendo el desarrollo y crecimiento tumoral.

Nrf2 pertenece a la familia de proteínas de cierres básicos de leucinas que funcionan como factores de transcripción. En condiciones basales Nrf2 se encuentra unido a cluster de proteínas (Keap1 y proteínas del complejo ubiquitin-proteosoma) que lo llevan a la degradación mediante proteosoma. Luego de ciertos estímulos Nrf2 se separa de estas proteínas, trasloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes target.

Hemos reportado que vGPCR inicia una cascada de señalización que converge en la activación del promotor de HO-1. Hemos caracterizado que vGPCR induce la expresión de HO-1 y la transformación dependiente de HO-1 a través de las subunidades $G_{\alpha_{12/13}}$ de las proteínas G heterotriméricas y de la pequeña GTPasa RhoA.

Con el objeto de dilucidar los componentes moleculares que regulan la activación del promotor de HO-1 en respuesta a vGPCR, encontramos varias líneas de evidencia que apoyan el rol de Nrf2 en el eje vGPCR - $G_{\alpha_{12/13}}$ - RhoA .

La activación de diferentes vías de kinasas fueron evaluadas en células que sobre-expresan vGPCR con el objeto de investigar si cumplen alguna función en la activación de Nrf2 y en la inducción de HO-1. Nuestros resultados le asignan un rol fundamental a las vías de ERK1/2 y p38 siendo intermediarias en el signaling río debajo de vGPCR.

En este trabajo mostramos evidencia que indicaría un rol fundamental en la estabilización de Nrf2, su traslocación al núcleo, en su activación transcripcional y

consecuentemente en la expresión de HO-1. Estos resultados contribuyen a dilucidar la naturaleza compleja de las vías de transducción de señales reguladas por vGPCR y refuerza la noción de que tanto HO-1 como sus intermediarios podrían ser potenciales targets terapéuticos en el tratamiento de KS.

Palabras Clave: Transducción de señales, regulación de la expresión génica, Virus del Sarcoma de Kaposi, Hemo-Oxigenasa 1, Nrf2, MAPKs.

Resumen en Inglés

Resumen en Inglés

Signaling triggered by Kaposi's Sarcoma Herpes Virus oncogenes. Gene expression regulation by transcription factors associated to Hemeoxygenase-1 promoter.

The constitutively active and oncogenic G protein-coupled receptor (KSHV-GPCR or vGPCR) is expressed by the viral genome in cells infected by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV).

Heme oxygenase-1 (HO-1) is an enzyme upregulated and highly expressed in human Kaposi Sarcoma (KS) lesions and involved in KS development.

HO-1 also mediates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression favoring tumor growth and development.

Nrf2 belongs to the family of basic leucine zipper proteins that function as transcription factors. Under resting conditions Nrf2 is kept in the cytoplasm by a cluster of proteins that degrade it quickly. Upon activation Nrf2 is not degraded, travels to the nucleus and initiates transcription of target genes.

We have reported vGPCR-triggered activation of signaling pathways that converge on the HO-1 gene promoter. We have previously characterized that vGPCR induces HO-1 expression and HO-1 dependent transformation through the $G_{\alpha_{12/13}}$ subunit of heterotrimeric G proteins and the small GTPase RhoA.

In an attempt to narrow down the molecular components that regulate vGPCR triggered HO-1 expression at the gene promoter level, we found several lines of evidence that support a role for Nrf2 transcription factors and related family members in the vGPCR- $G_{\alpha_{12/13}}$ - RhoA signaling pathway that converges on the HO-1 gene promoter.

Different kinase pathways activated in cells expressing vGPCR were tested in order to unveil a putative role in regulating Nrf2 activation and concomitant HO-1 induction. Our current information assigns a major role to the ERK1/2 and p38 MAPK pathways as intermediates in signaling downstream from vGPCR.

We report here evidence for its role influencing Nrf2 stabilization, Nrf2 translocation to the cell nucleus, Nrf2 transactivation activity and consequently HO-1 expression. These results contribute to uncover the complex nature of the signaling pathways regulated by vGPCR and reinforce the notion of HO-1 and signaling intermediates like Nrf2 as potential therapeutic targets in the treatment of KS.

Keywords: signal transduction, gene expression regulation, Kaposi's sarcoma herpesvirus, Heme-Oxygenase 1, Nrf2, MAPKs.

Abreviaturas

Abreviaturas

A

AHR: Aryl Hydrocarbon Receptor

Akt: Proteína Kinasa B

AMPc: Adenosina mono fosfato
cíclico

AP-1: Proteína Activadora 1

ARE: Antioxidant Response
Element

ATF: Factor de transcripción
anabólico

B

BHA: Butilhidroxianisol

bZip: Basic leucine zipper domain

C

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CRE: Calcium Response Element

CREB: Cyclic AMP-Responsive
Element-Binding protein 1

D

DBD: DNA binding domain

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNAc: Ácido Desoxirribonucleico
Copia

E

EBV: Virus de Epstein Barr

EGF: Factor de Crecimiento
Epidérmico

ERK: Extracellular regulated
kinase

F

FL: Full Length o forma completa

G

GDP: Guanosina di fosfato

GMPc: Guanosina mono fosfato
cíclico

GM-CSF: Factor estimulante de
colonias de granulocitos y
macrófagos

GPCR: Receptor acoplado a
proteína G

GSH: Glutación

GSK3 β : Glycogen Synthase
Kinase 3 β

GTP: Guanosina tri fosfato

H

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

HHV8: Herpesvirus Humano 8

HIV: Virus de inmunodeficiencia
humano

HO-1: Hemo-oxigenasa 1

HPV: Virus del Papiloma Humano

HTLV-1: Virus linfotrópico de
células T humano Tipo I

I

IGF-1: Factor de crecimiento
insulínico tipo 1

IF: Inmunofluorescencia

IKB: inhibidor de kappa B

J

JNK: c-Jun NH2-terminal kinase

K

Keap1: kelch like ECH associated protein 1

KO: Knock-out

KSHV: Virus asociado al Sarcoma de Kaposi

KSHV-GPCR: Receptor acoplado a proteína G del Virus asociado al sarcoma de Kaposi

KS: Sarcoma de Kaposi

L

LANA-1: latency-associated nuclear antigen

LPS: Lipopolisacárido

M

Maf: musculoaponeurotic fibrosarcoma

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MCD: Desorden Multicéntrico de Castleman

MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

miRNA: micro RNA

mTORC: mammalian target of rapamycin complex 1 o

mechanistic target of rapamycin complex 1

MUT: Mutante

N

NES: Señal de exportación nuclear

NF-KB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLS: Señal de localización nuclear

NO: Óxido Nítrico

Nrf2: NF-E2 Related Factor 2

P

p38: MAPK de 38KDa

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PEL: Primary Effusion Lymphoma

PI3K: Phosphatidylinositide 3-kinases

PKA: Proteína Kinasa A

PKC: Proteína Kinasa C

PKG: Proteína Kinasa G

R

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas del oxígeno)

S

SAPKs: Stress Activated Protein Kinases

shRNA: Short Hairpin RNA

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SOD: Superóxido Dismutasa
StRE: Stress Response Element

interleukin-1 β -converting enzyme-
inhibitory protein

T

TAD: Transactivation domain
tBHQ: tert-Butylhydroquinona

vIL-6: Homólogo viral de IL-6

V

vCYC: Homólogo viral de Ciclina D
VEGF: Factor de Crecimiento de
Endotelio Vascular
VEGF-R: Receptor del Factor de
Crecimiento de Endotelio Vascular
vFLIP:: Homólogo viral de Fas-
associated death domain-like

W

WB: Western Blot
WT: Wild Type o forma salvaje

X

XRE: Xenobiotic Response
Element

Índice

Resumen en Español	4
Resumen en Inglés	8
Abreviaturas	12
Índice	15
Introducción.....	18
1. El Virus Asociado al Sarcoma de Kaposi	18
1.1 Rol de KSHV en el Sarcoma de Kaposi.....	19
1.2 Efecto de KSHV en la proliferación de células endoteliales	21
1.3 Propiedades angiogénicas de KSHV	22
1.4 KSHV se beneficia de e induce señales inflamatorias.....	23
1.5 Proteínas virales y RNAs responsables por los efectos de KSHV en células endoteliales primarias	25
2. Estrés oxidativo y HO-1	28
2.1 El sistema hemo oxigenasa	29
2.2 Mecanismos de inducción de HO-1.....	31
3. El Factor de Transcripción Nrf2	35
3.1 Regulación dependiente de Keap1	40
3.2 Regulación independiente de Keap1	45
Otras proteínas reguladoras de Nrf2: Maf y Bach1.....	47
4. Transducción de señales - MAPKs	49
Objetivos.....	60
Materiales y Métodos	64
1. Cultivo de líneas Celulares	64
2. Transfecciones Transitorias.....	64
3. Transfecciones estables	65
4. Plásmidos	66
5. Reactivos	67
6. Preparación de Bacterias Competentes.....	69
7. Transformación Bacteriana	70
8. Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Mini preparaciones.....	71
9. Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxi preparaciones	71
10. Cuantificación del DNA plasmídico	72

11. Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción.....	72
12. Extracción del RNA	73
13. Preparación de DNAc.....	74
14. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	74
15. qPCR o PCR en Tiempo Real	75
16. Cuantificación de Proteínas.....	77
17. Inmunoprecipitación.....	77
18. Western Blot.....	78
19. Ensayos de detección de la actividad luciferasa.....	81
20. Medición de la actividad de β -galactosidasa	82
21. Inmunofluorescencia.....	82
22. Ensayos <i>in vivo</i> - Xenotrasplantes en ratones Atímicos	83
Resultados	86
4.1 Elementos genómicos en el promotor de HO-1 involucrados en la activación por vGPCR.....	86
4.2 Relevancia de los sitios ARE en la activación de HO-1 mediada por vGPCR.....	87
4.3 Componentes transductores de señales involucrados en la señalización disparada por vGPCR	92
4.4 Efectos directos sobre la actividad transcripcional de Nrf2	94
4.5 Efectos sobre la traslocación nuclear de Nrf2.....	95
4.6 Activación de kinasas por vGPCR	97
4.7 Efectos de RhoA sobre ERK1/2	99
4.8 Efectos de ERK sobre actividad transcripcional de Nrf2	100
4.9 Efectos de ERK sobre la localización subcelular de Nrf2	102
4.10 Efectos de vGPCR sobre los niveles de Nrf2.....	104
4.12 Efectos de p38 sobre actividad transcripcional de Nrf2	107
4.14 Efectos de Nrf2 en el desarrollo de tumores <i>in vivo</i>	111
4.15 Descripción de los tumores desarrollados por los ratones Nude inoculados con NIH 3T3 vGPCR- shNrf2	112
Discusión	118
vGPCR, Nrf2 y signaling.....	124
KSHV y vGPCR.....	128
Conclusiones.....	129
Bibliografía	132

Introducción

Introducción

1. El Virus Asociado al Sarcoma de Kaposi

El virus asociado al Sarcoma de Kaposi (KSHV, HHV8) es un gamma-2 herpes virus implicado en la patogénesis de tres enfermedades en humanos, el Sarcoma de Kaposi (KS), un tumor endotelial así como Primary Effusion Lymphoma (PEL) y la variante en células plasmáticas del desorden Multicéntrico de Castleman (MCD), éstas últimas dos enfermedades de células B. Estas tres enfermedades ocurren en un contexto de deficiencia en el sistema inmune y/o de infección con HIV pero la patogénesis de cada una es muy diferente. KS resulta principalmente de los efectos combinados de la infección de un virus endoteliotrópico con propiedades angiogénicas y estímulos inflamatorios y por lo tanto representa un modelo de cáncer que surge en un contexto inflamatorio. Factores angiogénicos e inflamatorios del virus y la célula hospedadora también tienen un rol muy importante en la patogénesis de MCD.

Motivados por datos epidemiológicos que sugerían la participación de un agente de transmisión sexual como la causa del Sarcoma de Kaposi asociado al SIDA, Chang, Moore y colaboradores identificaron en 1994 el primer fragmento del Herpes virus asociado al Sarcoma de Kaposi (KSHV: nombre taxonómico Human Herpes virus 8 – HHV8) en muestras de KS¹. Muchos grupos de investigación luego establecieron que secuencias de DNA de KSHV podían ser identificadas en todos los tumores de KS y mostraron una alta asociación entre la detección de DNA por PCR o de anticuerpos para KSHV con el desarrollo de KS o con su posterior desarrollo²⁻⁴. Poco después de estos descubrimientos KSHV fue encontrado en dos desordenes asociados a células B, PEL y MCD^{5,6}.

La evidencia epidemiológica que relaciona a KSHV con KS, PEL y MCD junto con la evidencia de las propiedades oncogénicas de KSHV llevaron a la clasificación de KSHV como un carcinógeno de clase I por la Agency for Research on Cancer (IARC).

1.1 Rol de KSHV en el Sarcoma de Kaposi

El Sarcoma de Kaposi es un tumor atípico. Muchas de sus características sugieren que este tumor puede no resultar de un evento de transformación que resulta en el crecimiento autónomo de las células tumorales, pero representa los efectos combinados de un virus con características angiogénicas y un estado de inflamación local o sistémico. Hay cuatro clasificaciones de KS según su epidemiología:

- 1) La forma clásica, descrita por primera vez por Moritz Kaposi en 1872, se caracteriza por ser un tumor en la piel indoloro y que aparece predominantemente en hombres de mediana edad en países mediterráneos (Italia, Grecia) o del norte de África.
- 2) La forma endémica que se encuentra en individuos HIV negativos en países del este y centro de África puede además mostrar daño en algunos órganos y además puede ocurrir en niños.
- 3) La forma epidémica o asociada a HIV es la forma mas agresiva y ocurre principalmente en individuos HIV positivos en países de occidente (en donde la prevalencia de KSHV es mayor que en la población en general) y en países de África, en donde afecta a individuos infectados con KSHV que pueden o no estar infectados con HIV.
- 4) La forma iatrogénica puede ocurrir en individuos inmunosuprimidos por trasplante.

La existencia de diferentes formas clínicas de KS resalta la importancia de distintos co-factores que pueden promover el desarrollo de KS en individuos infectados con KSHV: el alto riesgo de KS en pacientes con SIDA (más de 5000 veces mayor relativo a la población en general del mismo país) y de individuos receptores de trasplante (300 veces mayor relativo a la población en general) sugiere que una disminución en la capacidad del sistema inmune de vigilar frente a la infección con KSHV predispone al desarrollo de tumores KS⁷. Co-factores ambientales, como otras infecciones (por ejemplo helmintos⁸) o compuestos naturales encontrados en plantas que inducen la replicación de KSHV pueden explicar la distribución endémica característica de KS en el este y centro de África. Los tumores de KS han mostrado ser policlonales, oligoclonales o monoclonales⁹⁻¹¹. Células infectadas con KS aisladas de lesiones de KS no dan nuevos tumores

cuando son implantadas en ratones nude y cultivos primarios de células endoteliales infectadas con KSHV no muestran la capacidad de proliferar aun en cultivos 3D. Además, en KS sólo se encuentra una pequeña proporción de células infectadas con KSHV entre otras células ahusadas e inflamatorias (Figura 1a).

Estas observaciones sugieren que KSHV podría causar una enfermedad policlonal angioproliferativa e inflamatoria cuando infecta células endoteliales. Sin embargo, un efecto transformante de KSHV se ha observado en ratas¹², en líneas celulares endoteliales murinas transfectadas con el genoma de KSHV¹³ y en líneas celulares endoteliales humanas infectadas con KSHV¹⁴. Además, se ha demostrado en diferentes sistemas experimentales que varias proteínas virales son oncogénicas (Tabla 1). Más aún, algunas lesiones de KS muestran capas de células ahusadas infectadas con KS (Figura 1b). Es posible entonces que algunos casos de KS sean inflamatorios pero que alteraciones genéticas puedan ocurrir como resultado de inestabilidad genética inducida por KSHV haciendo que una célula infectada se transforme lo que puede llevar al desarrollo de un tumor monoclonal..

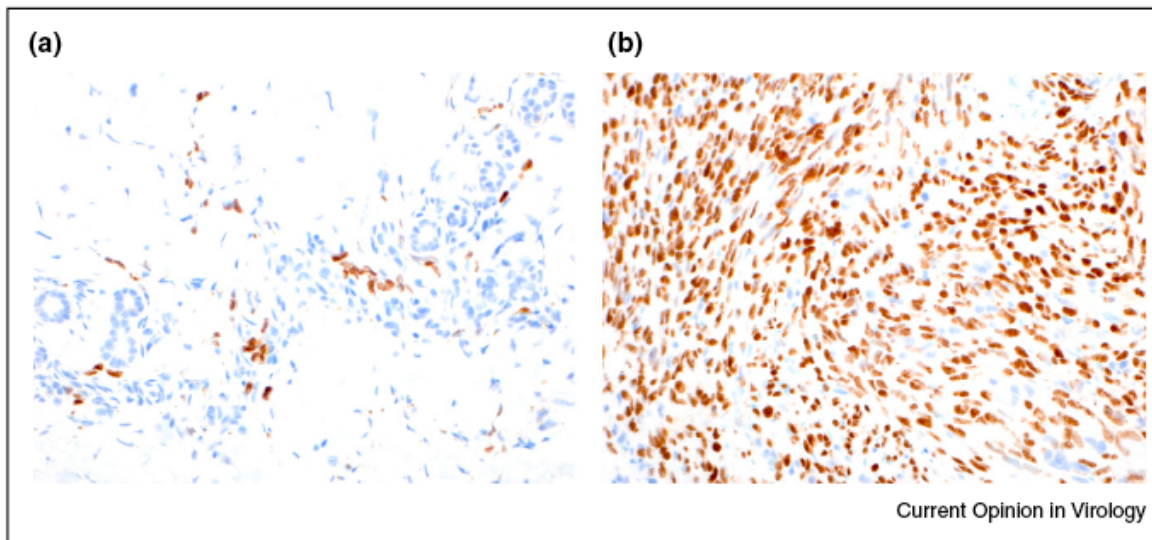


Figura 1: Heterogeneidad de KSHV en Sarcoma de Kaposi. Inmunohistoquímica de LANA en dos muestras representativas de KS. a) En este caso sólo unas pocas células son positivas para KSHV y se observan además células ahusadas no infectadas y células inflamatorias. b) En este caso la mayoría de las células ahusadas están infectadas con KSHV. Magnificación original: 40X. De Schulz et al ¹⁷.

Este modelo es apoyado por el descubrimiento de mutaciones en p53^{15,16} y KRAS en un grupo de pacientes. Más aún, este modelo explicaría la heterogeneidad de KS en términos de su apariencia clínica e histológica y en la respuesta al tratamiento. En los siguientes apartados describiremos los eventos moleculares más importantes que ocurren en el desarrollo de KS.

1.2 Efecto de KSHV en la proliferación de células endoteliales

Existe evidencia que indica que KSHV puede promover la proliferación de células endoteliales o de extender su vida media^{18,19}. Sin embargo, comparado con otros virus oncogénicos este efecto parece ser moderado. Células endoteliales infectadas con KSHV en cultivo no superan en número a las células no infectadas en el mismo cultivo a largo plazo dado que pierden el genoma de KSHV luego de varios pasajes en cultivo. Además, en muestras de KS, menos del 20% de las células ahusadas son positivas para un indicador de proliferación como PCNA²⁰, mientras que otro grupo ha encontrado un aumento de células p53 y Ki-67 positivas en lesiones más avanzadas de KS²¹. Por otro lado, las proteínas virales de KSHV cuando se expresan en células endoteliales aisladas interfieren con moduladores del control del crecimiento celular: entre esas proteínas virales se encuentran tres proteínas que se expresan durante la latencia LANA-1, vCYC (homólogo de Ciclina D) y vFLIP (homólogo de FLIP), un cluster de miRNAs y las proteínas virales K1 y vIRF1. En la Tabla 1 se encuentra una descripción de sus funciones.

La infección de células endoteliales por KSHV resulta en la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR, mediada por K1, vGPCR y vIL6²²⁻²⁵. El inhibidor de mTOR, Rapamicina, reduce el crecimiento de células endoteliales linfáticas infectadas con KSHV y mTORC1 es activado en células endoteliales linfáticas pero no en células endoteliales vasculares²⁶. La relevancia clínica de esta observación es subrayada por el descubrimiento de que la rapamicina puede inducir la regresión de tumores en pacientes KS positivos trasplantados, aunque este efecto puede ser en parte a la mejora del sistema inmunitario²⁷.

1.3 Propiedades angiogénicas de KSHV

Aunque KSHV puede no ser un virus con la capacidad transformante de EBV, HPV o HTLV-1, la infección de células endoteliales con KSHV altera su comportamiento fisiológico. El sello histológico característico de las lesiones avanzadas KS es la forma ahusada atípica que adoptan las células endoteliales infectadas por KSHV (Figura 1). Incluso antes del descubrimiento de KSHV, estas células ahusadas eran conocidas por expresar indicadores de células endoteliales linfáticas y de endotelio vascular (podoplanina, VEGFR3, CD34) así como de células mesenquimales (Vimentina, PDGFR1)²⁸. Es sabido que la infección de células endoteliales con KSHV induce la transición endotelio – mesenquimal (EndMT) que resulta en la expresión de indicadores mesenquimales y aumenta la invasividad de las células infectadas en virtud de la expresión de las metaloproteasas celulares MMT1-MMP²⁹. Este efecto parece ser mediado por la proteína viral de latencia vFLIP en conjunto con el receptor viral vGPCR a través de la activación de la vía de Notch²⁹. En cultivo 2D, KSHV ha mostrado re-diferenciar células endoteliales del endotelio vascular infectadas en células endoteliales linfáticas y viceversa^{30,31}. Esto involucra un aumento en la expresión del regulador maestro de la diferenciación endotelial linfática, Prox-1, en las células infectadas con KSHV así como también un aumento en la expresión de citoquinas inflamatorias y angiogénicas y de sus receptores³⁰. La morfología característica ahusada de las células infectadas por KSHV en tumores KS puede ser mimificada infectando células endoteliales vasculares o linfáticas con la proteína de latencia vFLIP³²⁻³⁴.

Las características histológicas de KS incluye elementos de angiogénesis aberrante, como espacios vasculares, fugas, extravasación de eritrocitos y la diferenciación anormal de células endoteliales infectadas por KSHV que describimos previamente. En cultivo celular, la infección de células endoteliales primarias con KSHV aumenta su habilidad de formar estructuras tubulares en matrigel en la ausencia de factores de crecimiento agregados, un fenotipo que se asemeja al inducido por VEGF en los ensayos clásicos de angiogénesis; la infección con KSHV además aumenta su capacidad invasiva y migratoria^{19,29-38}. Además estas células secretan citoquinas pro-angiogénicas como VEGF, Ang2, IL-6, IL-8 y diferentes metaloproteasas^{30,35,37,39}. Otros factores celulares que contribuyen a la

angiogénesis como Ephrina B2, Emprina, Hey1, PDGFRb, c-kit también están aumentados⁴⁰⁻⁴³. El inhibidor de PDGFRb y c-kit, Imatinib, ha sido utilizado en ensayos clínicos de SIDA-KS y ha demostrado ser parcialmente eficiente^{44,45} sugiriendo que la elevada expresión de estos dos receptores tirosina – kinasa pueden contribuir al desarrollo dependiente de KSHV de KS.

1.4 KSHV se beneficia de e induce señales inflamatorias

La apariencia de las lesiones de KS podría indicar que mecanismos de inflamación o reparación de herida promueven el desarrollo de este tumor en individuos infectados con KSHV. El mayor riesgo de individuos con SIDA respecto de individuos trasplantados de desarrollar KS podría indicar el estado de inflamación crónica observados en individuos con SIDA podría ser un factor importante. Experimentalmente, citoquinas inflamatorias como IL-6 han mostrado aumentar la carga viral de KSHV en sangre periférica, células B y monocitos^{46,47}. Células en cultivo provenientes de muestras de KS inducen lesiones tipo KS en ratones nude, sugiriendo un potencial antigénico de factores parácrinos secretados por células de KS en cultivo⁴⁸. En lesiones KS es típico encontrar infiltrados inflamatorios celulares con monocitos, eosinófilos y células plasmáticas⁴⁹. KSHV por si mismo contribuye a este ambiente inflamatorio. La infección de células endoteliales primarias induce, entre otros, la expresión de citoquinas angiogénicas e inflamatorias y receptores de citoquinas como IL-6, IL-8, IL-1R, IL-16, Interferón 12 (IL28A), IL-15 y otras quimioquinas^{30,33,36}. Además, KSHV codifica para homólogos de IL-6, vIL-6 y de quimioquinas vCCL1-3 como se resume en la Tabla 1. La expresión de vIL-6 en unas pocas células infectadas ha sido documentado^{50,51}. Entre los factores celulares que han sido implicados en los procesos inflamatorios inducidos por KSHV está COX-2, proteína que se encuentra sobre-expresada en KS y es inducida por KSHV en células endoteliales infectadas. Es inducido por varias proteínas virales como por ejemplo vFLIP y K15 (Tabla 1) y contribuye a la secreción de quimioquinas celulares (RANTES, MCP2, TARC, MIP1a, MDC) que median el reclutamiento tanto de leucocitos como de factores angiogénicos (IGF1, PDGF, IL-14, MCSF, GM-CSF, VEGF A y C, angiogenina, oncostatina M, TGFb1); además contribuye a la activación de KSHV en células infectadas en estado de latencia y a su aumento en la invasividad^{37,52}.

Viral protein/RNA	Role in KSHV life cycle	Contribution to KSHV oncogenesis
LANA	Essential for KSHV persistence; replicates latent KSHV episomes and ensures their distribution to daughter cells	Antagonizes p53, p73 and pRB; redistributes GSK3 β ; regulates c-myc; may extend the life span of infected primary endothelial cells;
vCYC	Modulation of cell cycle; involved in latency control	Promotes entry into S phase of cell cycle by phosphorylating RB; induces oncogene-induced senescence (OIS), helps to override contact inhibition of latently infected cells
vFLIP	NF κ B activation, suppresses lytic reactivation and thereby contributes to latency and persistence, anti-apoptotic and anti-autophagy role, induces interferon-inducible cellular genes	Contributes to KS spindle cell formation, essential for PEL cell survival, may contribute to lymphoma formation, antagonizes vCYC-induced OIS, induces the expression of IL6, involved in notch signaling, KSHV-induced differentiation of endothelial cells and endothelial-mesenchymal transition, involved in B cell differentiation, regulates PRC2 complex to induce epigenetic changes in KSHV-infected cells, may contribute to inflammatory infiltrate in KS lesions
vGPCR	Regulates lytic reactivation, downregulates TLR4 expression	Transgenic expression in mice causes angioproliferative tumors, may contribute to development of KS in a paracrine manner by promoting VEGF and angiopoietin expression, activates PI3K γ /Akt/mTOR pathway, modulates notch signaling, KSHV-induced endothelial cell differentiation and EndMT.
K1	Regulates KSHV lytic replication, activates MEK/Erk and PI3K/Akt pathways, modulates B cell antigen receptor,	Transforming or oncogenic properties when overexpressed, in transgenic mice, or when inserted into MHV68; increases angiogenesis and invasiveness of KSHV-infected endothelial cells; may contribute to increased vascular permeability.
K15	Regulates KSHV lytic replication, regulates B cell receptor-dependent signaling; activates MEK/Erk, JNK, NF κ B and PLC γ 1-dependent signaling	Increases angiogenesis and invasiveness of KSHV-infected endothelial cells; induces inflammatory cytokines
vIL6	Activates signaling via gp130 subunit of IL6R; promotes B-cell proliferation; induces VEGF and IL6 secretion and angiogenesis; is regulated by intracellular notch.	Supports PEL cell proliferation; its induction of IL6 and VEGF contributes to vascular permeability and the pathogenesis of MCD and PEL; vIL6 levels are associated with disease activity in MCD and contribute to inflammation. May contribute to lymphatic endothelial cell differentiation of KSHV-infected blood vascular endothelial cells.
vMIP I-III	vMIP-I (vCCL1) is a CCR8 agonist and induces angiogenesis; vMIP-III (vCCL3) is a CCR4 and XCR1 agonist, stimulates angiogenesis and attracts TH2 cells; vMIP-II (vCCL2) is an antagonist of CCR1-5, CXCR4 and an agonist of CCR8, inhibits migration of NK cells. vCCL1 and vCCL2 promote KSHV lytic reactivation.	Could modulate infiltration of neutrophils, TH2 cells into KS lesions; could contribute to angiogenic phenotype of KSHV. vCCL1 and vCCL2 promote survival of PEL cells.
vIRF1	Modulates cGAS-STING pathway; blocks recruitment of CBP/p300 to vIRF3; represses induction of interferon-inducible genes; represses MHC gene expression;	Inhibits p53 function; suppresses TGF- β /Smad pathway; inhibits apoptosis by interacting with bim, bid, and Grim19; inhibits activation-induced cell death by preventing C95L expression; has transforming activity
vIRF2	Inhibits innate immune responses: dsRNA sensing by inhibiting PKR phosphorylation and type I/III IFN responses by interacting with IRF-3, IRF-9, STAT1.	inhibits activation-induced cell death by preventing C95L expression

Viral protein/RNA	Role in KSHV life cycle	Contribution to KSHV oncogenesis
vIRF3	Modulates innate immune response: inhibits type I interferon expression by interacting with IRF-3, IRF-5, IRF-7; inhibits NFκB activation by interacting with IKKβ; decreases MHC II expression; disrupts PML nuclear bodies.	Prevents IRF3-mediated G2/M cell cycle arrest; may modulate p53-dependent apoptosis; inhibits PKR-induced apoptosis; stimulates c-myc transcription; required for survival of PEL cells; activates HIF-1α transcription and induces VEGF secretion;
vIRF4	Cooperates with RTA to activate lytic gene expression; binds to CSL/CBF1 to antagonize notch signaling;	Targets mdm2 and USP7 to promote p53 degradation;
Kaposin A		May have transforming properties; modulates integrin-dependent cell adhesion; promotes overexpression of glutamate receptor 1 and proliferation of KSHV-infected endothelial cells.
Kaposin B	Interacts with MK2 to modulate p38 signaling to stabilize cytokine and Prox-1 mRNAs; promotes STAT3 phosphorylation;	Activates RhoA to increase stress fiber formation, motility and angiogenesis of endothelial cells
Orf K3	E3 ubiquitin ligase, downregulates MHC I;	
Orf K5	E3 ubiquitin ligase, downregulates MHC I, ICAM-1, B7.2, BST/tetherin;	
KSHV miRNAs	miR-K12-1 and miR-K12-3 modulate NFκB to repress lytic reactivation; miR-K12-1 targets p21; miR-K12-5 reduces RTA expression to maintain latency; miR-K12-7 reduces expression of NK cell ligand MICB; miR-K12-11 is orthologue of miR-155, attenuates TGF-β signaling and may modulate B-cell maturation.	Contribution of miR-K12-11 to B-cell expansion and transformation of rat mesenchymal precursor cells; miR-K12-6 and miR-K12-11 reduce expression of the lymphatic endothelial cell-specific transcription factor MAF, thereby contributing to KSHV-induced endothelial cell differentiation;

Tabla 1: Descripción de las principales proteínas codificadas por el genoma de KSHV y sus principales funciones. De Schulz et al¹⁷.

1.5 Proteínas virales y RNAs responsables por los efectos de KSHV en células endoteliales primarias

Desde el descubrimiento de KSHV hace más de 20 años, muchos grupos han participado en la identificación de proteínas virales responsables por los efectos patogénicos de KSHV. La Tabla 1 resume el rol de varias proteínas virales y miRNAs en la patogénesis de KS. Para establecer si estas proteínas virales o RNAs se expresan en lesiones KS y en qué medida, los primeros estudios utilizaron la hibridación in situ y/o Inmunohistoquímica. Estos enfoques mostraron que la mayor parte de las células endoteliales infectadas y las células ahusadas en lesiones KS expresan la proteína viral nuclear LANA^{50,51,53,54} (Figura 1) junto con transcritos virales de dos genes de latencia, el orf 72 que codifica a vCYC y el orf 71/K13 que codifica a vFLIP

(homologo de FLIP) y la región K12 que da lugar a al menos 12 miRNAs virales^{55,56}. Además, un pequeño grupo de las células infectadas mostró un patrón de expresión de proteínas virales mas amplio, incluyendo algunas que han sido implicadas en la patogénesis de KS como vGPCR, vIL-6 y K1. Más recientemente, estudios poblacionales utilizando muestras de KS y qRT-PCR con múltiples sets de primers para todos los genes de KSHV mostraron que los tumores de KS pueden agruparse en dos categorías: una con un patrón de expresión de proteínas virales restringido (principalmente los tradicionales genes de latencia, LANA, vCYC, vFLIP, miRNAs, K15 y vGPCR) y un segundo grupo en el cual el patrón de expresión de genes virales es mas amplio e incluye proteínas que se expresan durante el ciclo lítico⁵⁷. En la Figura 2 se esquematiza la expresión de la proteínas virales según el ciclo de vida de KSHV.

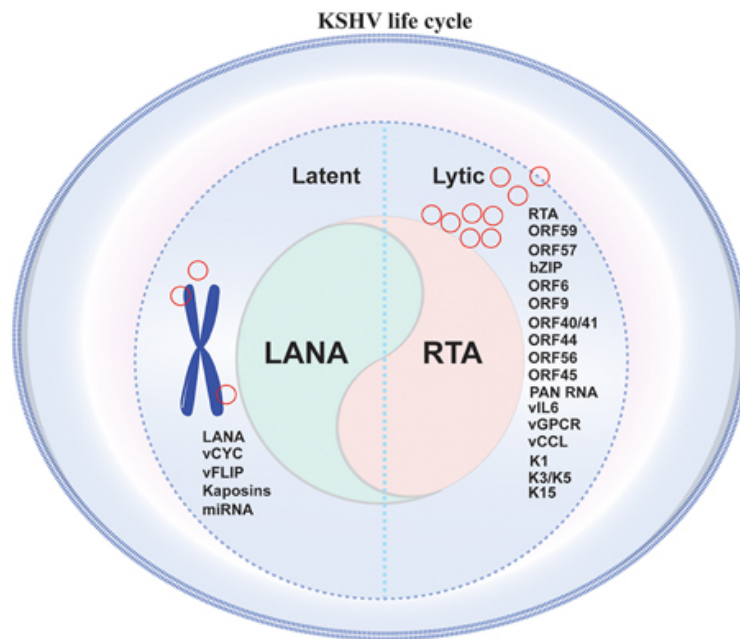


Figura 2: Esquema de la expresión de proteínas virales según la etapa del ciclo de vida de KSHV. En la etapa de latencia se encuentran LANA, vCYC y vFLIP entre otras y en la etapa lítica RTA, K1 y vGPCR entre otras. De *Purushothaman et al*⁵⁸.

La expresión de genes virales de KSHV también puede diferir entre células de endotelio vascular y células endoteliales linfáticas infectadas. Esta observación sugiere que KSHV puede no estar en estado de latencia en un

numero significativo de casos de KS lo cual puede ser beneficioso para la utilización de inhibidores del ciclo lítico²⁶.

El orf74 codifica para un receptor acoplado a proteína G (GPCR) denominado KSHV-GPCR o vGPCR que es homólogo al receptor de IL-8, CXCR2 en mamíferos. Este receptor viral tiene una mutación (Asp 142 Val) en una secuencia altamente conservada (Asp-Arg-Lys) en GPCRs homólogos en mamíferos que lo hace constitutivamente activo independientemente de la presencia de ligando. vGPCR puede, per se, inducir la transformación en fibroblastos, la angiogénesis en células endoteliales⁵⁹ e imitar lesiones KS^{21,57,58}. Diferentes estrategias experimentales utilizando modelos animales revelaron que vGPCR tiene un rol clave en el desarrollo de KS. A pesar del hecho de que sólo unas pocas células en lesiones KS expresan vGPCR, el silenciamiento de su expresión resulta en una disminución en la expresión de factores angiogénicos y regresión tumoral lo que confirma el rol clave de vGPCR en la oncogénesis inducida por KS⁶¹.

2. Estrés oxidativo y HO-1

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (del inglés ROS) y la capacidad de un sistema biológico de transformar esas especies en otras moléculas no tóxicas o bien de reparar el daño resultante. Las especies reactivas del oxígeno incluyen a los radicales libres como el superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el hidroxilo ($\bullet\text{HO}$), el peróxilo ($\bullet\text{RO}_2$) y el hidroperoxilo ($\bullet\text{HRO}_2^-$) y otras especies, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HClO). Los RNS incluyen radicales libres como el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y el radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) así como también el peroxinitrito (ONOO^-), el ácido nitroso (HNO_2) y alquil peroxinitratos (RONOO). La producción de estas especies pueden generar daño en todos los componentes celulares, incluyendo DNA, proteínas y lípidos.

Entre las moléculas reactivas, las más importantes y más estudiadas por sus efectos biológicos son el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y el peroxinitrito (ONOO^-)⁶². El anión superóxido es producido normalmente en el citoplasma por la reducción parcial del oxígeno. Este proceso es mediado por la actividad de distintas enzimas incluyendo a la NAD(P)H oxidasa, xantino oxidasa, ciclooxigenasa y eNOS (solo en bajas concentraciones de L-arginina). También se genera anión superóxido en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En condiciones normales, el anión superóxido es eliminado mediante la actividad de enzimas antioxidantes ya que es sustrato de la superóxido dismutasa que lo transforma en H_2O_2 (Cu ó Zn-SOD, en el citoplasma, y Mn-SOD, en las mitocondrias). Consecutivamente, el H_2O_2 es convertida en H_2O y O_2 en la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa citosólica (GSH-Px) o por la catalasa en peroxisomas⁶³. El H_2O_2 también puede generar el radical $\bullet\text{HO}$ en presencia de elementos de transición como el hierro o el cobre.

El sistema redox GSH/GSSG mantiene las proteínas celulares en estado reducido. En condiciones normales la forma cuantitativamente más importante del glutatión es la reducida (GSH), mientras que solo el 2% se encuentra en su forma oxidada (GSSG). Normalmente, las proteínas S-nitrosiladas son rápidamente reducidas por el GSH, que puede ser S-nitrosilado para formar glutatión-nitrosilado (GSNO). Los GSNO pueden, a su vez, transferir en NO hacia otros tioles proteicos⁶⁴.

2.1 El sistema hemo oxigenasa

Entre las enzimas involucradas en la respuesta adaptativa al estrés oxidativo se encuentra la Hemo Oxigenasa (HO). La enzima HO se ha descrito clásicamente como una enzima microsomal que cataliza la degradación del grupo Hemo (libre) en cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), biliverdina y Fe^{3+} (Figura 3).

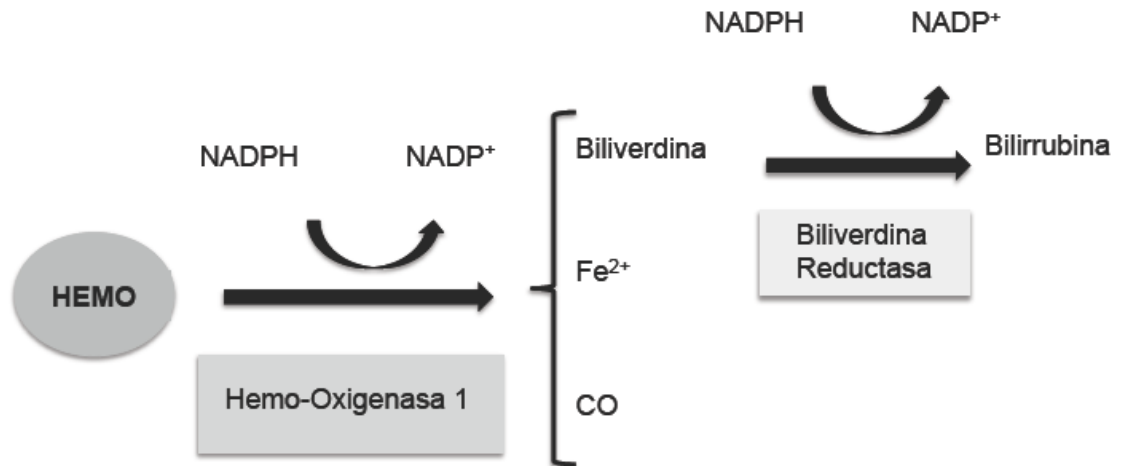


Figura 3: Catabolismo del grupo hemo por el sistema de Hemo Oxigenasa.

El sistema de HO fue descrito y caracterizado por primera vez por Tenhunen *et al* en 1968⁶⁵. Al presente, se han identificado tres isoformas de HO producto de distintos genes: una inducible (HO-1) y dos constitutivas (HO-2 y HO-3)^{66,67}. Se ha demostrado que ambas, HO-1 y HO-2, catalizan la degradación del hemo, y la función más probable de HO-3, dada su baja actividad enzimática, sería la de unirse al hemo como biosensor. Por técnicas de inmunolocalización se ha demostrado que la enzima HO-2 se expresa constitutivamente en diversos tejidos, incluyendo cerebro y sistema nervioso, hígado, riñón, vasculatura y testículos^{68,69}. HO-1, también conocida como HORASP32 (proteína de *shock* térmico de 32kDa), está presente en condiciones normales en hígado y bazo, donde participa de la degradación del hemo de la hemoglobina. No obstante, puede observarse un aumento de su expresión en una amplia variedad de tejidos frente a estímulos estresantes como metales pesados, *shock* térmico, disminución de los niveles de glutatión reducido, radiación UVA, endotoxinas y citoquinas, hipoxia,

hiperoxia, dadores de NO y peroxinitrito, y su propio sustrato, hemo⁷⁰. Ciertamente parece no haber sistema enzimático que responda a tanta variedad de agentes y condiciones como lo hace el de la HO-1.

Numerosas evidencias experimentales han llevado a proponer que la inducción de HO-1 es parte de un mecanismo de defensa celular y tisular frente a situaciones de estrés. Entre ellas, podemos citar los estudios realizados en ratones knock-out para la HO-1, los cuales son más sensibles al daño causado por LPS y además exhiben pobre tolerancia al estrés oxidativo (por peróxido de hidrógeno, hemina y endotoxina), anormalidades severas en el crecimiento, anemia, daño endotelial y deposición de hierro hepático y renal⁷¹. Un fenotipo similar se observa en la deficiencia de HO-1 humana, con marcado retardo del crecimiento, anemia y sensibilidad extrema a los oxidants⁷².

En general, la función protectora de la HO-1 se atribuye a un aumento del metabolismo del hemo, una molécula pro-oxidante, y a la producción de los antioxidantes biliverdina y bilirrubina, al mediador gaseoso vasoactivo CO y a la liberación de hierro, un regulador génico. Se han adjudicado a cada uno de estos productos efectos propios sobre la fisiología celular. El hemo es un complejo de Fe²⁺ con protoporfirina IX, que se transforma en hemina cuando el hierro se oxida. El grupo hemo es una molécula esencial para la vida de los organismos aerobios, al servir como grupo prostético de numerosas hemoproteínas con funciones biológicas diversas⁷³. Asociado a proteínas, el grupo hemo participa en reacciones de óxido reducción, oxigenación, hidroxilación, transporte y almacenamiento de oxígeno, monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO·). En contraposición, cuando el grupo hemo se encuentra libre en altas concentraciones es un pro-oxidante lipofílico que promueve la lipoperoxidación de las membranas lipídicas; también desestabiliza el citoesqueleto y las proteínas asociadas a la membrana, con lo que compromete tanto su estructura como el transporte celular^{74,75}. En este sentido, la degradación del hemo libre contribuye al mantenimiento del estado redox celular⁷⁶.

La biliverdina y la bilirrubina, producto de la actividad de la enzima biliverdina reductasa, son moléculas con capacidad de captar especies reactivas del oxígeno como anión superóxido, radical peróxido y peroxinitrito por lo que también forman parte del sistema antioxidante celular^{77,78}.

Por último, el monóxido de carbono es una molécula gaseosa cuya vida media es de aproximadamente 4 horas y que circula libremente por el microambiente donde es producido. Es conocido por ser tóxico para el desarrollo de la vida a concentraciones elevadas ya que, 1) tiene unas 250 veces más afinidad por el grupo hemo de la hemoglobina que el oxígeno formando una nueva especie, la carboxihemoglobina que disminuyen la concentración de oxihemoglobina, y con ello, la difusión de oxígeno a los tejidos; 2) inhibe la actividad de otras proteínas que contienen el grupo hemo, como los citocromos, entre ellos, la citocromo oxidasa, bloqueando la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, por lo que reduce la capacidad de la célula para producir energía; 3) al bloquear la cadena respiratoria, genera moléculas con alto poder oxidante como anión superóxido y peróxido de hidrógeno, que dañan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. A menores concentraciones se lo ha relacionado con diversas funciones biológicas de la HO-1, como citoprotección, vasodilatación, y efectos antiinflamatorios, anti-apoptóticos, o anti-proliferativos⁷⁹.

A pesar del rol citoprotector ampliamente estudiado de la HO-1, a esta enzima también se le asigna un rol pro-tumoral. Se vio en algunos tipos tumorales un aumento en los niveles de HO-1 que produce un aumento en la expresión de VEGF, factor de crecimiento clave para la formación de nuevos vasos sanguíneos. En cuanto al rol de HO-1 en el ciclo celular también se vieron efectos contradictorios en función del tipo celular. Por ejemplo, en queratinocitos la expresión elevada de HO-1 estimula la proliferación mientras que en células epiteliales tiene efecto anti-proliferativo. En los dos tejidos la inhibición de la expresión de HO-1 o su actividad enzimática revierte estos efectos.

Los efectos contradictorios de HO-1 en la proliferación celular apoyan el rol dual como molécula citoprotectora y pro-tumoral en distintos tipos celulares y sugieren que el destino de la célula está determinado por el balance entre muchas moléculas y que no se le puede asignar una función citoprotectora o pro-tumoral.

2.2 Mecanismos de inducción de HO-1

La regulación de la actividad enzimática de HO-1 depende principalmente del control de la expresión génica a nivel transcripcional⁸⁰⁻⁸².

Debido a las propiedades antioxidantes de los productos de degradación del grupo Hemo, HO-1 es considerada una enzima citoprotectora en la respuesta a estrés oxidativo⁸¹. Su expresión es activada por diversos estímulos estresores que incluyen hipoxia, metales pesados, radiación UV, ROS, NO, antioxidantes, factores de crecimiento y hormonas⁸³⁻⁸⁷. HO-1 previene un amplio rango de respuestas de estrés e inflamatorias como pueden ser el shock endotóxico e isquemia/lesión por reperfusión^{71,88,89}. Además, existe evidencia del rol citoprotector de HO-1 derivado de la investigación realizada en trasplante de órganos en la cual la expresión de HO-1 por la vasculatura es clave para el buen funcionamiento de los aloinjertos⁸⁹ y los productos de degradación del grupo hemo protegen a células endoteliales de estímulos apoptóticos. Ciertamente, HO-1 ha sido definida como un regulador importante del ciclo celular, proliferación, secreción de VEGF y angiogénesis de células endoteliales⁸². Como tal, factores angiogénicos como IL-1, IL-6, TGF β , prolactina, 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2⁸¹ y el péptido natriurético atrial son capaces de regular positivamente la expresión de HO-1⁸².

Si bien el hemo puede funcionar como ligando e interactuar directamente con el DNA para activar al gen de HO-1, este no es el mecanismo utilizado por la mayoría de los inductores. Las evidencias indican que, en general, los inductores incrementan la expresión de HO-1 activando una o más cascadas de señalización que eventualmente convergen en activadores de la transcripción. Los segundos mensajeros AMPc y GMPc, que activan a la PKA y a la PKG respectivamente, participan en algunas de esas cascadas de señalización, interviniendo en la transducción de las señales de diversas hormonas y estímulos extracelulares. Podemos citar como ejemplo los experimentos de Immenschuh *et al* que demostraron que la inducción de HO-1 por AMPc, en cultivos primarios de hepatocitos de rata, es mediada por el elemento de respuesta a AMPc/proteína activadora-1 en el promotor proximal y requiere la activación de la vía de señalización de PKA⁹⁰. Esta vía también participa de la inducción de HO-1 en células de músculo liso vascular y en células endoteliales estimuladas con fosfolípidos oxidados^{91,92}. Dado que el NO activa la producción de GMPc se sugirió que éste podría ser un activador del gen hmox-1, lo que fue demostrado en hepatocitos y en células endoteliales^{90,93}.

Las vías de las MAPKs participan de las respuestas celulares al estrés regulando la expresión génica, la proliferación celular y la apoptosis. Con relación a la inducción de HO-1, la bibliografía indica que la utilización de las diferentes cascadas de señalización de MAPKs y sus factores de transcripción blanco depende del inductor, del tipo celular y de la especie. Por ejemplo, se ha demostrado la participación de la vía de p38 MAPK en la activación por hipoxia de HO-1⁹⁴ y la de ERK y p38 MAPK en la activación por arsenito de sodio, metales pesados y NO^{81,95}.

También se ha demostrado la participación de la vía de NFκB, un factor pro inflamatorio y sensible al estado redox, en la inducción de HO-1 por compuestos polifenólicos como el resveratrol⁹⁶.

Finalmente, un estímulo puede provocar la activación de más de una vía de inducción de HO-1. En este sentido, Chen *et al* demostraron que la inducción de HO-1 por estatinas depende de la acción conjunta de las vías GMPc/PKG y MAPKs ERK y p38 en macrófagos murinos⁹⁷.

El estrés oxidativo es considerado uno de los principales inductores de HO-1 y entre los mecanismos de transducción de señales demostrados en diversos sistemas celulares pueden mencionarse los que involucran la activación de las vías de MAPKs, PI3K/Akt, PKC y los factores de transcripción NFκB, AP-1, Nrf2, p53, HIFF, entre otros^{63,98}. En la Figura 4 se muestra un esquema del promotor y de los factores de transcripción que participan de la regulación del gen Hmox1.

Más aún, se ha demostrado que la expresión y la actividad enzimática de HO-1 son inducidas por el oncovirus KSHV en células endoteliales. Además se encontraron niveles elevados de HO-1 en lesiones KS⁹⁹. Como mencionamos anteriormente, KS es el tumor más frecuente en pacientes con SIDA y se caracteriza por lesiones multifocales angioproliferativas que contienen células ahusadas que derivan de la infección de células endoteliales por KSHV.

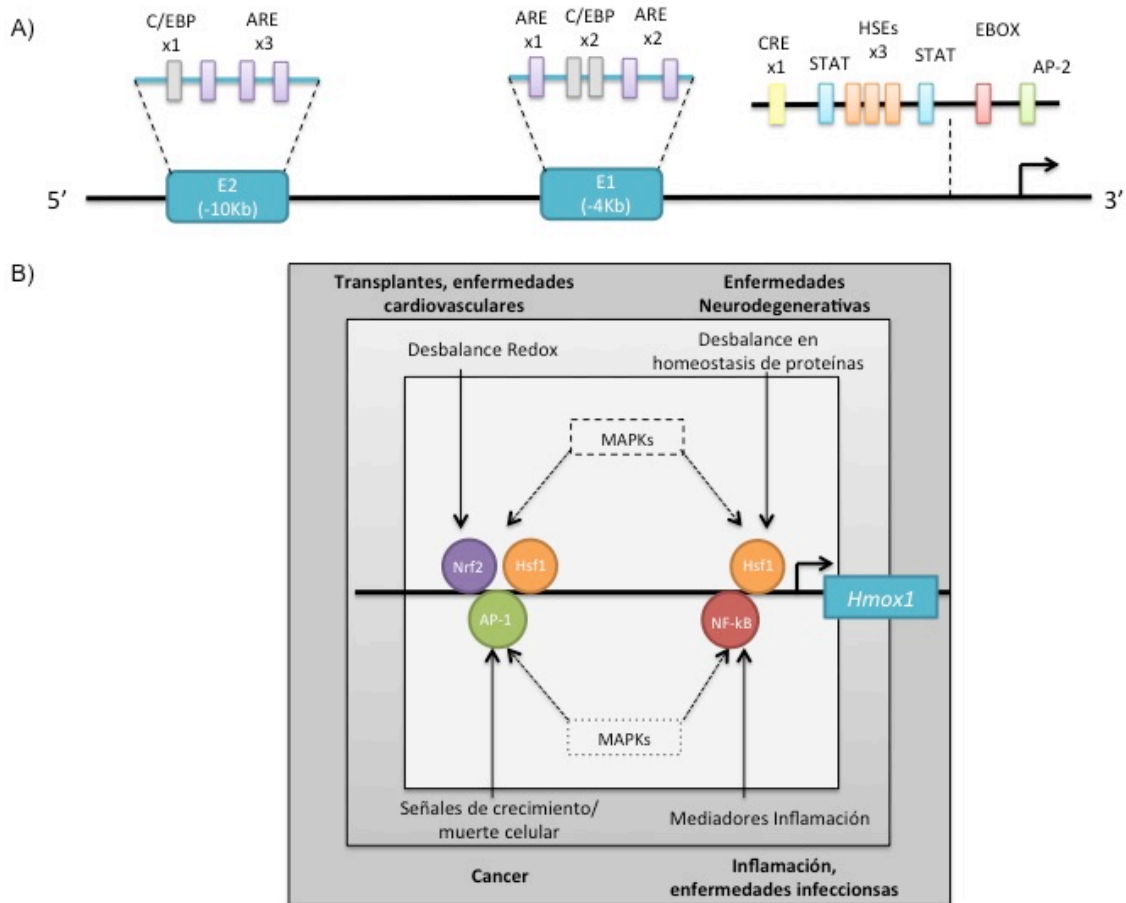


Figura 4: Regulación del gen Hmx1. A) Esquema del promotor del gen Hmx1. B). Los principales factores de transcripción de respuesta a estrés Nrf2, HSF1, AP-1 y NF-KB regulan este gen. MAPKs modulan la respuesta a través de fosforilación directa (fleche simple) o indirecta (flechas pequeñas) a través de la fosforilación de otras proteínas. Modificado de De Alam et al¹⁰⁰.

Teniendo en cuenta la función predominante de vGPCR en KS y la expresión elevada de HO-1 en lesiones KS y células endoteliales infectadas por KS es que en trabajos previos de nuestro laboratorio y colaboradores se ha estudiado si vGPCR puede regular la expresión de HO-1 y cuál es el rol de esta enzima en la transformación dependiente de vGPCR. Se ha demostrado que vGPCR induce a nivel de mRNA y proteína la expresión de HO-1 y que HO-1 está altamente expresada en tumores murinos derivados de células transfectadas con vGPCR. Además, el silenciamiento del gen y la inhibición enzimática de HO-1 impiden la expresión de VEGF, la proliferación y la transformación inducida por vGPCR tanto en cultivo celular como en un modelo de tumores murinos, lo que hace de HO-1 un potencial target terapéutico en KS¹⁰¹.

3. El Factor de Transcripción Nrf2

El análisis del promotor del gen *hmx-1* de ratón, permitió identificar un motivo de 10 pb (T/CGCTGAGTCA) denominado Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE). Este motivo está presente en múltiples copias en dos regiones *enhancer* (E1 y E2, localizadas a -4 y -10 kb del sitio de iniciación de la transcripción) y se ha postulado que media la activación del promotor en respuesta a muchos de los inductores de HO-1 analizados hasta el momento¹⁰⁰. Otras secuencias consenso para la unión de factores de transcripción que se solapan con los ARE (AP-1 y otros) son el sitio de unión de factores de transcripción diméricos constituidos por miembros de la familia de Jun, Fos, ATF, CREB y otros que pertenecen a la súper familia de factores de transcripción con dominios de cierre de leucina. Un papel particularmente importante en la regulación del gen *hmx-1* se atribuye actualmente a los factores con estructura cap'n'collar bZip. Estos factores incluyen a p45, a los factores eritroides nucleares Nrf1, Nrf2, Nrf3 y a Bach1/2 que se heterodimeriza principalmente con las pequeñas proteínas Maf (MafF, MafG y MafK). El factor Nrf2 participa en la inducción de genes antioxidantes y detoxificantes de fase II como *hmx-1* uniéndose a los sitios ARE en respuesta a múltiples agentes, incluyendo hemo, metales pesados, arsenito, curcumina, 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2 y varios reactivos electrofílicos¹⁰².

La expresión coordinada de estos genes remueve el daño y e intenta restaurar el estado basal de la al conferirle resistencia a al estrés, evitando de este modo daños en componentes celulares sensibles a los cambios redox (por ejemplo, proteínas, lípidos y DNA)¹⁰³. El factor de transcripción Nrf2 pertenece a la familia de factores de transcripción cap'n'collar bZip, es expresado de forma ubicua, es en gran parte responsable de la expresión basal e inducible de proteínas implicadas en el metabolismo de fármacos, la respuesta al estrés oxidativo y la citoprotección. Complementario a su rol esencial en la citoprotección, Nrf2 también está vinculado a la diferenciación, proliferación, crecimiento, apoptosis y se cree que además tuvo originalmente un rol en la hematopoyesis y la regulación de la diferenciación celular de los primeros linajes¹⁰⁴. Mientras que un estudio realizado por Chan et al., mostró que Nrf2 no es esencial para el crecimiento, desarrollo o eritropoyesis en células de mamíferos, estos autores sugieren que Nrf2 podría haber jugado

originalmente este papel en un sistema aviar, debido a las observaciones hechas por Itoh et al. de una alta expresión de Nrf2 en células hematopoyéticas de gallina^{105,106}. Además, siguen existiendo pruebas sobre la función de Nrf2s en la hematopoyesis en modelos de mamíferos, ya que regula la expresión de haemoxygenase-1 (HO-1), proteína implicada en la vía de degradación del grupo hemo y por lo tanto de la producción de hierro libre¹⁰⁷. Hallazgos recientes muestran que Nrf2 está funcionalmente implicada en el depósito de lípidos en el hígado. Utilizando el análisis proteómico (iTRAQ) para comparar ratones wild type (WT) y Nrf2 knockout (-/- Nrf2), se demostró que basalmente Nrf2 regula una serie de proteínas implicadas en la síntesis y metabolismo de los ácidos grasos y otros lípidos¹⁰⁸. Los inductores de Nrf2 más conocidos, los triterpenoides CDDO-Me y CDDO-Im (sintetizado a partir de ácido oleanólico), son moléculas solubles en lípidos que se ha demostrado que reducen la acumulación de lípidos en el hígado de ratones con una dieta alta en grasas, través de la vía Keap1/Nrf2¹⁰⁹. La importancia del control basal del metabolismo de los lípidos por Nrf2 todavía sigue sin entenderse. Sin embargo, es posible que este proceso esté bajo el control de Nrf2 cuando la célula está en un estado basal de suficiente energía, pero en situaciones de estrés y cuando se induce Nrf2, la síntesis de lípidos y otras rutas biosintéticas son desregulados para compensar los requerimientos de energía de los mecanismos de defensa celular.

Un factor vital en el funcionamiento de muchos factores de transcripción es su regulación espacio-temporal y esto no es diferente en el caso de Nrf2; es igual de importante que Nrf2 se active en respuesta a un estímulo, como que se inactive cuando el estímulo se ha eliminado. Por esta razón la vía está altamente regulada mediante distintos mecanismos responsables de la prevención de la activación aberrante de Nrf2.

Uno de los mecanismos más importantes que regulan la respuesta de células a estímulos inflamatorios, oxidativos, xenobiótico e hipoxia, es la degradación proteosomal; y la vía Nrf2 no es una excepción a esto¹¹⁰. En condiciones no estresantes, los niveles de Nrf2 se mantiene muy bajos debido a su inhibidor Keap1, que secuestra Nrf2 en el citosol y facilita su degradación a través del proteosoma. En condiciones de estrés o en presencia de compuestos activadores de Nrf2, esta degradación se ve obstaculizada y Nrf2 trasloca al núcleo. Allí, Nrf2 heterodimeriza con una pequeña proteína llamada Maf que facilita la unión de Nrf2 al elemento de

respuesta antioxidante (ARE), una secuencia enhancer de acción en cis (TCAG / CXXXGC) en la región promotora de los genes regulados por la Nrf2^{111,112} (Figura 5). Estos genes regulados por Nrf2 pueden clasificarse en enzimas antioxidantes metabolizadoras de xenobióticos de fase II, chaperones moleculares, enzimas de reparación del DNA, y proteínas de respuesta anti-inflamatorias¹¹³ y que reducen los compuestos reactivos como agentes electrofílicos y radicales libres a intermediarios menos tóxicos, lo que aumenta la capacidad de la célula para reparar cualquier daño que se produjo. Es importante mencionar que se ha demostrado que Nrf2 posee una secuencia ARE dentro de su propia región promotora proporcionando una plataforma para Nrf2 para iniciar su propia transcripción mejorando aún más la respuesta de defensa de adaptación celular¹¹¹. Siguiendo su importación nuclear, Nrf2 recluta maquinaria transcripcional para transactivar efectivamente los genes que contienen sitios ARE. Esta maquinaria incluye co-activadores tales como el receptor co-activador asociado (RAC3) que inicia el dominio de transactivación de Nrf2 mientras que la presencia de otros co-reguladores tales como la proteína de unión a CREB, co-activador-asociado a arginina metiltransferasa (CARM1) y proteína arginina metiltransferasa (PRMT1), mejoran aún más la capacidad de RAC3 para iniciar el dominio de transactivación.

El descubrimiento de la secuencia ARE llevó a la identificación de Nrf2 como el factor de transcripción capaz de la unión a esta secuencia de DNA como de la inducción de la expresión de genes de defensa celular, lo que dio lugar a una explosión de la investigación de esta vía como un potencial agente terapéutico. La gran variedad de compuestos naturales y sintéticos capaces de inducir Nrf2 puede dividirse en al menos 10 grupos descritos en la Tabla 2. La activación farmacológica de Nrf2 por diversos compuestos tales como sulfuros de alilo, ditioletones, flavonoides, isotiocianatos, polifenoles y triterpenoides, se ha propuesto para su uso en la prevención de un número de enfermedades asociadas con estrés oxidativo¹⁰⁴. Una serie de inductores de Nrf2, sobre todo compuestos derivados de plantas con propiedades quimiopreventivos, tales como sulforafano (brócoli)¹¹⁴, la curcumina (cúrcuma)^{115,116} y resveratrol (uvas)^{117,118}, están actualmente en ensayos clínicos de una variedad de cánceres. Curiosamente existe cierta controversia sobre el papel exacto de Nrf2 en el cáncer, ya que parece desempeñar un doble papel, actuando tanto

como supresor tumoral como un factor oncogénico. Observaciones recientes incluyen mutaciones en el Nrf2 o Keap1, lo que resulta en la expresión aberrante o regulación ineficaz de Nrf2. Se han detectado niveles elevados de Nrf2 mediante arrays de distintos tejidos, que incluye pulmón^{119,120} y páncreas^{121,122}, y que se propone que esto le provee a las células una mayor quimio-resistencia así como también un aumento de la proliferación que promueve el crecimiento y desarrollo del cáncer¹²¹.

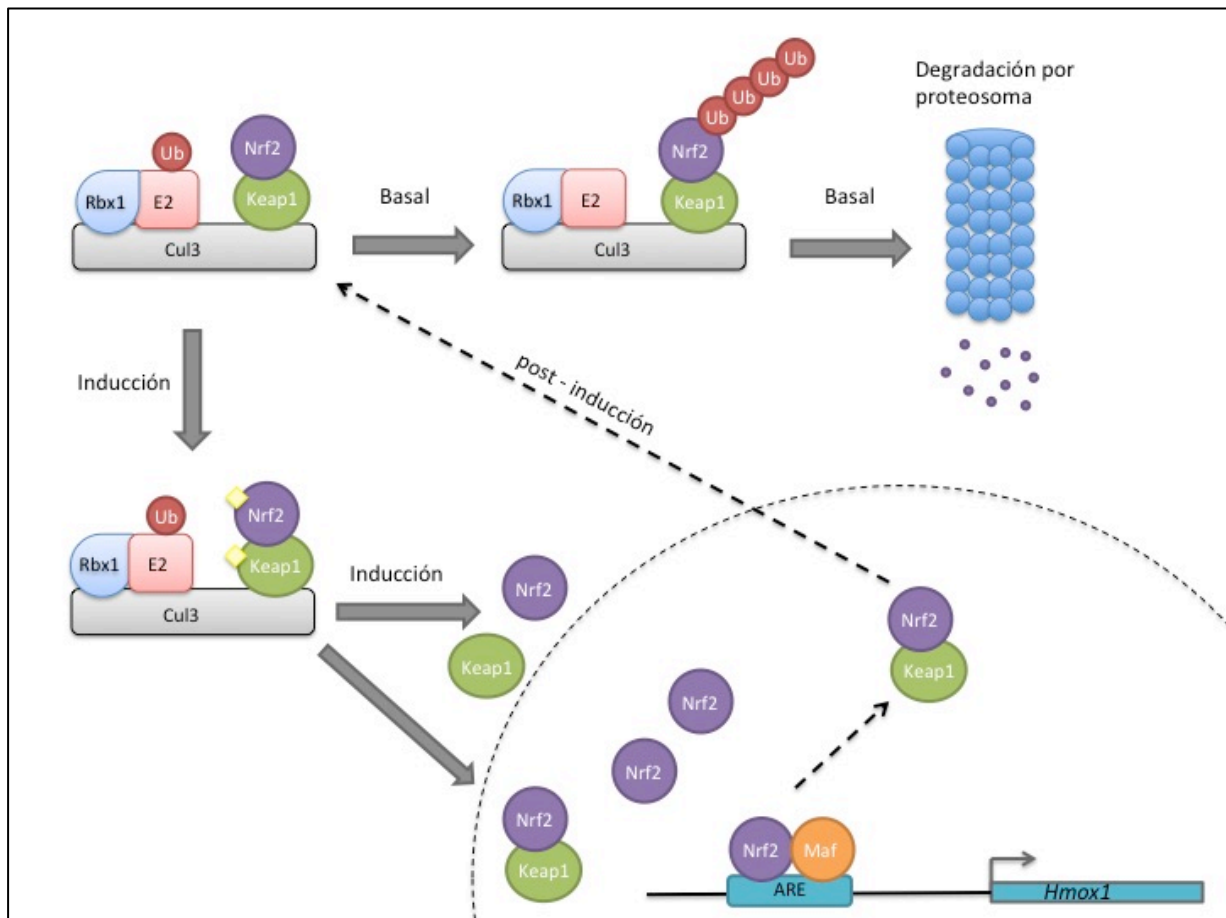


Figura 5 : Esquema general de inducción de genes por la vía de señalización Keap1-Nrf2-ARE. Pequeñas moléculas de origen endógeno o exógeno producen la activación de genes regulados por Nrf2. Estos agentes interrumpen la asociación entre Keap1 y Nrf2, llevando a la fosforilación de Nrf2 y a su estabilización y traslocación al núcleo. Este mecanismo lleva a la inducción de genes antioxidantes que participan en el catabolismo de xenobióticos y confieren a la célula una respuesta adaptativa de resistencia frente al estrés ambiental mediado por radicales libres y agentes electrofílicos. Modificada de *Zhang et al*¹²³.

Ratones deficientes en Nrf2 son más susceptibles a la toxicidad por un número de compuestos tales como paracetamol y el humo del tabaco y a muchas enfermedades (neurodegenerativa, cáncer, inflamación), pero, curiosamente, ratones Nrf2 $-/-$ no son capaces de sobrevivir y procrear, lo que sugiere que aunque algunos procesos constitutivamente activos están bajo control de Nrf2 (por ejemplo, homeostasis de los lípidos), Nrf2 no es necesariamente vital para la supervivencia en células no estresadas y sólo es requerido por la presencia de estrés¹²⁴. Lo que es evidente, sin embargo, es que Nrf2 juega un papel importante en la salud y enfermedad y no es de extrañar que Nrf2 sea considerado como un potencial target terapéutico. El desarrollo de un número de inductores de Nrf2 como posibles agentes farmacológicos sin un completo conocimiento del funcionamiento de esta vía y su regulación realza la necesidad de ahondar en el conocimiento y de determinar si la activación de Nrf2 sería beneficioso tanto a corto como a largo plazo.

La principal proteína responsable de la regulación de Nrf2 es Kelch-like ECH-associated protein (Keap1), que forma un homodímero responsable de secuestrar Nrf2 en el citosol, haciendo que se mantenga inactiva. Por un lado la asociación entre Keap1 y el citoesqueleto de actina previene que este complejo ingrese al núcleo, limitando la actividad basal del factor de transcripción¹²⁵. Adicionalmente, Keap1 facilita la poli-ubiquitinación mediada por Cul3 de Nrf2 que conduce a su degradación proteosomal.

Mientras que Keap1 parece ser el principal mecanismo por el cual los niveles de Nrf2 son controlados en la célula, investigaciones de distintos grupos sugiere que la vía es muy compleja y apoya la idea de que es un sistema de defensa multifactorial.

A continuación nos centraremos en los mecanismos por los cuales Keap1 regula la vía Nrf2 bajo condiciones basales y de estrés y también cómo es que Keap1 se hizo conocido como sensor redox, sensando condiciones ambientales y facilitando la regulación positiva de la vía de defensa celular por Nrf2. Exploraremos una serie de mecanismos por los que Nrf2 se puede regular de forma independiente de Keap1 a nivel transcripcional, traduccional y por modificaciones post-traduccionales.

3.1 Regulación dependiente de Keap1

Respecto a los dominios presentes en estas proteínas podemos destacar que Nrf2 posee seis dominios altamente conservados denominados Nrf2-ECH homology (Neh) domains. El Neh1 es un dominio de estructura CNC-bZIP que le permite a Nrf2 heterodimerizar con las proteínas Maf. El dominio Neh2 es el responsable de la unión de Nrf2 a Keap1 vía los motivos DLG-ETGE¹²⁶. El dominio Neh3 es importante en la estabilidad de Nrf2 y puede actuar como dominio de transactivación interactuando con proteínas

Clase	Ejemplos
Difenoles oxidables, fenilenediaminas, quinonas	BHA (2(3)-ter-butil-4hidroxianisola) tBHQ: ter-butilhidroquinona
Aceptores de la Reacción de Michael	Curcumina CDDO-Me
Isotiocianatos sulfoxitiocarbamatos	Sulforane Benzilisotiocianato
Tiocarbamatos	PDTC: ditiocarbamato pirrolidina
Ditioleiones	4-metil-5-pirazina-3H-1,2-ditiol-3-triona Ácido Lipoico
Polienos	Clorofila Porfirinas Clorofilinas
Hidroperóxidos	Peróxido de Hidrógeno
Arsénicos trivalentes	Trióxido de Arsénico
Metales Pesados	Metil-mercurio Cadmio Zinc
Dimercaptanos	Mercaptano (Metanotiol)

Tabla 2: Principales clases de inductores de Nrf2. Modificado de Bryan et al¹²⁷.

de la maquinaria de transcripción¹²⁸. Los dominios Neh4 y Neh5 son los dominios de transactivación pero, a diferencia de Neh3, se unen a la proteína CREB (cAMP Response Element Binding Protein)¹²⁶.

La proteína Keap1 posee tres dominios. El dominio BTB (Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac) es responsable por la dimerización de dos

moléculas de Keap1 (dominio de homodimerización), el dominio IVR (dominio bisagra) y el dominio “Kelch Repeats” es la región que se une a Nrf2 (unión a Nrf2) (Figura 6).

3.1.1 Identificación de Keap1 como inhibidor de Nrf2

La identificación de un inhibidor de Nrf2 fue propuesta por Itoh et al observar que la delección del la región Neh2 de Nrf2 resultaba en un aumento en la actividad de Nrf2 en eritoblastos. Esto lo llevó a proponer a esta región como la responsable de la regulación negativa de Nrf2 a través de la interacción con una proteína represora¹²⁹. Luego utilizaron un sistema de doble híbrido, con el dominio Neh2 de Nrf2 como “carnada”, para identificar a una proteína murina homóloga a la proteína Kelch de Drosófila a la que denominaron Keap 1 (de KEAP1 kelch like ECH associated protein 1). Posteriormente los dominios de Keap1 fueron caracterizados y propusieron que dos moléculas de Keap1 son capaces de unirse a una molécula de Nrf2¹¹⁰ y que el dominio BTB es el responsable de la homodimerización de Keap1 y su consecuente inhibición de Nrf2¹³⁰ (Figura 6). Cuando Nrf2 se transfectaba en células en cultivo su localización era nuclear, mientras que la co-transfección con Keap1 mostraba a Keap1 y a Nrf2 en el citoplasma, mientras que el agregado de agentes electrofílicos acumulaba a Keap1 en el citoplasma y a Nrf2 en el núcleo¹³¹. Esto llevó a la idea de que Keap1 secuestra a Nrf2 en el citoplasma hasta que un estímulo estresor produce la liberación de Nrf2 y su traslocación al núcleo.

3.1.2 Ubiquitinación y degradación vía proteosoma de Nrf2

Bajo condiciones basales, bajos niveles de Nrf2 son mantenidos para prevenir la activación constitutiva de la respuesta a estrés oxidativo. Es la interacción con Keap-1 la que facilita la degradación vía proteosoma que resulta en una vida media de Nrf2 de aproximadamente 10 – 20 minutos^{132,133}. En ausencia de estímulos estresores o un desbalance redox, Nrf2 es secuestrado en el citosol por un homodímero de Keap-1, el cual además actúa como “adaptador” para la ubiquitinación de Nrf2 dependiente de cullin-3 (Cul3)¹³⁴. Nrf2 se une, a través de su dominio Neh2, al sitio DRG de cada subunidad de Keap1¹¹⁰ (Figura 6). La hipótesis de “la bisagra y el

pestillo” propone que uno de los sitios de unión (el de alta afinidad) permite que Nrf2 se una a Keap1 mientras sigue teniendo algún grado de libertad para moverse, mientras que el sitio de menor afinidad actúa como “pestillo” que impide el movimiento de Nrf2 y posiciona los residuos de lisina de la región Neh2 que serán ubiquitinados¹¹⁰. Cuando se une a los dos sitios, Nrf2 puede ser poli-ubiquitinado vía Cul3 E3 ligasa y consecuentemente degradado por el proteosoma 26S, asegurando un nivel de expresión de Nrf2 bajo (Figura 5).

Frente a diversos estímulos estresores se propuso que diversas cisteínas de Keap1 pueden ser modificadas. Estas modificaciones pueden resultar en cambios conformacionales que llevan a la liberación de Nrf2 del sitio de baja afinidad afectando la ubiquitinación de Nrf2. De esta manera Keap1 queda “saturada” con moléculas de Nrf2 que no podrán ser ubiquitinadas y moléculas sintetizadas *de novo* de Nrf2 se acumulan en el citoplasma. Consecuentemente, Nrf2 trasloca al núcleo en donde se une a los sitios ARE y activa la transcripción de los genes target (Figura 6). Si se co-transfecta Keap1 con una mutante de Nrf2 que no es capaz de unirse a Keap1, la vida media de Nrf2 aumenta al doble en células COS-7¹³⁵ aunque

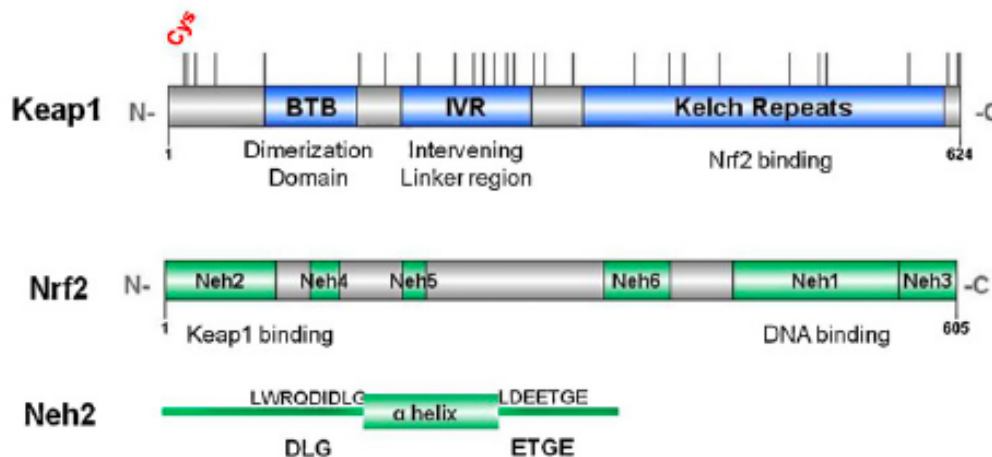


Figura 6: Esquema de los dominios de Keap1 y Nrf2. La proteína Keap1 posee tres dominios, BTB (dominio de homodimerización), IVR (dominio bisagra) y el dominio “Kelch Repeats” (unión a Nrf2). La proteína Nrf2 posee Los dominios Neh1 – Neh6, Neh1 (unión a sitios ARE), Neh2 (unión a Keap1) y Neh3/4/5 (dominios de transactivación). Modificado de Bryan et al ¹²⁷.

este tiempo puede variar en distintas líneas celulares¹³⁶⁻¹³⁸. Existen grandes controversias respecto a cuál es el mecanismo por el cual Nrf2 se libera del complejo Keap1-Cul3, algunos grupos proponen que los estímulos estresores producen la disociación del complejo Keap1-Nrf2^{139,140}, mientras que otros grupos proponen que producen la disociación del complejo Keap1-Cul3, impidiendo la degradación de Nrf2¹⁴¹⁻¹⁴³. Existe otra hipótesis que plantea que mientras que la ubiquitinación de Nrf2 disminuye, la de Keap1 aumenta, sin embargo esto sólo se vio para muy pocos estímulos¹⁴⁴.

3.1.3 Regulación Post-transcripcional: microRNAs

Los microRNAs (miRs) son RNAs no codificantes, simple cadena y de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. Son transcritos por la RNA Polimerasa II y procesados antes de ser exportados del núcleo en forma de “short hairpin loops” para su maduración¹⁴⁵. Luego de la maduración, estos microRNAs forman un complejo llamado RNA-induced silencing complex (RISC) que se une al mRNA target en la región 3'UTR e impide la síntesis de la proteína ya sea por degradación del mRNA o por inhibición de la traducción¹⁴⁵. Los microRNAs han sido centro de numerosas investigaciones debido a su habilidad de “regulación fina” de distintas proteínas, entre ellas Nrf2. Los microRNAs involucrados en la regulación de Nrf2 son miR144¹⁴⁶, miR-28¹⁴⁷ y miR-34¹⁴⁸ (Figura 7). Por ejemplo, se ha demostrado que miR-28 regula se une al mRNA de Nrf2 promoviendo su degradación así como también promueve la degradación de Nrf2 proteína¹⁴⁵. Sin embargo miR-28 no tiene ningún efecto sobre la expresión de Keap1 ni sobre la interacción Keap-1/Nrf2, demostrando un mecanismo por el cual la expresión de Nrf2 es regulada independientemente de Keap1¹⁴⁵.

3.1.4 Modificaciones Post-traduccionales: Fosforilación y Acetilación

Hay numerosos trabajos que sugieren que la fosforilación de Nrf2 puede contribuir a su regulación. Nrf2 contiene serinas, treoninas y tirosinas que pueden proveer sitios de fosforilación para diversas kinasas¹⁴⁹. Distintas vías han sido investigadas por distintos grupos de investigación, entre ellas

las vías de MAP Kinasas (ERK, p38, JNK), PI3K/AKT, PKC, GSK3b (Figura 7). Cabe destacar que estas vías se activan frente a determinados estímulos y en determinadas líneas o modelos celulares.

Se ha demostrado que PKC puede fosforilar a Nrf2 en la serina 40 (Neh2) interrumpiendo la asociación entre Nrf2/Keap1 y por lo tanto promoviendo la traslocación de Nrf2 al núcleo¹⁵⁰. Esto fue a su vez comprobado mutando la serina 40 y observando una disminución en la traslocación al núcleo de Nrf2 S40A comparada con Nrf2 WT.

La identificación de secuencias de localización nuclear (NLSs) y secuencias de exportación nuclear (NESs) en Nrf2 sugieren que en orden de facilitar su traslocación al núcleo, los motivos NLS en Nrf2 son identificados por proteínas como importinas que forman un complejo con Nrf2 facilitando su importación a través de la membrana nuclear¹⁵¹.

Diversas serinas/treoninas pueden ser fosforiladas por un distintas MAPK. Keum et al han demostrado que p38 puede fosforilar Nrf2, promover su asociación con Keap1 y por lo tanto impedir su traslocación nuclear¹⁵². Otros trabajos han destacado la participación de JNK y ERK1/2 en la activación de Nrf2. El Butilhidroxianisol (BHA) aumenta los niveles de fosforilación de ERK1/2 y de JNK 1/2 para activar Nrf2, disociarlo de Keap1 y permitirle su traslocación a núcleo¹⁵³. La mayoría de los activadores de Nrf2 también activan otras vías de señalización. Por ejemplo tBHQ activa la vía PI3K/AKT mientras que BHA activa MAP kinasas^{137,153}. El mecanismo molecular por el cual estas moléculas activan estas vías requiere de más investigación dado que la activación de vías específicas depende de un número de factores como el tipo celular y la naturaleza química del agente inductor entre otros.

A pesar de la vasta evidencia que demuestra el efecto de varios activadores de Nrf2 sobre las diversas vías de señalización, poco se sabe de cómo interactúan estas vías y cómo se coordinan para contribuir a la regulación de la vía de Nrf2.

Sabiendo que la ubiquitinación y la fosforilación son importantes en la regulación de Nrf2 es de esperar que la acetilación también juegue un rol en la regulación de esta vía. El co-activador transcripcional p300/CBP acetila histonas para facilitar a decondensación de la cromatina y reclutar la maquinaria de la RNA Polimerasa. p300/CBP se une a Nrf2 en respuesta a estrés oxidativo inducido por arsenito y acetila varias lisinas dentro de la

región Neh1 (dominio de unión al DNA) de Nrf2. Mutaciones en estas lisinas no afectan la estabilidad de Nrf2 pero sí su unión al DNA¹⁵⁴. Es probable que este mecanismo ocurra una vez que Nrf2 ya no está unido a Keap1 y aumente la habilidad de Nrf2 de unirse a los sitios ARE .

El número de factores que se ha demostrado que están involucrados en la modificación post-traducciona l de Nrf2 destaca lo complicado y altamente regulado de esta vía. El conocimiento de la interacción entre cada una de las vías implicadas ayudará más a nuestra comprensión de los mecanismos de defensa celular y a la vez puede destacar objetivos terapéuticos potenciales.

3.2 Regulación independiente de Keap1

A pesar de lo mencionado en secciones anteriores sobre la regulación de Nrf2 vía Keap1, hay nuevas evidencias que también indicarían que Nrf2 puede ser regulado independientemente de Keap1. Un estudio de Li et al muestra que el inductor de Nrf2 sulforafan previene la disociación de Nrf2 de Keap1 apoyando a la idea de que hay mecanismos de activación de Nrf2 alternativos que no se basan en Keap1¹⁰⁴.

Los niveles de expresión y la función de una proteína pueden ser regulados a varios niveles que incluyen: nivel transcripcional, post-transcripcional, abundancia de proteína, modificaciones post-traduccionales y localización subcelular. La fosforilación de Nrf2 a través de varias vías de transducción de señales, la participación de factores exigenticos como miRNAs o la interacción de Nrf2 con otras proteínas también puede tener un rol importante en la activación de Nrf2.

3.2.1 Regulación de la transcripción y autorregulación de Nrf2

Las secuencias regulatorias ARE (de Antioxidant Response Element) y XRE (de Xenobiotic Response Element) se encuentran en las regiones promotoras de muchos genes relacionados con el mantenimiento del estado redox de la célula se encuentran regulados por Nrf2. Nrf2 se une a los sitio ARE para inducir la transcripción de sus genes target mientras que a los sitios XRE se une el factor de transcripción AHR (de Aryl Hydrocarbon

Receptor). Los ligandos que activan AHR provocan su heterodimerización con ARNT (AHR Nuclear Translocator) y este complejo se une a la secuencia XRE para inducir la expresión de muchos genes que codifican para enzimas detoxificantes de fase I como el citocromo p450s¹⁵⁵ que promueve la generación de formas reactivas intermedias de un compuesto parental que potencialmente podría activar la respuesta antioxidante vía Nrf2. Un estudio de Miao et al. demostró que TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), un inductor de AHR, también induce ROS y Nrf2 por lo que puede activar ambas vías, ARE y XRE directamente¹⁵⁶. Los elementos ARE y XRE se encuentran cerca dentro de la región promotora de los genes regulados por Nrf2 así como también en el promotor de Nrf2 (Figura 7). La región promotora de Nrf2 contiene un elemento similar al XRE (XRE like element) en la posición -712pb de la región promotora y dos sitios en las posiciones +755bp y +850bp¹⁵⁶. La presencia de estos elementos de respuesta dentro del propio promotor de Nrf2 sugiere que Nrf2 tendría la habilidad de regular su propia transcripción. Kwak et al. demostraron que el activador de sitios ARE D3T (3H-1,2-ditiole-3-tiona) aumenta los niveles de mRNA y proteína de Nrf2 y que este efecto no se observa al tratar las células con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Más aun, han demostrado la unión directa de Nrf2 a su propio promotor y que la sobreexpresión de Nrf2 aumenta la actividad de una construcción reportera que contiene la región proximal del promotor de Nrf2 y que este efecto no se obtiene cuando se sobreexpresa Nrf2 mutado¹³⁸. Esta evidencia que sugiere que Nrf2 activa su propia expresión deja entrever un loop de retroalimentación positiva dentro de esta vía.

NF- κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B Cells) es un factor de transcripción involucrado en procesos celulares como apoptosis, inflamación y desarrollo. NF- κ B se asocia con su inhibidor I κ B en el citoplasma y es activado luego de la fosforilación de I κ B por la I κ B kinasa (IKK) llevando a la disociación del complejo y a la traslocación nuclear de NF- κ B. Muchos agentes quimiopreventivos son conocidos por activar Nrf2 mientras que a la vez reprimen la actividad de NF- κ B. Más aún NF- κ B puede suprimir la transcripción de genes ARE dependientes. El cross-talk entre Nrf2 y NF- κ B y la identificación de sitios de unión a NF- κ B en la región promotora de Nrf2 sugiere que Nrf2 podría estar siendo regulado por NF- κ B¹⁵⁷ (Figura 7). Más aún, se ha demostrado que Keap1 se une a IKK β , una proteína del

complejo IKK promoviendo su ubiquitinación y degradación por lo que Keap1 tiene un rol en la regulación negativa de la vía de NF- κ B^{158,159}.

Otras proteínas reguladoras de Nrf2: Maf y Bach1

Como mencionamos en apartados anteriores, en condiciones basales los sitios ARE están ocupados por heterodímeros formados por las proteínas Maf-Bach1. Frente a determinados estímulos, Bach1 (proteína represora) deja de estar unida en el sitio ARE y Nrf2 es capaz de formar el heterodímero con Maf y unirse al sitio ARE. Es por este motivo que estas proteínas son posibles reguladores de Nrf2. A continuación una pequeña descripción de cada una de ellas.

Las pequeñas proteínas Mafs son factores de transcripción con dominios de cierre de leucina (bZip). En vertebrados se encuentran MafF, MafG y MafK las cuales no presenta diferencias funcionales. Pueden formar homodímeros o heterodímeros con factores de transcripción del grupo cap 'n' collar (p45 NF-E2, Nrf1, Nrf2, and Nrf3) y con Bach1/2. Debido a que estos factores de transcripción no se pueden unir al DNA como monómeros las proteínas Maf son fundamentales para que puedan llevar a cabo su función. Dado que no tienen dominio de transactivación se considera que cuando están en forma de homodímero actúan como represores transcripcionales. Sin embargo, pueden participar en la activación transcripcional de distintos genes dependiendo de la proteína con la que heterodimeriza¹¹². Bach1 es un regulador negativo del gen Hmox (gen de HO-1)^{160,161}. La unión del grupo hemo a Bach1 lleva a la de-represión de éste, dado que produce que inhibe la unión Bach1 al sitio ARE.

La primer evidencia genética que apoya la significancia biológica del heterodímero Nrf2 - Mafs fue provista por análisis de ratones deficientes de Keap1 o Maf¹⁶². Los ratones deficientes en Keap1 mostraron letalidad post-natal debido a una hiperactivación de Nrf2, la cual resulta en hiperproliferación de queratinocitos¹⁶³. Respecto a Maf, fibroblastos embrionarios derivados de embriones deficientes de Maf (MafF, MafG y MaK) mostraron un impedimento en la inducción de genes regulados por Nrf2¹⁶⁴. Las células tumorales requieren del heterodímero Nrf2 – Maf para aumentar las especies reductoras que son necesarias para la supervivencia celular¹⁶⁵.

Recientemente se reportó que el heterodímero Bach1 – MafG recluta un factor remodelador de cromatina y una DNA metiltransferasa que facilita la hipermetilación y represión del gen MLH1 (reparadora de DNA). Respecto a Bach1, se ha reportado que es regulado por microRNAs. Mi-R-155 y miR-K12-11 reprimen la expresión de Bach1, haciendo de este evento un mecanismo de regulación indirecta de Nrf2 y favoreciendo la expresión de los genes activados por este factor de transcripción^{166,167}.

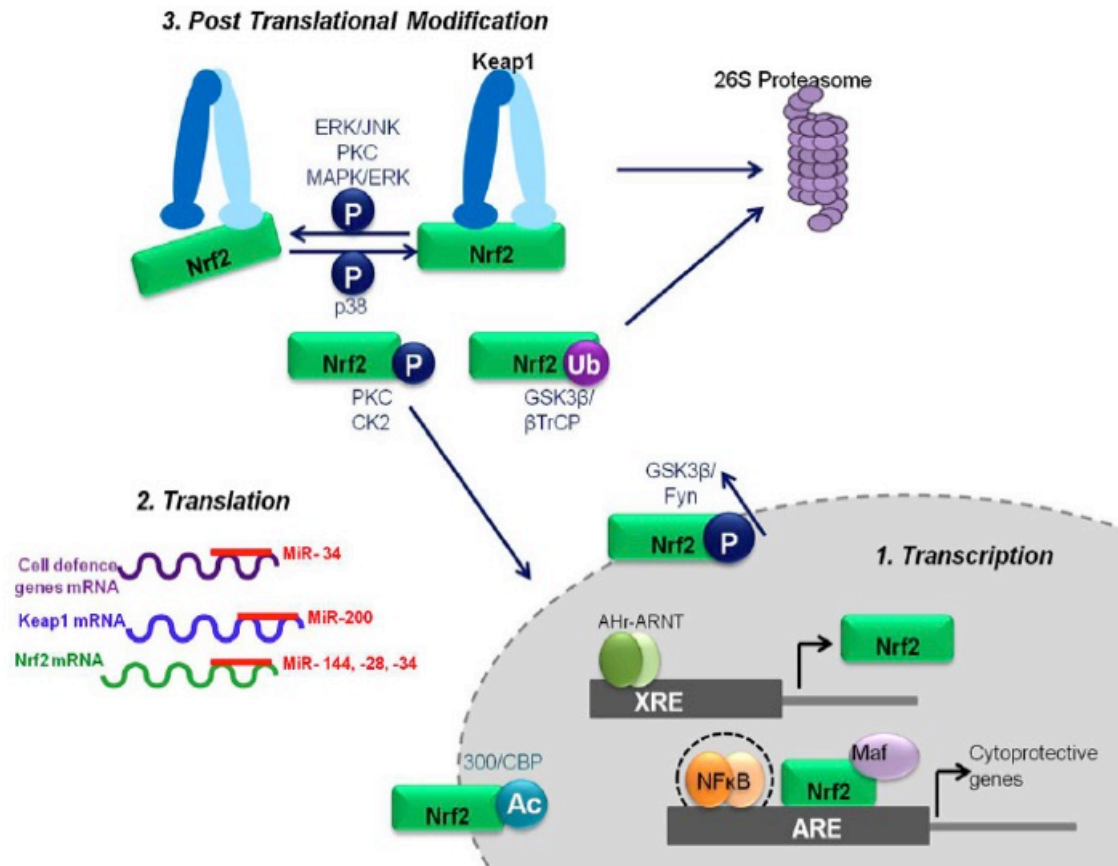


Figura 7: Esquema general de la regulación de Nrf2 Independiente de Keap1. Ha sido demostrado que Nrf2 puede ser regulado 1) a nivel transcripcional por Ahr-ARNT, 2) a nivel post-transcripcional por microRNAs y 3) a nivel post-traduccional por fosforilación, ubiquitinación y acetilación. Cada modificación post-traduccional afecta de manera diferente a Nrf2 ya sea a través de la interacción Nrf2/Keap1 (ERK, JNK, p38), de la localización subcelular de Nrf2, de la degradación de Nrf2 o de la capacidad de Nrf2 de unirse al DNA. Modificado de Bryan et al¹²⁷.

4. Transducción de señales - MAPKs

El estudio de los mecanismos que llevan a que las células animales respondan a señales externas ha recibido especial atención en las últimas décadas. Estas respuestas incluyen cambios en la actividad de enzimas metabólicas, un reordenamiento del citoesqueleto y cambios en la actividad de una variedad de genes. Todas esas respuestas son mediadas por caminos de transducción de señales conformados por una serie de moléculas que, funcionando en cascada, conectan los receptores de las señales con las moléculas efectoras.

Las cascadas de señalización que involucran a las MAPKs o kinasas activadas por mitógenos ("Mitogen-Activated Protein Kinases"), se encuentran conservadas en muchos organismos. Si bien una variedad muy amplia de estímulos pueden activar estas vías, la existencia de múltiples vías de MAPKs (en mamíferos se conocen 14 genes para MAPKs y 7 vías de señalización¹⁶⁸), les permite a las células responder de manera específica según el estímulo del que se trate. El estímulo no sólo puede comprender a moléculas mitogénicas, como los factores de crecimiento EGF ("Epidermal growth factor") o PDGF ("Platelet-derived growth factor"), sino también otro tipo de agonistas como hormonas (insulina u hormona de crecimiento), citoquinas inflamatorias (moléculas de la familia del TNF, "tumor necrosis factor") y el estrés ambiental, como el estrés osmótico o la radiación ionizante.

Los complejos de MAPKs están clásicamente organizados en módulos que involucran distintas proteínas kinasas de fosforilación secuencial. Estos módulos comparten un núcleo de 3 pasos: 1) La primera kinasa que se activa para iniciar la cascada es una MAPKKK (MAP kinasa kinasa kinasa, o sea, una kinasa que fosforila a la kinasa de la MAPK); 2) Esta MAPKKK activa a una MAPKK (MAP kinasa kinasa, una kinasa que fosforila a la MAPK); 3) Por último la MAPK es fosforilada por la MAPKK. Una vez activadas por fosforilación, las MAPKs puede fosforilar a una gran variedad de sustratos presentes en diferentes compartimentos intracelulares.

Las MAPKs fosforilan serinas o treoninas seguidas de prolinas. Estos pares Ser - Pro o Tre - Pro pueden estar dentro de una secuencia consenso más compleja, aceptada como la secuencia de reconocimiento para sus sustratos [(Pro/residuo no polar)-Leu-(Ser/Thr)-Pro]¹⁶⁹.

Las MAPKs son activadas por fosforilación dual en treonina y tirosina, separadas por otro residuo, conformando el motivo TXY, donde la letra X puede representar varios aminoácidos distintos. Y dado que las MAPKs son las responsables de estas fosforilaciones, son consideradas como kinasas de fosforilación dual. La identidad del aminoácido intermedio define a las distintas subfamilias de MAPKs. Actualmente se pueden definir tres subgrupos o subfamilias (subfamilia ERK, subfamilia p38 y subfamilia JNK) (Figura 8).

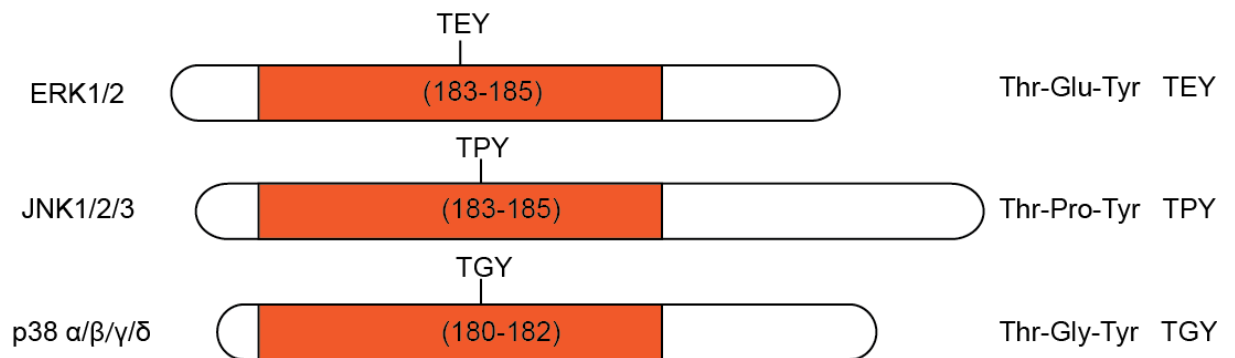


Figura 8. Sitios consenso de fosforilación por MAPKs (kinasas de fosforilación dual) sobre MAPKs. Se indican las tres cascadas más estudiadas de MAPKs, junto con los miembros más representativos de cada una. Las MAPKs son reguladas por la fosforilación dual de residuos treonina y tirosina en los aminoácidos que se muestran en blanco en los esquemas. La pertenencia a una dada familia de MAPKs es determinada por el residuo que se encuentra entre los sitios de fosforilación.

La localización de las MAPKs es predominantemente citoplasmática en células quiescentes. Sin embargo luego del tratamiento de las células con suero, se observa su translocación al núcleo¹⁷⁰, fenómeno que algunos autores muestran como índice inequívoco de activación. Esta característica es coherente con el hecho de que la mayoría de los sustratos de MAPKs son proteínas que se unen al DNA y son de localización nuclear (factores de transcripción).

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

Al activarse los receptores de tipo tirosina kinasa o TKR, estos experimentan una serie de cambios que incluyen cambios conformacionales y fosforilaciones (autofosforilaciones) de residuos de tirosina localizados en su porción citoplasmática. La activación de la actividad de tirosina kinasa le permite al receptor fosforilar proteínas citoplasmáticas que pueden transmitir la señal en el interior de la célula. Las proteínas fosforiladas por el receptor pueden ser de dos tipos: proteínas adaptadoras que reclutan a otras proteínas transductoras, o bien factores o enzimas directamente transductores/as que tras unirse al receptor son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo como las proteínas G pequeñas (Ras, Rac, Rho, cdc42) que activan a las MAPKKs¹⁷¹.

Por otra parte, se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que constituyen una gran superfamilia de proteínas. En el exterior de la célula, estos receptores reciben un ligando, y en el interior celular activan proteínas G heterotriméricas. Los GPCRs presentan una estructura de siete pasos de membrana, con su extremo amino terminal orientado hacia el exterior y su extremo carboxilo terminal hacia el lado citoplásmico en donde se acopla una proteína G heterotrimérica. Estas, compuestas por las subunidades α , β - γ se encuentran acopladas al receptor cargadas con GDP mediante la subunidad α del complejo. Cuando el receptor se activa, la subunidad α intercambia el GDP por GTP y el complejo se disocia en la subunidad α y el dímero β - γ .

Tanto la subunidad α como la β - γ pueden activar vías de señalización, y si bien el más estudiado es aquel que involucra la activación a través de la subunidad α , las MAPKs reciben su señalización a través de β - γ ^{172,173}.

Un ejemplo de GPCR es el receptor que utilizamos en este trabajo, el receptor codificado por el orf74, vGPCR. Los receptores GPCR controlan la actividad de las distintas MAPKs llevando a la activación de las MAPKKs que a su vez activan a las MAPKs y estas a las MAPKs^{173,174}. En la Figura 9 se esquematizan las cascadas clásicas de MAPKs. El apagado de la señal se debe en gran parte a la acción de fosfatasas. Las fosfatasas de especificidad dual, DSP (“dual specificity phosphatases”), que remueven los fosfatos en tirosinas y treoninas del sitio de activación de las MAPKs. Las fosfatasas duales que actúan sobre MAPKs se llaman MKPs, por “MAPK Phosphatases”¹⁷⁵.

4.1 MAPK - ERK1/2

ERK1 (“Extracellular Regulated Kinase” 1) y ERK2 también conocidas como p44MAPK y p42MAPK respectivamente, son componentes centrales de los caminos de proliferación, se expresan en todos los tejidos estudiados y comparten cerca del 90% de identidad¹⁷⁶. Son activadas por la fosforilación dual de los residuos Treonina 183 y la Tirosina 185 por la MAPKK MEK1 o MEK2 que a su vez se activa por la MAPKK Raf en respuesta a factores de crecimiento, suero, etc^{171,176}.

Uno de los ejemplos más estudiados que involucran la activación de ERK2 por receptores TKR es el del receptor de EGF, EGFR. Cuando el EGF se une a su receptor produce su auto-fosforilación que sirve como sitio de anclaje para proteínas adaptadoras que incluyen, entre otras, a Grb2la¹⁷⁷. Grb2 recluta a SOS (“Son of Sevenless”) que estimula el intercambio de GDP por GTP en la pequeña proteína Ras (una pequeña proteína G que une GTP)¹⁷⁸. Ras unido a GTP inicia la cascada de proteínas kinasas que incluyen, secuencialmente, a la MAPK kinasa kinasa (MAPKKK) Raf, que fosforila y activa a la MAPK kinasa (MAPKK) MEK, que a su vez fosforila y activa a la MAPK, ERK1/2¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

La MAPK fosfatasa, MKP3 defosforila a ERK2¹⁸² tanto en la treonina como en la tirosina de su sitio de activación. También defosforilan a ERK1/2 las MKS-X y MKP-4¹⁷⁵. Otro importante regulador de ERK1/2 es la fosfatasa PP2A (“Protein phosphatase” 2A), pero en este caso actúa de manera activadora, ya que defosforila sitios inhibitorios de la MAPKKK Raf, permitiendo de esta manera que se active la vía¹⁸³.

La activación de ERK1/2 induce señales proliferativas que contribuyen tanto al crecimiento celular normal como al canceroso^{184,185}. Su actividad enzimática crece con la estimulación de mitógenos y el impedimento de su función previene la proliferación celular en respuesta a diversos factores de crecimiento¹⁸⁶. Este hecho es consistente con que moléculas que activan la vía de ERK1/2, como por ejemplo Ras, se encuentran generalmente mutadas en distintos tipos de cáncer¹⁸⁷ y que la activación constitutiva de moléculas que actúan río arriba de éstas es suficiente para producir tumorigénesis¹⁸⁵.

4.2 MAPK – JNK

Las proteínas de la familia JNK (c-Jun NH2-terminal “Kinase”) son proteínas kinasas activadas principalmente por estrés y citoquinas¹⁸⁸. Las JNKs son codificadas por tres genes *Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3*¹⁸⁹.

El factor de transcripción c-Jun es fosforilado por JNK en las Serinas 63 y 73 en respuesta al estímulo con esteres de forbol (TPA)¹⁹⁰.

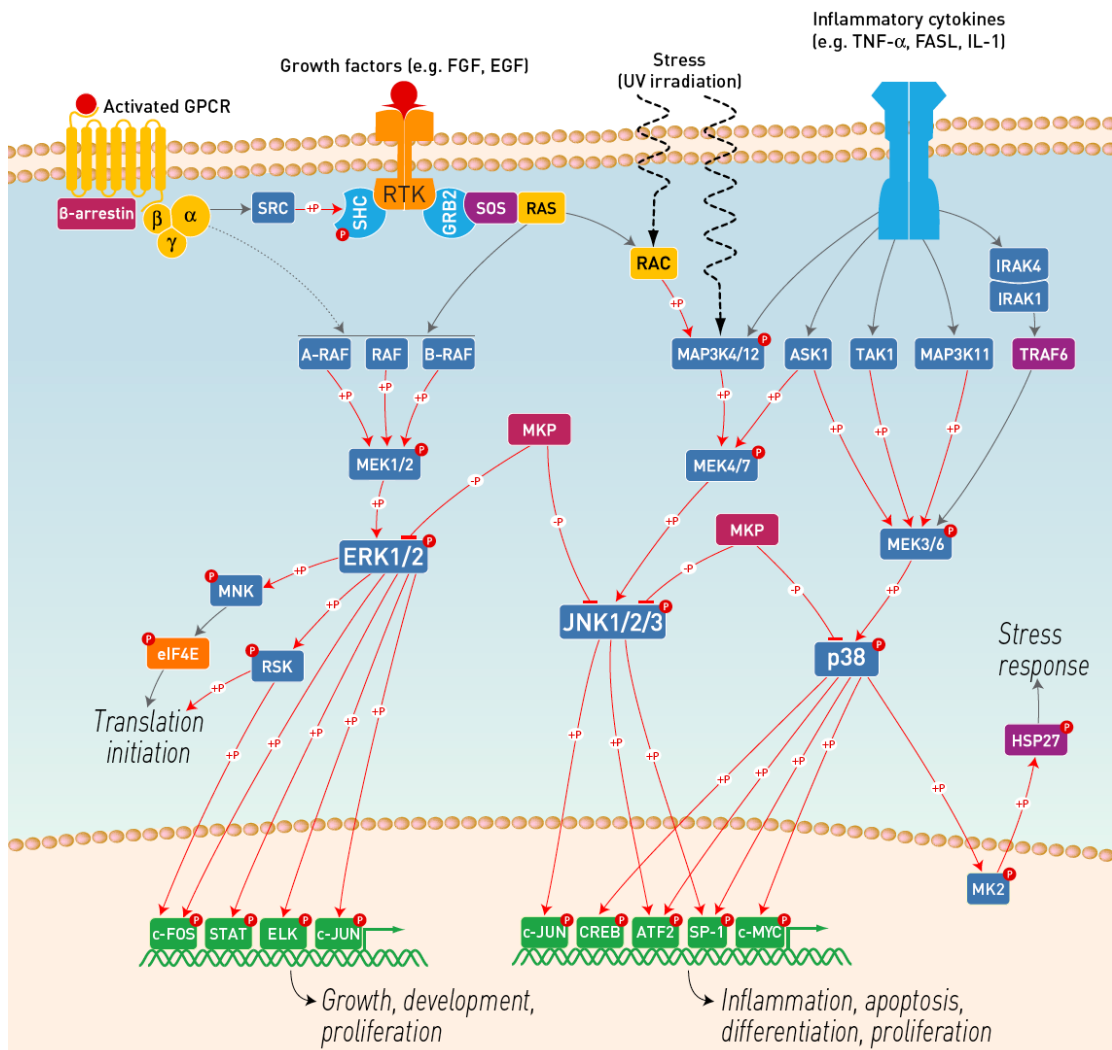


Figura 9: Esquema de las cascadas de señalización de MAPKs. Diversos estímulos activan factores intercambiadores GEFs, que cargan GTP sobre proteínas G pequeñas. Estas, a su vez, activan una cascada de fosforilación, finalizando en la activación de MAPKs y sus sustratos, la mayor parte factores de transcripción <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Signaling-Pathways/Mitogen-Activated-Protein-Kinase-MAPK/Mitogen-Activated-Protein-Kinase-MAPK-Overview.html>.

Esta fosforilación se produce en la región amino terminal de c-Jun, que corresponde al dominio de transactivación. La fosforilación de c-Jun en los sitios que son fosforilados por JNK causa un incremento en la actividad transcripcional¹⁹¹. Además, se encontró que JNK es capaz de fosforilar a otras proteínas de la familia AP1, incluidas JunB, JunD y ATF2¹⁹². En cada caso la fosforilación corresponde a motivos Ser/Thr-Pro presentes en los dominios de activación de los factores de transcripción.

Las proteínas JNKs, son activadas por fosforilación dual en treonina y tirosina por MKK4 (también llamada SEK1) y MKK7 (SEK2)¹⁹³. La proteína kinasa MKK7 es principalmente activada por citoquinas (Ej.: TNF e IL-1) y MKK4 es principalmente activada por estrés ambiental. La comparación de las propiedades bioquímicas de MKK4 y MKK7 demuestra que mientras ambas pueden activar a JNK por fosforilación dual, hay diferencias en la especificidad del sustrato.

Diversas MAPKKs que activan a JNK han sido reportadas. Estas incluyen miembros del grupo de MEKK (MEKK1 a MEKK4), el grupo de proteínas kinasa mixed-lineage (MLK1, MLK2, MLK3, DLK y LZK)¹⁹⁴, el grupo ASK (ASK1 y ASK2), TAK1 y TPL2¹⁹⁵.

Se reportaron distintas fosfatasa MKPs que pueden actuar sobre JNK, entre ellas, MKP-7 y VH5, que también regulan a p38a y p38b. Otras MKPs como MKP6, MKP2, MKP4 y MKP5 también podrían actuar sobre JNK¹⁹⁶.

Diversos estímulos activan JNK, por ejemplo, radicales libres de oxígeno (ROS), TNF, H₂O₂, sorbitol, etc¹⁹⁷. JNK está involucrada en producción de citoquinas, en la función del sistema inmune, en respuesta inflamatoria, en apoptosis inducida por estrés y durante el desarrollo, en la reorganización de actina y en la transformación celular¹⁹⁸.

JNK también ha sido involucrada en la formación de tumores. La transformación inducida por Ras requiere la activación del factor de transcripción c-Jun¹⁹⁹ y la tumorigénesis que induce Ras es revertida por la mutagénesis de c-Jun en los sitios de fosforilación por JNK²⁰⁰. Ha sido reportado que JNK está constitutivamente activa en varias líneas tumorales y que las acciones transformantes de varios oncogenes han sido dependientes de la activación de JNK¹⁹².

4.3 MAPK - p38

La primera isoforma de p38 aislada corresponde a p38a, o MAPK14. Fue encontrada como una proteína de 38 KDa que se fosforila rápidamente en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS)²⁰¹. Posteriormente se identificaron otras tres isoformas; p38b (169), p38g (ERK6, SAPK3)²⁰² y p38d (SAPK4)²⁰³. Las cuatro isoformas comparten entre si un 60-70% de identidad. p38a y p38b son ubicuas, mientras que p38g y p38d se expresan solo en algunos tejidos²⁰⁴.

Se ha reportado su activación en respuesta a una gran variedad de estímulos como radiación UV, cambios de temperatura, shock osmótico, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento²⁰⁵⁻²⁰⁸ y en organismos diferentes. Fueron clonados homólogos de p38 en levaduras (Hog1 & Spc/Sty1)²⁰⁹, gusano (pmk-2)²¹⁰ y mosca²⁰¹ entre otros organismos.

Las cuatro isoformas de las p38 MAPKs son activadas predominantemente por las MAPKKs MKK3 y MKK6²¹¹, mientras que MKK4 sólo activa a p38 α ²¹² y MMK7 activaría a p38d²¹³. La activación de estas MAPKKs lleva a la fosforilación de las treonina 180 y tirosina 182 en un dominio Treonina-Glicina-Tirosina (TGY)²¹⁴.

El hecho de que p38 pueda responder a una cantidad de estímulos tan amplia podría deberse en parte a la variedad de MAPKKs que participan en su activación, que incluyen TAK1²¹⁵, ASK1/MAPKKK5²¹⁶ DLK/MUK/ZPK^{217,218} y MEKK4²¹⁹. La sobreexpresión de cualquiera de estas kinasas lleva a la activación de las p38 MAPKs y generalmente también a la activación de JNK, lo que explicaría la co-activación de ambas vías.

También contribuyen a la activación de p38 pequeñas proteínas G de la familia de Rho, como Rac1 y Cdc 42^{220,221}, activando a MAPKKs. Por otra parte existen formas de activación de p38 que son independientes de las MAPKKs. Por ejemplo, p38a puede activarse por autofosforilación cuando interacciona con la proteína TAB1 (TAB-“activated protein kinase 1-binding protein”)²²².

Nuevamente las encargadas de remover los fosfatos en treonina y tirosina e inactivar a las p38s son fosfatasas de la familia MKP. Varios miembros de las MKPs pueden defosforilar p38a y p38b²²³.

Además se conocen otros tipos de fosfatasas como la fosfatasa de serinas/treoninas PP2C (protein phosphatase 2C). Esta fosfatasa actúa sobre

la MAPK HOG1 (homólogo de p38 en levaduras) y también sobre las MAPKs humanas MKK6 y MKK4 tanto *in vitro* como *in vivo*²²⁴⁻²²⁶.

El primer sustrato de p38 identificado fue MAPKAPK2 o MK2, (MAP “kinase-activated protein kinase” 2)²²⁷. MK2 y otro miembro de esta familia de proteínas kinasa, MK3, activan varias proteínas incluyendo HSP27 (small heat shock protein 27)²²⁸ y LSP1 (“lymphocyte-specific protein”). MK2 también regula la actividad de proteínas de unión a elementos ARE o AUBPs como TTP y BRF1 regulando el mecanismo de decaimiento de mensajeros como explicaremos más adelante²²⁹. Por otra parte se ha observado que p38 β es capaz de regular la actividad de la AUBP KSRP por fosforilación directa.

Aproximadamente la mitad de los sustratos conocidos para p38 son factores de transcripción. Algunos ejemplos son ATF-1/2/6 (“activating transcription factor” 1, 2 & 6), SAP1 (SRF “accessory protein”), CHOP (“growth arrest and DNA damage inducible gene” 153, or GADD153), p53, C/EBP β , MEF2C (“myocyte enhance factor” 2C), MEF2A, MITF1 (“microphthalmia-associated transcription factor”), ELK1 (ETS-“domain transcription factor”), NFAT (“nuclear factor of activated T cells”), HBP1 (“high mobility group-box protein” 1)^{206,230-236}. También se observó que fosforilan a CREB (cAMP “response element-binding protein”)²³⁰ y a SRF (“serum response factor”)²³⁷.

Además de MK2, p38 fosforila a otras kinasas, como por ejemplo a MNK1 (MAPK-“interacting protein kinases”) que está involucrada en la iniciación traduccional debido a que es una kinasa que fosforila al factor de iniciación eIF-4E (“eukaryotic initiation factor”-4e)^{238,239}.

Por otra parte, p38 fosforila sustratos que no son ni kinasas ni factores de transcripción. Algunos ejemplos de este tipo de sustratos son: cPLA2 (“phospholipase A2 family”), un grupo de enzimas intracelulares conocidas como fosfolipasas A que median la producción de productos lipídicos en respuesta a estímulos extracelulares; NHE-1 (Na⁺/H⁺ “exchanger isoform”-1) una proteína integral de membrana involucrada en la regulación del pH intracelular; tau (Microtubule-associated protein tau) cuya función principal esta en el ensamblaje y estabilización de la red microtubular de las células y keratina 8 (intermediate filament protein keratin 8), una proteína de los filamentos intermedios, uno de los tres sistemas filamentosos del citoesqueleto²⁴⁰⁻²⁴².

Existe una relación establecida entre las vías de señalización de p38 y los procesos inflamatorios. Enfermedades como la artritis reumatoidea, el

mal de Alzheimer y la enfermedad de Bowel están reguladas al menos en parte por la vía de p38²⁴³⁻²⁴⁵. La activación de las vías que involucran a esta kinasa llevan a la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF; a la inducción de enzimas como COX-2, que controla el remodelado de tejido conectivo durante condiciones patológicas; a la expresión de enzimas intracelulares como iNOS, un regulador del estado de oxidación intracelular²⁴⁶⁻²⁴⁸ y a la inducción de VCAM-1 y otras proteínas de adherencia²⁰⁷.

Las p38 MAPKs están involucradas en la regulación del ciclo celular. La participación de p38a ha sido observada tanto en levaduras como en mamíferos²⁴⁹. Las p38s están involucradas en la regulación de las fases G1 y G2/M del ciclo. También se sabe que p38a se activa en células arrestadas en fase M.

En algunos tipos celulares se ha descrito que p38a y p38b están involucradas en el proceso de diferenciación celular. Por ejemplo, en la diferenciación de la línea celular de pre-adipocitos 3T3-L1 en adipocitos, o en la de las células PC12 en neuronas^{250,251}. Por otra parte, se demostró que la MAPK p38d sería necesaria para la diferenciación de keratinocitos²⁵².

La MAPK p38 está también involucrada en senescencia y supresión tumoral, a través del acortamiento de telómeros, exposición a H₂O₂, activación permanente de la vía de RAS y activación de MKK3 o MKK6²⁵³⁻²⁵⁵. Aún no está claro cual es el rol fisiológico de cada una de las p38 MAPKs. Algunos trabajos postulan que existe un importante antagonismo entre las isoformas p38a, p38b y p38g, p38d en donde las isoformas de p38a y p38b activarían la transcripción de genes con sitios de respuesta a AP-1 mientras que p38g y p38d la inhibirían^{256,257}. También se ha reportado un antagonismo entre las isoformas p38a y p38b en células HeLa y en cardiomiocitos en donde p38a induce apoptosis y p38b supervivencia celular^{258,259}.

La señalización por MAPKs puede inducir tanto la supervivencia y proliferación así como la muerte celular o la diferenciación. El balance entre cada cascada de MAPK es el que determina el destino celular, y este balance, a su vez, está determinado por el tipo de estímulo y el contexto en el que se encuentre la célula²⁶⁰.

Objetivos

Objetivos

Como desarrollamos en la sección anterior, el sarcoma de Kaposi (KS) es el tumor más frecuente en pacientes de SIDA y consiste de lesiones a nivel de la piel del paciente, muy vascularizadas, compuestas por células que derivan de tejido endotelial transformadas por el virus KSHV²⁶¹⁻²⁶³. Se ha visto que la transformación celular es causada principalmente por el oncogén viral vGPCR, un receptor de membrana acoplado a proteína G.

Trabajos previos de nuestro grupo indican que los promotores de HO-1 y VEGF (ambas proteínas elevadas en KS) son activados por el signaling de vGPCR (receptor de membrana). Más aún, en ensayos de formación de foco hemos visto que vGPCR induce la formación de focos y que la inhibición farmacológica de la actividad enzimática de HO-1 disminuye este efecto. Esto nos ha permitido sugerir que en células NIH3T3 vGPCR induce la transformación celular y que este efecto es mediado por un aumento en la actividad transcripcional de HO-1 y VEGF¹⁰¹ y que lo hace a través de las pequeñas proteínas G heterotriméricas G12/13. Resultados de nuestro laboratorio indican que vGPCR activa a la GTPasa RhoA río debajo de G12/13 y que la inhibición de RhoA impide el aumento de VEGF, la supervivencia celular, la proliferación y la transformación, tanto en un modelo de células en cultivo como en un modelo murino. Más aún, la tumorigénesis inducida por G13-RhoA se ve disminuída cuando la expresión o la actividad de HO-1 es inhibida. Esto indica que en G12/13 y RhoA participan de la señalización de vGPCR hacia HO-1²⁶⁴.

En la presente propuesta pretendemos extender nuestras observaciones sobre la regulación de caminos de señalización activados por el oncogén vGPCR vinculando a proteínas G y proteínas kinasas con factores de transcripción, enfocándonos particularmente en el estudio del promotor del gen de *Hemooxigenasa-1* del cual demostramos en trabajos anteriores que su expresión y actividad es requisito para la transformación celular en nuestro modelo de transformación en cultivo.

Nuestro objetivo es caracterizar las proteínas que sobre este promotor interactúan, los caminos de transducción de señales disparados por vGPCR que convergen sobre esas proteínas y el modo en que estos elementos interactúan para regular la expresión de la enzima HO-1, necesaria para la actividad transformante de KSHV-vGPCR de modo de poder proveer potenciales blancos

moleculares para bloquear dicha transformación y prevenir la progresión de las células en el Sarcoma de Kaposi.

En ese contexto nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

OBJETIVO ESPECIFICO 1: Identificar los elementos que dentro del promotor de HO-1 son responsables de la activación transcripcional debida a vGPCR y sus proteínas asociadas.

OBJETIVO ESPECIFICO 2: Estudiar los caminos de señalización disparados por vGPCR que convergen en esas proteínas y esos elementos respondedores.

OBJETIVO ESPECIFICO 3: Analizar la necesidad de esos componentes moleculares para la capacidad transformante de vGPCR.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1. Cultivo de líneas Celulares

- NIH 3T3 (ATCC CRL-1658- Fibroblastos de ratón): fueron cultivadas en medio DMEM alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternera (CALF) (Hyclone/GIBCO), glutamina 2 mM (Invitrogen), y una solución de penicilina , estreptomina y anfotericina B (Invitrogen), a 37°C y 5% de CO₂.
- NIH 3T3 vGPCR (Fibroblastos de ratón): Células NIH 3T3 fueron transfectadas establemente con el cDNA de vGPCR¹⁰¹. Fueron cultivadas en medio DMEM alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternera (CALF) (Hyclone/GIBCO), glutamina 2 mM (Invitrogen), una solución de penicilina , estreptomina y anfotericina B (Invitrogen) y G418 (350 µg/ml) , a 37°C y 5% de CO₂.

Las células se repicaron cada 48 - 72 horas según su confluencia, con una solución de TripLE express 1X (Invitrogen), un reemplazo recombinante de la tripsina animal. Previo a este paso, las células fueron lavadas con una solución de PBS 1X (PBS 10X: NaCl 1,37 M, KCl 26,8 mM, KH₂PO₄ 14,7 mM, NaH₂PO₄ 43 mM. pH=7,4).

2. Transfecciones Transitorias

2.1 Transfecciones con Polietiliminina o PEI

Células HEK 293T y NIH 3T3 fueron sembradas en medio completo y se permitió su proliferación durante toda la noche (16 horas) hasta llegar a una confluencia de 70-80%, en placas de 6 wells, 6 cm de diámetro o 10 cm según el caso. Para el caso de células HEK 293 se sembraron 200.000 células/well y en el caso de células NIH3T3 40.000 células/well. Luego de 3 lavados con una solución de PBS 1X, las células fueron transfectadas con una solución compuesta por 2, 4 ó 16 µg de DNA total respectivamente y un volumen de PEI (concentración madre de 1 µg/µl en agua, pH 7,2), en una relación de a 3:1 (PEI:DNA) para las células HEK 293 y una relación de 7:1

para las células NIH 3T3. Los complejos PEI-DNA fueron incubados en medio Optimem (Invitrogen) o DMEM (Invitrogen) durante 15 minutos y luego de ser agregados a las células se los incubó durante 3 horas (HEK 293) o 6 horas (NIH 3T3). Pasado el tiempo de transfección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X e incubadas con medio completo durante 2 – 3 días.

2.2 Transfecciones con Lipofectamina

Para algunos experimentos las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen). En este caso, se sembraron células NIH3T3 (40.000 células en cada well de una placa de 12 wells) de manera que el día de la transfección estuvieran en un 70% – 90% de confluencia. En un tubo se mezclaron 2,5 µg de DNA con 5 µl de P3000 Reagent (Invitrogen) y 125ul de OPTIMEM (Invitrogen). En otro tubo se mezclaron 5ul de Lipofectamina 3000 Reagent (Invitrogen) con 125ul de OPTIMEM. Luego se mezclaron ambos tubos y se incubó 10 – 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS se agregaron los complejos de DNA – Lípidos a las células, se incubaron 4 horas a 37C y se cambió el medio a DMEM 10% CALF.

3. Transfecciones estables

Células NIH 3T3 vGPCR fueron transfectadas establemente con plásmidos que contienen secuencias “short hairpin” para Nrf2 (Thermo, RMM4532-EG18024) siguiendo el mismo protocolo utilizado para las transfecciones transitorias. Luego de 48 horas post transfección se cambió el medio por medio de selección (DMEM 10% CALF – G418 (750 ug/ml) – Puromicina (0.4 ug/ml). Durante la selección las células se fueron monitoreando observando la expresión de la proteína GFP utilizando un microscopio de fluorescencia. En la sección de Resultados se muestran los Western Blot en donde se evalúa el efecto de la transfección estable con estos plásmidos.

4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis fueron cedidos por distintos laboratorios o adquiridos comercialmente

4.1 Vectores reporteros

Se utilizaron plásmidos reporteros en donde distintos promotores se clonaron río arriba del gen de la luciferasa.

- pmHO-1 Luc: cedido por J. Alam, contiene 15 Kb del promotor murino de HO-1⁸⁴.
- pGL3pv Nrf2 3xARE Luc: cedido por M. Marinnisen, promotor mínimo que contiene 3 sitios ARE (Antioxidant Response Element) en tándem.
- pG5 Luc: promotor mínimo que contiene 5 sitios de unión a GAL4 (Promega).

4.2 Vectores de expresión

- pCDNA 3 His B – V5 Nrf2 (Full Length): cedido por M. McMahon y J. Hayes. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para Nrf2
- pEF/myc Nrf2 Dominante Negativo (DN): cedido por J. Alam. Vector que codifica para la versión mutada de Nrf2 que carece el dominio de activación de Nrf2²⁶⁵
- pCEFL-AU5-vGPCR: cedido por S. Gutkind. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para vGPCR.¹⁰¹
- pCDNA3 G α_{12} QL: cedido por S. Gutkind. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para la versión constitutivamente activa de G α_{12} ²⁶⁶.
- pCEFL HA G α_{13} QL: cedido por S. Gutkind. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para la versión constitutivamente activa de G α_{13} ²⁶⁶.
- pCEFL AU5 RhoAQL: cedido por S. Gutkind. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para la versión constitutivamente activa de RhoA²⁶⁶.

- pCEFL Rho N19 Dominante Negativo (DN): cedido por S. Gutkind. Vector que codifica para la versión mutada de RhoA²⁶⁶.

Para normalizar los valores de DNA transfectado en los ensayos de luciferasa se co-transfectó en cada caso el vector pCDNA3- β -galactosidasa, para posteriormente medir la actividad de esta enzima.

4.3 Vectores de expresión - Kinasas

Los vectores de expresión de las siguientes kinasas fueron descritos en trabajos del Dr. Omar Coso en el Laboratorio del Dr. Silvio Gutkind²⁶⁶.

- pCEFL-HA-ERK2: Vector de expresión para ERK2 río abajo de 8 aminoácidos que corresponden a un fragmento de la Hematoglutina del virus de la influenza humana²⁶⁷

- pMEKEE/AA: cedido por S. Gutkind. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para la versión constitutivamente activa (EE) o inactiva (AA) de MEK, kinasa de ERK.

- pMEK3EE/AA: cedido por S. Gutkind. Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para la versión constitutivamente activa (EE) o inactiva (AA) de MEK3, kinasa de p38.

5. Reactivos

5.1 Estímulos

- Anisomicina: Se utiliza una concentración final de 10 ug/ml durante 20 minutos (Sigma). La anisomicina fue resuspendida en etanol 100 % a una concentración 500X.
- PDGF humano bb: Se utiliza a una concentración de 100 ng/ml. El stock 2000X se realiza en solución acuosa (donación laboratorios Beta). El tiempo de incubación se detalla en cada experimento.

5.2 Anticuerpos

- Anti epítopes: HA, Covance (HA.11); GFP, Santa Cruz Biotechnology (sc-9996). Utilizados en una dilución 1:1000, incubado 3 - 16 horas en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada.
- Anticuerpos control: GAPDH, Santa Cruz Biotechnology (sc-32233); actina, Santa Cruz Biotechnology (sc-1616-R). Utilizados en una dilución 1:1000 o 1:500 (β -tubulina), incubado 3 - 16 horas en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada.
- Anticuerpos Específicos: Utilizados en una dilución 1:1000 o 1:500 (β -tubulina), incubado 3 - 16 horas en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada.

Nrf2 Abcam: ab89443

Phospho-Nrf2 (pNrf2) Abcam: ab76026

HO-1 Abcam: ab13248

ERK2 Santa Cruz: sc-154

Phospho -ERK1/2 (pERK) Santa Cruz: sc-7383

p38 Santa Cruz: sc-535-G

Phospho -p38 (pp38) Cell Signalling: 9211

JNK Santa Cruz: sc-474-G

Phospho -JNK (pJNK) Cell Signaling: 9255S

Akt1 Santa Cruz: sc-1618

Phospho -Akt1/2/3 (pAkt) Santa Cruz: sc-16646-R

- Anticuerpos secundarios conjugados a HRP: anti Mouse, anti Rabbit y anti Goat conjugados a peroxidasa, Santa Cruz Biotechnology. Se utilizaron en una dilución 1:3000 - 1:5000, incubados en una solución de TTBS 0.05% 5 % leche descremada durante 1hr.

- Anticuerpos secundarios a fluoróforos: anti Mouse, anti Rabitt y anti Goat conjugados a fluoróforos utilizados para el revelado en el sistema IR de Odyssey (Li-Cor). Se utilizaron en una dilución 1:15000, incubados en una solución de TTBS 0.05% 5 % leche descremada durante 1hr.

5.3 Inhibidores Farmacológicos

- SB203580 (Calbiochem): inhibidor de la actividad de p38 alfa (aproximadamente inhibe el 70% de su actividad) y beta (aproximadamente inhibe el 20% de su actividad). Se utiliza en una concentración final de 10 μ M. El stock es resuspendido en DMSO.
- PD98059 (Calbiochem): inhibidor de MEK1/2, inhibe la activación de ERK de manera indirecta. Se utiliza en una concentración final de 20 μ M. El stock es resuspendido en DMSO.

6. Preparación de Bacterias Competentes

Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5alfa fueron utilizadas para preparar bacterias competentes. Se utilizó el protocolo INOUE. Las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libre de antibiótico e incubadas a 37°C por 16 horas. Al día siguiente, una colonia fue picada y crecida durante 6 horas en 25 ml de medio LB en agitación (200 rpm, 37°C). Se inocularon 200 ml de medio SOB con el agregado de KCl y MgCl₂, a baja temperatura y agitación durante toda la noche. Al día siguiente se midió la densidad óptica a 600 nm, y al llegar a 0.5 se cortó la incubación. Se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm y el pellet bacteriano fue resuspendido en 80 ml de la solución de competencia Inoue (MnCl₂, CaCl₂, KCl, PIPES) pre-enfriado en hielo. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El pellet fue resuspendido nuevamente pero en 20 ml de la solución Inoue. Se agregó 1.5 ml de DMSO y se alicuotaron las bacterias para su almacenamiento a -80°C.

Bacterias *E. coli* cepa BL21 fueron utilizadas para transformaciones con el objetivo final de producir proteínas recombinantes. Se utilizó el mismo protocolo nombrado en el párrafo anterior para llegar a la competencia.

7. Transformación Bacteriana

50ul de bacterias competentes DH5 alfa (eficiencia de al menos 1×10^7 colonias/ml), almacenadas a -80°C son descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez que se descongelan se agregan entre 25 ng y 100 ng de plásmido, y se las incuba 20 min en hielo. Luego se les aplica un shock térmico de 90 segundos a 42°C y nuevamente se las coloca en hielo 5 minutos. Se agregan 700 - 1000ul de medio SOC o LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C . Finalmente, se toman cantidades variables de la suspensión de bacterias (entre 50-500 ul), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquean en placas de LB con el antibiótico correspondiente según el vector utilizado.

Soluciones utilizadas:

- LB: 0.5% p/v extracto de levadura, 1% p/v bacto-triptona, 1% p/v NaCl
- LB agar: LB + 1.5% p/v bacto-agar
- LB/ampicilina: 100mg/ml (tanto en medio sólido como líquido)
- SOB: 2 % p/v bacto-triptona, 0.5 % p/v extracto de levadura, 0.05 % p/v NaCl.
- SOC: SOB + Glucosa 20mM.
- Inoue: 55 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250 mM KCl, 10 mM PIPES.

8. Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Mini preparaciones

Tubos conteniendo 3 a 5 ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente, fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés. Los cultivos se mantienen por 20 horas aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm. Luego, son trasvasados a tubos tipo eppendorff y centrifugados a 12000 rpm durante 30 segundos. El pellet celular es resuspendido en 200 µl de P1 (Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 µg/ml). Luego se agregan 200 µl de P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1%), se mezcla por inversión y se mantiene por no más de 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 150 µl de P3 (KAcO 3M, pH:5.2) fría. Se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos. Se realiza un lavado con una solución de cloroformo:isoamílico 24:1 de 1 volumen para retirar proteínas y DNA genómico. A la fase acuosa se le agrega 0.7 volúmenes de isopropanol. Luego de una centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, el pellet que se obtiene es lavado con 500 µl de etanol 70%. El pellet finalmente se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 20-100 µl de agua.

9. Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxi preparaciones

Las maxi preparaciones fueron llevadas a cabo mediante el uso de columnas de afinidad (QIAGEN-tip 500, Cat 10063). Este protocolo esta basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado, seguido de una purificación del DNA plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico.

Brevemente, 300 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado para la selección, es inoculado con una alícuota de bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés. Los cultivos son mantenidos por 20 horas aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm. Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento son trasvasados a botellas de policarbonato de 500 ml y centrifugados a 6000 x g por 15 min a

4°C. El sobrenadante se descarta y el pellet celular es resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM, pH:7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50 microgramos/ml). Luego se agregan 10 ml de P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1 %) se mezcla por inversión y se agregan otros 10 ml adicionales de P3 (KAcO 3 M, pH:5.2)fría, se incuba la mezcla en hielo durante 20 min y luego se centrifuga a 20.000 xg durante 10 min a 4°C. Durante la centrifugación se equilibran las columnas QIAGEN-tip 500 con buffer QBT. El sobrenadante se filtra en un embudo con gasa y se vuelca en la columna. La columna se vacía por gravedad y se lava dos veces con 30 ml de buffer de lavado QC. Finalmente el DNA atrapado en la columna es eluído con 15 ml buffer de elución QF.

El DNA del eluído se precipita con 0.7 volúmenes de isopropanol en tubos de vidrio COREX y centrifugado a 15000xg. El DNA precipitado se lava dos veces con etanol 70 % y el pellet se seca al aire durante 20 min y se resuspende en 300 µl de agua destilada miliQ. La calidad del DNA plasmídico se verifica por geles de agarosa y la concentración final se mide por espectrofotometría.

10. Cuantificación del DNA plasmídico

Una vez disuelto en agua, el DNA plasmídico fue cuantificado midiendo la absorbancia de la solución a 260 nm en un espectofotómetro NanoDrop (Thermo – NanoDrop 2000) . También se cuantificaron muestras de DNA por electroforesis en gel de agarosa, comparando las intensidades observadas bajo luz UV con las intensidades dadas por cantidades conocidas de DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III (Lambda Hind III, Invitrogen).

11. Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción

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

Para ello el DNA plasmídico fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: aproximadamente 1 µg de DNA plasmídico, 2 µl de buffer de restricción correspondiente 10X, 1 U de la/las enzima de restricción escogida y agua hasta completar 20 µl de volumen final. Se incuba durante 2 – 16 horas a 37°C. Luego se realizan electroforesis en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X. Finalmente las bandas se observan mediante exposición a luz UV.

- Buffer TAE

40 mM Tris base (pH 7.6)

20 mM Ácido acético glacial

1 mM EDTA pH=8

12. Extracción del RNA

Se utilizó el reactivo Tri-reagent (Genbiotech) y se siguieron las especificaciones del fabricante.

Se extrae el medio que cubre a las células y se agrega 1 ml de reactivo por pocillo de una placa de 6 pocillos. Se pipetea varias veces cada placa hasta observar que todas las células se despegan y que se obtiene una solución homogénea. Luego se transfiere a tubos eppendorf y se agregan 200 µl de cloroformo, se agita a mano y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifuga a 11,500 rpm por 15 min a 4°C. Se extrae la fase acuosa y se transfiere a otro tubo. Se agregan 500 µl de isopropanol y se mezcla por inversión 4-5 veces. El RNA se precipita a -80 °C entre 2h a toda la noche.

Luego se centrifuga a 11,500 rpm por 15 min at 4°C. Se descarta el isopropanol y se agrega 1 ml de etanol 75%. A continuación se centrifuga nuevamente durante 5 minutos a la misma velocidad, se descarta el etanol y se deja secar el pellet aproximadamente 10 minutos, hasta que se torna transparente. Luego el RNA se resuspende en agua. Para lograr una mejor disolución se incuba a 55°C por 10 minutos.

Para la cuantificación del RNA se utilizó 1ul de la muestra y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm en un NanoDrop (Thermo – NanoDrop 2000). La pureza de las muestras se determinó mediante el índice de absorbancia a 260/280 nm. Una relación de 1,8-2 de este índice es indicativa de una alta pureza del RNA obtenido.

La integridad del RNA de las muestras es realizar una electroforesis a 30 V/cm en geles de agarosa 1 % en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de etidio. Solo son utilizadas aquellas muestras que no mostraron ningún grado de degradación.

13. Preparación de DNAc

Para la síntesis de DNA complementario a partir del RNA extraído, el RNA contenido en 5 µl fue desnaturalizado a 65°C por 5 min, incubado a 0°C por 2 min y mezclado con 15 µl de una solución “Mix” conteniendo buffer 5X de la enzima transcriptasa reversa MMLV (ver adelante) (Tris-HCl 50 mM pH:7.3; KCL 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM), 20 U de RNAsin (Promega), dNTPs 400 µM, Oligo dT 2.5 µM y 300 U de transcriptasa reversa MMLV-RT (virus de la leucemia murina de Moloney). Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 min, luego a 39°C durante 60 min y finalmente la enzima fue desnaturalizada durante 95°C durante 5 min.

14. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó utilizando 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Promega) en 50 µl de reacción que contiene 5 µl de buffer de reacción 10X, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de dNTPs y 100 pM de cada primer. Las condiciones de ciclado térmico fueron la siguientes: Primero, desnaturalización a 94°C por 1 min; luego “annealing” o anillado a 55–65°C (dependiendo de cada par de primers); luego elongación a 72°C por 2 min, Estos pasos se repitieron durante 30 - 35 ciclos y finalmente se realizó un paso adicional de extensión a 72°C por 10 min.

El producto de PCR se resuspendió en buffer de siembra 6X (0.25 % p/v de Azul de bromo fenol; 0.25 % p/v de Xylen Cyanol; 0.30 % p/v de glicerol) antes de sembrar. El producto de PCR y un marcador de peso molecular, en nuestro caso el 1 Kb plus Ladder (Invitrogen), se sembraron en un gel de agarosa 1 % en buffer TAE 1X, con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta.

15. qPCR o PCR en Tiempo Real

El DNAc obtenido de las extracciones de RNA que debían ser cuantificadas, fue sujeto a PCR en tiempo real.

En el caso de la PCR en tiempo real es un requisito indispensable obtener un único producto que correlacione con un único pico de fluorescencia detectado por el termociclador. La obtención de un único pico así como la forma final de ese pico dependen de ciertos factores como la concentración de MgCl₂, la temperatura de “annealing”, la calidad y cantidad del DNAc, la secuencia de los primers y la longitud del producto final. Se determinó la concentración de Magnesio óptimo para cada par de primers variando inicialmente entre 2 y 4 mM de Magnesio, concentración final.

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

La Tabla M1 muestra la secuencia y la temperatura de annealing de los primers utilizado en este trabajo.

Se realizaron las mezclas de reacción correspondientes, según la concentración de Magnesio requerida, junto con 0.3 µl de Taq polimerasa (Invitrogen), 2,5 µl de buffer de reacción 10X, primers correspondientes, dNTPs 0.6 mM con el agregado de SYBR green (0.025 µl por reacción de una solución de trabajo 1/30 en DMSO (Roche)), a un volumen final de 25 µl. El DNAc fue diluido de 3 a 10 veces y se agregaron 5 µl en cada tubo. Cada punto fue medido por duplicado o triplicado para evitar errores de medición.

Primer	Especie		Secuencia	Temperatura de Anneling
HO-1	Mouse	F	AGGAGCGATAGATATACTG	66C
		R	CAACACTTCTGCCAATAG	64C
Nrf2	Mouse	F	CTTTAGTCAGCGACAGAAGGAC	55C
		R	AGGCATCTTGTTTGGGAATGTG	56C
VEGF	Mouse	F	GGAGACTCTTCGAGGAGCACTT	58C
		R	GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGA A	55C
GAPDH	Mouse	F	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC	60C
		R	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG	60C
vGPCR	KSHV	F	TGTGTGGTGAAGGAGGACAAA	51C
		R	GTTACTGCCAGACCCACGTT	54C

Tabla M1: Secuencia y temperatura de annealing de los primers utilizados

Para las PCR se utilizaron ciclos con las siguientes características:

- 1- 95°C 3 minutos
- 2- 95°C 20 segundos
- 3- 50 - 65°C por 20 segundos
- 4- 72°C por 20 segundos
- 6- Leer placa
- 7- Ir al paso 2, 35 veces
- 8- 95 °C 1 min
- 9- Curva de melting: de 65°C a 95°C, leer cada 0.1°C

La intensidad de fluorescencia fue graficada en función de los ciclos utilizando un algoritmo provisto por los fabricantes. El termociclador utilizado fue el Mx3000 de Stratagene.

La curva de melting se realiza con el fin de observar la presencia de un pico único como producto de la amplificación.

16. Cuantificación de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford. Brevemente se mezclaron 10 µl del extracto (provenientes de diluciones de 1 en 4 a 1 en 100, en H₂O) con 200 µl del reactivo de Bradford 1X (Bio-Rad). La concentración se determinó a partir de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro y la extrapolación de la misma en una curva estándar de BSA (0.5-10 µg/µl).

Se utilizó además el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo 23227) según las indicaciones del mismo.

17. Inmunoprecipitación

Se lavan las células con PBS frío, luego se *scrappean* con PBS y se pasan a un tubo eppendorf. Se centrifugan las células a 3000 rpm 30 segundos y se resuspende el pellet con 500ul de buffer RIPA (150ul por well de placa de 6 wells) con Inhibidores de proteasas. En este punto se puede guardar a -80°C. Se agitaron los tubos en un rotor 30 minutos a 4°C y luego se centrifugaron a 11100 rpm 30 minutos a 4°C. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se tomaron 50ul para el input. Al input se le agregó Cracking buffer y los guardamos a -20°C. Luego se tomaron 45ul de bolitas de A/G agarosa por tubo y marcamos el volumen. Lavamos con PBS 2 veces y centrifugamos a 3000 rpm 30 segundos. y Se reconstituyó el volumen inicial con buffer RIPA.

Para hacer el pre-clear incubamos los lisados con 15ul de bolitas A/G agarosa lavadas en el rotor 1 hora a 4°C. Se centrifugaron a 3000 rpm 30

segundos y se pasó a un tubo nuevo el sobrenadante con 1ug del anticuerpo con el que se va a inmunoprecipitar.

Se agitó en rotor 16 horas a 4°C. Luego se agregaron 30ul de bolitas A/G agarosa lavadas y se incubó en rotor 2 horas a 4°C. Se centrifugó a 5600 rpm 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavaron los inmunoprecipitados 3 veces con 400ul de buffer RIPA frío y una vez con PBS. Se agregó al inmunoprecipitado 35 – 40ul de Cracking Buffer (2X) y se incubaron 5 minutos a 95C.

Soluciones

- Buffer RIPA

50 mM Tris – HCl pH 7.5

50mM NaCl

1% NP-40

10% Glicerol

0.1% SDS

2mM EDTA pH 8

- Inhibidores

PMSF (100X)

IP Sigma (100X)

NaF (100X)

Ortovanadato (100X)

b-Glicerofosfato (100X)

DTT (500X)

18. Western Blot

18.1 Preparación de los extractos celulares

Se prepara el buffer de lisis (RIPA) agregando a ultimo momento el DDT y PMSF (RIPA: 25 mM HEPES, pH7.5, 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 20 mM beta-glicerofosfato, 1 mM sodio vanadato, and 1 mM PMSF, and 0.4 M NaCl). Se

lavaron las células con PBS 1X frío y se agrega buffer de lisis (100ul por cada placa de 6cm).

Una vez que los lisados celulares se pasaron a tubos eppendorfs se dejan en hielo durante 10-20 minutos y luego se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se cuantificó la cantidad de proteína utilizando el kit de BCA y se prepararon las muestra agregando al volumen conteniendo la masa de proteínas deseada Laemmli Buffer 2X o 5X.

En algunos casos después del lavado con PBS se agregó Laemmli Buffer 2X directamente a la placa (100ul por cada placa de 6 cm).

Las muestras fueron calentadas a 95C durante 5 – 10 minutos.

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

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12 %* o al 10 %** de mm de espesor. Luego de la siembra de las muestras, la corrida electroforética fue llevada a cabo en una cuba de electroforesis (mini Protean, Bio-Rad) a 100 V constante en buffer de electroforesis (15.1g Tris; 94 g glicina; 50 ml de SDS 10 %) durante 1 a 3 horas.

Se utilizó el marcador de peso molecular para proteínas All Blue (Bio-Rad) como referencia.

Preparación de geles:

- Gel de poliacrilamida al 12 % (gel de resolución): 3.3 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 4 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.
- Gel de poliacrilamida al 10 % (gel de resolución): 4 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5 M Tris-HCl pH: 8,6); 3,3 ml de acrilamida 30 %/ bisacrilamida 0,8 %; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10 % y 100 µl de persulfato de amonio 10%.

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

18.3 Transferencia

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

Luego la membrana se bloquea una hora con 5% leche descremada en TTBS (0.05 % Tween-20 en TBS). Se hacen 3 lavados con TTBS, de 10 minutos cada uno. Se agrega el primer anticuerpo a la concentración óptima en la misma solución de 5% leche descremada en TTBS y se incuba ON a 4C. Se realizan 3 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno y se agrega el anticuerpo secundario de la especie correspondiente en una dilución 1:3000 para anticuerpos conjugados a HRP y 1:15.000 para anticuerpos conjugados a fluoróforos (Li-Cor) durante 1 hora a temperatura ambiente. En el caso de los anticuerpos conjugados a fluoróforos la incubación se realiza protegida de la luz. Finalmente se realizan 2 lavados con TTBS de 10 minutos cada uno y un lavado con TBS, para eliminar exceso de segundo anticuerpo y restos de detergente que interfieren el revelado.

La proteína HRP - peroxidasa (horse-radish peroxidase) acoplada al anticuerpo secundario, reacciona con el reactivo ECL (Enhanced chemoluminescence, Millipore) para dar quimioluminiscencia que puede ser observada con un dispositivo especial o mediante placas fotosensibles. Luego del agregado del reactivo y de la exposición, se revela mediante exposición a placas radiográficas.

En el caso del revelado por fluorescencia (emisión de luz a 700nm u 800nm) se utilizó un equipo Odyssey (Li-Cor).

Soluciones:

- 5X de Laemmli buffer: 0.3125M Tris pH=6.8; 10% SDS; 25% glicerol; 0.05% bromo fenol blue; 10% β -mercaptoetanol.
- 10X Buffer Tris-glicina (transferencia, para Westerns Blot): para 1 litro; 29g glicina; 58g Tris base; 3.7g SDS; en el momento la solución 1X se prepara con 20% metanol
- 1X Buffer de Corrida: para 1 litro; 100ml 10X Buffer Tris-Glicina; 5ml SDS 20%; llevar a volumen con H₂O.
- 1X Buffer de Transferencia: para 1 litro; 100ml 10X Buffer Tris-Glicina; 200ml Metanol; llevar a volumen con H₂O.
- TTBS: Tris 20mM pH=7.5, NaCl 9g/litro, 0.05% -0.1% Tween 20.

19. Ensayos de detección de la actividad luciferasa

Seguido del tiempo indicado de incubación luego de la transfección con el plásmido reportero, se lavan las células con PBS 1X. Se agregan 200 μ l de buffer de lisis 1X (5X Reporter Lysis Buffer, Promega) por pocillo de una placa de 6 pocillos y se incuba 10 min a temperatura ambiente. En este punto se puede guardar a -80C. Se trasvasan los lisados a tubos eppendorf y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min. Se recuperan los sobrenadantes sobre los que se ensaya la actividad enzimática.

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

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

Se anotan los valores obtenidos de las Unidades Relativas de Luciferasa (URL) y se procede al análisis de los datos, normalizando estos

valores con los obtenidos para el ensayo de β -galactosidasa, es decir el cociente entre URL y los valores de β -galactosidasa.

20. Medición de la actividad de β -galactosidasa

En placas de 96-wells se mezclan un volumen del extracto de células transfectadas en Buffer de Lisis (mismo lisado que para medir Luciferasa) y un volumen de buffer β -gal 2X (0.2 M Fosfato de sodio pH 7,4; 2 mM $MgCl_2$; 0.1 M β -mercaptoetanol; 1.33 mg/ml (ONPG) Orto-nitro-fenil-galactopiranosido). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 200 μ l. Luego Se incubó a 37 °C hasta la aparición de color amarillo moderado.

Se cuantifica la aparición del producto coloreado (orto-nitro-fenol) midiendo la absorbancia a 415 nm en un lector de Elisa (Bio-Rad). Los valores se consideran que entran en el rango lineal (Ley de Lambert – Beer) cuando están entre 0.2 – 0.8.

21. Inmunofluorescencia

Para realizar los ensayos de visualización de proteínas fluorescentes, células NIH3T3 fueron plaqueadas sobre cubreobjetos. Las células fueron hambreadas durante 2 horas o durante 16 horas y tratadas o no con SB203580 (Calbiochem) o PD98059 (Calbiochem).

Luego se lavaron con PBS 1X 3 veces, se fijaron con Paraformaldehído 4% y luego de 3 lavados con PBS 1X se permeabilizaron con 0.05% Triton X-100 en PBS 1X por 10 min. Luego de 3 lavados con PBS 1X los cubreobjetos fueron bloqueados con una solución de BSA/SFB 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron los cubreobjetos con la dilución específica de cada anticuerpo en solución de BSA/SFB 1% (anticuerpos primarios 1:500) durante 16 horas a 4°C. Después de 3 lavados con PBS 1X se incubaron con la dilución específica de anticuerpo secundario en solución de BSA/SFB 1% (anticuerpos secundarios 1:1000) (Alexa Fluor – Thermo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron los cubreobjetos y se incubaron con una solución de DAPI/PBS o

ioduro de propidio/PBS para teñir los núcleos durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS 1X se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos con Mowiol (Sigma) como medio de montaje.

La visualización de la localización subcelular de la proteína se realizó en un microscopio confocal Olympus, Fluoview FV1000, mediante un láser de 415 nm y un objetivo 60X de agua. El software pertenecía al fabricante.

22. Ensayos *in vivo* - Xenotrasplantes en ratones Atímicos

Se utilizaron X ratones machos *Nude* (BALB/c nu/nu), provenientes del Bioterio de la Universidad de La Plata, de entre 2 y 3 meses de edad mantenidos en el Bioterio de la FCEyN. Los animales fueron mantenidos con una dieta a base de alimento balanceado ad libitum, bajo condiciones controladas de luz (Fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad) a una temperatura entre 20 y 28⁰C según la época del año. Los animales fueron manipulados según normas internacionales acordes acorde con “NIH Guidelines” y el protocolo de trabajo correspondiente aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) FCEyN (#52). Los experimentos fueron realizados por duplicado con un mínimo de 3 ratones por grupo experimental.

Para evaluar el crecimiento tumoral, se inocularon subcutáneamente (sc) 1×10^6 células en PBS 1X en ambos flancos laterales de los ratones. El tamaño tumoral fue controlado por palpado hasta que alcanzó un valor lo suficientemente adecuado (aproximadamente 3-4 mm) para ser medido con calibre Vernier (largo x ancho, mm). Este procedimiento se repitió dos veces por semana hasta finalizar el experimento. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 17mm (correspondiente al peso de un tumor mayor al 10% del peso corporal normal del animal, en un ratón de 25 g, tumor subcutáneo de un diámetro de 17 mm) fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Se graficaron las curvas de crecimiento tumoral correspondientes (tamaño tumoral vs. Tiempo)

El volumen tumoral se calculó según la siguiente fórmula = $L \times W^2 \times 0.5$

L= largo (longest section)

W= ancho (shortest section)

Grupos de animales control y experimentales:

NIH 3T3 (WT)

NIH 3T3 vGPCR

NIH 3T3 vGPCR - shCtrl

NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 1 (Pool)

NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 2 (Pool)

NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 3 (Pool)

NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 2.1 (clon)

Los tumores se extirparon mediante un corte subcutáneo con ayuda de tijera y pinza. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% en PBS 1X, luego se incluyeron en parafina según técnicas de rutina para procesamiento histológico. Los cortes se evaluaron por Hematoxilina & Eosina (H&E).

23. Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante ANOVA seguido del test de Dunnett en donde se comparan todas las condiciones contra el control del experimento. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 7.0 para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

Resultados

4.1 Elementos genómicos en el promotor de HO-1 involucrados en la activación por vGPCR.

Como mencionamos anteriormente en introducción, resultados previos de nuestro laboratorio y colaboradores, han demostrado que vGPCR induce el promotor de HO-1^{101,264}. Por otro lado se sabe que el promotor de HO-1 contiene dos sitios ARE (Figura 4 Introducción) que son reconocidos por el factor de transcripción Nrf2. Nos preguntamos entonces cuál es el rol de esos u otros elementos genómicos en el promotor de HO-1 involucrados en la activación de HO-1 por señalización disparada por vGPCR. Realizamos ensayos de genes reporteros en donde utilizamos una serie de construcciones en donde el gen de la luciferasa está regulado por deleciones seriadas del promotor de HO-1 para determinar la región que responde al vGPCR. El constructo control contiene 4.9Kb del promotor murino de HO-1 (HO-1 4.9 Luc). Las siguientes deleciones contienen 3.8Kb (HO-1 3.8 Luc), 1.4Kb (HO-1 1.4 Luc) y 0.3Kb (HO-1 0.3 Luc) del mismo promotor murino de HO-1 (Figura R1). Como se observa en la Figura R2, la pérdida del sitio ARE produce una disminución en la actividad del reportero. Este resultado resalta que el sitio ARE está involucrado en la activación del promotor de HO-1 dado que hay una disminución en la actividad luciferasa entre los sitios que están en la posición 4.9 Kb y 3.8Kb.

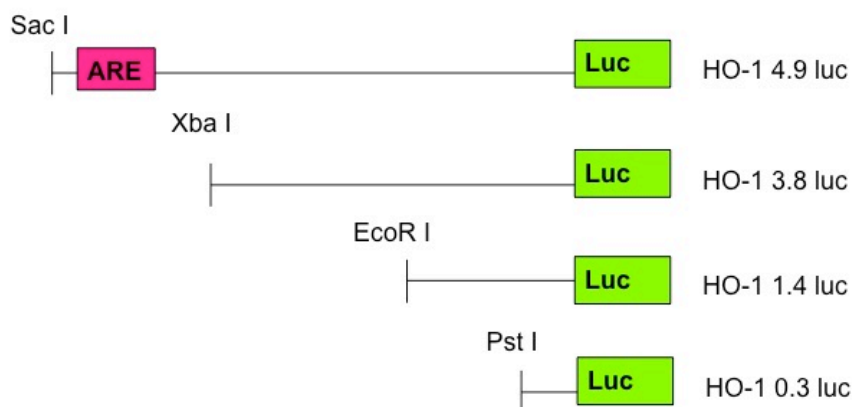


Figura R1: Esquema de las deleciones seriadas de la región 4.9KB del promotor de HO-1.

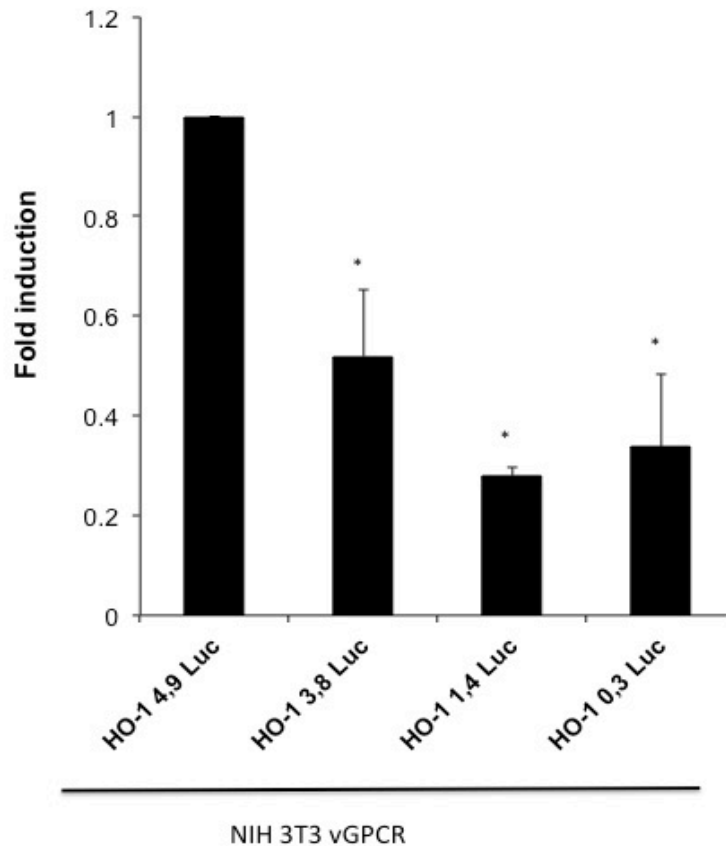


Figura R2: Actividad Luciferasa de las deleciones seriadas del promotor de HO-1, 4.9Kb, 3.8Kb, 1,4Kb, 0.3Kb. Células NIH 3T3 vGPCR fueron transfectadas con las distintas construcciones reporteras y un vector de expresión para la enzima b-galactosidasa. Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción respecto al resultado dado por el constructo de 4.9Kb

4.2 Relevancia de los sitios ARE en la activación de HO-1 mediada por vGPCR

Dado que observamos que la pérdida del sitio ARE disminuye la actividad del promotor de HO-1 y sabiendo que estos sitios son reconocidos por el factor de transcripción Nrf2, nos preguntamos si Nrf2 es importante en la activación del promotor de HO-1 mediada por vGPCR. Para eso realizamos ensayos de genes reporteros utilizando el promotor de HO-1 murino río arriba del gen de la luciferasa (pmHO-1 Luc) y co-transfectamos vGPCR (pCEFL-AU5-vGPCR) (Figura R3 A), vGPCR y Nrf2 WT (pCDNA 3 His B – V5 Nrf2) (Figura R3 B) y vGPCR y un dominante negativo de Nrf2, Nrf2 DN (pEF/myc Nrf2 DN) (Figura R3 C). Lo primero

que se puede observar es que la expresión de vGPCR produce un incremento del 70% en la actividad del promotor de HO-1 (Figura R3 A). Además, la co-transfección de vGPCR con Nrf2 WT produce un aumento de 30 veces respecto a la sobreexpresión de vGPCR solo. Más aún, la co-transfección de vGPCR con un dominante negativo de Nrf2 produce una disminución en la activación del promotor de HO-1 respecto a la dada por la expresión de vGPCR solo, lo que estaría indicando de dos modos alternativos que en la activación del promotor de HO-1 por vGPCR participa Nrf2.

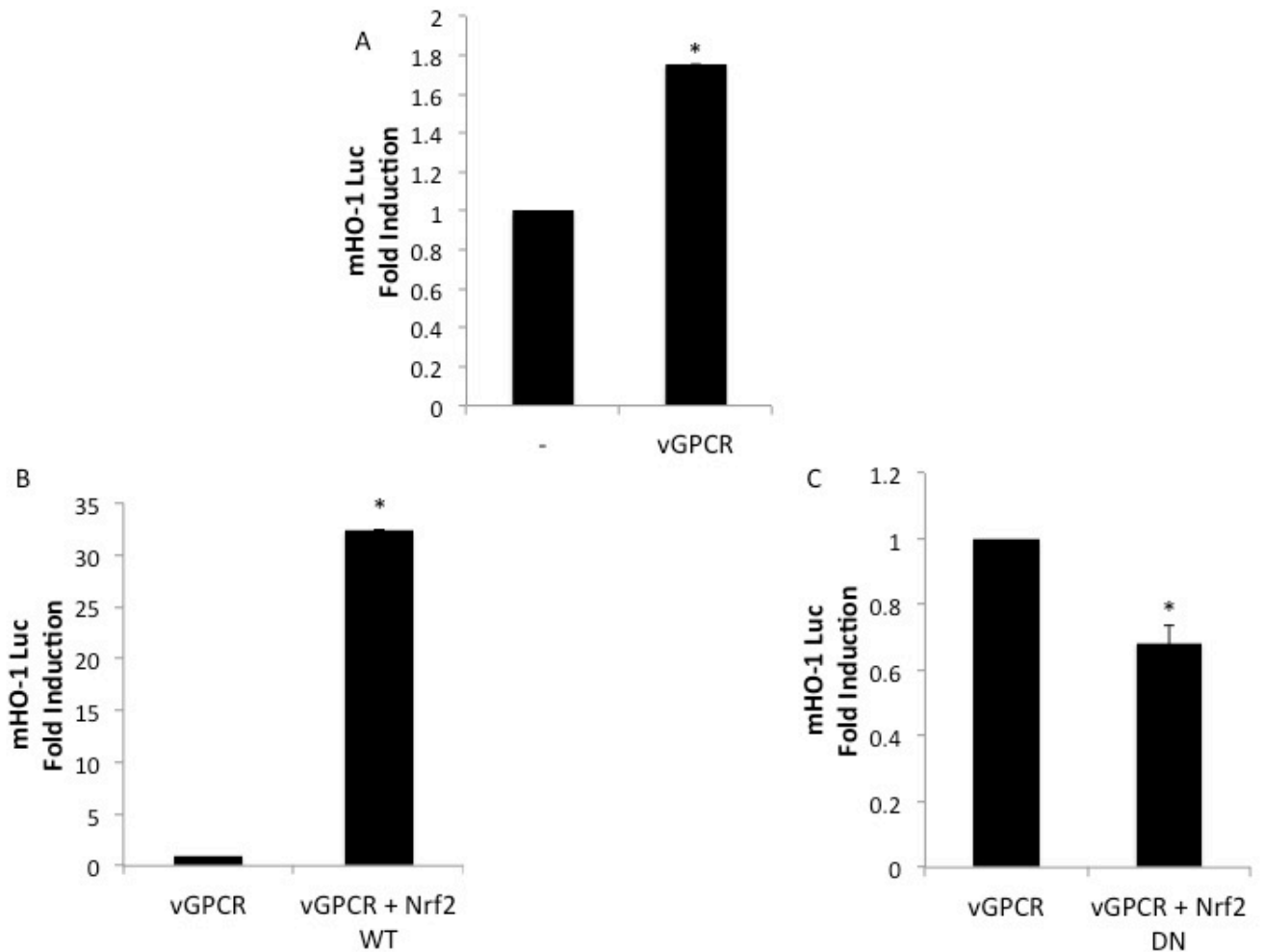


Figura R3: Actividad del promotor mHO-1. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, Nrf2 WT (Wild Type) y Nrf2 DN (dominante negativo). Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción relativizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

Luego nos propusimos corroborar si los sitios ARE son los responsables de la activación del promotor de HO-1 por vGPCR. Para esto utilizamos una construcción reportera que contiene un promotor mínimo más tres sitios ARE río arriba del gen de luciferasa, Nrf2 ARE Luc (pGL3pv Nrf2 3xARE Luc). Lo primero que hicimos fue validar que este reportero respondiera a Nrf2 y para eso lo co-transfectamos con Nrf2 WT o con Nrf2 DN. Como se observa en la Figura R4, la sobreexpresión de Nrf2 WT produce un incremento en la actividad de este reportero de más de treinta veces respecto al control mientras que el dominante negativo de Nrf2 no tiene efecto alguno en la activación de los sitios ARE.

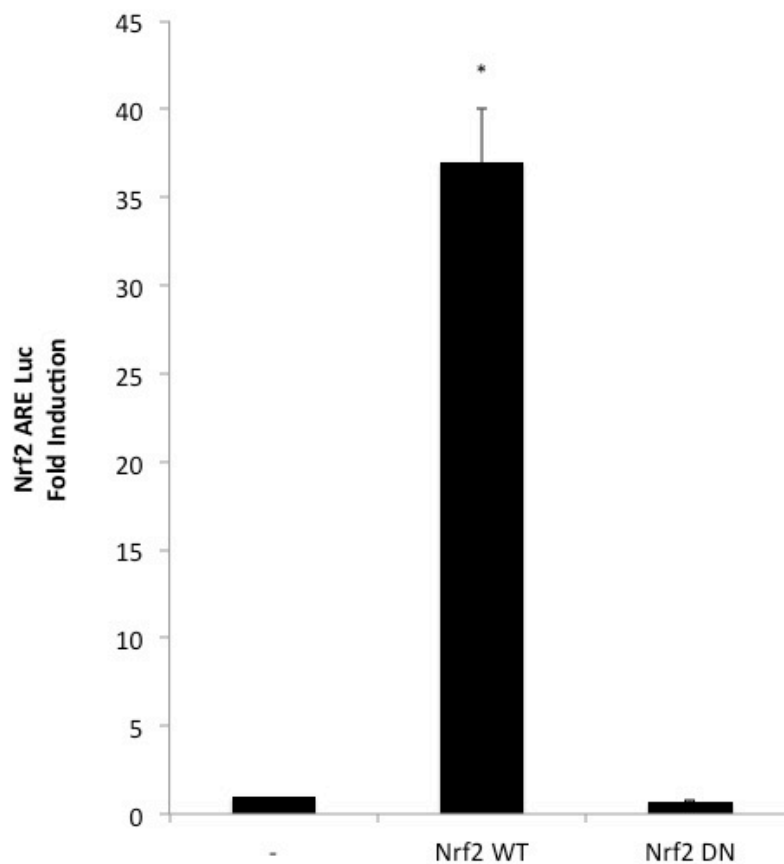


Figura R4: Actividad Luciferasa de un promotor mínimo con 3 sitios ARE en tándem. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para Nrf2 WT (Wild Type) o Nrf2 DN (dominante negativo). Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

Nos preguntamos luego si vGPCR tenía la capacidad de activar sitios ARE. Como se observa en la Figura R5 la sobreexpresión de vGPCR produce un aumento de este promotor mínimo con sitios ARE en tándem. La pregunta que surge luego es si la activación de ese promotor es vía Nrf2 o independiente del mismo. Para responder esto co-transfectamos vGPCR con Nrf2 WT o con Nrf2 DN.

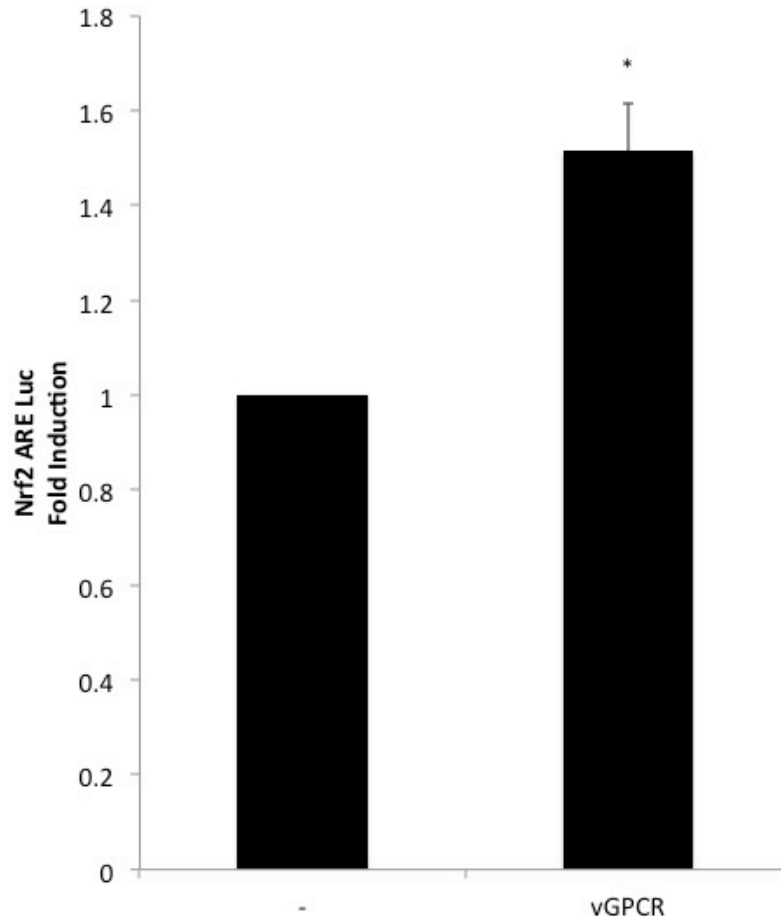


Figura R5: Actividad Luciferasa de un promotor mínimo con 3 sitios ARE en tándem. Se co-transfectó el gen reportero con un vector de expresión para vGPCR. Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

Como se observa en la Figura R6 A, al co-transfectar con vGPCR y Nrf2 WT el efecto obtenido fue superior a la suma de los efectos individuales lo que podría indicar que ambas proteínas están en la misma vía. Más aún y para

confirmar esto, la co-transfección de vGPCR con un dominante negativo de Nrf2 produjo un efecto menor al obtenido con vGPCR sólo (Figura R6 B).

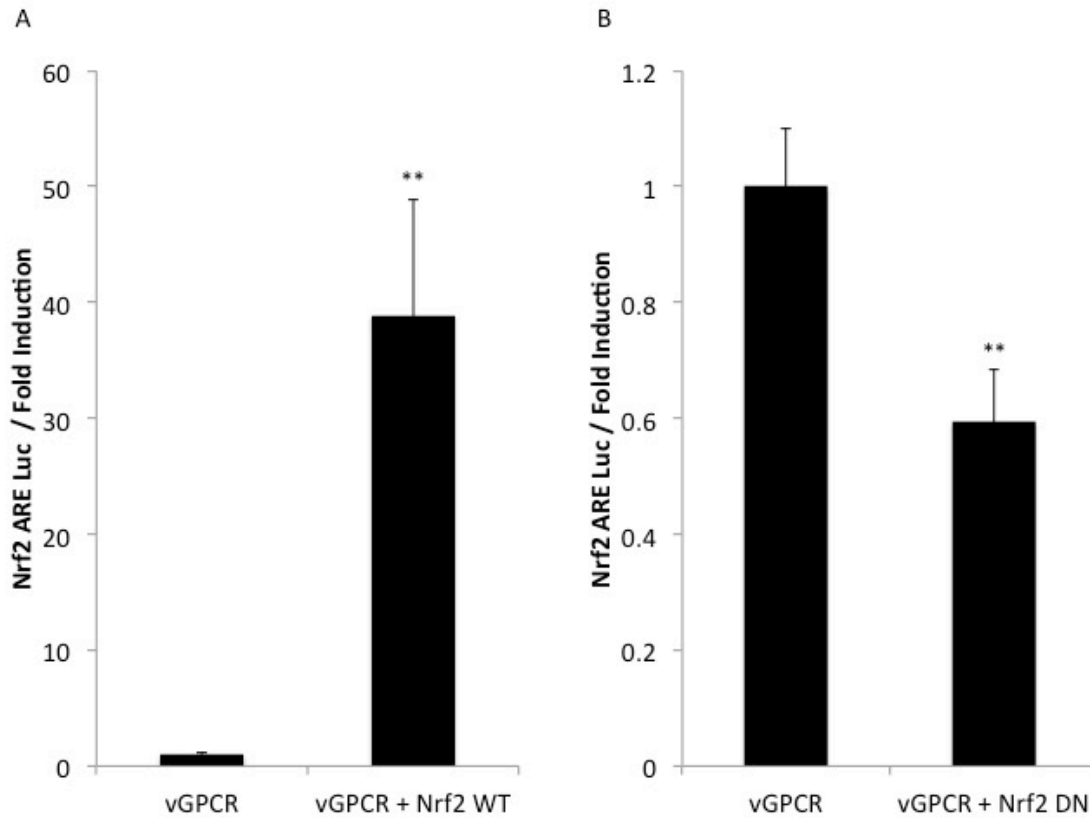


Figura R6: Actividad Luciferasa de un promotor mínimo con 3 sitios ARE en tándem. A) Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR o vGPCR más Nrf2 WT. B) Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR o vGPCR más Nrf2 DN. Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

Los resultados obtenidos hasta aquí nos sugieren que en la activación de los sitios ARE del promotor de HO-1 mediada por vGPCR, el factor de transcripción Nrf2 posee un rol fundamental.

4.3 Componentes transductores de señales involucrados en la señalización disparada por vGPCR

Teniendo en cuenta que fue reportado previamente que río abajo de vGPCR se activan las proteínas G12/13 y RhoA, y que éstas producen un aumento en la actividad del promotor de HO-1²⁶⁴, nos propusimos estudiar si estos componentes involucrados en la señalización por vGPCR influyen directamente en la activación de los sitios ARE. Para esto hicimos ensayos de genes reporteros utilizando el plásmido Nrf2 ARE Luc y co-transfectando con G12QL (pCDNA3 G α_{12} QL), G13QL (pCEFL HA G α_{13} QL) y RhoAQL (pCEFL AU5 RhoAQL), todas versiones constitutivamente activas. Como se muestra en la Figura R7 tanto vGPCR (como ya había sido demostrado en la Figura R5) como los intermediarios río abajo, G12/13 y RhoA, están involucrados en la activación de estos sitios ARE dado que observamos un aumento en la actividad del reportero cuando lo comparamos con el control.

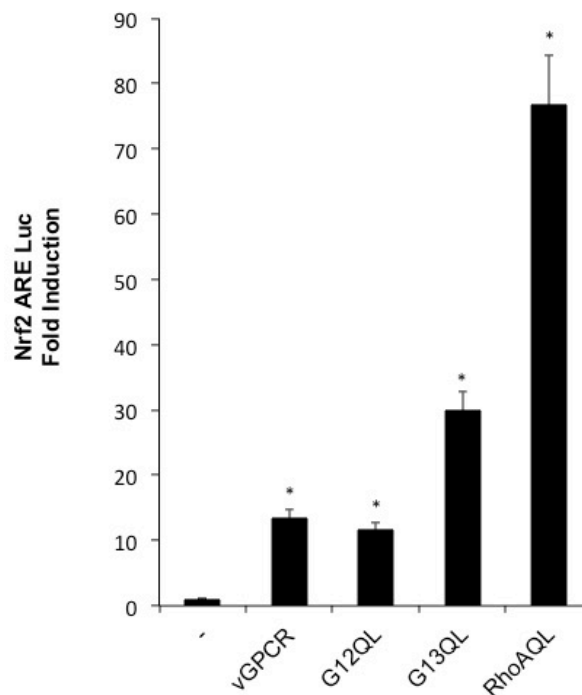


Figura R7: Actividad Luciferasa de un promotor mínimo con 3 sitios ARE en tándem. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, G12QL, G13QL y RhoAQL. Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

Luego nos preguntamos si en la activación de los sitios ARE, vGPCR y las proteínas G12/13 señalizan a través de la GTPasa RhoA o si lo hacen independientemente de ella. Para eso co-transfectamos vGPCR, G12QL y G13QL con o sin el dominante negativo de RhoA, RhoAN19 (pCEFL Rho N19 DN). Como se observa en la Figura R8, cuando vGPCR, G12QL y G13QL son co-expresadas con el dominante negativo de RhoA la activación del reportero se ve disminuída a valores similares al obtenido para el control. Estos resultados sugieren que tanto vGPCR como G12/13 activan los sitios ARE y lo hacen a través de la pequeña GTPasa RhoA.

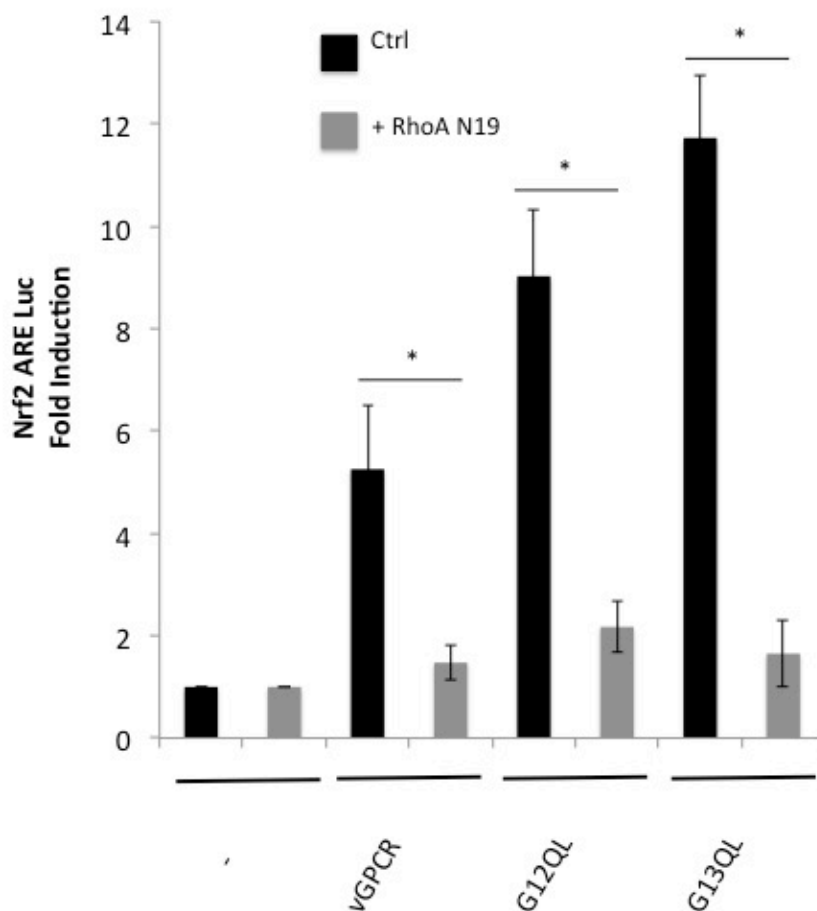


Figura R8: Actividad Luciferasa de un promotor mínimo con 3 sitios ARE en tándem. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, G12QL, G13QL con el agregado o no de RhoAN19 (dominante negativo). Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

4.4 Efectos directos sobre la actividad transcripcional de Nrf2

Con el objetivo de estudiar qué efectos tiene vGPCR y los elementos involucrados en la vía de activación de HO-1 sobre la actividad transcripcional del Nrf2 hicimos ensayos de luciferasa utilizando un sistema de fusión de la proteína GAL4 al dominio de transactivación de Nrf2 (Figura R9). En este sistema el gen de la luciferasa se encuentra río debajo de un promotor mínimo que contiene cinco sitios de unión a GAL4 en tándem (pG5 Luc) y es co-transfectado con una proteína de fusión que contiene el dominio de unión al DNA de GAL4 (GAL4 DBD) y el dominio de transactivación de Nrf2 (Nrf2 TAD) (pGAL4 Nrf2 TAD). Como puede observarse en la Figura R10 tanto vGPCR como sus mediadores río abajo producen un aumento en la actividad del sistema reportero, lo que estaría indicando un efecto directo sobre la activación del dominio de transactivación del factor de transcripción Nrf2.

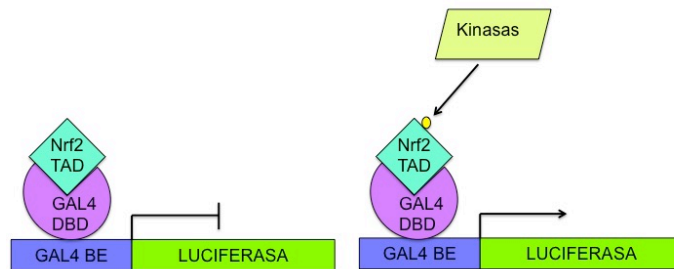


Figura R9: Esquema del sistema reportero para evaluar actividad transcripcional de Nrf2. El gen de la luciferasa se encuentra río debajo de un promotor mínimo que contiene cinco sitios de unión a GAL4 en tándem y es co-transfectado con una proteína de fusión que contiene el dominio de unión al DNA de GAL4 (GAL4 DBD) y el dominio de transactivación de Nrf2 (Nrf2 TAD).

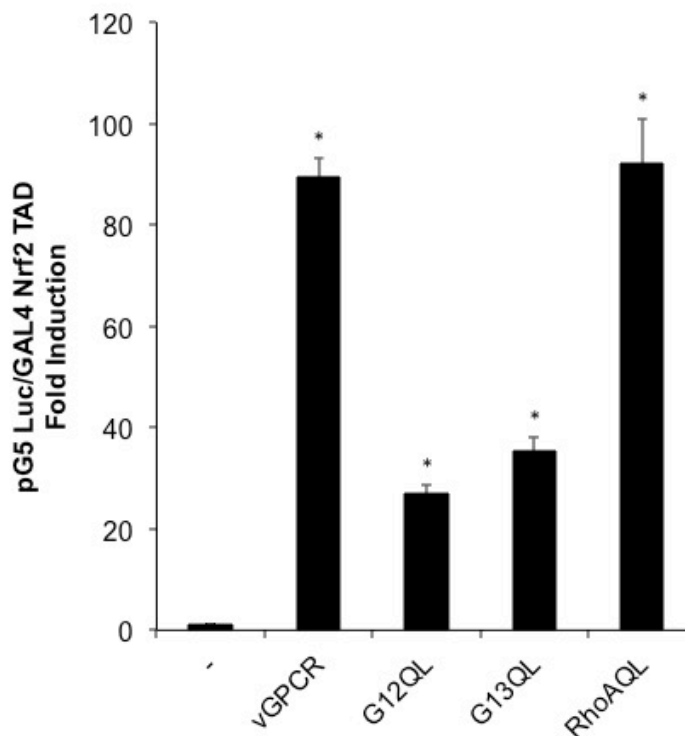


Figura R10: Actividad luciferasa del sistema reportero pG5 Luc / Gal4-Nrf2 TAD. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, G12QL, G13QL y RhoAQL. Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. Los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para el control (células transfectadas con el gen reportero y vector vacío).

4.5 Efectos sobre la traslocación nuclear de Nrf2

Dado que se sabe que en condiciones basales Nrf2 se encuentra en el citoplasma y que frente a estímulos activadores trasloca al núcleo, nos propusimos investigar si vGPCR tiene algún efecto sobre la traslocación nuclear de Nrf2 y si ese efecto es mediado por G12/13 y RhoA. Realizamos ensayos de Inmunofluorescencia para determinar la localización subcelular del factor de transcripción Nrf2 y observamos los resultados de la misma mediante microscopía confocal (Figura R11 A). La cuantificación se realizó utilizando el software ImageJ y se graficaron los resultados como fluorescencia nuclear sobre fluorescencia citoplasmática (Figura R11 B). Valores cercanos a uno indican localización “homogénea” mientras que valores mayores a uno indican localización principalmente nuclear y menores a uno indican localización principalmente citoplasmática. Como se puede observar en la Figura R11 la localización

subcelular de Nrf2 en condiciones basales (NIH 3T3) es principalmente citoplasmática, como también lo indica la relación de fluorescencia nuclear sobre fluorescencia citoplasmática que da un valor cercano a uno. Cuando observamos la localización subcelular de Nrf2 en líneas estables para vGPCR, G12QL, G13QL y RhoAQL podemos ver que es principalmente nuclear (relación fluorescencia nuclear sobre fluorescencia citoplasmática mayor a uno) (Figura R11). En la Figura R12 se muestra con más detalle la Figura R11.

Este resultado sugiere que tanto vGPCR como sus mediadores río abajo tienen efecto sobre la traslocación nuclear de Nrf2.

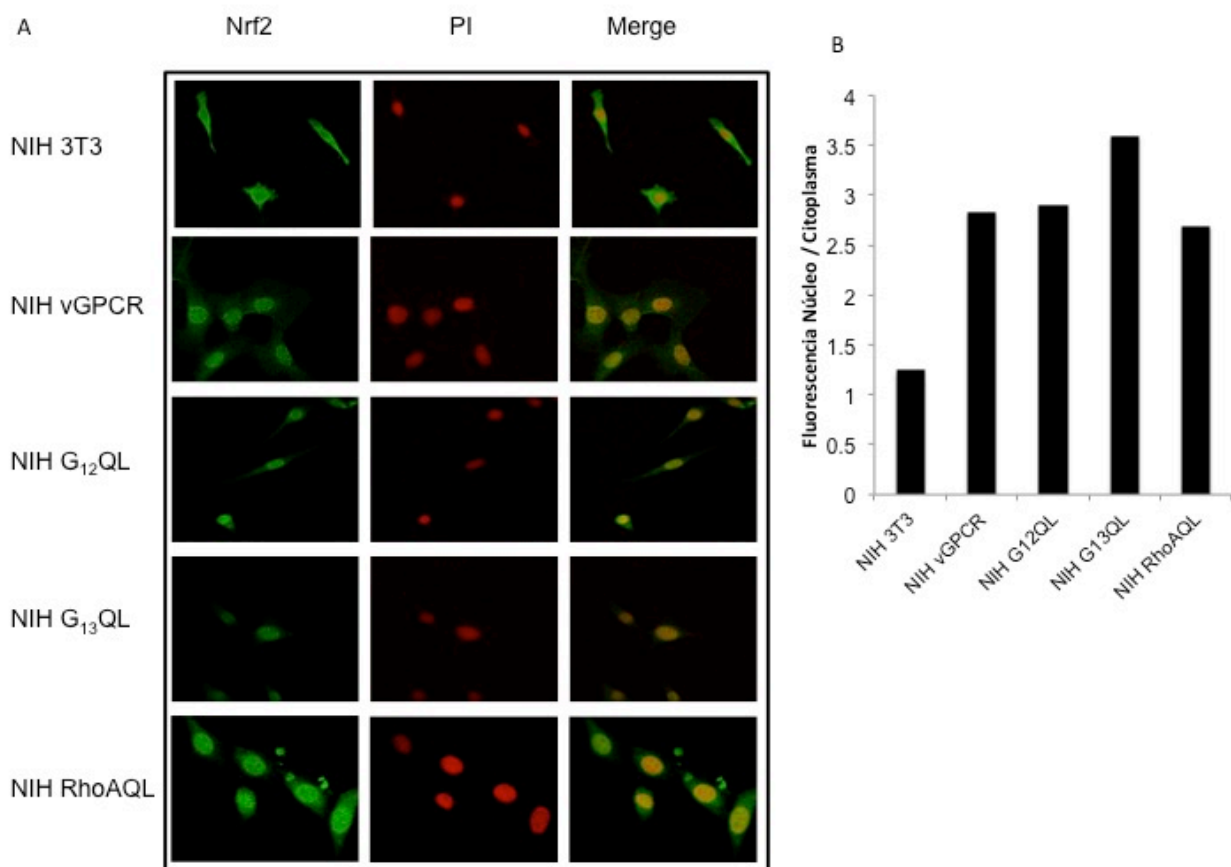


Figura R11: A) Transfección estable de células NIH 3T3 con vGPCR, G12QL, G13QL y RhoAQL inducen la traslocación nuclear de Nrf2. Microscopía confocal de células transfectadas (estable) con vGPCR, G12QL, G13QL y RhoAQL fueron incubadas con anti-Nrf2 y anti-rabbit FITC. Para la visualización de los núcleos se incubaron con Ioduro de Propidio. Magnificación 40X. Se muestran imágenes representativas de cinco campos analizados. B) Se cuantificó la intensidad de Fluorescencia nuclear y citoplasmática utilizando el software ImageJ. En el gráfico se puede observar la fluorescencia nuclear sobre la fluorescencia citoplasmática en cada línea celular.

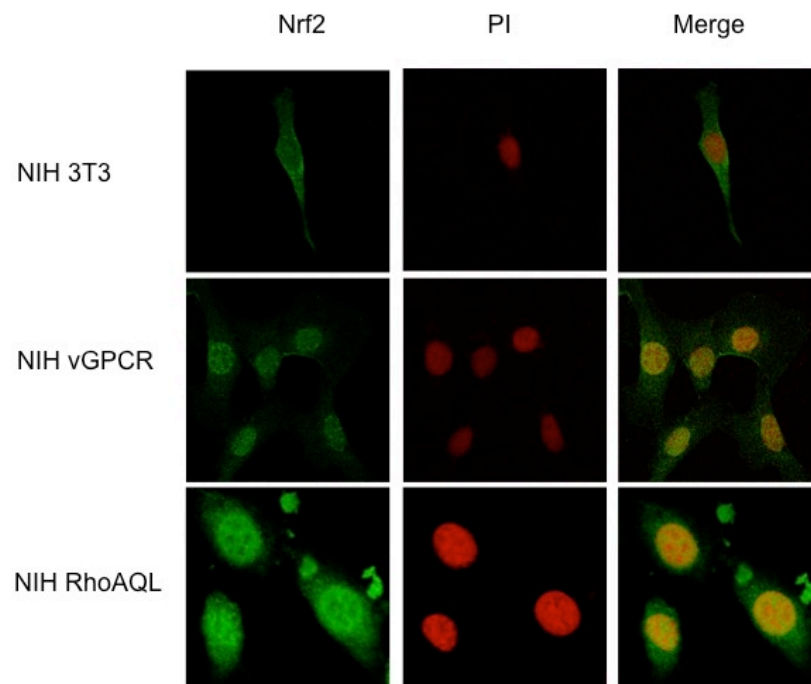


Figura R12: Se muestra con más aumento un detalle de lo observado en la Figura R10.

4.6 Activación de kinasas por vGPCR

Dado que está publicado por nosotros y por otros autores que vGPCR activa distintas kinasas en distintos modelos celulares, nos propusimos investigar cuáles están activadas en el estado en el que nuestro sistema celular se cultiva hoy en el laboratorio. Para demostrar qué kinasas son activadas por vGPCR realizamos ensayos de Western Blot y sembramos lisados totales de células NIH 3T3 y de NIH 3T3 vGPCR y analizamos la expresión endógena y los niveles de fosforilación de las distintas vías. Como se observa en la Figura R13 la expresión de vGPCR no activa las vías de Akt ni la vía de JNK. Como controles positivos utilizamos lisados totales de NIH 3T3 estimulados con PDGF durante 20 minutos.

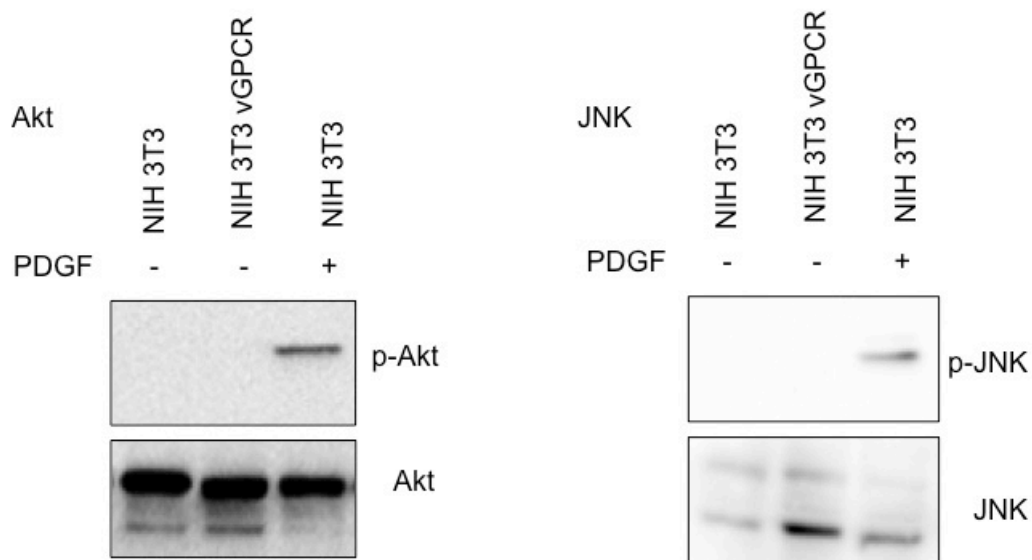


Figura R13: Western Blot de células NIH 3T3 y NIH 3T3 vGPCR. Se reveló con anti-pAkt/anti-Akt y anti-pJNK/anti-JNK. El control positivo se realizó estimulando células NIH 3T3 con PDGF 20 minutos.

Luego evaluamos el estado de activación de ERK1/2 y p38. En este caso los controles positivos los realizamos incubando células NIH 3T3 con PDGF durante 5 minutos para ERK1/2 o con Anisomicina durante 20 minutos para p38. Como se observa en la Figura R14 vGPCR aumenta la fosforilación tanto de ERK1/2 como de p38, indicando que existe un pathway que vincula a vGPCR con cada una de estas MAPKs.

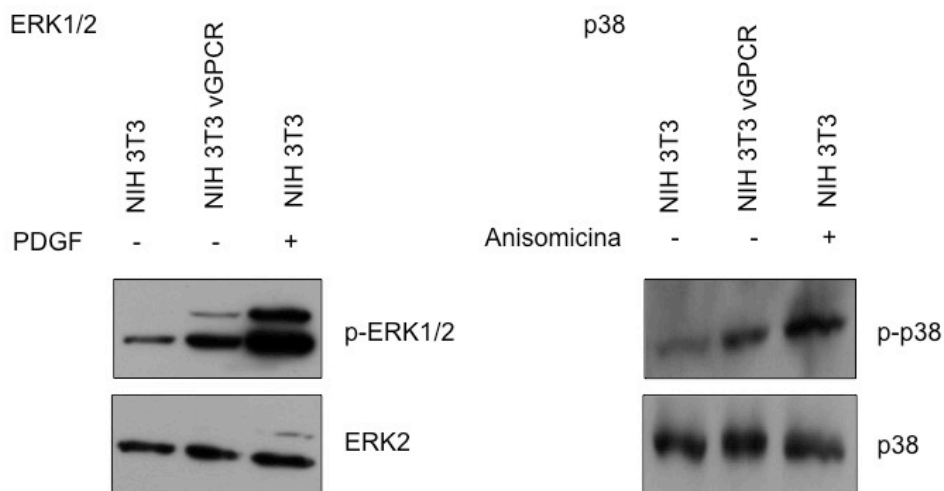


Figura R14: Western Blot de células NIH 3T3 y NIH 3T3 vGPCR. Se reveló con anti-pERK y anti-ERK. El control positivo se realizó estimulando células NIH 3T3 con PDGF 5 minutos. Se reveló con anti-p-p38 y anti-p38. El control positivo se realizó estimulando células NIH 3T3 con anisomicina 20 minutos.

4.7 Efectos de RhoA sobre ERK1/2

Habiendo visto que vGPCR no sólo actúa a través de la GTPasa RhoA sino que además activa la vía de ERK1/2, nos preguntamos si RhoA y ERK1/2 formaban parte de la misma vía o si eran vías independientes. Para responder esta pregunta realizamos ensayos de inmunoprecipitación en donde transfectamos con HA-ERK2 y co-transfectamos (o no) con el dominante negativo de RhoA (RhoAN19).

Utilizamos un anticuerpo anti-HA para inmunoprecipitar ERK2 y evaluamos los niveles de fosforilación utilizando un anticuerpo anti-fosfo ERK1/2. Como se observa en la Figura R15 tanto la sobre-expresión de vGPCR como de G12QL producen un aumento en la fosforilación de ERK (cuando se compara con el nivel de fosforilación observado en células NIH 3T3). Por otro lado, la co-transfección con el dominante negativo de RhoA produce una disminución en los niveles de fosforilación cuando se compara contra el control sin RhoAN19 en la misma línea celular. Este resultado indica que la activación de ERK1/2 por vGPCR y $G\alpha_{12}$ sería a través de RhoA.

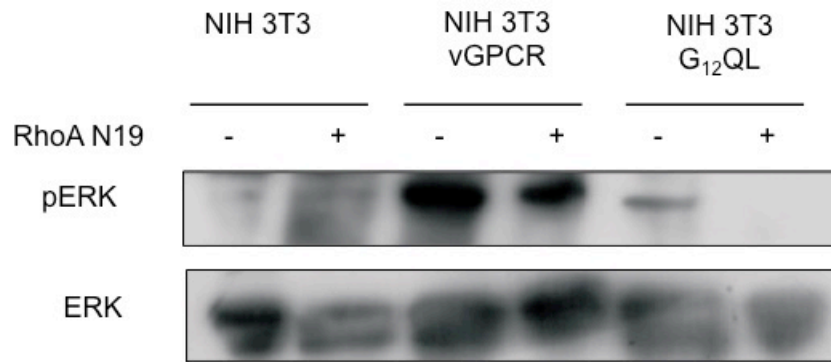


Figura R15: Ensayos de inmunoprecipitación. Células NIH 3T3, NIH 3T3 vGPCR y NIH 3T3 G12QL se co-transfectaron con HA-ERK2 y RhoAN19 (o no). La inmunoprecipitación se realizó utilizando un anticuerpo anti-HA. Se realizó el Western Blot con el inmunoprecipitado y se reveló con anti-pERK y anti-ERK1/2.

4.8 Efectos de ERK sobre actividad transcripcional de Nrf2

Habiendo visto que vGPCR tiene efectos no sólo sobre la localización subcelular de Nrf2 sino también sobre su actividad transcripcional y que vGPCR activa la vía de ERK1/2, nos propusimos evaluar los efectos que tiene ERK1/2 sobre la actividad transcripcional de Nrf2. Para esto realizamos ensayos de Luciferasa utilizando el promotor completo de HO-1 (Figura R16 A), el reportero Nrf2 ARE Luc (Figura R16 B) y el sistema reportero GAL4 Nrf2 TAD (Figura R16 C). Transfectamos células NIH 3T3 vGPCR con el plásmido reportero correspondiente y activamos la vía de ERK1/2 co-transfectando con un vector de expresión de MEKKEE (constitutivamente activo) o inhibimos la vía co-transfectando con un vector de expresión de MEKAA (dominante negativo) y evaluamos la activación del reportero correspondiente. En las Figuras R3 A, R5 y R10 se puede evidenciar que vGPCR activa estos tres promotores. En la Figura R16 A se puede observar que la co-transfección de vGPCR con MEKKEE no produce un aumento superior en la activación del promotor de HO-1 al producido por vGPCR. Esto puede deberse a que el sistema ya esté saturado con la sola expresión de vGPCR. Por otro lado, la co-transfección de vGPCR con MEKAA produce una disminución de la actividad del promotor de HO-1 respecto al efecto observado para vGPCR

solo, sugiriendo que la vía de ERK1/2 estaría participando en la activación del promotor de HO-1 por vGPCR.

En la Figura R16 B se puede observar que la co-transfección de vGPCR con MEKEE produce un aumento en la activación de los sitios ARE respecto al efecto observado con vGPCR solo. Por otro lado, la co-transfección de vGPCR con MEKAA produce una disminución en la actividad de este reportero respecto al efecto observado para vGPCR solo, indicando que la vía de ERK1/2 estaría participando en la activación de los sitios ARE por vGPCR.

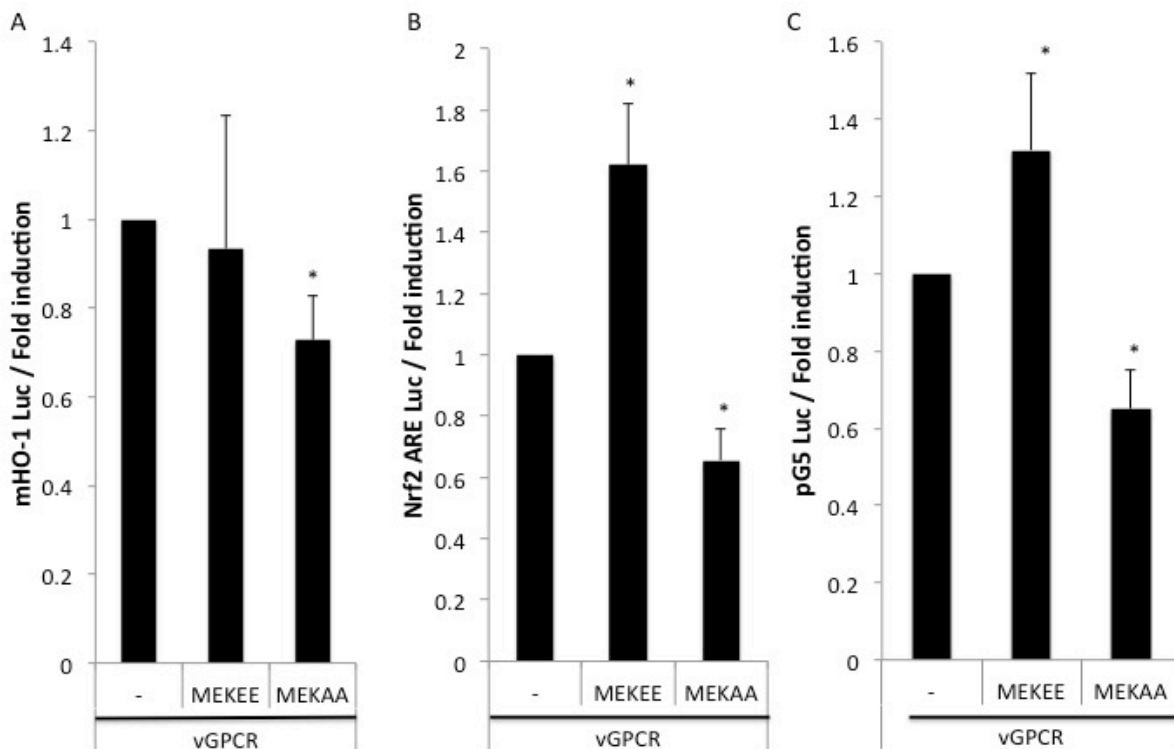


Figura R16: A) Actividad Luciferasa del promotor de HO-1. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, MEKEE (constitutivamente activo) y MEKAA (dominante negativo). B) Actividad Luciferasa de un promotor mínimo con 3 sitios ARE en tándem. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, MEKEE (constitutivamente activo) y MEKAA (dominante negativo). C) Actividad Luciferasa del sistema pG5 Luc / GAL4 Nrf22 TAD. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, MEKEE (constitutivamente activo) y MEKAA (dominante negativo). Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. En todos los casos los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para células que sobre-expresan vGPCR (células transfectadas con el gen reportero y vGPCR).

En la Figura R16 C se puede observar que la co-transfección de vGPCR con MEKEE produce un aumento en la activación del sistema pG5 Luc / GAL4 Nrf2 TAD respecto al efecto observado con vGPCR solo. Por otro lado, la co-transfección de vGPCR con MEKAA produce una disminución de la actividad de este reportero respecto al efecto observado para vGPCR solo, lo que indicaría que vGPCR induce la actividad transcripcional de Nrf2 a través de la vía de ERK1/2.

Estos resultados sugieren que la vía de ERK1/2 es importante no sólo en la activación del promotor de HO-1 sino más específicamente en la activación de los sitios ARE y la actividad transcripcional de Nrf2.

4.9 Efectos de ERK sobre la localización subcelular de Nrf2

Como mencionamos en la introducción, ha sido descrito que en condiciones basales Nrf2 se encuentra en el citoplasma (unido a Keap1 y direccionado a degradación por proteosoma) y que frente a determinados estímulos este complejo se disocia y Nrf2 puede entrar al núcleo. Esto nos llevó a preguntarnos si el efecto de traslocación nuclear de Nrf2 inducido por vGPCR era mediado por ERK. Para responder esta pregunta hicimos ensayos de Inmunofluorescencia para Nrf2 y comparamos células NIH 3T3 vGPCR tratadas o no con el inhibidor de MEK PD98059 (20uM 2 horas). Como se observa en la Figura R17 en células NIH 3T3 vGPCR Nrf2 se encuentra en el núcleo (ver también Figura R11) mientras que el tratamiento de estas células con el inhibidor PD impide este efecto, es decir, Nrf2 es retenido en el citoplasma. Este resultado sugiere que ERK1.2 participa en la traslocación nuclear de Nrf2 por vGPCR.

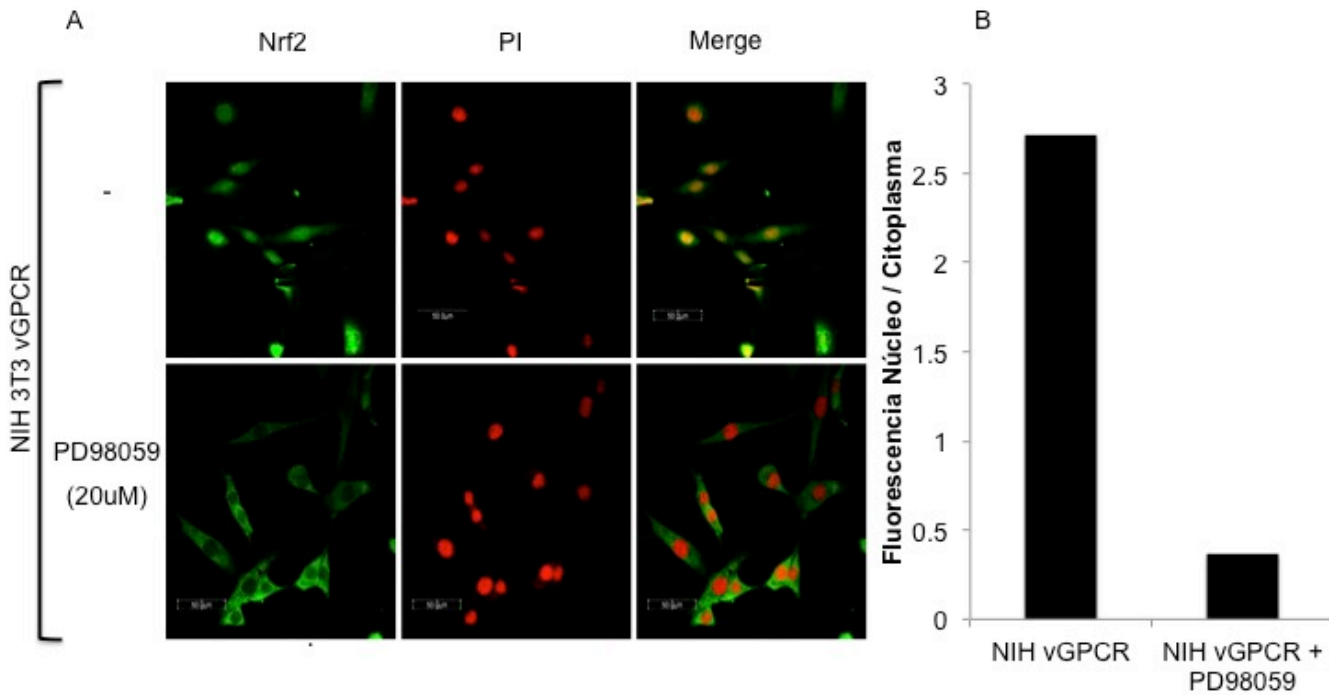


Figura R17: Células NIH 3T3 vGPCR fueron tratadas (o no) con el inhibidor de MEK PD98059 durante 2 horas. Luego se realizó la Inmunofluorescencia con anti-Nrf2 y anti-rabbit FITC. Para la visualización de los núcleos se incubaron con Ioduro de Propidio. Magnificación 40X. Se muestran imágenes representativas de cinco campos analizados. B) Se cuantificó la intensidad de Fluorescencia nuclear y citoplasmática utilizando el software ImageJ. En el gráfico se puede observar la fluorescencia nuclear sobre la fluorescencia citoplasmática en cada línea celular.

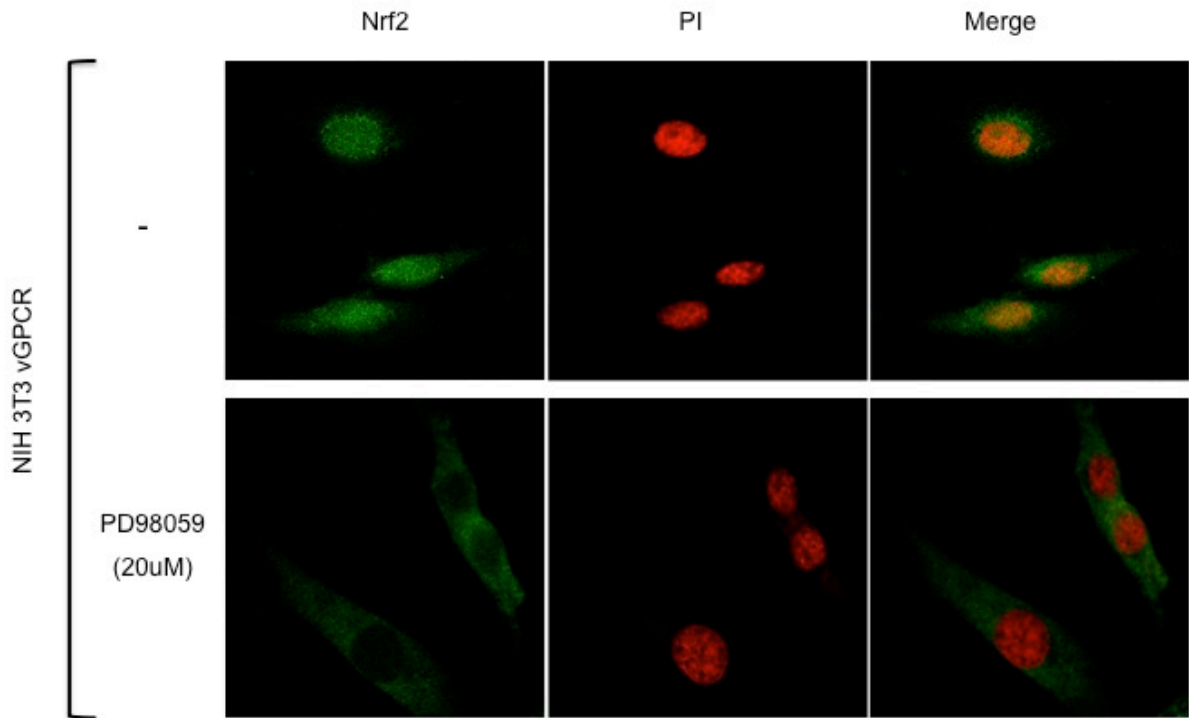


Figura R18: Se muestra con más detalle lo observado en la Figura 17.

4.10 Efectos de vGPCR sobre los niveles de Nrf2

Hemos descrito en la introducción que en condiciones basales Nrf2 es dirigido a degradación vía proteosoma. Nos preguntamos entonces si vGPCR tenía la capacidad de aumentar la estabilidad de esta proteína. Para responder esto realizamos ensayos de Western Blot y comparamos los niveles de Nrf2 total en células NIH 3T3 y NIH 3T3 vGPCR. Relativizamos el valor observado a GAPDH. Como se puede observar en la Figura R19 la expresión de vGPCR produce un aumento en los niveles de Nrf2 totales de aproximadamente tres veces. Luego nos preguntamos si vGPCR sólo aumentaba los niveles de proteína o si también aumentaba los niveles de fosforilación de Nrf2. Para responder esto realizamos ensayos de Western Blot pero esta vez utilizando un anticuerpo que reconoce la Nrf2 fosforilado. En este caso también relativizamos a GAPDH porque, dado que en condiciones basales se detectan niveles de Nrf2 total muy bajos, relativizar a este valor nos llevaría a sobreestimar el valor real de fosfo-Nrf2 en células NIH 3T3. Cabe destacar que se reveló utilizando el sistema Odyssey y debido a que cada anticuerpo secundario tiene acoplado un

fluoróforo que emite a diferente longitud de onda (680 nm y 800 nm) nos permitió revelar las tres proteínas en la misma membrana (Nrf2, fosfo-Nrf2 y GAPDH). Como se observa en la Figura R20, la expresión de vGPCR produce un aumento en los niveles de Nrf2 fosforilado. Estos resultados sugieren que la expresión de vGPCR no sólo produce un aumento en los niveles de Nrf2 totales sino que además produce un aumento en el nivel de fosforilación de este factor de transcripción.

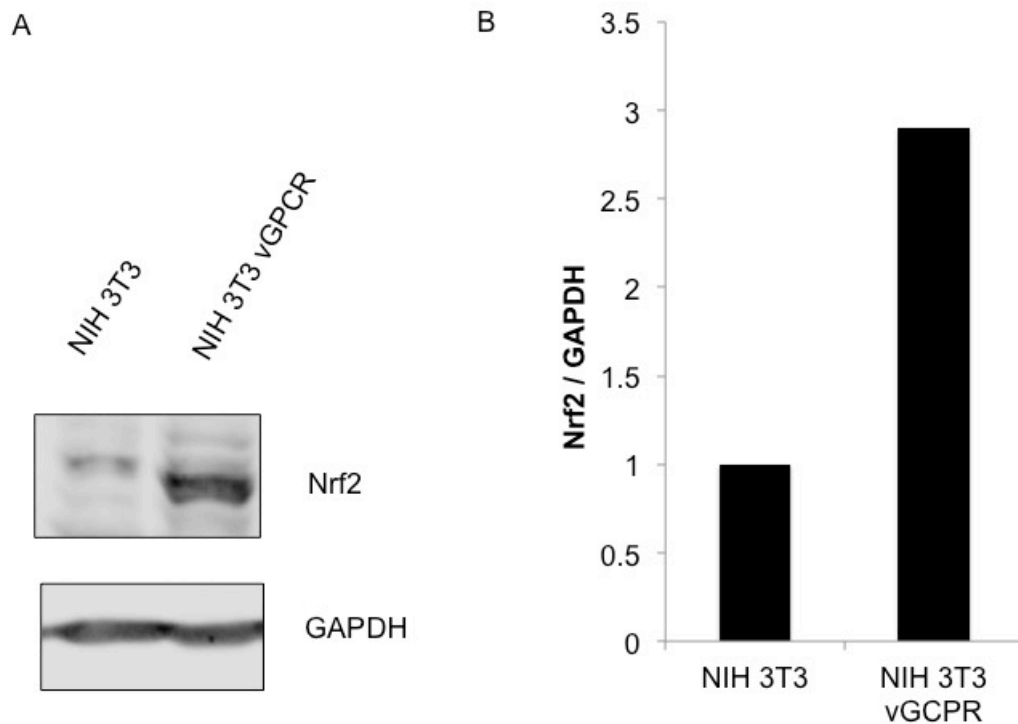


Figura R19: vGPCR aumenta los niveles de Nrf2 total. A) Western Blot de células NIH 3T3 y NIH 3T3 vGPCR. Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-Nrf2 (M) y anti GAPDH (M). Se reveló utilizando el sistema Odyssey con anticuerpo secundario anti-Mouse (800nm). B) Cuantificación de las bandas obtenidas en el Western Blot utilizando el software ImageJ.

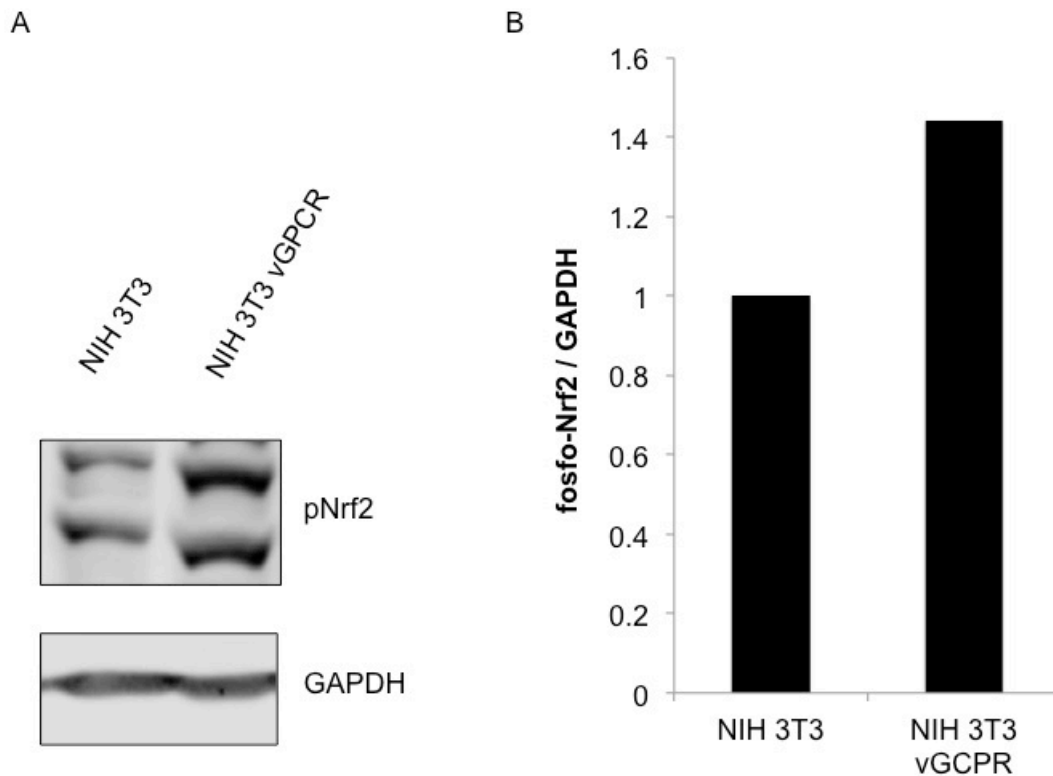


Figura R20: vGPCR aumenta los niveles de fosfo-Nrf2. A) Western Blot de células NIH 3T3 y NIH 3T3 vGPCR. Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-pNrf2 (R) y anti GAPDH (M). Se reveló utilizando el sistema Odyssey con anticuerpos secundarios anti-Rabbit (680nm) y anti-Mouse (800nm). B) Cuantificación de las bandas obtenidas en el Western Blot utilizando el software ImageJ.

4.11 Efectos de ERK sobre la fosforilación de Nrf2

Sabiendo que vGPCR induce un aumento en la estabilidad de Nrf2 y en los niveles de fosforilación del mismo, nos preguntamos si este efecto era mediado por la vía de ERK1/2. Para eso realizamos ensayos de Western Blot de células NIH 3T3 vGPCR tratadas o no con el inhibidor de MEK PD98059 (20uM) durante 2 horas. Como se observa en la Figura R21, en células NIH 3T3 vGPCR tratadas con PD98059 no se ven diferencias ni en los niveles de Nrf2 total ni en los niveles de Nrf2 fosforilado respecto de células NIH 3T3 vGPCR no tratadas. Esto podría sugerir, en principio, que la vía de ERK1/2 no estaría participando ni en la estabilización de Nrf2 ni en la fosforilación del mismo al menos hasta donde puede indicarnos este anticuerpo particular.

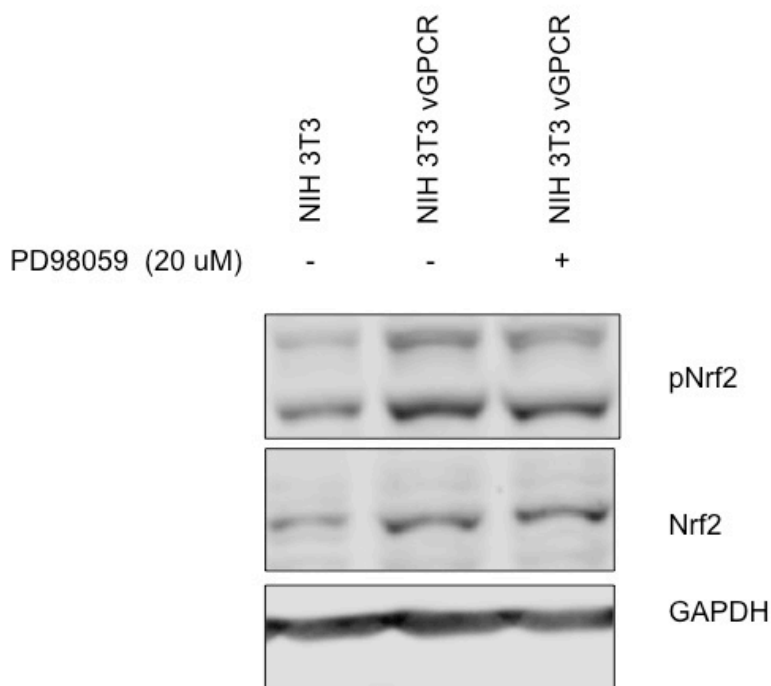


Figura R21: Western Blot de células NIH 3T3 y NIH 3T3 vGPCR tratadas o no con PD98059 (20uM 2 horas) . A) Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-Nrf2 (M) y anti GAPDH (M). B) Se utilizaron como anticuerpos primarios anti-pNrf2 (R) y anti GAPDH (M). Se reveló una única membrana utilizando el sistema Odyssey con anticuerpos secundarios anti-Rabbit (680nm) y anti-Mouse (800nm).

4.12 Efectos de p38 sobre actividad transcripcional de Nrf2

Habiendo visto que los efectos de vGPCR sobre la localización subcelular de Nrf2 y sobre su actividad transcripcional estarían mediados por ERK1/2 y que vGPCR activa la vía de p38, nos propusimos evaluar qué efectos tenía p38 sobre la actividad transcripcional de Nrf2. Para esto realizamos ensayos de Luciferasa utilizando el promotor completo de HO-1 (Figura R22 A) y el sistema reportero GAL4 / Nrf2 TAD (Figura R22 B). Transfectamos células NIH 3T3 vGPCR con el plásmido reportero y activamos la vía de p38 co-transfectando con un vector de expresión de MEK3EE (constitutivamente activo) o inhibimos la vía co-transfectando con un vector de expresión de MEK3AA (dominante negativo) y evaluamos la activación del reportero en cuestión. Como mencionamos en las

Figuras R3 A y R9 se puede evidenciar que vGPCR activa estos dos promotores. En la figura R22 A se puede observar que la co-transfección de vGPCR con MEK3EE produce un aumento en la activación del promotor de HO-1. Por otro lado, la co-transfección de vGPCR con MEK3AA produce una disminución de la actividad del promotor de HO-1 respecto al efecto observado con MEK3EE pero no así con el efecto observado para vGPCR solo.

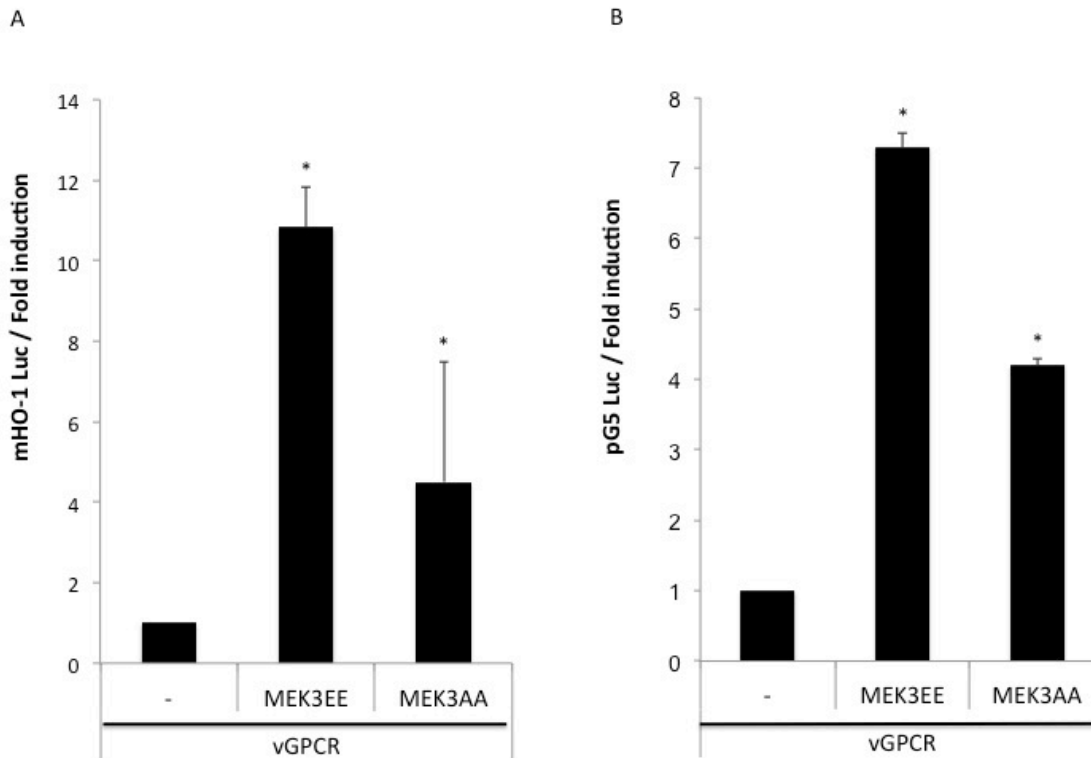


Figura R22: A) Actividad Luciferasa del promotor de HO-1. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, MEK3EE (constitutivamente activo) y MEK3AA (dominante negativo. B) Actividad Luciferasa del sistema pG5 Luc / GAL4 Nrf22 TAD. Se co-transfectó el gen reportero con vectores de expresión para vGPCR, MEK3EE (constitutivamente activo) y MEK3AA (dominante negativo). Los valores de RLU fueron normalizados con la actividad b-galactosidasa. En todos los casos los resultados se expresan como veces de inducción normalizado por el valor obtenido para células que sobre-expresan vGPCR (células transfectadas con el gen reportero y vGPCR).

En la figura R22 B se puede observar que la co-transfección de vGPCR con MEK3EE produce un aumento en la activación del sistema pG5 Luc / GAL4 Nrf2 TAD respecto al efecto observado con vGPCR solo. Por otro lado, la co-transfección de vGPCR con MEK3AA, al igual que con lo observado para el

promotor de HO-1 (Figura R22 A) produce una disminución en la actividad de este reportero respecto al efecto observado para MEK3EE pero no así con el efecto observado para vGPCR solo.

Los resultados de la co-transfección con MEK3EE son indicativos de un rol para p38 MAPKs en señalización al promotor de HO-1 y en la activación de Nrf2, los resultados de la co-transfección con MEK3AA requieren un análisis mas detenido.

4.13 Efectos de p38 sobre la localización subcelular de Nrf2

Como mencionamos anteriormente, vGPCR induce no sólo la traslocación nuclear de Nrf2 sino también la activación de la vía de p38. Esto nos llevó a preguntarnos si el efecto de traslocación nuclear de Nrf2 inducido por vGPCR era mediado por p38. Para responder esta pregunta hicimos ensayos de Inmunofluorescencia para Nrf2 y comparamos células NIH 3T3 vGPCR tratadas o no con el inhibidor de p38 SB 203580 (10 uM) durante 2 horas. Como se observa en la Figura R23 en células NIH 3T3 vGPCR Nrf2 se encuentra en el núcleo (ver también Figura R10) mientras que el tratamiento de estas células con el inhibidor de p38 no impide este efecto. Este resultado sugiere que p38 no estaría participando en la traslocación nuclear de Nrf2 por vGPCR.

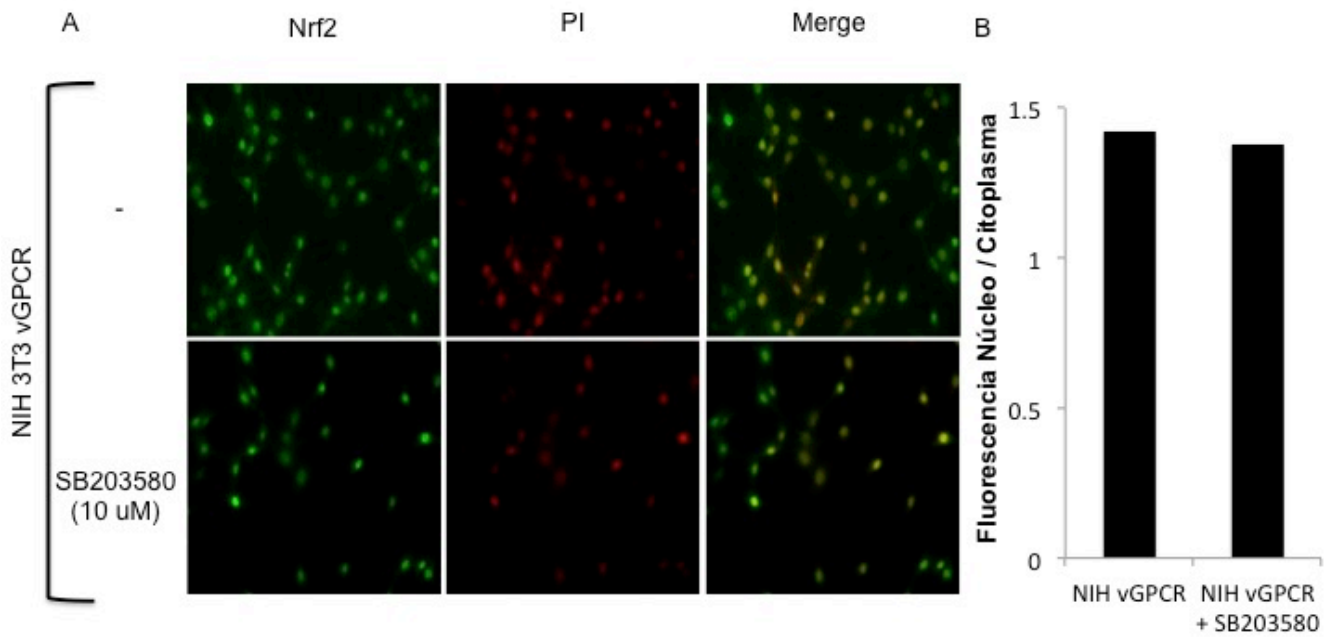


Figura R23: Células NIH 3T3 vGPCR fueron tratadas (o no) con el inhibidor de p38 SB 203580 (10 uM) durante 2 horas. Luego se realizó la Inmunofluorescencia con anti-Nrf2 y anti-rabbit Alexa 488 . Para la visualización de los núcleos se incubaron con Ioduro de Propidio. Magnificación 40X. B) Se cuantificó la intensidad de Fluorescencia nuclear y citoplasmática utilizando el software ImageJ. En el gráfico se puede observar la fluorescencia nuclear sobre la fluorescencia citoplasmática en cada línea celular.

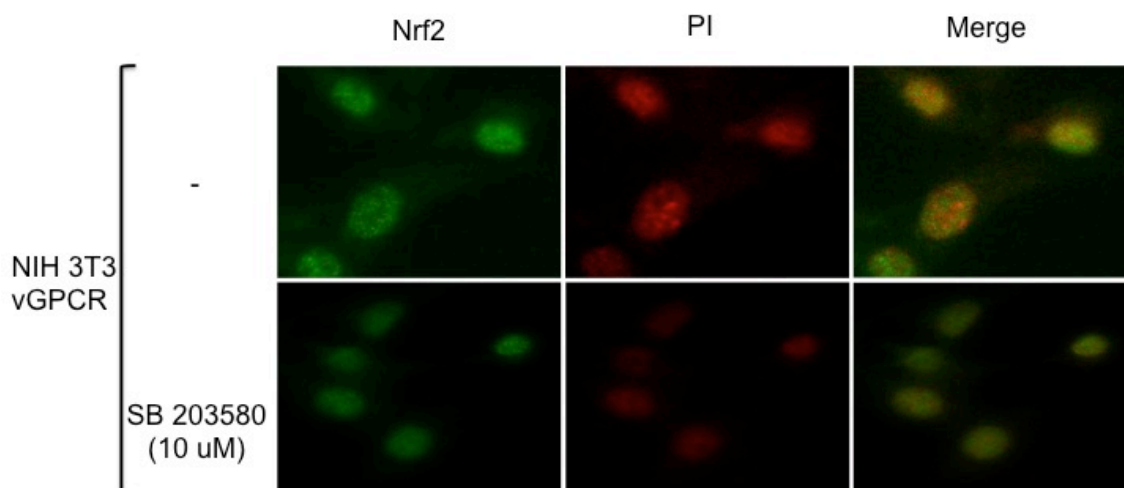


Figura R24: Se muestra con más detalle lo observado en la Figura R23.

4.14 Efectos de Nrf2 en el desarrollo de tumores *in vivo*.

Como mencionamos en la introducción, se sabe que vGPCR es clave en la tumorigénesis inducida por KSHV⁵⁹ y que este mecanismo es mediado por HO-1¹⁰¹. Sabiendo eso y que vGPCR activa el promotor de HO-1 a través de Nrf2, como mostramos anteriormente, nos decidimos a estudiar el rol del factor de transcripción Nrf2 para el desarrollo de tumores en las células transformadas por vGPCR. Con este objetivo utilizamos un modelo experimental *in vivo* y generamos líneas estables NIH 3T3 vGPCR en las cuales la expresión de Nrf2 está disminuída. El objetivo es comparar las líneas generadas con las NIH 3T3 vGPCR que veníamos utilizando.

Para atenuar la expresión de Nrf2 utilizamos vectores comerciales que expresan secuencias “short hairpin” para Nrf2 (Thermo, RMM4532-EG18024) y generamos las líneas estables como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Generamos una línea estable para un vector control o scramble (NIH 3T3 vGPCR – shScramble) y cuatro líneas estables tres secuencias distintas que reconocen Nrf2 (NIH 3T3 vGPCR – shNrf2). Para el shNrf2 1 y el shNrf2 3 generamos lo que se denominan “*mass cultures*” es decir que no hicimos selección clonal sino que seleccionamos una población heterogénea de células transfectadas establemente con el shNrf2 correspondiente. Para simplificar la nomenclatura, nos referiremos a cada uno de estos como “*pool*”. Para el shNrf2 2, además de generar un *pool* hicimos una selección clonal y nos quedamos con el clon shNrf2 2.1. Evaluamos los niveles de proteína para Nrf2 en cada una de estas líneas por Western Blot. Como se puede observar en la Figura R25 todas las líneas generadas con shNrf2 muestran una disminución en los niveles de proteína de Nrf2, más aún, tanto el pool como el clon generado para el shNrf2 2 son los que menor nivel de Nrf2 muestran.

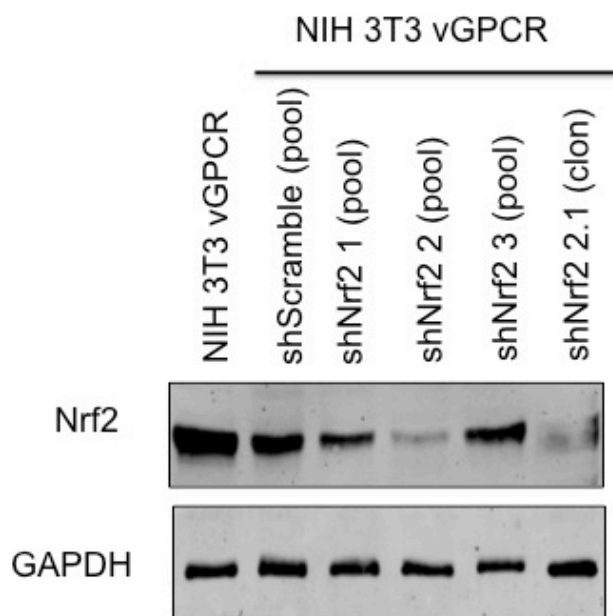


Figura R25: Western Blot para Nrf2 realizado sobre las líneas generadas para el silenciamiento de Nrf2. Se utilizó un anticuerpo anti-Nrf2 y un anticuerpo anti GAPDH como control de carga.

4.15 Descripción de los tumores desarrollados por los ratones *Nude* inoculados con NIH 3T3 vGPCR- shNrf2

Dado que vimos que las células estables para el shNrf2 2 (pool y clon) fueron aquellas que tuvieron menor nivel de expresión para Nrf2 realizamos los ensayos *in vivo* con estas dos líneas y con la línea NIH 3T3 shScramble. Para esto inyectamos ratones *Nude* (ratones atímicos (nu/nu)) con 10^6 células en ambos flancos. Los ratones fueron monitoreados a diario a la espera de la aparición de tumores, los cuales fueron medidos a medida que aparecieron. A continuación se describe lo observado para cada línea celular.

En los ratones inyectados con células NIH 3T3 vGPCR comenzaron a crecer tumores palpables luego de 28 días de inyectadas, lo cual concuerda con observaciones nuestras y de colaboradores publicadas previamente¹⁰¹. Una vez alcanzado el tamaño tumoral permitido por el protocolo de la CICUAL, los animales fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos para estudios posteriores. Luego de 90 días post - inyección se observó en el ejemplar inyectado con células NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 2.1 presentaba formación de tumor. Sin embargo, el ejemplar inyectado con células NIH 3T3 no presentó

formación de tumor hasta finalizado el experimento.

En la Figura R27 se muestra el volumen tumoral en función del tiempo para las líneas NIH 3T3 (control negativo), NIH 3T3 vGPCR (control positivo), NIH 3T3 vGPCR – shScramble, NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2 pool y NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1. Los animales inyectados con células NIH 3T3 vGPCR – shScramble presentaron tumores palpables una semana después que el grupo NIH 3T3 vGPCR, debiendo ser sacrificados antes del alcanzar el máximo tamaño tumoral permitido debido a ulceración de los mismos. Respecto a los grupos experimentales inyectados con las células NIH 3T3 vGPCR seleccionadas con los distintos shNrf2s podemos observar que todos desarrollaron tumor (Figura R27) pero el comienzo de las mediciones, en todos los casos, fue significativamente posterior a la detección de los tumores del grupo NIH 3T3 vGPCR - shScramble (Figura R27). En particular, el grupo NIH 3T3 vGPCR – shNrf2 2.1, que presentaba una importante disminución en la expresión de Nrf2, presentó aparición de tumores palpables luego de 70 días post - inyección de las células

A la culminación del experimento, 90 días luego de las inyecciones, un segundo animal inyectado con células NIH 3T3 vGPCR – shNrf2 2.1 no había desarrollado tumores.

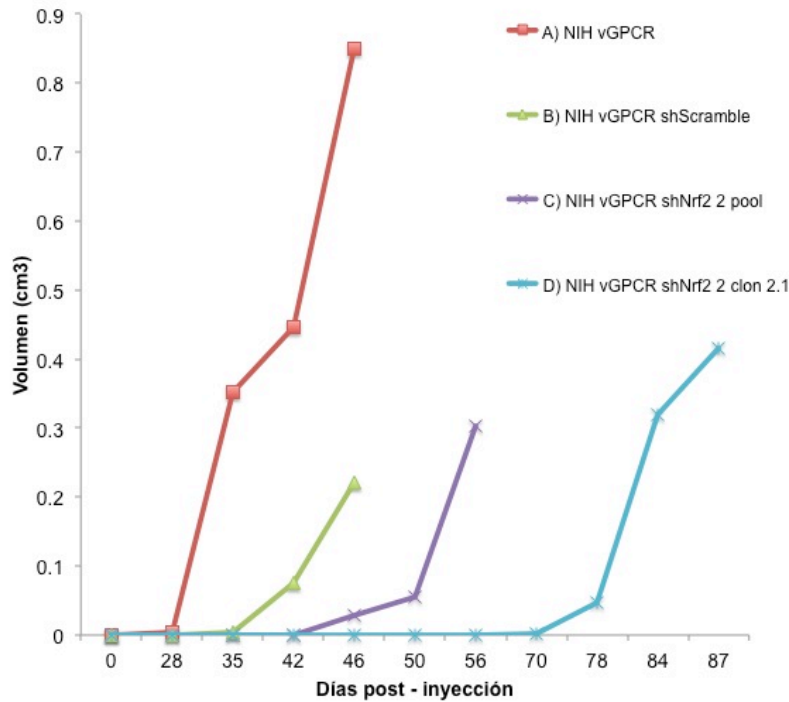


Figura R27: volumen tumoral en función del tiempo para las líneas NIH 3T3 (control negativo), NIH 3T3 vGPCR (control positivo), NIH 3T3 vGPCR – shScramble, NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2 pool y NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1.

En la Figura 28 se presentan tinciones con Hematoxilina-eosina representativas de los tumores desarrollados por los ratones nude inyectados con células NIH vGPCR y con células NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1. vGPCR indujo tumores con proliferación atípica de tipo sarcomatosa o fusiforme, morfología característica de las lesiones de sarcoma de Kaposi observadas en humanos (Figura 28 panel A). Los animales inyectados con células NIH vGPCR-shScramble desarrollaron tumores similares a los vGPCR (datos no mostrados). Los tumores vGPCR con Nrf2 silenciado por el shNrf2 2 pool crecieron mas lentamente que los inducidos por las células parentales NIH vGPCR pero se ulceraron rápidamente. La morfología de los tumores NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2 pool es similar a la de los vGPCR pero con mayor vascularización (Datos no mostrados). En cuanto a los tumores generados con las células NIH vGPCR shNrf2 2.1 su morfología fue similar a los generados por las células parentales si bien su crecimiento fue el más lento de los distintos grupos silenciados con shRNA para Nrf2 (curva de crecimiento) (Figura 28 panel B). En la Figura 28 paneles C y D se muestra un ensayo de Inmunohistoquímica para Nrf2 realizado

para los tumores producidos por la inyección de células NIH 3T3 vGPCR (panel C) y para los tumores producidos por la inyección de células NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1. Se puede observar para tumores producidos por NIH 3T3 vGPCR una intensa marcación nuclear de Nrf2 en todo el tumor (Figura 28 panel C) mientras que la expresión nuclear de Nrf2 en tumores producidos por NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1 es más leve.

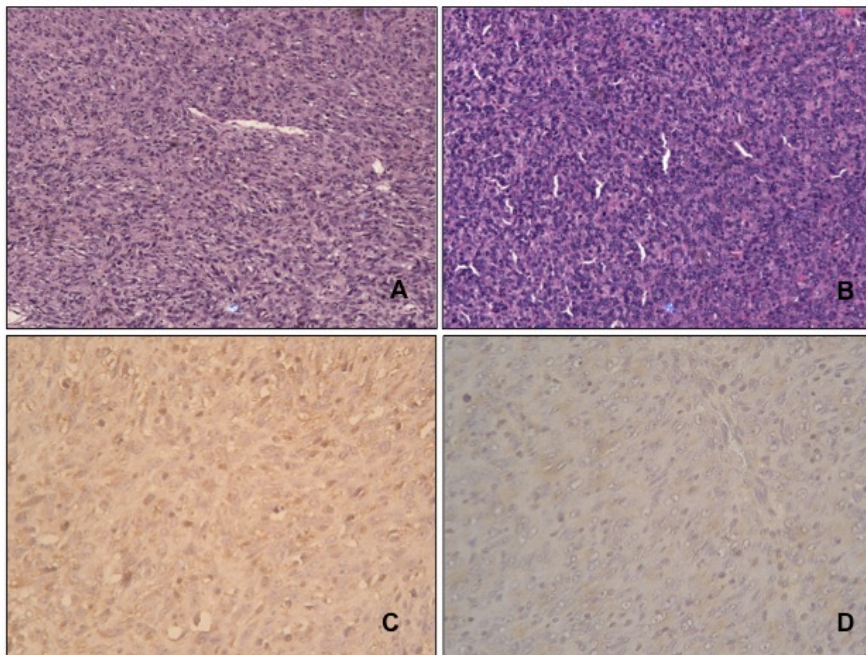


Figura 28: Tinción Hematoxilina – eosina de A) NIH 3T3 vGPCR y B) NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1. Magnificación 10X. Inmunohistoquímica de Nrf2 en C) NIH 3T3 vGPCR y D) NIH 3T3 vGPCR shNrf2 2.1. Magnificación 40X.

Estos resultados resaltan el rol de Nrf2 en el desarrollo tumoral inducido por vGPCR, de modo análogo a lo ya reportado para HO-1. Teniendo en cuenta el rol importante que mostramos para Nrf2 en la regulación de HO-1 dada por vGPCR nuestra observación en conjunto otorgan a Nrf2 un rol central en la tumorigénesis disparada por este oncogén.

Discusión

Discusión

El sarcoma de Kaposi (KS) es el tumor más frecuente en pacientes de SIDA y consiste de lesiones a nivel de la piel del paciente, muy vascularizadas, compuestas por células que derivan de tejido endotelial transformadas por el virus KSHV²⁶¹⁻²⁶³. Se ha demostrado que el producto del marco de lectura abierto *orf* 74 dentro del genoma de KSHV representa una proteína de siete pasos de membrana del tipo de los receptores acoplados a proteínas G (vGPCR). Esta proteína cumple un rol clave en la oncogénesis inducida por el virus²⁶⁸. La proteína vGPCR presenta alta identidad de secuencia con el receptor para la interleuquina 8 (CXCR2) pero presenta una mutación en una región altamente conservada entre los GPCR de mamíferos que hace que, a diferencia de estos, presente actividad señalizadora aun en ausencia de ligando²⁶⁸.

En trabajos previos de nuestro laboratorio y colaboradores hemos contribuido a mostrar como la expresión de vGPCR en fibroblastos produce transformación con formación de focos en placas de Petri, y tumores en ratones “nude”. Las lesiones producidas por esos tumores en los animales son ricas en irrigación de vasos, lo que las asemeja a las de los pacientes humanos con KS^{261,268}. Además hemos demostrado que vGPCR induce al gen que codifica para el ARN mensajero y la proteína HO-1 tanto en fibroblastos como en células endoteliales y que ese aumento en los niveles de expresión de HO-1 coincide con un aumento de la proliferación y la supervivencia celular. Por otro lado, inhibiendo la expresión de HO-1 o su actividad, se compromete la formación de tumores inducidos por vGPCR en ratones¹⁰¹.

El nivel del conocimiento actual indica que vGPCR contribuye al establecimiento de KS de diversos modos. Mientras que se ha demostrado la activación de varias proteínas señalizadores y factores de transcripción actuando de forma directa, también existiría un modo de acción indirecto por medio de retroalimentación celular tanto autócrina como parácrina²⁶⁹.

HO-1 funciona como un importante agente de defensa de la célula frente a la agresión de agentes oxidantes. Este rol también le permite actuar como citoprotector frente a la administración de quimioterápicos, provocando resistencia al tratamiento²⁷⁰. Asimismo alteraciones en los niveles de regulación de la función de la enzima HO-1 han sido reportados en casos de cáncer^{270,271}.

Respecto al rol de HO-1 en el desarrollo de tumores, algunos resultados sugieren que HO-1 puede actuar como una enzima citoprotectora disminuyendo el riesgo de desarrollar algunos tipos de tumores. Sin embargo, a HO-1 se le asigna un rol "dual". Por un lado protege a los tejidos sanos pero por otro lado puede actuar como un mediador antiapoptótico y proangiogénico.. Ha sido descrito por múltiples autores un comportamiento diferente de HO-1 en distintos tipos tumorales. En algunos tipos tumorales la expresión de HO-1 se encuentra elevada²⁷²⁻²⁷⁵, participa en la transformación celular y la inducción de carcinogénesis. Estos efectos están asociados a su capacidad antiapoptótica que resulta en un incremento de la supervivencia de la célula tumoral y en mayor resistencia a las terapias. Más aún, HO-1 es un mediador proangiogénico que aumenta la vascularización tumoral como mediador del aumento en la expresión de VEGF. Sin embargo, en otros trabajos se describe una disminución en los niveles de HO-1 en ciertos tipos de tumores. En estos casos la sobreexpresión de HO-1 resulta en una disminución en la proliferación celular^{276,277}.

La investigación sobre el rol de HO-1 parece ser importante no sólo para tener un mayor entendimiento de la regulación en el crecimiento tumoral sino también para la práctica clínica. Dependerá de cada tipo tumoral si HO-1 se encuentra elevada o disminuída y en función de eso el tipo de terapia a utilizar.

De un modo u otro, y a pesar de que queda claro el rol de HO-1 como blanco de vGPCR, aun no conocemos el mecanismo que regula la expresión de su promotor. Los factores de transcripción que se unen al promotor de HO-1 aun están pobremente caracterizados, lo mismo que los caminos de transducción de señales que los regulan. Existen dos zonas de "enhancers" que han sido descritas siendo la zona de Enhancer-1 (E1) la mejor conocida²⁷⁸. Esta zona posee elementos de unión de factores como CREB/ATF y AP-1. Aun así, existen sólidas evidencias que indican que la zona regulatoria por excelencia estaría restringida a los elementos conocidos como ARE.

Además de estar en el promotor del gen de HO-1, los elementos ARE se encuentran en las regiones promotoras de varios genes que codifican para proteínas antioxidantes involucradas en procesos de detoxificación. Entre las proteínas codificadas por esos genes podemos citar: Glutatión-s-transferasa (GST), Thioredoxina, Thioredoxina reductasa, etc²⁷⁹.

La regulación transcripcional al nivel de los ARE esta principalmente controlada por Nrf2, un factor de transcripción del tipo de cierre de leucinas²⁸⁰. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma asociado a un dímero de otras proteínas llamadas Keap1²⁸¹. Esta interacción deriva regularmente a Nrf2 hacia el proteosoma, por lo que resulta inactivo y termina siendo degradado. Frente a variados inductores o agentes de estrés, Nrf2 se libera de Keap y es capaz de traslocar al núcleo donde ejerce su función como activador de la transcripción. En el interior nuclear, Nrf2 encuentra otra proteína asociada, Maf, con la cual forma un complejo que se une a los elementos ARE en los promotores de sus genes blanco²⁸¹. Un factor de control adicional estaría dado por la presencia de una proteína nuclear inhibitoria para dichos complejos llamada Bach1²⁸⁰. Diferentes estudios relacionan la actividad transcripcional de Nrf2 con proteínas kinasas como MAPK/p38²⁸² y PI3K/Akt⁸⁴, sin embargo no se conoce aun acción directa de fosforilación ni detalles del mecanismo de activación. Cabe destacar que distintos estímulos en distintos modelos celulares activan distintas vías de señalización.

Los ratones manipulados genéticamente para dar delección de Nrf2 presentan muerte embrionaria temprana y células de ratón Nrf2 (-/-) condicionales son mas susceptibles al estrés oxidativo que sus contrapartes Nrf2 (+/+) ²⁷⁹. En resumen, Nrf2 es un regulador clave de la activación transcripcional de genes responsables de mantener la homeostasis del equilibrio redox en la célula viva.

Como ya mencionamos, la expresión de vGPCR activa varios caminos de transducción de señales incluyendo varias proteínas G y proteínas kinasas así como induce respuestas que incluyen la activación de genes entre los cuales ya hemos citado a los que expresan a la enzima hemoxygenasa 1 (HO-1) y el mismo VEGF.

En células transformadas por vGPCR se ha reportado la activación de al menos tres importantes vías transductoras de señales por MAPKS (ERK2, JNK y p38) ^{261,268} con variaciones entre un reporte y otro. También la cascada que incluye a Akt ha sido reportada como activada por el oncogén viral. La activación de Akt seria dependiente de PI3K y tendría a las subunidades beta y gamma de proteínas G como intermediarias ²⁸³.

Por otro lado las pequeñas proteínas G de la familia Rho, como RhoA y Rac1, así como subunidades alfa de proteínas G heterotriméricas aumentan su carga de GTP en células que expresan vGPCR con su consiguiente

activación^{101,264,268}. En particular hemos mostrado que vGPCR induce expresión de HO-1 y transformación celular utilizando un camino que incluye de modo secuencial a las proteínas $G_{\alpha_{12/13}}$ y RhoA^{101,264}.

Con los resultados previos obtenidos por nuestro laboratorio sumado a lo reportado por otros grupos fue que nos planteamos la hipótesis que propone a Nrf2 como factor clave en la regulación del promotor de HO-1 por vGPCR. Podemos decir que a lo largo de esta tesis hemos logrado aportar nuevos eslabones que unen a vGPCR con el promotor de HO-1 destacando el rol fundamental que cumple Nrf2 no sólo en la regulación de HO-1 sino también en la tumorigénesis inducida por vGPCR.

Hemos descrito que la pérdida del elemento ARE (ubicado en la posición -4 Kb) produce una disminución en la actividad del reportero indicando que este sitio es importante en la activación de HO-1 mediada por vGPCR (Figura R2), pero dado que las siguientes deleciones también muestran una disminución en la activación del reportero y que el promotor residual más corto conserva cierta capacidad de activación, no se descarta que haya otros elementos importantes en la regulación del promotor de HO-1. Por ejemplo, hemos visto que la deleción que produce un fragmento de 2.2 Kb produce un aumento en la activación del reportero indicando que entre la posición -3.8 Kb y -2.2 kb hay un elemento que regula negativamente este promotor (datos no mostrados). Analizando la secuencia regulatoria de HO-1 se han encontrado, por ejemplo, sitios de unión para AP-1, activator protein 1; AP-2, activator protein-2; NF- κ B, nuclear factor kappa-B y distintos elementos de respuesta como son CdRE, cadmium responsive element; C/EBP, CAAT/enhancer binding protein binding site; CRE, cAMP responsive element; egr1, early growth response factor-1 binding site; ets, ets binding site; GATAx, GATA binding proteins, (GT) $_n$, GT-rich repeat region; HNF1/4, hepatocyte nuclear factor; HRE, hypoxia responsive element; HSE, heat shock element; (Pyr) $_n$, pyrimidine-rich region; SP-1, specificity protein-1; STAT, signal transducer and activator of transcription⁷⁹ (Ver Figura 4 Introducción). Esto abre las puertas a futuros experimentos en donde se podría determinar si en nuestro modelo celular vGPCR induce la activación de otros factores de transcripción que puedan estar aportando a la regulación fina de la expresión de HO-1.

Hemos determinado la relevancia de los sitios ARE en la activación mediada por vGPCR. Por un lado mostramos que la delección de una región de promotor que contiene esta secuencia produce una disminución en la activación del promotor de HO-1 (Figura R2) y por otro lado, que vGPCR es capaz de activar un promotor mínimo con sitios ARE en tándem (Nrf2 ARE Luc) (Figura R5). Una vez demostrado esto era importante estudiar el rol de la proteína factor de transcripción Nrf2. Como se observa en las Figuras R3 y R6, Nrf2 es clave para la activación del promotor de HO-1 y los sitios ARE. El hecho de que la co-transfección de vGPCR y Nrf2 WT resulte en un aumento que es aproximadamente el producto de los efectos individuales nos sugería que Nrf2 estaba en la vía que activaba vGPCR. Esto fue confirmado por un enfoque alternativo al ver que la co-transfección con el dominante negativo de Nrf2 anula el efecto observado para vGPCR solo. En este punto cabe destacar que además de haber confirmado esto utilizando el dominante negativo de Nrf2 también se podría haber generado un vector reportero con el promotor de HO-1 y los sitios ARE mutados, de manera que Nrf2 no pudiera unirse al elemento de respuesta. Aunque no podemos saber de antemano el resultado de este experimento, existe la posibilidad de que la co-transfección con vGPCR no tenga efecto si es que Nrf2 es el factor de transcripción maestro en la regulación de HO-1 o que haya un efecto residual ante a la falta de Nrf2 y que otros factores de transcripción activen el reportero.

Respecto a los elementos río abajo de vGPCR fue descrito por nuestro grupo y colaboradores que vGPCR activa el promotor de HO-1 a través de la pequeña proteína G $G\alpha_{12/13}$ y la GTPasa RhoA^{101,264}. En este trabajo demostramos que tanto vGPCR como $G\alpha_{12/13}$ activan los sitios ARE a través de RhoA y que no son vías independientes dado que cuando co-transfectamos con un dominante negativo de RhoA el aumento inducido por vGPCR y $G\alpha_{12/13}$ fue bloqueado. Esto sugiere que estos elementos son clave en la activación de Nrf2.

Sin embargo, es importante destacar que dentro de la familia de RhoA se encuentran otras GTPasas. Por ejemplo, respecto a Rac1 se ha demostrado que la sobre-expresión de su variante constitutivamente activa en ratones es suficiente para producir lesiones similares a KS a través de mecanismos que involucran proliferación mediada por ROS y angiogénesis mediada por HIF-1a²⁸⁴. Además, en células endoteliales, vGPCR induce al factor de transcripción NF- κ B a través de Rac1 mientras que en células PEL la

activación de este factor de transcripción ocurre independientemente de Rac1²⁸⁵. Sin embargo, en nuestro modelo Rac1 no activa el promotor de HO-1²⁶⁴. Esto sugiere que en diferentes modelos de estudio la expresión de distintos genes resulta en la activación de distintos intermediarios de señalización lo que lleva a que pueda haber diferencias en la activación de Rho o Rac en distintos tipos celulares. vGPCR activa distintos factores de transcripción que controlan distintos genes. En nuestro modelo, por más de que vGPCR tiene la capacidad de inducir NF-κB a través de Rac1, y el promotor de HO-1 tiene sitios de unión a este factor de transcripción, demostramos que el factor de transcripción clave en la regulación de HO-1 mediado por vGPCR es Nrf2 y que su activación es a través de RhoA y no de Rac1. Sin embargo, esto deja entrever una fina regulación a cargo de una compleja red de proteínas que se activan diferencialmente en distintos modelos y que regulan distintos genes que orquestan la respuesta biológica (proliferación, angiogénesis).

Sabiendo que en nuestro modelo el elemento clave en la activación del promotor de HO-1 era el elemento ARE fue que decidimos enfocarnos en Nrf2. Como mencionamos anteriormente, en condiciones basales Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a Keap1 quien favorece su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma. Al mismo tiempo, los elementos ARE se encuentran ocupados por el heterodímero Bach1 – MafG y la transcripción de los genes target se encuentra apagada. Frente a determinados estímulos, el complejo Nrf2 - Keap1 se disocia y Nrf2 trasloca al núcleo mientras que Bach1 deja de estar unido al sitio ARE. Ahora Nrf2 puede unirse (como heterodímero con MafG) y reclutar la maquinaria transcripcional que permita la expresión de los genes target. Es por esto que nos pareció importante estudiar tanto la activación transcripcional de Nrf2, es decir su capacidad para reclutar la maquinaria transcripcional así como su localización subcelular en respuesta a vGPCR. En este trabajo hemos demostrado que Nrf2 es capaz de reclutar la maquinaria transcripcional e inducir la expresión de un gen reportero en respuesta, no sólo a vGPCR, sino también en respuesta a los elementos río abajo (Figura R10). En este sentido y para ampliar las evidencias del efecto de vGPCR sobre la actividad transcripcional de Nrf2 es que podríamos haber hecho distintas mutaciones sobre el dominio de transactivación y evaluar el efecto de vGPCR por ejemplo sobre el Nrf2 ARE Luc y sobre el promotor de HO-1. De esta manera, hubiéramos tenido más evidencias sobre el rol de Nrf2

en la regulación de estos sitios en respuesta a vGPCR y, mas aún, sobre la regulación del promotor de HO-1.

Otro aspecto clave es la localización subcelular de Nrf2. Para que pueda ejercer su función como factor de transcripción es necesario que pueda trasladarse al núcleo. En este trabajo demostramos que tanto vGPCR como los elementos río abajo son capaces de inducir la traslocación nuclear de Nrf2 (Figuras R11 y R12). Esto sugiere que vGPCR no sólo es capaz de inducir la traslocación al núcleo de Nrf2 sino que una vez unido a los elementos ARE, Nrf2 es capaz de reclutar la maquinaria transcripcional e iniciar la transcripción.

vGPCR, Nrf2 y signaling

Distintos estímulos pueden llevar a la modificación de Keap1 o de Nrf2 y eso puede producir la disociación del complejo. Aunque hay mucha bibliografía al respecto la misma es controversial. En diferentes modelos, distintos estímulos producen distintas modificaciones en Keap1 o en Nrf2. Por ejemplo Dinkova-Kostova et al postularon que las cisteínas Cys-273 y Cys-288 del dominio IVR de Keap1 eran fundamentales para la ubiquitinación de Nrf2 y que modificaciones sobre estas cisteínas producían un aumento en los niveles de Nrf2 y posterior traslocación al núcleo²⁸⁶.

Como se mencionó en la introducción Nrf2 puede ser fosforilada, acetilada y palmitoilada. Aún hablando solo de fosforilación sobre Nrf2 hay controversia. Hay numerosos trabajos que sugieren que la fosforilación de Nrf2 puede contribuir a su regulación. Nrf2 contiene serinas, treoninas y tirosinas que pueden proveer sitios de fosforilación para diversas quinasas¹⁴⁹. Por ejemplo, se ha demostrado que PKC puede fosforilar a Nrf2 en la serina 40 (Neh2) interrumpiendo la asociación entre Nrf2/Keap1 y por lo tanto promoviendo la traslocación de Nrf2 al núcleo¹⁵⁰.

Diversas serinas/treoninas pueden ser fosforiladas por distintas MAPK. Keum et al han demostrado que p38 puede fosforilar Nrf2, promover su asociación con Keap1 y por lo tanto impedir su traslocación nuclear¹⁵². Otros trabajos han destacado la participación de JNK y ERK1/2 en la activación de Nrf2. El Butilhidroxianisol (BHA) aumenta los niveles de fosforilación de ERK1/2 y de JNK 1/2 para activar Nrf2, disociarlo de Keap1 y permitirle su traslocación al núcleo¹⁵³. La mayoría de los activadores de Nrf2 también activan otras vías

de señalización. Por ejemplo tBHQ activa la vía PI3K/AKT mientras que BHA activa MAP kinasas^{137,153}. El mecanismo molecular por el cual estas moléculas activan estas vías requiere de más investigación dado que la activación de vías específicas depende de un número de factores como el tipo celular y la naturaleza química del agente inductor entre otros.

A pesar de la vasta evidencia que demuestra el efecto de varios activadores de Nrf2 sobre los diversos caminos de señalización, poco se sabe de cómo interactúan y cómo se coordinan para contribuir a la regulación de la vía de Nrf2. Trabajos de distintos grupos han demostrado que vGPCR puede activar diferentes caminos de señalización en distintos modelos. Por ejemplo, Bais et al demostraron que en células HEK293 vGPCR activa las vías de JNK y p38²⁸⁷. En células endoteliales, vGPCR activa múltiples vías, entre ellas la de AMPc²⁸⁸ y AKT²⁸³. En células NIH 3T3 también se ha descrito la activación de esta vía. En nuestro trabajo, aún utilizando la misma línea celular no hemos visto activación de AKT (Figura R13). Una posible explicación es que aunque la línea celular es la misma, el origen es distinto y el número de pasajes no es el mismo. Sin embargo, hemos demostrado que en nuestro sistema, vGPCR activa las vías de ERK1/2 y p38 como se puede observar en la Figura R14.

Demostramos que en nuestro sistema vGPCR estabiliza y aumenta los niveles de fosforilación de Nrf2. Más aún, vGPCR activa la vía de ERK1/2 y ésta tiene efecto sobre la activación transcripcional de Nrf2 (Figura R15) y traslocación al núcleo (Figura R17). Sin embargo no observamos efecto sobre la fosforilación de Nrf2 cuando tratamos células NIH 3T3 vGPCR con el inhibidor de MEK PD98059 (Figura R21). Esto podría deberse, por ejemplo, a que Nrf2 se esté fosforilando en varios residuos y que la inhibición de la vía de ERK afecte sólo a determinados aminoácidos entre los cuales no se encuentra la Serina 40 que es la que reconoce el anticuerpo aquí utilizado. Otra posibilidad que justifique este resultado sería que vGPCR active la fosforilación de Nrf2 por una vía independiente de ERK y que ERK esté regulando alguna proteína relacionada con la importación de Nrf2 al núcleo. De esta manera la inhibición de la vía de ERK estaría impidiendo la traslocación al núcleo de Nrf2 sin afectar su nivel de fosforilación.

Nuestros resultados muestran claramente la participación de ERK2 como intermediario entre el eje vGPCR-G12/13-RhoA y la traslocación nuclear de Nrf2 así como su activación transcripcional.

Respecto a p38 hemos visto que la co-transfección de vGPCR con MEK3EE (constitutivamente activo) produce un aumento en la activación del promotor de HO-1 así como en la activación del sistema pG5 Luc GAL4-Nrf2 TAD, indicativo de un rol para p38 MAPK en la activación de Nrf2. Sin embargo no obtuvimos el efecto contrario al co-transfectar vGPCR con MEK3AA (dominante negativo) (Figura R22). Esto podría deberse a que forzar el sistema hacia el bloqueo de una determinada vía puede causar la activación de otras vías que no estamos evidenciando directamente aquí y que podrían estar actuando sobre otras proteínas que regulan la expresión de HO-1 y el signaling hacia el dominio de transactivación de Nrf2. Sería posible, además, que forzar el sistema hacia el bloqueo de la vía de p38 pudiera estar causando que otras vías se activen (ERK1/2) y señalicen hacia Nrf2.

Este resultado es muy interesante porque nos anticipa que, de confirmar un rol para p38 MAPK en la activación de Nrf2, su mecanismo es claramente diferente al de ERK2 y merece especial atención en futuros trabajos.

Respecto al rol de p38 en la localización subcelular de Nrf2 vimos que la inhibición de esta vía no tiene efecto sobre la traslocación nuclear. Estos resultados sugieren, aunque faltan evidencias, que p38 podría estar regulando la expresión de HO-1 a través de otros factores de transcripción o participando a través de la activación del dominio de transactivación de Nrf2 aunque no sobre su traslocación al núcleo y que sí o sí p38 necesite de la colaboración de otra proteína que regule la traslocación al núcleo.

La habilidad de las distintas MAPKs de transmitir una señal diferente (muchas veces opuesta) depende de cómo la especificidad de cada una de las señales transmitida es regulada. Se han propuesto seis mecanismos que participan en esta regulación. 1) duración y fuerza de la señal. 2) interacción con proteínas de andamiaje. 3) localización subcelular. 4) presencia de diferentes isoformas en cada nivel de la cascada. 5) *cross-talk* entre distintas vías de señalización. 6) modificaciones post – traduccionales diferentes a la fosforilación²⁹⁰.

Respecto al *cross-talk* entre distintas vías de señalización y en función de lo visto en este trabajo, cabe destacar que existen trabajos publicados por otros autores en donde se demuestra la interacción entre las vías de ERK1/2 y p38. Ha sido demostrado que la inhibición de la fosforilación de ERK o p38 induce un aumento en la fosforilación de p38 o ERK respectivamente²⁹¹.

En función de los resultados obtenidos es lógico pensar que sea probable que haya un *cross-talk* no sólo entre ERK1/2 y p38 sino también con otras vías que no fueron estudiadas en este trabajo. Esto justificaría los resultados obtenidos con la co-transfección de vGPCR y MEK3AA (dominante negativo de la vía de p38) (Figura R22 A y B) en donde vemos que el efecto obtenido es mayor que el efecto de vGPCR sólo dado que podría estar sucediendo que los efectos observados se deban a la activación de ERK producto del silenciamiento de p38.

Es importante considerar que este trabajo se enfoca en el eje vGPCR – Nrf2 - HO-1 pero es posible que las vías de señalización activadas por vGPCR puedan desembocar no sólo en Nrf2 como mencionamos anteriormente sino también sobre Keap1 o Bach1, ambas proteínas reguladoras negativas. Por ejemplo, se sabe que determinados antioxidantes inducen la fosforilación de la tirosina 486 de Bach1 que produce la exportación nuclear del mismo. Dado que Bach1 y Nrf2 compiten por el sitio de unión, la fosforilación de Bach1 estaría permitiendo la unión de Nrf2 al sitio ARE²⁹².

Respecto a Keap1, como se mencionó anteriormente, la modificación de determinadas cisteínas produce un cambio conformacional en Keap1 que permite la acumulación de Nrf2. Sin embargo, no está tan claro que la fosforilación de algún residuo de Keap1 tenga un efecto en la estabilización de Nrf2 pero sí se sabe que una vez que Nrf2 está en el núcleo y se activan los genes involucrados en la respuesta a ese estímulo determinado, Keap1 se fosforila en la tirosina 85 y el complejo Keap1-Cul3-Rbx1 es importado al núcleo para degradar el Nrf2 nuclear²⁹³ o para inducir la exportación nuclear de Nrf2²⁹⁴. Además, ha sido demostrado que la tirosina 141 de Keap1 puede ser fosforilada y que esto produce un aumento en la estabilidad de la misma, impidiendo la acumulación de Nrf2²⁹⁵.

De esta manera vGPCR podría estar aumentando la expresión de HO-1 no sólo por modificación del complejo Keap1 – Nrf2 sino también por modificación de Bach1 y su posterior “despegado” del sitio ARE. Estos eventos convergen en la unión de Nrf2 a los sitios ARE y la activación de la transcripción. En este trabajo demostramos que vGPCR no sólo produce un aumento en la estabilidad de la proteína Nrf2 si no que también produce un aumento en los niveles de fosforilación de Nrf2. Lo que no podemos determinar con las técnicas realizadas es si el aumento de Nrf2 se debe a un aumento en la vida media de Nrf2 o si es por un aumento en la expresión del gen de Nrf2.

KSHV y vGPCR

Trabajos publicados por Gjyshi et al^{296,297} han demostrado que la infección *de novo* por KSHV produce aumento en la expresión de Nrf2, un aumento en la fracción nuclear de Nrf2 y un aumento en los niveles de fosforilación de Nrf2. Además demostraron que el aumento en la estabilidad de Nrf2 no se debe directamente a la disociación de Nrf2 de Keap1 sino que también aumenta la expresión de Nrf2 y que ese aumento en Nrf2 lleva a un aumento en HO-1. Cabe destacar que en estos trabajos se trabaja con el genoma completo de KSHV por lo que diferentes proteínas pueden estar participando de la regulación de HO-1 pero ya con el virus completo se le asigna un rol fundamental a Nrf2. Nosotros, apoyándonos en estos trabajos, podemos aportar que el efecto observado por Gjyshi et al se deba probablemente a vGPCR y sea este receptor el responsable de los efectos observados con la infección *de novo* de KSHV.

Además es importante tener en cuenta que cuando se infecta con el genoma completo de KSHV muchas vías empiezan a interactuar. Por ejemplo, en lo que respecta al aumento de HO-1 mencionamos que KSHV aumenta la estabilidad y fosforilación de Nrf2 pero, se sabe además que el mRNA de BACH1 (represor de la expresión de HO-1) es regulado negativamente por el miRNA viral miR-K12-11^{166,167}. Esto significa que la expresión de vGPCR y el miR-K12-11 son dos mecanismos independientes que convergen en el aumento de HO-1.

Nrf2 y la formación de tumores por vGPCR

Realizando experimentos en ratones nude vimos que el efecto tumorigénico de vGPCR se ve afectado por el silenciamiento de Nrf2. Las células que muestran claramente una disminución en la expresión de Nrf2 por Western Blot fueron capaces de formar tumores pero con un retraso netamente significativo. Es interesante observar que, análisis por inmunohistoquímica de cortes de los tumores control (NIH 3T3 vGPCR) así como de los experimentales con disminuida expresión de Nrf2 muestran niveles de expresión de Nrf2, aunque solo residual en el segundo caso. Este dato nos habla de una selección positiva de células que expresan Nrf2

producida *in vivo* sobre la población de células inyectadas y aporta un dato extra respecto de la importancia de expresar Nrf2 para que estas células puedan desarrollar un tumor.

Conclusiones

Antes de comenzar con esta tesis sabíamos que vGPCR era uno de los genes clave para el desarrollo tumoral inducido por la infección con KSHV. Nuestro laboratorio había reportado previamente que vGPCR señalizaba hacia el promotor de HO-1 a través de las proteínas $G\alpha_{12/13}$ - RhoA y que el desarrollo de esos tumores era mediado por HO-1. Demostraron también que la inhibición farmacológica o bien la disminución de la expresión de HO-1 producía una disminución en el tamaño de los tumores.

A lo largo de esta tesis hemos logrado profundizar el estudio sobre los efectos que vGPCR tiene sobre la expresión de HO-1. Hemos demostrado que vGPCR no sólo activa $G\alpha_{12/13}$ - RhoA sino que éstas proteínas señalizan hacia los sitios ARE presentes en el promotor de HO-1 y que el factor de transcripción Nrf2 es clave en esta regulación. Demostramos además que al eje vGPCR - $G\alpha_{12/13}$ - RhoA se suman la MAPK ERK1/2 y que vGPCR también activa la MAPK p38, con mecanismos río abajo de ERK2 y p38 por explorar aún pero en principio diferentes. Respecto al rol de ERK hemos demostrado que tiene efectos no sólo sobre la traslocación al núcleo de Nrf2 sino también sobre la activación transcripcional de su dominio de transactivación. Respecto al rol de p38, pudimos ver que parecería no tener efecto sobre la traslocación de Nrf2 al núcleo pero sí un efecto activador sobre el promotor de HO-1. Queda por delante llevar a cabo más experimentos para poder describir los roles diferenciales en este sistema. Finalmente, pudimos ver haciendo experimentos en ratones nude que el efecto tumorigénico de vGPCR se ve afectado por el silenciamiento de Nrf2 dado que los ratones inyectados con células NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 2.1 mostraron un retraso en el desarrollo tumoral. Esto se correlaciona con lo observado en ensayos de Inmunohistoquímica de estos tumores que mostraron menor expresión de Nrf2 nuclear en tumores provenientes de células NIH 3T3 vGPCR - shNrf2 2.1.

En la Figura D1 se muestra un esquema del modelo propuesto por nosotros por el cual vGPCR podría estar actuando sobre el promotor de HO-1.

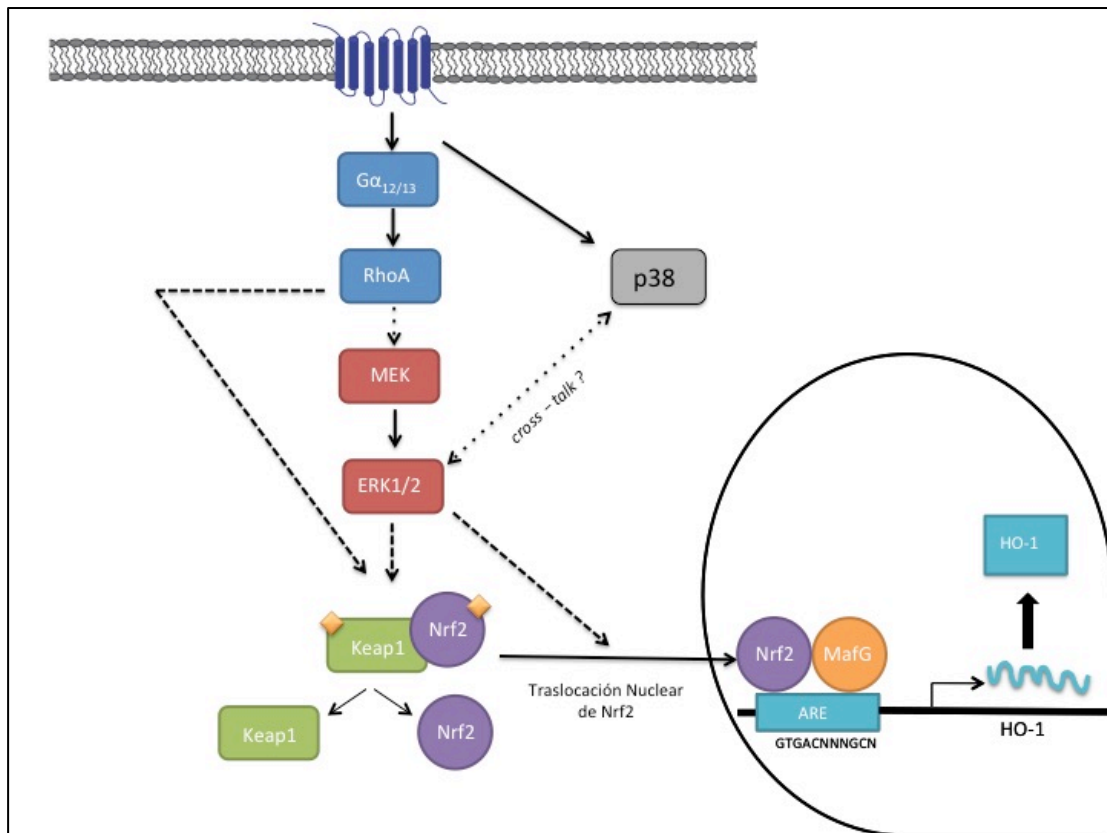


Figura D1: Modelo propuesto sobre la acción de vGPCR sobre el promotor de HO-1.

En conclusión, nuestros datos muestran que vGPCR induce el promotor de HO-1 a través de una vía de señalización que involucra al factor de transcripción Nrf2 y a las vías de ERK1/2 y p38 (de la cual falta aún obtener más información). Finalmente, el silenciamiento parcial de Nrf2 resulta en un retraso en el desarrollo tumoral inducido por vGPCR. Estos resultados ayudan a revelar la naturaleza compleja de las vías de señalización activadas por vGPCR y a la importancia de HO-1 y Nrf2 como potenciales *targets* terapéuticos en el tratamiento de KS y de otros tumores con elevados niveles de RhoA

Bibliografía

Bibliografía

1. Chang, Y. *et al.* Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi ' s Sarcoma Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2885040> JSTOR is a not-for-profit service that helps scholar. **266**, 1865–1869 (2016).
2. Cathomas, G. *et al.* Detection of herpesvirus-like DNA by nested PCR on archival skin biopsy specimens of various forms of Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol* **49**, 631–633 (1996).
3. Whitby, D. *et al.* Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* **346**, 799–802 (1995).
4. O'Brien, T. R. *et al.* Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* **180**, 1010–1017 (1999).
5. Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P. S., Said, J. W. & Knowles, D. M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS- related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* **332**, 1186–1191 (1995).
6. Soulier, J. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* **86**, 1276–80 (1995).
7. Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O. & Vajdic, C. M. Incidence of cancers in people with HIV / AIDS compared with ... *Lancet* **370**, 59–67 (2007).
8. Dedicoat, M. & Newton, R. Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. *Br. J. Cancer* **88**, 1–3 (2003).
9. Judde, J. G. *et al.* Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J Natl Cancer Inst* **92**, 729–736 (2000).
10. Delabesse, E. *et al.* Molecular analysis of clonality in Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Pathol.* **50**, 664–668 (1997).

11. Gill, P. S. *et al.* Evidence for multiclonality in multicentric Kaposi's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8257–61 (1998).
12. Jones, T. *et al.* Direct and efficient cellular transformation of primary rat mesenchymal precursor cells by KSHV. *J. Clin. Invest.* **122**, 1076–1081 (2012).
13. Mutlu, A. D. A. *et al.* In Vivo-Restricted and Reversible Malignancy Induced by Human Herpesvirus-8 KSHV: A Cell and Animal Model of Virally Induced Kaposi's Sarcoma. *Cancer Cell* **11**, 245–258 (2007).
14. An, F. *et al.* Long-Term-Infected Telomerase-Immortalized Endothelial Cells : a Model for Kaposi ' s Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency In Vitro and In Vivo †. *J. Virol.* **80**, 4833–4846 (2006).
15. Scinicariello, F., Dolan, M. J., Nedelcu, I., Tyring, S. K. & Hilliard, J. K. Occurrence of human papillomavirus and p53 gene mutations in Kaposi's sarcoma. *Virology* **203**, 153–7 (1994).
16. Li, J. J. *et al.* Expression and mutation of the tumor suppressor gene p53 in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Am. J. Dermatopathol.* **19**, 373–8 (1997).
17. Schulz, T. F. & Cesarman, E. Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus: Mechanisms of oncogenesis. *Curr. Opin. Virol.* **14**, 116–128 (2015).
18. Flore, O. *et al.* Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma- associated herpesvirus. *Nature* **394**, 588–592 (1998).
19. Wang, L. & Damania, B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus confers a survival advantage to endothelial cells. *Cancer Res.* **68**, 4640–4648 (2008).
20. Kaaya, E. E. *et al.* Spindle cell ploidy and proliferation in endemic and epidemic African Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Cancer* **28**, 1890–1894 (1992).
21. Hodak, E. *et al.* Differential expression of p53 and Ki-67 proteins in classic and iatrogenic Kaposi's sarcoma. *Am J Dermatopathol* **21**, 138–145 (1999).
22. Montaner, S. *et al.* Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can

- promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer Cell* **3**, 23–36 (2003).
23. Tomlinson, C. C. & Damania, B. The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. *J. Virol.* **78**, 1918–27 (2004).
24. Sodhi, A. *et al.* The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *Cancer Cell* **10**, 133–143 (2006).
25. Morris, V. a, Punjabi, A. S. & Lagunoff, M. Activation of Akt through gp130 receptor signaling is required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced lymphatic reprogramming of endothelial cells. *J. Virol.* **82**, 8771–9 (2008).
26. Chang, H. H. & Ganem, D. A unique herpesviral transcriptional program in KSHV-infected lymphatic endothelial cells leads to mTORC1 activation and rapamycin sensitivity. *Cell Host Microbe* **13**, 429–440 (2013).
27. Stallone, G. *et al.* Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1317–1323 (2005).
28. Ojala, P. M. & Schulz, T. F. Manipulation of endothelial cells by KSHV: Implications for angiogenesis and aberrant vascular differentiation. *Seminars in Cancer Biology* **26**, 69–77 (2014).
29. Cheng, F. *et al.* KSHV-initiated notch activation leads to membrane-type-1 matrix metalloproteinase-dependent lymphatic endothelial-to-mesenchymal transition. *Cell Host Microbe* **10**, 577–590 (2011).
30. Wang, H.-W. W. *et al.* Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* **36**, 687–693 (2004).
31. Hong, Y.-K. K. *et al.* Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* **36**, 683–685 (2004).
32. Grossmann, C., Podgrabinska, S., Skobe, M. & Ganem, D. Activation of NF-kappaB by the latent vFLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for the spindle shape of virus-infected endothelial cells and contributes to their proinflammatory phenotype. *J.*

- Viol.* **80**, 7179–85 (2006).
33. Alkharsah, K. R. *et al.* Deletion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus FLICE inhibitory protein, vFLIP, from the viral genome compromises the activation of STAT1-responsive cellular genes and spindle cell formation in endothelial cells. *J. Virol.* **85**, 10375–88 (2011).
 34. Ballon, G., Chen, K., Perez, R., Tam, W. & Cesarman, E. Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV) vFLIP oncoprotein induces B cell transdifferentiation and tumorigenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1141–1153 (2011).
 35. Qian, L.-W., Xie, J., Ye, F. & Gao, S.-J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection promotes invasion of primary human umbilical vein endothelial cells by inducing matrix metalloproteinases. *J. Virol.* **81**, 7001–10 (2007).
 36. Bala, K. *et al.* Kaposi's Sarcoma Herpesvirus K15 Protein Contributes to Virus-Induced Angiogenesis by Recruiting PLC γ 1 and Activating NFAT1-dependent RCAN1 Expression. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
 37. Haas, D. A. *et al.* The Inflammatory Kinase MAP4K4 Promotes Reactivation of Kaposi's Sarcoma Herpesvirus and Enhances the Invasiveness of Infected Endothelial Cells. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
 38. Gramolelli, S. *et al.* Inhibiting the Recruitment of PLC γ 1 to Kaposi's Sarcoma Herpesvirus K15 Protein Reduces the Invasiveness and Angiogenesis of Infected Endothelial Cells. *PLoS Pathog.* **11**, (2015).
 39. He, M. *et al.* Cancer angiogenesis induced by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus is mediated by EZH2. *Cancer Res.* **72**, 3582–3592 (2012).
 40. Qin, Z., Dai, L., Slomiany, M. G., Toole, B. P. & Parsons, C. Direct activation of emmprin and associated pathogenesis by an oncogenic herpesvirus. *Cancer Res.* **70**, 3884–3889 (2010).
 41. Masood, R., Cesarman, E., Smith, D. L., Gill, P. S. & Flore, O. Human herpesvirus-8-transformed endothelial cells have functionally activated vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor. *Am. J. Pathol.* **160**, 23–9 (2002).
 42. Wang, X. *et al.* Latency-associated nuclear antigen of kaposi sarcoma-associated herpesvirus promotes angiogenesis through targeting notch signaling effector hey. *Cancer Res.* **74**, 2026–2037 (2014).

43. Moses, A. V *et al.* Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Induced Upregulation of the c-kit Proto-Oncogene, as Identified by Gene Expression Profiling, Is Essential for the Transformation of Endothelial Cells. *J. Virol.* **76**, 8383–8399 (2002).
44. Koon, H. B. *et al.* Phase II trial of imatinib in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: AIDS malignancy consortium protocol 042. *J. Clin. Oncol.* **32**, 402–408 (2014).
45. Koon, H. B. *et al.* Imatinib-induced regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 982–989 (2005).
46. Monini, P. *et al.* Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood* **93**, 4044–58 (1999).
47. Sirianni, M. C. *et al.* gamma-Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages. *Blood* **91**, 968–976 (1998).
48. Salahuddin, S. Z. *et al.* Angiogenic properties of Kaposi's sarcoma-derived cells after long-term culture in vitro. *Science (80-.)*. **242**, 430–433 (1988).
49. Grayson, W. & Pantanowitz, L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn Pathol* **3**, 31 (2008).
50. Parravicini, C. *et al.* Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am. J. Pathol.* **156**, 743–9 (2000).
51. Katano, H., Sato, Y., Kurata, T., Mori, S. & Sata, T. Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castleman's disease. *Virology* **269**, 335–44 (2000).
52. Sharma-Walia, N. *et al.* Kaposi's Sarcoma Associated Herpes Virus (KSHV) induced COX-2: A key factor in latency, inflammation, angiogenesis, cell survival and invasion. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
53. Rainbow, L. *et al.* The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus

- 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J. Virol.* **71**, 5915–5921 (1997).
54. Dupin, N. *et al.* Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4546–4551 (1999).
55. Stürzl, M. *et al.* Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int. J. Cancer* **72**, 68–71 (1997).
56. Davis, M. A. *et al.* Expression of human herpesvirus 8-encoded cyclin D in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst* **89**, 1868–1874 (1997).
57. Hosseinipour, M. C. *et al.* Viral profiling identifies multiple subtypes of Kaposi's sarcoma. *MBio* **5**, (2014).
58. Purushothaman, P., Dabral, P., Gupta, N., Sarkar, R. & Verma, S. C. KSHV genome replication and maintenance. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
59. Bais, C. *et al.* Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *October* **392**, 0–3 (1998).
60. Yang, T. Y. *et al.* Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* **191**, 445–454 (2000).
61. Jensen, K. K. *et al.* The human herpes virus 8-encoded chemokine receptor is required for angioproliferation in a murine model of Kaposi's sarcoma. *J Immunol* **174**, 3686–3694 (2005).
62. Brown, G. C. & Borutaite, V. Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 953–6 (2006).
63. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
64. Leon, L., Jeannin, J.-F. & Bettaieb, A. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric*

- Oxide* **19**, 77–83 (2008).
65. Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **61**, 748–755 (1968).
66. Trakshel, G. M. & Maines, M. D. Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *J. Biol. Chem.* **264**, 1323–1328 (1989).
67. Cruse, I. & Maines, M. D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J. Biol. Chem.* **263**, 3348–3353 (1988).
68. Maines, M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 517–54 (1997).
69. Maines, M. D. The heme oxygenase system and its functions in the brain. *Cellular and Molecular Biology* **46**, 573–585 (2000).
70. Agarwal, A. & Nick, H. S. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 965–973 (2000).
71. Poss, K. D. & Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10925–30 (1997).
72. Yachie, A. *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* **103**, 129–135 (1999).
73. Orozco-Ibarra, M., Chirino, Y. I. & Pedraza-Chaverrí, J. Papel de la hemooxigenasa-1 en las enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Neurologia* **43**, 556–562 (2006).
74. Ryter, S. W. & Tyrrell, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 289–309 (2000).
75. Balla, J. *et al.* Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9285–9 (1993).

-
76. Jeney, V. *et al.* Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* **100**, 879–887 (2002).
77. Stocker, R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 841–849 (2004).
78. Mancuso, C., Pani, G. & Calabrese, V. Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species. *Redox Rep.* **11**, 207–213 (2006).
79. Ryter, S. W., Alam, J. & Choi, A. M. K. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev* **86**, 583–650 (2006).
80. Maines, M. D. & Gibbs, P. E. M. 30 Some years of heme oxygenase: From a 'molecular wrecking ball' to a 'mesmerizing' trigger of cellular events. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 568–577 (2005).
81. Alam, J., Igarashi, K., Immenschuh, S., Shibahara, S. & Tyrrell, R. M. Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 924–33 (2004).
82. Dulak, J., Łoboda, A., Zagórska, A. & Józkwicz, A. Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 858–66 (2004).
83. Salinas, M., Diaz, R., Abraham, N. G., De Galarreta, C. M. R. & Cuadrado, A. Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **278**, 13898–13904 (2003).
84. Martin, D. *et al.* Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol. *J. Biol. Chem.* **279**, 8919–8929 (2004).
85. Malaguarnera, L. *et al.* Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *J. Cell. Biochem.* **93**, 197–206 (2004).
86. Lam, C. W., Getting, S. J. & Perretti, M. In vitro and in vivo induction of heme oxygenase 1 in mouse macrophages following melanocortin

- receptor activation. *J. Immunol.* **174**, 2297–2304 (2005).
87. Kiemer, A. K., Bildner, N., Weber, N. C. & Vollmar, A. M. Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinology* **144**, 802–812 (2003).
88. Amersi, F. *et al.* Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **104**, 1631–1639 (1999).
89. Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K. & Bach, F. H. Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology* **24**, 449–455 (2003).
90. Immenschuh, S. *et al.* The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures. *Mol. Pharmacol.* **53**, 483–491 (1998).
91. Durante, W. *et al.* cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **273**, H317–H323 (1997).
92. Krönke, G. *et al.* Oxidized Phospholipids Induce Expression of Human Heme Oxygenase-1 Involving Activation of cAMP-responsive Element-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 51006–51014 (2003).
93. Polte, T., Abate, a, Dennery, P. a & Schröder, H. Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1209–15 (2000).
94. Kacimi, R., Chentoufi, J., Honbo, N., Long, C. S. & Karliner, J. S. Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: Role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection. *Cardiovasc. Res.* **46**, 139–150 (2000).
95. Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 625–632 (2002).
96. Juan, S.-H., Cheng, T.-H., Lin, H.-C., Chu, Y.-L. & Lee, W.-S. Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem.*

- Pharmacol.* **69**, 41–8 (2005).
97. Chen, J. C., Huang, K. C. & Lin, W. W. HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways. *Cell. Signal.* **18**, 32–39 (2006).
 98. Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1493–505 (2006).
 99. McAllister, S. C. *et al.* Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces heme oxygenase-1 expression and activity in KSHV-infected endothelial cells. *Blood* **103**, 3465–3473 (2004).
 100. Alam, J. & Cook, J. L. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 166–174 (2007).
 101. Marinissen, M. J. *et al.* Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 11332–11346 (2006).
 102. Uruno, A. & Motohashi, H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. in *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **25**, 153–160 (2011).
 103. Wang, X. J. & Zhang, D. D. Ectodermal-neural cortex 1 down-regulates Nrf2 at the translational level. *PLoS One* **4**, (2009).
 104. Li, Y., Paonessa, J. D. & Zhang, Y. Mechanism of chemical activation of Nrf2. *PLoS One* **7**, e35122 (2012).
 105. Chan, K., Lu, R., Chang, J. C. & Kan, Y. W. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13943–8 (1996).
 106. Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. & Yamamoto, M. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4184–93 (1995).
 107. Maher, J. & Yamamoto, M. The rise of antioxidant signaling-The

- evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**, 4–15 (2010).
108. Kitteringham, N. R. *et al.* Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *J. Proteomics* **73**, 1612–1631 (2010).
109. Shin, S. *et al.* Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide. *Eur. J. Pharmacol.* **620**, 138–144 (2009).
110. Tong, K. I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: A hinge and latch mechanism. in *Biological Chemistry* **387**, 1311–1320 (2006).
111. Nguyen, T., Sherratt, P. J. & Pickett, C. B. Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated By the Antioxidant Response Element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 233–260 (2003).
112. Itoh, K. *et al.* An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313–322 (1997).
113. Hayes, J. D. & McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* **31**, 273–300 (1999).
114. Kensler, T. W., Curphey, T. J., Maxiutenko, Y. & Roebuck, B. D. Chemoprotection by organosulfur inducers of phase 2 enzymes: dithiolethiones and dithiins. *Drug Metabol. Drug Interact.* **17**, 3–22 (2000).
115. Balogun, E. *et al.* Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J* **371**, 887–895 (2003).
116. Garg, R., Gupta, S. & Maru, G. B. Dietary curcumin modulates transcriptional regulators of phase I and phase II enzymes in benzo[a]pyrene-treated mice: Mechanism of its anti-initiating action. *Carcinogenesis* **29**, 1022–1032 (2008).
117. Kode, A. *et al.* Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*

- 294**, L478-88 (2008).
118. Chen, C. Y., Jang, J. H., Li, M. H. & Surh, Y. J. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 993–1000 (2005).
 119. Singh, A. *et al.* Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* **3**, 1865–1876 (2006).
 120. Ohta, T. *et al.* Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* **68**, 1303–1309 (2008).
 121. Lister, A. *et al.* Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol. Cancer* **10**, 37 (2011).
 122. DeNicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–9 (2011).
 123. Zhang, D. D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **38**, 769–789 (2006).
 124. Kensler, T. W., Wakabayashi, N. & Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89–116 (2007).
 125. Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G. & Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2046–2051 (2004).
 126. Motohashi, H. & Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine* **10**, 549–557 (2004).
 127. Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. & Park, B. K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 705–717 (2013).
 128. Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J. & Pickett, C. B. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10895–906 (2005).

129. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
130. Zipper, L. M. & Timothy Mulcahy, R. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **277**, 36544–36552 (2002).
131. Itoh, K., Mimura, J. & Yamamoto, M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1665–1678 (2010).
132. Itoh, K. *et al.* Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to Cells* **8**, 379–391 (2003).
133. Alam, J. *et al.* Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F743–F752 (2003).
134. Kobayashi, A. *et al.* Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7130–9 (2004).
135. McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 21592–21600 (2003).
136. Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T. R. & Kensler, T. W. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol. Med.* **7**, 135–45 (2001).
137. Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S. & Pickett, C. B. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element: Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 4536–4541 (2003).
138. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M. & Kensler, T. W. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2883–92 (2002).

139. Levonen, A.-L. *et al.* Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* **378**, 373–82 (2004).
140. Niture, S. K., Jain, A. K. & Jaiswal, A. K. Antioxidant-induced modification of Nrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J. Cell Sci.* **122**, 4452–4464 (2009).
141. Egger, A. L., Small, E., Hannink, M. & Mesecar, A. D. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.* **422**, 171–80 (2009).
142. Gao, L. *et al.* Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J. Biol. Chem.* **282**, 2529–2537 (2007).
143. Rachakonda, G. *et al.* Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 705–710 (2008).
144. Zhang, D. D. *et al.* Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 30091–30099 (2005).
145. Yang, M., Yao, Y., Eades, G., Zhang, Y. & Zhou, Q. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res. Treat.* **129**, 983–991 (2011).
146. Sangokoya, C., Telen, M. J. & Chi, J. T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* **116**, 4338–4348 (2010).
147. Eades, G., Yang, M., Yao, Y., Zhang, Y. & Zhou, Q. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 40725–40733 (2011).
148. Li, N., Muthusamy, S., Liang, R., Sarojini, H. & Wang, E. Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech. Ageing Dev.* **132**, 75–85 (2011).

149. Rojo, A. I. *et al.* Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 473–487 (2012).
150. Huang, H. C., Nguyen, T. & Pickett, C. B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 42769–42774 (2002).
151. Theodore, M. *et al.* Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **283**, 8984–8994 (2008).
152. Keum, Y. S. *et al.* Mechanism of action of sulforaphane: Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res.* **66**, 8804–8813 (2006).
153. Yuan, X. *et al.* Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol. Carcinog.* **45**, 841–850 (2006).
154. Sun, Z., Chin, Y. E. & Zhang, D. D. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2658–72 (2009).
155. Rushmore, T. H. & Kong, A.-N. T. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* **3**, 481–490 (2002).
156. Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J. & Batist, G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 20340–20348 (2005).
157. Nair, S., Doh, S. T., Chan, J. Y., Kong, A.-N. & Cai, L. Regulatory potential for concerted modulation of Nrf2- and Nfkb1-mediated gene expression in inflammation and carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **99**, 2070–82 (2008).
158. Kim, J. E. *et al.* Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKK activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell. Signal.* **22**, 1645–1654 (2010).

159. Lee, D. F. *et al.* KEAP1 E3 Ligase-Mediated Downregulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β . *Mol. Cell* **36**, 131–140 (2009).
160. Sun, J. *et al.* Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* **21**, 5216–5224 (2002).
161. Oyake, T. *et al.* Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6083–95 (1996).
162. Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J. D. & Yamamoto, M. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6379–6384 (2004).
163. Wakabayashi, N. *et al.* Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* **35**, 238–245 (2003).
164. Katsuoka, F. *et al.* Genetic Evidence that Small Maf Proteins Are Essential for the Activation of Antioxidant Response Element-Dependent Genes Genetic Evidence that Small Maf Proteins Are Essential for the Activation of Antioxidant Response Element-Dependent Genes. **25**, 8044–8051 (2005).
165. Hayes, J. D. & Ashford, M. L. J. Nrf2 orchestrates fuel partitioning for cell proliferation. *Cell Metab.* **16**, 139–141 (2012).
166. Gottwein, E. *et al.* A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* **450**, 1096–9 (2007).
167. Skalsky, R. L. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J. Virol.* **81**, 12836–45 (2007).
168. Coulombe, P. & Meloche, S. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1773**, 1376–1387 (2007).
169. Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *Faseb J* **9**, 726–735 (1995).
170. Karin, M. & Hunter, T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5**, 747–757 (1995).

171. McKay, M. M. & Morrison, D. K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**, 3113–21 (2007).
172. Goldsmith, Z. G. & Dhanasekaran, D. N. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**, 3122–3142 (2007).
173. Gutkind, J. S. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Networks by G Protein-Coupled Receptors. *Sci. Signal.* **2000**, re1-re1 (2000).
174. Marinissen, M. J. *et al.* G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 368–76 (2001).
175. Owens, D. M. & Keyse, S. M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203–3213 (2007).
176. Boulton, T. G. *et al.* ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**, 663–675 (1991).
177. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203–212 (1990).
178. Downward, J. Control of ras activation. *Cancer Surv* **27**, 87–100 (1996).
179. van der Geer, P. *et al.* A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr. Biol.* **5**, 404–412 (1995).
180. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573–580 (1995).
181. Sasaoka, T., Langlois, W. J., Leitner, J. W., Draznin, B. & Olefsky, J. M. The Signaling Pathway Coupling Epidermal Growth Factor Receptors to Activation of p21ras. *J. Biol. Chem.* **269**, 32621–32625 (1994).
182. Zhang, J., Zhou, B., Zheng, C. F. & Zhang, Z. Y. A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.* **278**, 29901–29912 (2003).
183. Dougherty, M. K. *et al.* Regulation of Raf-1 by direct feedback

- phosphorylation. *Mol. Cell* **17**, 215–224 (2005).
184. Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. & Marshall, C. J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**, 841–852 (1994).
 185. Mansour, S. J. *et al.* Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* (80-.). **265**, 966–970 (1994).
 186. Pagès, G. *et al.* Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Pnas* **90**, 8319–23 (1993).
 187. Hoshino, R. *et al.* Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* **18**, 813–822 (1999).
 188. Davis, R. J. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell* **103**, 239–252 (2000).
 189. Gupta, S. *et al.* Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**, 2760–70 (1996).
 190. Dérijard, 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**, 1025–1037 (1994).
 191. Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E. & Woodgett, J. R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670–674 (1991).
 192. 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**, 205–219 (1998).
 193. Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F. & Kraft, A. S. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 17001–17005 (1992).
 194. Teramoto, H. *et al.* The small GTP-binding protein Rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 25731–25734 (1996).

195. Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls: Upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 67–74 (1997).
196. Alonso, A. *et al.* Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* **117**, 699–711 (2004).
197. Torres, M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front. Biosci.* **8**, D369–D391 (2003).
198. Weston, C. R. & Davis, R. J. The JNK signal transduction pathway. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 142–149 (2007).
199. Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D. & Wisdom, R. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4504–11 (1996).
200. Behrens, A. *et al.* Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1769–1774 (2001).
201. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L. & Ulevitch, R. J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**, 808–11 (1994).
202. Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Møller, N. P. & Ullrich, A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4355–9 (1996).
203. Jiang, Y. *et al.* Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ . *J. Biol. Chem.* **272**, 30122–30128 (1997).
204. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R. J. & Han, J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 334–40 (1996).
205. Freshney, N. W. *et al.* Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**, 1039–1049 (1994).
206. Raingeaud, J. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and environmental

- stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **270**, 7420–7426 (1995).
207. Pietersma, a *et al.* p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 44–48 (1997).
208. Foltz, I. N., Lee, J. C., Young, P. R. & Schrader, J. W. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3296–3301 (1997).
209. Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E. & Gustin, M. C. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760–1763 (1993).
210. Berman, K., McKay, J., Avery, L. & Cobb, M. Isolation and characterization of pmk-(1-3): three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol Res Commun* **4**, 337–344 (2001).
211. Enslin, H., Raingeaud, J. & Davis, R. J. Selective Activation of p38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Isoforms by the MAP Kinase Kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* **273**, 1741–1748 (1998).
212. Brancho, D. *et al.* Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**, 1969–1978 (2003).
213. Hu, M. C., Wang, Y. P., Mikhail, A., Qiu, W. R. & Tan, T. H. Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **274**, 7095–7102 (1999).
214. Hanks, S. K. & Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–96 (1995).
215. Moriguchi, T. *et al.* A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**, 13675–13679 (1996).
216. Ichijo, H. *et al.* Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90–4 (1997).

217. Hirai, S. I. *et al.* MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 15167–15173 (1997).
218. Ubeda, M. *et al.* Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1479–89 (1996).
219. Takekawa, M., Posas, F. & Saito, H. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J.* **16**, 4973–4982 (1997).
220. Zhang, S. *et al.* Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* **270**, 23934–23936 (1995).
221. Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J. & Cerione, R. A. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 27995–27998 (1995).
222. Ge, B. *et al.* MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**, 1291–4 (2002).
223. Muda, M. *et al.* The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 27205–27208 (1996).
224. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242–245 (1994).
225. Posas, F. *et al.* Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 'two-component' osmosensor. *Cell* **86**, 865–875 (1996).
226. Takekawa, M., Maeda, T. & Saito, H. Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.* **17**, 4744–4752 (1998).
227. Rouse, J. *et al.* A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the

- small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027–1037 (1994).
228. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P. & Gaestel, M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**, 307–313 (1992).
229. Huang, C. K., Zhan, L., Ai, Y. & Jongstra, J. LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**, 17–9 (1997).
230. Tan, Y. *et al.* FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* **15**, 4629–4642 (1996).
231. Hazzalin, C. A. *et al.* p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr. Biol.* **6**, 1028–1031 (1996).
232. Whitmarsh, A. J., Yang, S. H., Su, M. S., Sharrocks, A. D. & Davis, R. J. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2360–71 (1997).
233. Wang, X. Z. & Ron, D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272**, 1347–1349 (1996).
234. Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V & Ulevitch, R. J. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**, 296–299 (1997).
235. Zhao, M. *et al.* Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 21–30 (1999).
236. Gómez del Arco, P., Martínez-Martínez, S., Maldonado, J. L., Ortega-Pérez, I. & Redondo, J. M. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.* **275**, 13872–13878 (2000).
237. Heidenreich, O. *et al.* MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 14434–14443 (1999).

238. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G. & Cooper, J. A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16**, 1909–1920 (1997).
239. Fukunaga, R. & Hunter, T. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* **16**, 1921–1933 (1997).
240. Kusuvara, M. *et al.* p38 kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circ. Res.* **83**, 824–831 (1998).
241. Reynolds, C. H., Nebreda, R., Gibb, G. M., Utton, M. a & Anderton, B. H. Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J. Neurochem.* **69**, 191–198 (1997).
242. Feng, L., Zhou, X., Liao, J. & Omary, M. B. Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 1, 2081–90 (1999).
243. Johnson, G. V. W. & Bailey, C. D. C. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* **183**, 263–268 (2003).
244. Hollenbach, E. *et al.* Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J.* **18**, 1550–1552 (2004).
245. Perregaux, D. G., Dean, D., Cronan, M., Connelly, P. & Gabel, C. A. Inhibition of Interleukin-1beta Production by SKF86002: Evidence of Two Sites of In Vitro Activity and of a Time and System Dependence. *Mol. Pharmacol.* **48**, 433–442 (1995).
246. Guan, Z., Buckman, S. Y., Pentland, A. P., Templeton, D. J. & Morrison, A. R. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 ??? SEK1/MKK4 ??? p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 12901–12908 (1998).
247. Badger, A. M. *et al.* SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J. Immunol.* **161**, 467–73 (1998).
248. Da Silva, J., Pierrat, B., Mary, J. L. & Lesslauer, W. Blockade of p38

- mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 28373–80 (1997).
249. Takenaka, K., Moriguchi, T. & Nishida, E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. *Science* (80-.). **280**, 599–602 (1998).
250. Engelman, J. A., Lisanti, M. P. & Scherer, P. E. Specific Inhibitors of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Block 3T3-L1 Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 32111–32120 (1998).
251. Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R. J. & Todokoro, K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* **92**, 1859–1869 (1998).
252. Efimova, T., Broome, A.-M. & Eckert, R. L. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J. Biol. Chem.* **278**, 34277–34285 (2003).
253. Wang, W. *et al.* Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3389–403 (2002).
254. Haq, R. *et al.* Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res.* **62**, 5076–5082 (2002).
255. Bulavin, D. V *et al.* Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat. Genet.* **31**, 210–5 (2002).
256. Pramanik, R. *et al.* p38 Isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun: The determinant role of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. *J. Biol. Chem.* **278**, 4831–4839 (2003).
257. Askari, N. *et al.* Hyperactive variants of p38alpha induce, whereas hyperactive variants of p38gamma suppress, activating protein 1-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **282**, 91–9 (2007).
258. Wang, Y. *et al.* Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 2161–2168 (1998).

259. Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S. & Lin, a. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16415–16420 (1998).
260. Cuvillier, O. *et al.* Suppression of Ceramide-Mediated Programmed Cell Death by Sphingosine-1-Phosphate. *Nature* **381**, 800–803 (1996).
261. Bais, C. *et al.* Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G protein-coupled receptor immortalizes human endothelial cells by activation of the VEGF receptor-2/ KDR. *Cancer Cell* **3**, 131–143 (2003).
262. Chaisuparat, R. *et al.* Dual inhibition of PI3Kalpha and mTOR as an alternative treatment for Kaposi's sarcoma. *Cancer Res.* **68**, 8361–8 (2008).
263. Martin, D., Galisteo, R., Ji, Y., Montaner, S. & Gutkind, J. S. An NF-kappaB gene expression signature contributes to Kaposi's sarcoma virus vGPCR-induced direct and paracrine neoplasia. *Oncogene* **27**, 1844–52 (2008).
264. Martín, M. J. *et al.* The G α 12/13 family of heterotrimeric G proteins and the small GTPase RhoA link the Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor to heme oxygenase-1 expression and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 34510–34524 (2007).
265. Alam, J. *et al.* Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 26071–26078 (1999).
266. Coso, O. a *et al.* The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137–1146 (1995).
267. Marinissen, M. J., Chiariello, M., Pallante, M. & Gutkind, J. S. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4289–301 (1999).
268. Sodhi, A., Montaner, S. & Gutkind, J. S. Does dysregulated expression of a deregulated viral GPCR trigger Kaposi's sarcomagenesis? *FASEB J.* **18**, 422–7 (2004).
269. Montaner, S. *et al.* The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor as a therapeutic target for the treatment of

- Kaposi's sarcoma. *Cancer Res.* **66**, 168–174 (2006).
270. Jozkowicz, Alicja; Was, Halina; Dulak, J. Oxygenase-1 in Tumors : Is It a False Friend? *Antioxid Redox Signal.* **9**, 2099–2117 (2007).
271. Sacca, P. *et al.* Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 1683–1689 (2007).
272. Deininger, M. H. *et al.* Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res.* **882**, 1–8 (2000).
273. Doi, K. *et al.* Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br. J. Cancer* **80**, 1945–54 (1999).
274. Henry, F., Bretaudeau, L., Barbieux, I., Meflah, K. & Gregoire, M. Induction of antigen presentation by macrophages after phagocytosis of tumour apoptotic cells. in *Research in Immunology* **149**, 673–679 (1998).
275. Tsuji, M. H. *et al.* Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett.* **138**, 53–59 (1999).
276. Yanagawa, T. *et al.* Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* **40**, 21–27 (2004).
277. Gueron, G. *et al.* Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol. cancer Res.* **7**, 1745–55 (2009).
278. Alam, J. *et al.* Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells: Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 27694–27702 (2000).
279. So, H.-S. *et al.* Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of heme oxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death Differ.* **13**, 1763–1775 (2006).
280. Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E. & Bonkovsky, H. L. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651–2653 (2006).

281. Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S. & Alam, J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J. Biol. Chem.* **278**, 2396–2402 (2003).
282. Alam, J. *et al.* Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 27694–27702 (2000).
283. Montaner, S., Sodhi, A., Pece, S., Mesri, E. A. & Gutkind, J. S. The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. *Cancer Res.* **61**, 2641–2648 (2001).
284. Ma, Q. *et al.* Antitumorigenesis of antioxidants in a transgenic Rac1 model of Kaposi's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8683–8 (2009).
285. Cannon, M. L. & Cesarman, E. The KSHV G protein-coupled receptor signals via multiple pathways to induce transcription factor activation in primary effusion lymphoma cells. *Oncogene* **23**, (2004).
286. Dinkova-Kostova, A. T. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11908–13 (2002).
287. Bais, C. *et al.* G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* **391**, 86–9 (1998).
288. Couty, J. P., Geras-Raaka, E., Weksler, B. B. & Gershengorn, M. C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor signals through multiple pathways in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 33805–33811 (2001).
289. Naidu, S., Vijayan, V., Santoso, S., Kietzmann, T. & Immenschuh, S. Inhibition and genetic deficiency of p38 MAPK up-regulates heme oxygenase-1 gene expression via Nrf2. *J. Immunol.* **182**, 7048–7057 (2009).
290. Krishna, M. & Narang, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3525–3544 (2008).
291. Shimo, T. *et al.* Specific inhibitor of mek-mediated cross-talk between

- erk and p38 mapk during differentiation of human osteosarcoma cells. *J. Cell Commun. Signal.* **1**, 103–111 (2007).
292. Kaspar, J. W. & Jaiswal, A. K. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 153–162 (2010).
293. Sun, Z., Zhang, S., Chan, J. Y. & Zhang, D. D. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6334–49 (2007).
294. Velichkova, M. & Hasson, T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4501–4513 (2005).
295. Kaspar, J. W., Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 1304–1309 (2009).
296. Gjyshi, O. *et al.* Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces Nrf2 during De Novo Infection of Endothelial Cells to Create a Microenvironment Conducive to Infection. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
297. Gjyshi, O. *et al.* Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces Nrf2 Activation in Latently Infected Endothelial Cells through SQSTM1 Phosphorylation and Interaction with Polyubiquitinated Keap1. *J. Virol.* **89**, 2268–2286 (2015).