Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Avances en el estudio de las funciones de p8 a través del análisis de su localización subcelular y de la identificación de sus proteínas interactoras

Valacco, María Pía

2009

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:
Valacco, María Pía. (2009). Avances en el estudio de las funciones de p8 a través del análisis de su localización subcelular y de la identificación de sus proteínas interactoras. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Valacco, María Pía. "Avances en el estudio de las funciones de p8 a través del análisis de su localización subcelular y de la identificación de sus proteínas interactoras". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

AVANCES EN EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE p8 A TRAVES DEL ANALISIS DE SU LOCALIZACION SUBCELULAR Y DE LA IDENTIFICACION DE SUS PROTEINAS INTERACTORAS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

María Pía Valacco

Director de Tesis: Silvia Moreno de Colonna
Director Asistente: Cecilia L. Varone
Consejero de estudios: Silvia Moreno de Colonna

Laboratorio de Biología Molecular
Departamento de Química Biológica

Buenos Aires, 2009

Avances en el estudio de las funciones de p8 a través del análisis de su localización subcelular y de la identificación de sus proteínas interactoras

Resumen

p8 es una proteína de 8 kDa que fue identificada en rata debido a su inducción durante la fase aguda de la pancreatitis. Los niveles de expresión de p8 aumentan en líneas celulares en respuesta al estrés y a factores mitogénicos. Se postula un rol importante para p8 en la progresión tumoral, ya que, al anular su expresión en fibroblastos transformados, se inhibe el desarrollo tumoral.

El objetivo de este estudio es comprender más profundamente las funciones de p8 así como las vías celulares en las que está involucrada.

Un análisis de homología de secuencias nos permitió identificar a p8 en diferentes especies de eucariotas superiores, y no en eucariotas inferiores. Se encontró una NLS (señal de localización nuclear) altamente conservada en su secuencia.

Ensayos de inmunocitoquímica nos permitieron estudiar su localización subcelular. Observamos que se encuentra nuclear en cultivos de células subconfluentes y uniformemente distribuida en toda la célula en cultivos superconfluentes. Su importación al núcleo es dependiente de energía, y su localización depende del estadio del ciclo celular, y del estado de acetilación. Demostramos que la NLS de p8 es funcional.

p8 es lo suficientemente pequeña como para difundir libremente entre el núcleo y el citoplasma. Su NLS y el estricto control de su localización, indican que formaría parte de complejos multiproteicos. Para profundizar en esta hipótesis, identificamos por abordaje proteómico las proteínas que copurifican con p8. A partir de las proteínas identificadas construimos el interactoma de p8. El análisis de este interactoma indica que p8 es una proteína multifuncional que puede interactuar con distintas proteínas con diversas funciones en diferentes compartimentos celulares.

Palabras Clave: p8- proteómica- localización subcelular- tumorigenesis- interactoma- NLS –

Advances in the study of the functions of p8 through the analysis of its subcellular localization and identification of its interacting partners

Abstract

p8 is an 8 kDa protein that was first identified in rat due to its induction during the acute phase of pancreatitis. Various functions related to cell growth control and stress have been attributed to p8. An important role in tumor progression was also assigned to p8 since it was observed that transformed p8-/- fibroblasts do not induce tumors when injected in nude mice.

In this study we aim to understand further, the functions of p8 and to find the pathways in which it is involved. Through sequence homology analysis we identified p8 in different species of higher eukaryotes, but not in lower eukaryotes. We saw that there is a highly conserved NLS (Nuclear Localization Signal).

Through immunocytochemistry, we found that p8 presents nuclear localization in sub-confluent cells, but it localizes in the cytoplasm of confluent cells. We also observed that nuclear import of p8 is energy dependent, and that its sub-cellular localization changes with the cell cycle stage and the acetylation state of the cells. We proved the functionality of its NLS.

p8 is small enough to diffuse between nucleus and cytoplasm passively. The fact that it presents a NLS and a strictly controlled sub-cellular localization suggests that it is forming part of multiprotein complexes. To study this, and to identify the proteins associated to p8 we performed co purification experiments and mass spectrometry analysis. With the identified proteins we built the p8 interactome, and conclude that p8 is a multifunctional protein that is capable of interacting with different proteins associated to different pathways in different cellular compartments.

Key Words: p8- proteomics- subcellular lozalization - tumorigenesis- interactome- NLS -

Trabajos publicados

Los resultados presentados en este trabajo dieron origen a la siguiente publicación:

Cell density dependent localization of p8, a protein with tumorigenic properties

J Cellular Biochemistry 2006 Apr 1;97(5):1066-79.

Valacco,María P., Malicet, Cédric., Varone,Cecilia L,Cánepa, Eduardo T.,Iovanna, Juan L. Moreno, Silvia.

A Gonzalo, a mis papás y a mis hermanos

AGRADECIMIENTOS:

Silvia Moreno por ser un ejemplo en todos los ámbitos: como persona, como científica, como docente, como tutora. Por la alegría con la que encaras todo, tanto en la vida como en el trabajo. Por tu energía, tu solidaridad, tu generosidad. Por hacernos sentir que todo se puede lograr y solucionar. Por darnos la tranquilidad de que contamos con vos para lo que necesitemos. Por entusiasmarte con las pequeñas cosas de la vida y con las pequeñas cosas de la ciencia. Por hacer que cada discusión y aprendizaje juntas sea divertido, desafiante y disfrutable.

Juan por darme la oportunidad de trabajar con vos, por tu creatividad y tu pasión por la ciencia, que trasmitís hasta con la mirada, y por priorizar a las personas ante todo.

Ceci por enseñarme todo con amor y dulzura, por mostrarme que equivocarse no es grave y por cuidarme y aconsejarme.

Al por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y de vivir 2 años inolvidables.

Silvia Rossi por regalarme tu tiempo y tus conocimientos desinteresadamente, por estar siempre al pie del cañón y por prestar atención a todo lo que nos pasa (desde lo que comemos hasta los resultados de los Westerns),

Pauli por contestar todas mis preguntas con lujo de detalles, por interesarte por mis experimentos siempre y por tu empuje y tu fuerza que se contagia a todo el laboratorio.

Mariela Scassa por tu alegría y energía, tus consejos y tu apoyo.

Richard por ser mi compañero de frustraciones y fracasos, por tus conocimientos sobre TODO, tu cultura general, tus videos educativos y porque nunca te falta una palabra.

Edu por tu cariño y tu buena onda, por tener siempre una frase alegre a mano.

Elba, por los consejos y la ayuda cada vez que la necesite.

Jime, Jose, Fiore, Vane, Cons, Leti , Lucas, Paula, Irina, Marcelo, Patricia, Silargi y Virgi, por el lindo ambiente, por compartir las cosas sin problemas, por ayudarme cuando les pedí, por los almuerzos divertidos, los seminarios, Garbis, Siga la vaca, congresos varios y por la buena onda.

Juli, Marie, Abel por ser buenos vecinos y compañeros de cursos, docencias, miedos y alegrías.

Juan O, Patricia R, Aenoch, por su paciencia y por contestar todas mis preguntas.

A los chicos del laboratorio de Marsella, por hacerme sentir como en casa.

Mis amigos y familia política: por admirarme e interesarse por lo que hago, aunque nunca entendieran realmente de que se trata.

Mi familia por estar orgullosos de mí, sin importar lo que haga.

Gonzalo, por estar siempre al lado mío. Por apoyarme, por confiar en mí y por darme fuerza y libertad.

INDICE

INTRODUCCION 1

p8: gen y proteína 2

Regulación de la expresión de p8 3

p8 y estrés celular 5

p8 y progresión tumoral 6

p8 y metástasis 7

p8 y ciclo celular 9

p8 y apoptosis 10

p8 y quimioresistencia 11

Otras funciones 11

Integración de los antecedentes de p8 12

OBJETIVOS 14

Objetivo General 15

Primer objetivo particular 15

Segundo objetivo particular 15

Hipótesis 16

MATERIALES Y METODOS 17

Cultivo de líneas celulares 18

Medios de Cultivo 18

Tripsinización 18

Determinación del número de células y su viabilidad 18

Preparación de vectores de expresión 19

Obtención de bacterias competentes 19

Transformación de bacterias competentes 19

Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep) 20

Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep) 20

Análisis de las preparaciones plasmídicas 20

Construcción de vectores 21

pGFP-p8 21

pGFP-p8NLS 21
pGFP-p8NLSmut 22
pGFP-NES (606-614) 22
FlagHIS-p8 22
Transfección de células 24
Western Blot 24
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA) 24
Transferencia a membrana 25
Detección de proteínas 25
Inmunocitoquímica 26
Anticuerpos Primarios 27
Citometría de Flujo 27
Tratamientos con drogas 27
Espectrometría de masas 28
Preparación de extractos celulares 28
Protocolo de Purificación 29
SDS-PAGE y digestión en gel 30
Digestión en solución 31
Cromatografía liquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tandem (QStar) 31
Estudio de la sobre expresión de p8 en *S. cerevisiae* 32
Construccion del vector p8-pESC-URA 32
Transformación de levaduras 34
Extracción de ARN levaduras 34
Extracto para WB levaduras 34

RESULTADOS Y DISCUSION 35

ESTUDIO DE LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE p8 36
Introducción 37
Señal de localización nuclear de p8 37
La localización subcelular de p8 depende de la densidad de células en cultivo 39

Localización subcelular de p8 a lo largo del ciclo celular 41
Importación nuclear de p8 42
Exportación de p8 46
Vías de transducción de señales y localización de p8.. 48
Acetilación de proteínas y localización subcelular de p8..... 49
Discusión 51

p8 Y SACCHAROMYCES CEREVISIAE 55
p8 y *Saccharomyces cerevisiae* 56

ESTUDIOS PROTEOMICOS DE P8 Y DE SUS PROTEINAS INTERACTORAS..... 57
Introducción..... 58
Abordaje experimental: purificación de complejos proteicos asociados a p8..... 59
Resultados de la purificación 63
Análisis e identificación por espectrometría de masa..... 70
Estrategia de espectrometría de masas utilizada 74
Modificaciones post traduccionales de p8 76
Proteínas que interactúan con p8 de forma directa o indirecta 83
Construcción del interactoma de p8 89
Ubc9 93
Relación entre p8 y p53 96
AIM2..... 97
FUS..... 98
Relación de p8 con correguladores de la transcripción..... 101
p100 101
YY1 102
Otros interactores 103
FHL1 103
BolA 104
Rae1 104
LSM12..... 105

Apg16 105
SRP9 106
Galectina 7 106
KNP-1 106
Septin-2 107
BCAS2 107
Interactoma de p8 108

INTEGRACION DE RESULTADOS 110
p8: proteína multifuncional 111

BIBLIOGRAFIA 115

INTRODUCCION

p8: gen y proteína

El gen *p8* fue identificado en el año 1997 por el grupo de Iovanna, debido a su fuerte expresión en células acinares de rata durante la pancreatitis aguda [1]. Simultaneamente fue identificado y denominado Com1 (Candidate of Metastasis 1) por otro grupo independiente, que observó que este gen estaba inducido en células de cáncer de mama metastásicas [2]. Luego fue clonado en humanos, ratón y Xenopus [3 - 5]. En los últimos años se ha adoptado el nombre NUPR1 (Nuclear Protein 1) como el sinónimo más utilizado.

El gen p8 humano está situado en el cromosoma 16, en posición p11.2. Está organizado en tres exones separados por dos intrones. El tamaño de los exones es de 214, 150 y 329 nucleótidos. Algunos tejidos de humanos adultos tales como el estómago, el colon y los riñones expresan p8 constitutivamente [3]. El RNA mensajero de *p8* se expresa en páncreas de rata durante el período prenatal y decrece progresivamente hasta llegar a niveles indetectables en la glándula adulta [1]. La secuencia completa del mensajero humano es de 693 nucleótidos, sin considerar la extensión de poliA. Presenta un único marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 82 amino ácidos.

MATFPPATSA PQQPPGPEDE DSSLDESDLY SLAHSYLGGG
GRKGRTKREA AANTNRPSPG GHERKLVTKL QNSERKKRGA RR

p8 es una proteína básica con un alto punto isoléctrico (9,6 a 10,4), su extremo amino terminal es rico en aminoácidos ácidos y el extremo C-terminal es rico en aminoácidos básicos. p8 contiene en su secuencia 14 a 17% de aminoácidos susceptibles de ser fosforilados (serinas, treoninas y tirosinas) y una alta abundancia de prolina y glicina.

La proteína p8 no presenta homología de secuencia con proteínas de función conocida, pero si presenta características de las proteínas denominadas HMG-I/Y (High Mobility Group). A pesar que la identidad total entre ese grupo de proteínas, y p8 es de un 35%, se vio que comparten su bajo peso molecular, punto isoeléctrico y la distribución de cargas, y el hecho de que no se desnaturalizan por calentamiento a 100°C y no precipitan con TCA (ácido tricloroacético) al 2%, aunque sí lo hacen con TCA 10% [6].

Diferentes métodos de predicción de estructura secundaria indican que p8 presenta un motivo hélice-vuelta-hélice, característico de muchos factores de transcripción. Técnicas biofísicas demuestran que p8 carece de estructura terciaria, o que ésta es, a lo sumo, muy débil. También se vio que p8 no está plegada en solución y presenta una estructura aleatoria (probablemente debido a su alto contenido de glicinas y prolinas y su bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos).

p8 tiene la capacidad de unirse al DNA, sin preferencia por alguna secuencia específica. Se ha demostrado que algunas proteínas quinasas como la proteína quinasa A (PKA) y la tirosina quinasa de sarcoma p60 son capaces de fosforilar a p8 en ensayos in vitro, y la fosforilación por PKA produce un aumento en la estructura tipo hoja β y una disminución de la estructura aleatoria. Además, la forma fosforilada de p8 presenta una mayor afinidad al DNA que la forma no fosforilada [6].

Esta característica de unirse al DNA es compartida con las HMG-I/Y, y esto sugeriría que p8, al igual que las HMG podría ser un factor de transcripción arquitectónico, que regula la estructura del DNA y de la cromatina [7, 8]

Regulación de la expresión de p8

El gen p8 presenta todas las características de un gen de estrés muy sensible y ubicuo, que puede ser inducido por una gran variedad de agentes de estrés, y que estaría involucrado en un gran número de vías de señalización.

Se realizaron experimentos para comprender la regulación de la expresión de p8 realizando construcciones conteniendo fragmentos de longitud variable correspondientes al promotor de p8, en un vector reportero en el cual este promotor controla la expresión de la enzima Cloranfenicol Acetiltransferasa (CAT). Estos experimentos demostraron que la zona proximal al gen es la que regula la expresión de p8, y que contiene elementos de regulación positiva y negativa. Se identificó entre los elementos de regulación el sitio consenso de unión en *cis* de C/EBP y se comprobó que el factor de transcripción C/EBP y p38 [4] inducen la expresión de p8.

TGFβ también fue identificado como inductor de p8 en células murinas. El pico de expresión se observa 9 horas después del agregado de TGFβ [9]. Los miembros de la familia TGFβ son citoquinas, moléculas producidas por muchos tipos celulares que están involucradas en procesos como la proliferación, la diferenciación y la fabricación de matriz extracelular. El control de la proliferación celular por TGFβ es un proceso complejo que depende del tipo celular, del ambiente y del estado de la célula. Puede provocar una regulación positiva o negativa: estimula el crecimiento de ciertas células mesenquimáticas, fibroblastos y osteoblastos pero inhibe la proliferación de otros tipos celulares como las células epiteliales y endoteliales.

La vía de señalización de TGFβ utiliza receptores con actividad serina/treonina quinasas que están presentes en la membrana. Una cascada de fosforilación activa la vía Smad que provoca la traslocación de Smad al núcleo para regular la expresión de ciertos genes. En el promotor murino de p8 se observan tres secuencias putativas de regulación por Smad, y una de las secuencias contiene el sitio consenso de unión en *cis* de C/EBP. Es probable que Smad y C/EBP cooperen en este proceso regulatorio.

Se demostró que la incorporación de timidina tritiada luego del tratamiento con TGFβ es más marcada en los fibroblastos que expresan p8 (obtenidos de ratónes wt, p8 +/+), y menos en los que no expresan p8 (obtenidos de ratónes p8 -/-). Esto sugeriría que p8 actuaría como mediador de los efectos de TGFβ.

Una hipótesis interesante seria que TGFβ active la expresión de p8, que a su vez estimula la actividad transcripcional de las Smads responsables de completar la señalización por TGFβ [10].

Ensayos realizados con una línea celular clonal, derivada de células que no expresan p53, demostraron que p53 ejercería un rol supresor sobre p8, ya que en ausencia de p53, los niveles del mRNA de p8 se encuentran más elevados que en presencia de p53, lo que indica una regulación negativa de p53 sobre la expresión de p8 [10].

El control de la expresión de una proteína también puede estar dado por regulaciones post traduccionales. Goruppi et al [11] demostraron que p8 contiene una región de degradación PEST (Pro/Glu/Ser/Thr-rich) en la zona

amino terminal. Las secuencias PEST son comúnmente observadas en proteínas que son degradadas por el sistema ubiquitina/proteasoma. Se vio que la expresión de p8 en células mesangiales es regulada al menos parcialmente por la vía del proteasoma, y que además, esta degradación depende del grado de fosforilación de la proteína.

p8 y estrés celular

In vivo, muchos agentes de estrés son capaces de inducir la expresión del mRNA de p8. Esta inducción se vio en páncreas, hígado y riñón, como consecuencia de la administración sistémica de lipopolisacáridos [12]. La expresión de p8 también aumenta en células de cerebro murino luego de injurias como la isquemia [4]. Esto indica que la capacidad de p8 de ser inducida por estrés es ubicua.

In vitro, se demostró que algunas drogas como cicloheximida, TNFα, dexametasona, ceramidas, y staurosporina, y la ausencia de suero en el medio, inducen la expresión de p8 en células pancreáticas AR4-2J; éstas drogas son capaces de inducir apoptosis en estas células, con lo cual la sobreexpresión de p8 podría también estar relacionada a este proceso [3]. Se vio que incluso un estrés mínimo es capaz de inducir la expresión de p8: células NIH3T3 mostraron un aumento fuerte y transitorio de la expresión de p8 entre las 3h y 9h luego del cambio de medio a células en cultivo por medio fresco [13]. La expresión luego disminuye y se vuelve indetectable al cabo de 12h. Esta cinética de activación llevaría a pensar que este aumento se debe a la ausencia de factores secretados por la célula ya que la inducción no ocurre al cambiar el medio por medio condicionado, y estos factores no son específicos de un tipo celular en particular ya que medios condicionados provenientes de cultivos de otras células también inhiben la expresión de p8. Se ha reportado que otras moléculas tales como p38, JNK y ERK1/2 sufren la misma inducción transitoria frente a un cambio de medio a células en cultivo, y es importante destacar que estas proteínas parecerían estar involucradas en la inducción de p8 ya que el inhibidor de p38 (SB203580) disminuye este aumento transitorio de la expresión de p8 y los inhibidores de JNK y ERK1/2 lo inducen[14].

p8 y progresión tumoral

Existen varios ejemplos de sobreexpresion de genes de estrés en tumores en los cuales, los niveles de expresión de éstos correlaciona con la agresividad del tumor. Los genes de estrés pueden facilitar la progresión tumoral y la formación de metástasis ayudando a las células a adaptarse al nuevo microambiente [15].

Existe una correlación entre el nivel de expresión de p8 y la agresividad de varios tipos de tumores. En tumores pancreáticos, se vio que p8 presenta niveles de expresión aumentados [16]. Asimismo p8 es el gen cuya expresión se encuentra más aumentada en adenomas pituitarios al compararlos con tejidos normales, y se comprobó que p8 contribuye a las propiedades tumorigénicas de las células pituitarias, ya que la disminución en la expresión de p8 en células tumorales pituitarias, enlentece su capacidad de formar tumores [17].

La expresión de p8 también está incrementada en tumores cerebrales [18] y en tumores mamarios [19-21] y tiroideos [22].

La implicancia de p8 como gen de estrés que permite el desarrollo tumoral ha sido estudiada por el grupo de Iovanna. Para esto se utilizaron fibroblastos de ratónes normales p8+/+ y de ratónes p8-/- . Los fibroblastos se trasformaron con un retrovirus pBabe-ras^{V12}/E1A que codifica para la proteína ras^{V12} mutada y el oncogen adenoviral E1A. La expresión de estas dos proteínas les da a los fibroblastos normales la capacidad de formar tumores. Se midió y comparó el poder tumorigénico en los fibroblastos transformados que expresan p8 y en los que no. Mientras que los fibroblastos p8+/+ son capaces de formar colonias en agar blando y de inducir tumores al ser inyectados subcutáneamente en ratónes inmunosuprimidos, los fibroblastos p8-/- transformados no tienen esta capacidad (figura 1).

Al restaurar la expresión de p8 en los fibroblastos p8-/-, por medio de un retrovirus recombinante se recuperó la capacidad tumorigénica. Estos resultados indican que p8 seria indispensable para el desarrollo de tumores [16, 23]. El mecanismo por el cual p8 permite el desarrollo de tumores es una incógnita hasta el momento, pero se podría suponer que p8 estaría

confiriendo a las células la ventaja de resistir el estrés ambiental que genera el nuevo entorno, permitiendo asi la proliferación de las células.

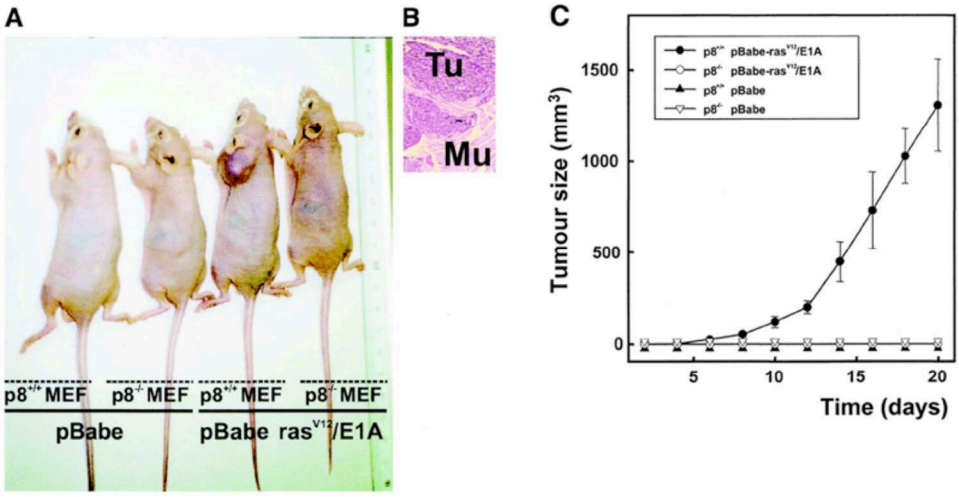


Figura 1: Ratónes inmunosuprimidos recibieron fibroblastos transformados con ras^{v12}/E1A provenientes de ratónes que expresaban (p8+/+) o no expresaban p8 (p8-/-). A: Ratónes representativos del crecimiento tumoral. B: Aspecto histológico de un tumor representativo. C: Curvas de crecimiento de los tumores.

Contradictoriamente, también se ha observado que p8 podría tener actividad supresora de tumores.

Se ha demostrado que la expresión de p8 en células de cáncer de próstata esta disminuida y que la sobreexpresión de p8 retarda el crecimiento de estas células [24]. Se vio que la inhibición de la proliferación de células MCF7 en cáncer de mama, está mediada por un aumento en la expresión del mRNA de p8 [21]. En células de sarcoma sinoviales la expresión de p8 está disminuida y el aumento de la expresión de p8, reduce la proliferación celular [25].

p8 y metástasis

En un tumor primario, ciertas células son seleccionadas en base a su rápido crecimiento, su pobre respuesta a señales apoptóticas y a su capacidad de evadir la vigilancia inmunológica del huésped [26]. Luego las células tumorales migran por el organismo, pero no forman metástasis en todos los tejidos; este proceso depende de interacciones que la célula pueda establecer con los órganos blanco [27] y serán capaces de invadir un órgano

sólo si logran adaptarse al nuevo microambiente. El entorno del órgano invadido será diferente al del órgano original, las células invasoras deberán poder resistir el estrés que les produce este nuevo ambiente, y su capacidad de adaptarse y sobrevivir estará directamente relacionada con su capacidad de generar metástasis. Esta adaptación es un proceso complejo, que requiere que las células adquieran nuevas propiedades como la capacidad angiogénica, la producción de proteasas, y la expresión de algunas moléculas de adhesión [28, 29].

Dado que p8 es una proteína de estrés que presenta alta expresión en varios tipos de cánceres podría decirse que juega un rol importante durante los procesos metastásicos, para la adaptación de las células tumorales al nuevo entorno que las rodea [23].

Los fibroblastos p8+/+ transformados presentan la capacidad de crecimiento disperso ya que son capaces de formar tumores al ser inyectados intraperitonealmente en ratónes inmunosuprimidos, mientras que los fibroblastos p8-/- transformados no tienen estas capacidades metastásicas.

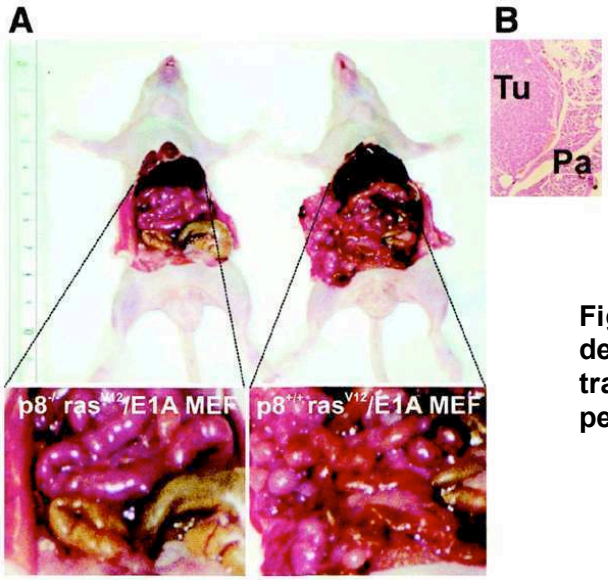


Figura 2: Capacidad de metástasis de los fibroblastos p8+/+ y p8 -/- transformados inyectados intra-peritonealmente.

El grupo de Ree, identificó a la proteína Com1 (Candidate of Metastasis1), idéntica a p8, como una proteína necesaria para el desarrollo de metástasis en cáncer de mama [2, 30]. Estos resultados sugieren que p8/Com1 controlaría las funciones celulares necesarias para la progresión tumoral y para el desarrollo de metástasis.

p8 y ciclo celular

Las proteínas de estrés son las responsables de regular la respuesta de la célula frente a estímulos inesperados. La regulación de expresión génica y de vías de transducción, determinarán si la célula sigue su ciclo de proliferación normal, si arresta su ciclo o si entra en apoptosis.

Una comparación entre fibroblastos p8+/+ y p8-/-, permitió observar que los fibroblastos p8-/- crecen más rápidamente e incorporan mayores niveles de [^{3}H] timidina y de BrdU que los fibroblastos normales [10]. La regulación de p8 podría ser a través de las quinasas dependientes de ciclina ya que los niveles intracelulares, así como la actividad de Cdk2 y Cdk4 son más bajos en los fibroblastos normales.

La expresión de p8 aumenta al arrestarse el ciclo celular, y el arresto de células en respuesta a la deprivación de suero es más marcado en los fibroblastos normales que en los p8-/- [10] y en líneas celulares pancreáticas tumorales Panc-1 y BxPc-3 que expresan p8 comparadas con las que tienen el gen de p8 silenciado [14]. Parecería entonces que p8 podría también estar implicado en mecanismos de arresto del ciclo celular.

p8 interactúa con Jab1. Jab1 es una proteína multifuncional que está asociada a la regulación del ciclo celular y al desarrollo, y es una subunidad clave en el complejo de señalización COP9. Una de sus funciones más importantes es controlar los niveles de p27/Kip1, a través de su exportación al citoplasma para su eventual degradación vía proteasoma. p27 es un inhibidor de Cdk por lo que Jab1 estaría controlando el ciclo celular al regular la localización de p27. p8, al interactuar con Jab, regula el efecto de ésta sobre p27 ya que es necesaria para la traslocación, Jab1 dependiente, de p27 del núcleo al citoplasma y se propuso que juntos, Jab1 y p8 podrían estar regulando el crecimiento celular.

Recientemente se demostró que, en respuesta a doxorrubicina en celulas tumorales mamarias, p8 estaría formando un complejo con p53 y p300, y este complejo se pegaría al promotor de p21, activando su expresión. Este fenómeno permite la progresión del ciclo celular aún en presencia de doxorrubicina [20], lo que indicaría en este caso, un rol de p8 en favor de la progresion del ciclo celular en presencia de esta droga.

p8 y apoptosis

Hay reportes contradictorios con respecto a la relación entre p8 y apoptosis. El rol de p8 en apoptosis parecería depender del tipo celular analizado y del estado de las células. La ausencia de suero en el medio o las drogas como cicloheximida, TNFα, dexametasona, ceramidas, y staurosporina que inducen apoptosis en células AR4-2J, son capaces de aumentar la expresión de p8 [1].

Los fibroblastos que expresan p8 son más sensibles a la apoptosis inducida por adriamicina (daños al DNA) que los fibroblastos que tienen el gen de p8 anulado. Asimismo, células HeLa que sobreexpresan p8 presentan niveles más altos de apoptosis inducida [10]. O sea que, parecería que, la expresión de p8 podría estar facilitando la muerte celular por apoptosis. Dado que p53 está involucrada en estos dos procesos, sería posible que p8 y p53 pudieran estar implicadas en las mismas vías de señalización. El grupo de Iovanna ha demostrado que la expresión de p53 en respuesta al daño al DNA es más marcada en células que expresan p8 comparadas con las células KO para p8, sugiriendo que p8 podría estar regulando la actividad de p53. Como ya mencionamos, se demostró, a través de ensayos con genes reporteros utilizando el promotor de p8, que p53 es un fuerte represor de p8. Parecería entonces que p8 y p53 están relacionados en algún tipo de circuito de autorregulación [9].

Por otro lado, la expresión de p8 correlaciona negativamente con apoptosis en tumores mamarios y pancreáticos [16], indicando que p8 tendría un rol anti-apoptótico.

p8 interactúa con la pequeña proteína protimosina α. Esta es una proteína muy conservada y ampliamente distribuida en mamíferos. Su papel fisiológico no es claro, pero se sabe que es una proteína principalmente nuclear que contiene una NLS bipartita funcional [31]. En solución adopta una estructura plegada al azar, y es capaz de ser fosforilada in vivo [32]. Está presente en todos los estadíos del ciclo celular [33] y su expresión correlaciona con la proliferación [34, 35]. Es un marcador de cáncer de mama y sirve como marcador pronóstico de hepatocarcinoma [36]. Se ha demostrado que cuando p8 y protimosina α se sobreexpresan juntas, son

capaces de inhibir la apoptosis inducida por staurosporina [37] lo que indicaría un rol antiapoptótico para ambas proteínas.

p8 y la quimioresistencia

Se ha propuesto que p8 puede conferir a las células una resistencia a los agentes tradicionales utilizados en quimioterapias. Por un lado se vio que células pancreáticas p8-/- eran más susceptibles a la apoptosis inducida por gembcitabina, el único agente quimioterapeutico que es parcialmente efectivo contra el cáncer de páncreas [38]. Como mencionamos anteriormente, p8 puede conferir resistencia a la doxorrubicina en células de cáncer de mama, a través de un aumento en la expresión de p21 (que en este caso estaría permitiendo la progresión del ciclo celular y no su arresto) y de la proteína antiapoptotica Bcl-X_L [20].

La expresión de p8, permite a células MCF10A, resistir el tratamiento con Taxol, Carboplatino y Vitamina D_3 [39]. Estas drogas actúan a través de diferentes mecanismos, ya que Carboplatino y doxorrubicina inducen un estrés genotóxico, mientras que el taxol actúa sobre la estabilidad de los microtúbulos, previniendo la reestructuración celular, y la vitamina D_3 induce efectos antiproliferativos a través de múltiples mecanismos.

Esta variedad en los mecanismos de acción de las drogas a las que p8 confiere resistencia, indica que p8 tendría un rol de amplio espectro en esta resistencia al efecto tóxico de las drogas.

Otras funciones

Grupos independientes al de Iovanna, sugieren la participación de p8 en otros procesos. El grupo de Nilson demostró que la expresión embrionaria de la hormona luteneizante LHβ parecería estar acoplada a la expresión de p8 [40] y que la pérdida de p8 está relacionada con alteraciones en los fenotipos genitales [41].También se asoció a p8 con el crecimiento inducido por glucosa de células β pancreáticas [42], y con la hipertrofia de células renales mesangiales [43]. Ya en otro modelo como *Drosophila,* se relacionó a p8 con el arresto celular en respuesta al hambreado [44].

Se ha demostrado que p8 interactúa con y es acetilada por p300, y se ha propuesto que p8 regularía la expresión de genes a través de su interacción con este coactivador de la transcripción. Por ejemplo, se vio que este complejo se une a PTIP (Proteína interactora del dominio de transactivacion de Pax2) y de esta forma revierte la inhibición de PTIP sobre el promotor de glucagon en células InRIG9 y NIH3T3 [45].

Integración de los antecedentes de p8

La siguiente tabla resume las diferentes funciones propuestas para p8, por distintos autores en diferentes modelos.

Promoción del crecimiento/ Pro-tumoral	**Arresto del crecimiento/Anti tumoral**
Necesaria para el crecimiento de fibroblastos en agar blando[23]	Supresor de tumores en cáncer de próstata [24] y en algunas líneas tumorales mamarias[46] y de sarcoma sinovial [25]
Necesaria para el desarrollo de tumores a partir de fibroblastos transformados inyectados en ratónes nude[23]	Fibroblastos p8-/- crecen mas rápido que los que expresan p8[10]
Expresión aumentada en tumores (pancreáticos, tiroides, mama)[19, 22, 47]	Disminución de la expresión de p8 por RNA antisentido promueve el crecimiento de líneas celulares pancreáticas[14]
Necesaria para metastasis en cáncer de mama [30]	
Promueve progresión del ciclo celular en células cancerigenas mamarias e induce fosforilación de Rb [20]	
Anti-apoptotica	**Pro-Apoptotica**
Induce Bcl-X_L y p21 en respuesta a doxorrubicina, favoreciendo la progresión del ciclo celular.[20]	Fibroblastos p8 -/- son mas resistentes a la apoptosis inducida por daños al DNA [10, 19]
Ablación de la expresión de p8 resulta en mayores niveles de apoptosis [38]	Células HeLa que sobreexpresan p8 presentan mayores niveles de apoptosis inducida[3]
Correlaciona inversamente con la apoptosis en casos clínicos de cáncer pancreático [16] y de mama [19]	Sensibiliza a astrocitos a la apoptosis [39]
	Es mediadora de la apoptosis inducida por cannabinoides en células de glioma humano [48]

Tabla 1: Resumen de las funciones de p8 sugeridas hasta el momento.

Los antecedentes indican que p8 es una molécula biológica capaz de producir efectos opuestos, basados en el escenario fisiológico. Está

relacionada con la adaptación al estrés, la supervivencia y la progresión del ciclo celular.

Hasta el momento, no resulta fácil describir mecanismos de acción de p8. La multiplicidad de efectos, indicaría que p8 presenta diferentes modos de señalización en diferentes contextos celulares. p8 estaría regulando, por vías aún no determinadas, la progresión del ciclo celular y la supervivencia y la adaptación al estrés. Podemos proponer que, efectivamente es una proteína de estrés, que estaría regulando la actividad transcripcional de distintas proteínas como p53, Smads, p300, p21, actuando como cofactor de la transcripción, como se ha propuesto para ciertas proteínas HMG [49, 50]; y que de esta forma, estaría regulando la respuesta celular frente a distintas situaciones. Esto no explica todas las funciones que p8 parecería llevar a cabo en las células y parecería que esta no es la única vía de acción de p8.

Dada la importancia de los efectos de p8, es importante profundizar el estudio de esta proteína para poder identificar las vías en las que esta involucrada y así comprender los mecanismos que le confieren esta multiplicidad de funciones.

OBJETIVOS

Objetivo General

El gran objetivo es dilucidar el mecanismo de acción de p8 que aún se desconoce, y esclarecer sus funciones. La dilucidación de su mecanismo de acción permitirá evaluar la posibilidad de que este gen sea un nuevo gen blanco de drogas para tratar la progresión de las células tumorales y las metástasis, así como ser utilizado como diagnóstico.

El presente trabajo tuvo dos objetivos particulares, que contribuyen al objetivo general.

Primer objetivo particular

Estudio de la localización subcelular de p8

La primera parte de este trabajo se dedicó a definir la localización subcelular de p8, y a determinar los factores que la regulan. El estudio de la ubicación subcelular de p8 puede dar información sobre su función.

- Estudiar la localización subcelular de p8 endógena y sobreexpresada en células creciendo en cultivo en condiciones de rutina.
- Estudiar la localización subcelular de p8 endógena y sobreexpresada en situaciones de estrés, arresto celular por tratamiento con drogas o deprivación de suero, en situación de deprivación de energía, o de inhibición de la desacetilacion de histonas.
- Estudiar la localización de una proteína de fusión p8-GFP y evaluar la funcionalidad de la putativa NLS de p8 por construcciones con GFP.

Segundo objetivo particular

Estudios proteómicos de p8 y de sus proteínas interactoras

La segunda parte de este trabajo se dedicó a la *utilización de técnicas de espectrometría de masa para el análisis y* caracterización de los complejos a los cuales esté asociada p8.

- Purificar por anticuerpos y columnas de afinidad a p8 fusionada a 2 etiquetas expresada en células humanas, de forma tal de arrastrar las proteínas asociadas a ésta para su posterior identificación por espectrometría de masas.

- Generar una lista de proteínas interactoras de p8. Analizar esta lista y proponer funciones para p8, en base a las interacciones encontradas y a datos previos de interactores de p8.
- Estudiar por espectrometría de masas las modificaciones postraduccionales de p8

Hipótesis

Dado que p8 es una proteína pequeña que presenta una NLS en su secuencia, proponemos que debería tener una localización subcelular regulada y que ésta NLS debería ser funcional. Si esta NLS fuera realmente funcional proponemos que p8 estaría asociada a otras proteínas en la célula, ya que de no ser asi, debido a su tamaño debería poder difundir libremente entre núcleo y citoplasma encontrándose distribuida homogéneamente en toda la célula. En caso de estar interactuando con otras proteínas, podría estar involucrada en la traslocación de estas.

La identificación de las proteínas que interactúan debería ayudar a dilucidar las vías en las que p8 esta involucrada en la célula.

Las funciones propuestas para p8 hasta el momento han sido varias. Se la ha relacionado con la regulación de genes asociados al crecimiento celular, a la muerte celular, a la progresión tumoral, pero hasta el momento los datos son contradictorios y confusos.

A través del estudio de la regulación de la localización subcelular de p8 que es un proceso complejo, y del estudio del interactoma de p8 pretendemos llegar a esclarecer los procesos en los cuales p8 está involucrada identificando las proteínas con las que interactúa para llevar a cabo sus funciones en los diferentes compartimentos celulares. Proponemos que p8 no tiene una única función en la célula, y que está involucrada en más de una vía. El estudio de las proteínas interactoras de p8 nos permitirá verificar esta hipótesis.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de líneas celulares

Las células HeLa, HEK 293T, y las líneas tumorales de páncreas: Panc-1 y MiaPaCa fueron crecidas a 37°C en atmósfera de aire 5% de CO_2 y 95% de humedad.

Medios de Cultivo

Se utilizó medio modificado D-MEM (Dulbecco´s Modified Eagle medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de amino ácidos esenciales, 4mM de glutamina, bicarbonato de sodio 1,5 g/L y 50 U/ml de penicilina y 50 μg/ml de estreptomicina.

Tripsinización

Una vez que las células formaron una monocapa, el medio de cultivo fue aspirado y descartado, las células se lavaron una vez con PBS (8 g de ClNa, 0,2 g de ClK, 1,44 g de PO_4HNa_2, y 0,24 g de PO_4H_2K en 1 litro de agua bidestilada, pH 7,4) para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero y luego se agregó a cada placa o botella 1,5 ml de solución de tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM (GIBCO). Se incubaron a temperatura ambiente (o a 37 °C) hasta observar en el microscopio que las células se despegaran. Luego fueron resuspendidas en medio fresco, se determinó el número y la viabilidad celular como se indica más abajo y se plaqueó a una densidad de 2,0 x 10^4 células/ cm^2 en botellas T 25 o T 75 o en placas de 100 mm de diámetro.

Determinación del número de células y su viabilidad

Para la determinación del número de células y su viabilidad se empleó el método de exclusión del azul tripán. Se colocaron 50 μl de la suspensión celular en 30 μl de medio y 20 μl de la solución de azul tripán 4 % (azul tripán 400 mg, ClNa 810 mg, PO_4HK_2 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg a pH 7,4, en PBS). Se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se efectuó el recuento celular (N) al microscopio óptico en los cuatro cuadrantes de la cámara entre los 5 y los 10 minutos luego del

agregado del colorante. El número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

Células/ ml = (N/ 4) x 1.000 x 2 x 10

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \times 100$$

Preparación de vectores de expresión

Obtención de bacterias competentes

Las bacterias competentes se prepararon según los protocolos del manual de Molecular Cloning [51]. Brevemente, se inocularon 2 ml de medio LB líquido (extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, ClNa 5 g, agua c.s.p 1 litro) con bacterias *Escherichia coli*, cepa DH5α e incubaron con agitación constante a 37 °C, durante toda la noche. Luego se diluyó el cultivo a 50 ml con medio LB y se incubó a 37 °C con agitación, hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento (DO_{600}= 0,35-0,4). Se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en 10 ml de Cl_2Ca 60 mM frío y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 5.000 x g y el pellet celular se resuspendió en una solución de Cl_2Ca 60 mM, glicerol 15%. Las bacterias competentes se alicuotaron y almacenaron a -70 °C.

Transformación de bacterias competentes

Una pequeña cantidad de DNA plasmídico (50-100 ng) se incubó con 50-100 µl de bacterias en hielo durante 45 minutos. A continuación las bacterias fueron sometidas a un shock térmico a 42 °C durante 2 minutos, seguido de un enfriamiento rápido en baño de agua con hielo. Luego se agregó LB hasta completar un volumen de 1 ml y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron y resuspendieron en 50 µl de sobrenadante. Se sembraron en placas de Petri con LB agar 1,5% con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron 16 horas en estufa a 37 °C.

Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep)

Se empleó el método de lisis alcalina del manual Molecular Cloning. Las bacterias transformadas con el plásmido de interés fueron inoculadas en 2 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Luego de centrifugarlas, se resuspendieron en 150 µl de Solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Se les agregó 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) para lisarlas y desnaturalizar el DNA. Se neutralizó con 150 µl de Solución III (acetato de potasio 3 M, pH 5,2) y se centrifugó 5 minutos a 10.000 x g para precipitar el DNA genómico. El DNA plasmídico presente en la fase acuosa se precipitó al disminuir la polaridad del medio por el agregado de dos volúmenes de etanol absoluto. Luego de 20 minutos a -20 °C se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos y el pellet se lavó con etanol 75 %. Luego se resuspendió en 20 µl de agua destilada o buffer TE.

Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep)

Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de maxipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 500 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) e incubadas durante 16 horas. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron preparaciones de concentración 0,7- 1 µg/ml.

Análisis de las preparaciones plasmídicas

Con el objeto de determinar la concentración y calidad de las preparaciones , las mismas fueron sometidas a electroforesis en gel agarosa 0,8- 1% en buffer TAE (Tris- acético 0,4 M, EDTA 1 mM) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 6X (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%), sometidas a electroforesis a voltaje constante (5 V/cm) y visualizadas por transiluminación con luz UV. Paralelamente, las preparaciones plasmídicas fueron cuantificadas espectrofotométricamente:

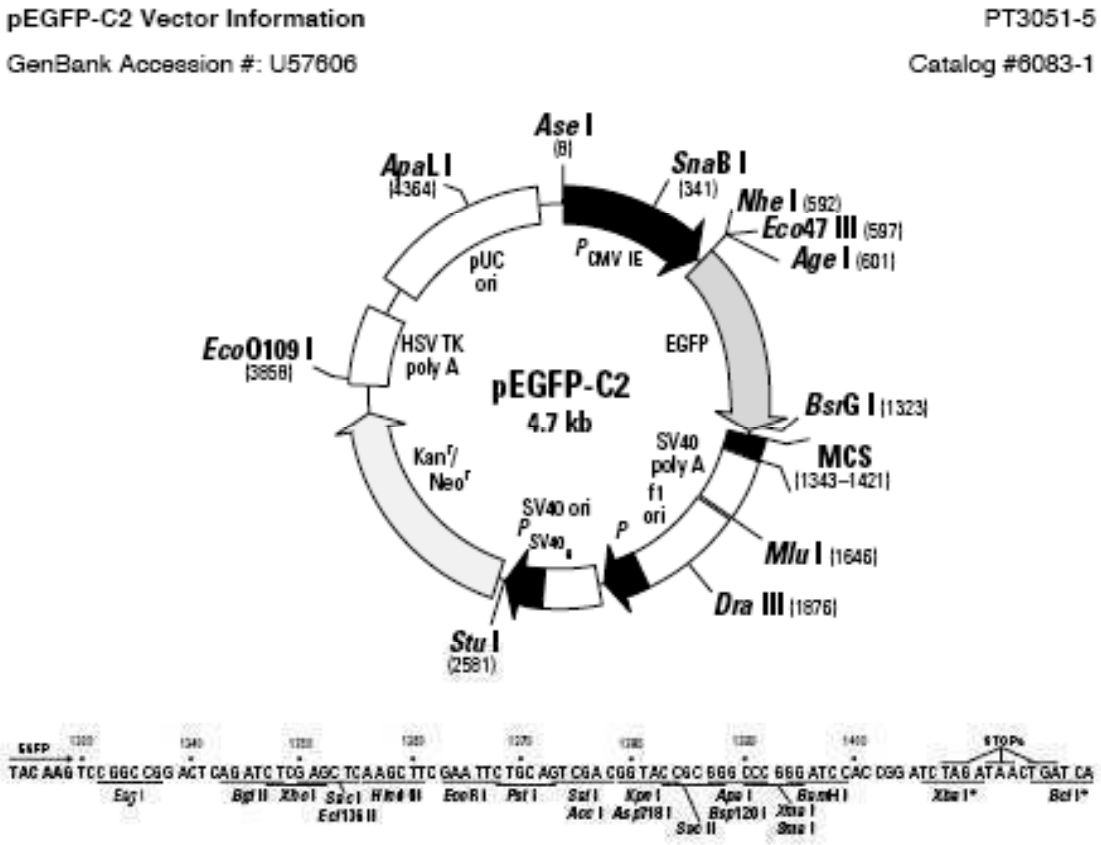
DO_{260}= 1 equivale 50 µg/ml de DNA.

$DO_{260/280}$ > 1,5 indica pureza aceptable [51]

Construcción de vectores

pGFP-p8

El vector pGFP-p8 fue generado por ligación en fase de p8 en el extremo 3' de la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) en el plasmido pEGFP-C2 (Clontech, Palo Alto, CA).



La secuencia de p8 fue amplificada por PCR partir del plásmido pcDNA3/hp8, usando los siguientes primers:

Fwd:5'GGGCTCGAGGATGGCCACCTTCCCACCAGCA-3'

Rev: 5'GGGGGATCCTCAGCGCCGTGCCCCTCGCTT-3'

Flanqueados por los sitios de restricción *XhoI-HindIII.*

pGFP-p8NLS

Fue generado por la ligación en fase del extremo 3' de la secuencia que codifica para GFP en el vector pEGFP-C2 a la putativa señal de localización nuclear (NLS) de p8, que comprende desde el aminoácido 64 al 78,

flanqueada por los sitios de corte de las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*: ATCTCGAGTAGGAAACTGGTGACCAAGCTGCAGAATTCAGAGAGGA AGAAGCGAGATCC.

pGFP-p8NLSmut

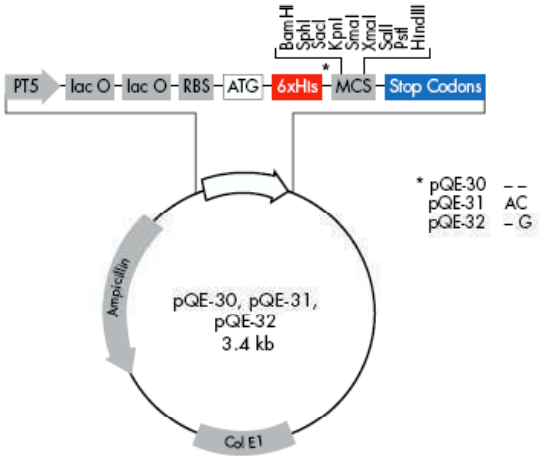
Fue generado por la ligación en fase de una versión mutada de p8 en la que las lisinas 65, 69, 76 y 77 fueron cambiadas por alaninas utilizando el kit de mutagenesis Stratagene Quick Change Site. La secuencia NLSmut de p8 se insertó en los sitios *XhoI-BamHI*.

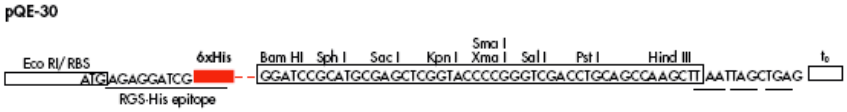
pGFP-NES (606-614)

La mutante Smurf1NES fusionada a GFP usada como control positivo para el efecto de retención nuclear de la leptomicina B, fue donada por el Dr. Takeshi Imamura (The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan).

FlagHIS-p8

El vector FlagHIS-p8 fue generado a partir de la construcción p8HIS en pQE-30 [3]



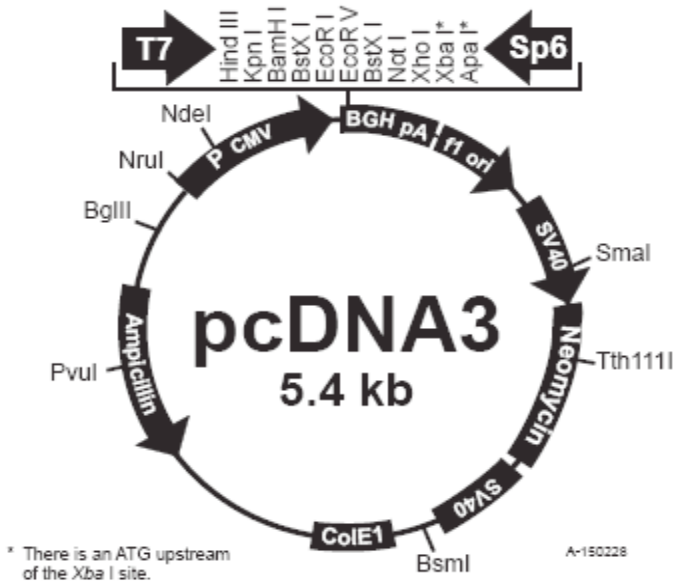


Utilizando los primers :

FWD:5'-G GGG GGTAC C ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AGA GGA TCG CAT CAC-3'

M D Y K D D D K R G S H H

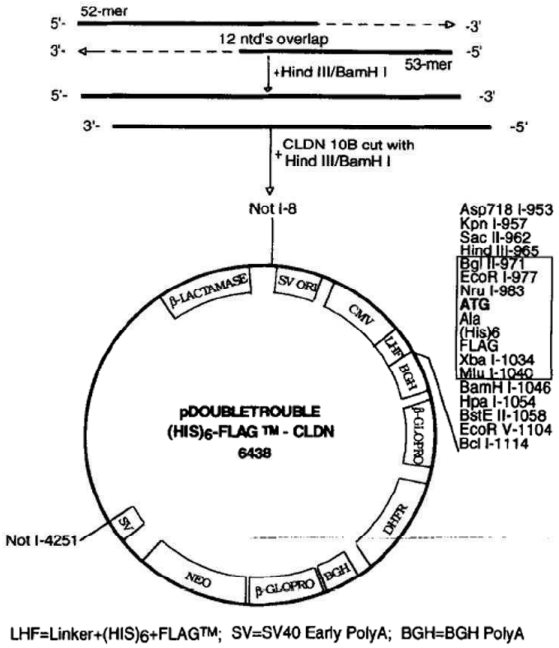
Este primer contiene el extremo amino terminal de la proteína de fusión HIS-p8 que se encuentra en la construcción HISp8, pero contiene la secuencia del epitope FLAG en el extremo 5' de forma tal de agregar este epitope al producto de PCR. También posee en el extremo 5', el sitio de corte para la enzima *KpnI* para permitir su inserción en el vector pcDNA3.



REV: 5' -CCG CTC GAG CTG CCG TGC GTG TCT ATT TA-3'

Este primer corresponde al extremo C terminal de p8, con el agregado del sitio de corte para la enzima *XhoI*.

Como control se utilizó el plasmido pDOUBLETROUBLE que contiene las etiquetas HIS-FLAG [52]. Es importante destacar que no sabemos si estas etiquetas se expresan, y si lo hacen, su estabilidad probablemente sea muy baja, al no estar fusionados a ninguna proteína. De todas formas consideramos que dada la estrategia utilizada, era útil transfectar a las células control con este vector que además tiene el mismo marcador de selección que FlagHIS-p8.



Transfección de células

Células HeLa o HEK293T crecidas a 60% de confluencia en cajas de 10cm, fueron transfectadas usando FuGene (siguiendo las normas de Roche Diagnostics) con un total de 8 μg de plasmido (pCDNA3-p8) [3]. Para seleccionar las células transfectadas establemente, se agrego 600 μg/ml de G418 (Sigma) al medio de cultivo 48 hs después de la transfección, y se continuó el crecimiento en presencia de antibiótico durante 3 semanas. Las colonias transfectadas fueron seleccionadas, repicadas y crecidas en medio suplementado con 400 μg/ml de G418.

Las transfecciones transientes para las inmunocitoquímicas fueron realizadas en células crecidas en cajas de 8 pocillos (0,8 cm^2) utilizando el reactivo de transfección Escort™ (Sigma) y 100-500 ng de DNA plasmídico por pocillo.

Western Blot

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA)

En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de PAA en condiciones desnaturalizantes. Utilizamos el sistema vertical de Bio-Rad. El gel separador (inferior) se preparó al 15% con acrilamida:bisacrilamida

29:08 y el gel concentrador se preparó al 5%. Las muestras, con el buffer de siembra se hirvieron 6 minutos. En un pocillo se sembraron 5 μl del marcador de peso molecular. La electroforesis fue realizada a 120 V, en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Tris base 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel separador.

Transferencia a membrana

Una vez concluída la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de nitrocelulosa [53]. Una de las caras del gel fue apoyada sobre un trozo de nitrocelulosa del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3MM previamente humedecidos en buffer de transferencia 1X (Tris-glicina 1X, SDS 0,01%, metanol 20%) y estos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en el tanque electroforético, con buffer de transferencia 1X, con el filtro de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 300mA, durante 90 minutos.

Detección de proteínas

Luego de la transferencia, se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo, 0,02% Tween 20 en PBS) entre 4-16 horas a temperatura ambiente para reducir los sitios potenciales de unión de proteínas irrelevantes. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluído en solución de bloqueo durante 8-10 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó 3 veces con 0,02% Tween 20 en PBS, durante 5 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) diluído en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó igual que antes y se agregó un lavado con PBS. Para visualizar las proteínas de interés se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech), basado en la producción de quimioluminisencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyser Fujifilm LAS-1000. Como control de carga del gel se utilizó

la técnica de tinción de un gel de proteínas corrido en paralelo con el colorante Coomassie Blue.

Inmunocitoquímica

Las células fueron plaqueadas en cajas de cultivo de 0,8 cm^2 de superficie (Lab-Tek II, 8 pocillos, Nunc) a baja densidad celular (30.000 células por pocillo) o a alta densidad celular (300.000 células por pocillo) y no fueron manipuladas hasta 24 horas después de ser plaqueadas.

Para el ensayo de inmunofluorescencia, las células fueron lavadas con Buffer Fosfato PBS y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron 2 lavados con PBS y las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos. Luego fueron incubadas durante 30 minutos con seroalbumina bovina 3% (BSA), SFB 10%, Triton X-100 0,2% en PBS. Se enjuagaron las células y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-p8b (generado en ratón inoculado con proteína p8 humana recombinante) diluido en la solución anticuerpo: 3% BSA, 0,2% Triton x-100 a una proporción 1:200 para detectar p8 endógena y 1:600 para detectar p8 recombinante. Las células se enjuagaron 2 veces con PBS y dos veces con solución de lavado (Tris-HCl 50mM pH 7,2, ClNa 100 mM, Tween 0.2%, Triton X-100 0.2%) y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con el anticuerpo secundario (anticuerpo anticonejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) diluido 1:100 en la solución anticuerpo.

La adición de 0,2% Triton X-100 a las soluciones de la inmunofluorescencia, fue necesaria para evitar el artificio de una exclusión nuclear cuando las células se encuentran superconfluentes.

Luego de enjuagar con PBS y solución de lavado, los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (3 μg/ml en PBS) o ioduro de propidio (50 μg/ml). Finalmente las células fueron montadas usando Mowiol 4-88 (Calbiochem, San Diego, CA). Los preparados fueron observados usando un microscopio invertido Olympus Fluoview FV 300 scanning laser IX70, y las imágenes fueron adquiridas utilizando software AxioVision 3.1. Las imágenes de microscopia confocal fueron adquiridas con un Microscopio Olympus FV300 y

el software Fluoview 3.3.

Anticuerpos Primarios:

Anti p8 b: generado en conejo contra la proteína entera recombinante humana

Anti HIS: Quiagen

Anti SF2/ASF utilizado como control, fue una donación del Dr. A Kornblihtt (Universidad de Buenos Aires).

Citometría de Flujo

Las células fueron tripsinizadas, lavadas una vez con PBS y resuspendidas en PBS 1% formaldehído frío y se dejaron a 4°C durante 1 hora. Luego se centrifugaron las células y el pellet se lavó con PBS y se fijó con 70% etanol, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en PBS con RNAsa (4U/ml) y ioduro de propidio (50 μg/ml). Los reactivos fueron comprados como kit de Coultronics, Francia. Luego de agitar en vortex, las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad antes del análisis. Los datos fueron obtenidos usando un citómetro de BD FACSCalibur System, usando el software BD CELLQuest.

Tratamientos con drogas

Para la sincronización de células subconfluentes en las placas de 8 pocillos (Lab-Tek), éstas fueron deprivadas de suero durante 24hs. En este punto se fijó uno de los pocillos, mientras que los demás recibieron medio completo con 10% de suero y fueron fijados a tiempos sucesivos cada 4 horas. En otros casos, las células fueron tratadas con hidroxiurea 1mM durante 12 horas para arrestarlas en el estadío G1/S.

Para los ensayos de depleción de energía, células confluentes transfectadas transientemente con pGFP, pGFP-p8 y pGFP-NLSp8, y células HeLap8, fueron tratadas con azida sódica 10 mM y 2-deoxiglucosa 6 mM en medio salino Hank's libre de glucosa suplementado con SFB 0,1%. Como control se realizó un experimento en presencia de este medio y ausencia de azida sódica y 2-deoxiglucosa.

Para los ensayos de exportación nuclear, las células fueron crecidas hasta llegar a superconfluencia, o células a baja densidad fueron plaquedas a alta densidad, incubadas en medio D-MEM 10% SFB con agregado de Leptomicina B (20 ng/ml) durante 8 horas previo a su fijación.

Se estudió el efecto de distintas drogas generadoras de estrés célular, incubando las células HeLap8 en presencia de éstas, durante los tiempos indicados respectivamente antes de su fijación: dexametasona 100 nM durante 20 horas, staurosporina 0,1 μM durante 20 horas, TNFα 100 ng/ml durante 1 hora, ClNa 120 mM durante 20 horas, Doxorubicina 0,8 μM durante 20 horas, y H_2O_2 100μM durante 1 hora.

También se ensayaron drogas que afectan las vías de MAP quinasas en las siguientes situaciones. Células HeLap8, crecidas a subconfluencia, fueron tripsinizadas y plaqueadas a superconfluencia e incubadas en medio D-MEM 10% SFB adicionado con la droga indicada durante 8-15 horas antes de ser fijadas. Por otro lado, células superconfluentes fueron tripsinizadas y plaqueadas a baja confluencia e incubadas en medio D-MEM 10% SFB adicionado con la droga indicada durante 8-15 horas antes de ser fijadas. Las drogas utilizadas fueron: U0126 10μM (Inhibidor MEK 1/2), SP600125 10μM (inhibidor JNK), SB503280 10 μM (inhibidor p38).

La influencia del estado de acetilación de las células sobre la localización de p8, fue estudiada agregando 2 μM de Tricostatina A durante 4 horas a células creciendo a baja densidad. Como control se realizó el mismo ensayo pero la inmunofluorescencia se realizó con anticuerpos anti SF2/ASF.

Espectrometría de masas

El desarrollo experimental de la siguiente parte, fue realizado durante mi estadía en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad de California San Francisco que está a cargo del Dr. Al Burlingame, donde realicé una pasantía.

Preparación de extractos celulares

Las células HEK 293 fueron cultivadas en placas de 15 cm. de diámetro en presencia de 400 μg/ml de G418.

Se utilizaron diferentes formas de preparar los extractos celulares de acuerdo a los métodos de purificación subsiguientes. En primera instancia se realizó la purificación con níquel primero y con anti flag después, por lo cual se realizó el extracto en un buffer de lisis que contenía imidazol. Posteriormente se realizó primero la purificación con antiflag, y en estos casos se utilizó un buffer sin imidazol.

Las células crecidas a confluencia, fueron lavadas dos veces con PBS frío, y luego levantadas utilizando rastrillo con PBS. Se centrifugaron y resuspendieron en Buffer de lisis: Buffer fosfato 50 mM pH 8, ClNa 300 mM, glicerol 7%, NP-40 1%, inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail EDTA free, Roche), inhibidores de fosfatasas (Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 & 2 Sigma), Imidazol 20 mM.

Se realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado en N_2 liquido/hielo. Se pasaron por jeringa de 1ml y se sonicaron 5 veces a 30% de potencia durante 10 segundos en hielo con intervalos de 10 segundos.

Se realizó la cuantificación de proteínas usando el Kit Micro BCA de Pierce.

Protocolo de Purificación

Se incubó el extracto proveniente de $600X10^6$ células (9 mg de proteínas totales) con 50 μl de la resina níquel-agarosa (equilibrada previamente en buffer de lisis). Se dejó en rotación a 4°C toda la noche.

Se realizaron 3 lavados en columna con buffer de lavado buffer fosfato 50 mM pH 8, ClNa 300 mM, imidazol 25 mM. La elución se realizó usando buffer fosfato 50 mM pH 8, ClNa 300 mM, imidazol 150 mM. Se hicieron tres eluciones que luego se juntaron para el siguiente paso.

Los eluídos se diluyeron en tres volúmenes con PBS. Se incubó con 40 μl de resina antiFLAG-M2 agarosa (Sigma) durante toda la noche a 4°C con rotación. Se hicieron 8 lavados con PBS y luego dos eluciones con el péptido FLAG a una concentración 100 μg/ml.

Se guardaron alícuotas de cada uno de los pasos de purificación para seguir a FLAG-HISp8 por WB usando un primer anticuerpo anti-HIS (Quiagen) y un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa (Sigma).

Los eluídos fueron tratados de diferentes maneras en distintas ocasiones. Fueron concentrados y desalados por diálisis, usando los cassettes Slide-A-Lizer (Pierce), utilizando las columnas de tamiz molecular Zeba Desalt Spin columns (Pierce) y Centricones (Amicon Bioseparations) o solamente concentrados por evaporación en speed vac y luego se les agrego Buffer de siembra para realizar la corrida electroforética para la digestión en gel o se procedió a la digestión en solución.

SDS-PAGE y digestión en gel

Las proteínas fueron separadas en geles 4-20% de poliacrilamida (ReadyGels, Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes. Luego de la corrida las proteínas fueron fijadas con etanol 50% y ácido fosfórico 2%, y luego los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie coloidal 0,5 g/L (Coomassie Blue G-250 en metanol 34%, SO_4 $(NH_4)_2$, 17%, ácido fosfórico 3%) durante 2 días. [54, 55]. Los geles fueron lavados con agua, se digitalizó la imagen y las bandas de proteínas fueron cortadas para su digestión en gel.

Cada banda se cortó en cubos de aproximadamente 1 mm^2 de tamaño. Se lavaron con CO_3HNH_4 25mM acetonitrilo 50% (ACN) 3 veces agitando en vortex durante 5 minutos entre cada paso. Se secaron usando un speed vac y se redujeron las proteínas por tratamiento con DTT 55 mM durante una hora a 56°C. Se alquiló utilizando una solución de iodoacetamida 55 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se lavó con CO_3HNH_4. Se deshidrataron los trozos de gel con CO_3HNH_4 -ACN 50% y se secaron en el speed vac.

Se agregó tripsina a una concentración final de 12.5 ng/μl. Luego de 10 minutos se agregaron 3 volúmenes de CO_3HNH_4 y se digirió durante 6-12 horas a 37°C.

Los péptidos digeridos fueron extraídos del gel por agitación con vortex con una solución ACN 50%, ácido fórmico 0,1%, y luego liofilizados al vacío y resuspendidos en ácido fórmico 0,1% en agua.

Digestión en solución

Las proteínas fueron desnaturalizadas y reducidas por incubación en DTT 2,5 mM a 95°C durante 5 minutos. Luego fueron alquiladas por incubación con iodoacetamida 10 mM durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. El exceso de iodoacetamida fue neutralizado incubando con DTT a concentración final de 10 mM durante 15-30 minutos.

Las proteínas fueron digeridas por incubación con 80 ng de tripsina durante 6 horas. Luego se liofilizó por evaporación y se resuspendieron los péptidos en 10μl de ácido fórmico 0,1%.

Cromatografía liquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas en tandem (QStar)

Los péptidos provenientes de la digestión en solución o en gel, resuspendidos en ácido fórmico 0,1% fueron separados por cromatografía liquida de nanoflujo utilizando una columna de fase reversa C18 PepMap (Dionex-LC Packings, San Francisco, California) de 75-μm por 150 mm a un flujo de 350 nl/min en un sistema NanoLC-1D proteomics de alta performance (Eksigent Technologies, Livermore, California) equipado con un autosampler FAMOS (Dionex-LC Packings, San Francisco, California) . La fase móvil A fue de ácido fórmico 0,1% en agua, y la fase móvil B de ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo. Luego de equilibrar la columna en fase móvil A conteniendo 5% de solvente B, se inyectó aproximadamente un décimo (1μl) de cada digestión; el contenido orgánico fue aumentando linealmente hasta 40% durante 30 minutos y luego a 50% en 1 minuto. Los eluídos de la cromatografía liquida fueron acoplados a la fuente de micro ion spray acoplado a un espectrómetro Qstar XL o Qstar Pulsar Q-TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex, South San Francisco, CA). Los péptidos fueron analizados en el modo ion positivo. Se adquirieron espectros por 1 segundo en un rango m/z de entre 300-1400. La adquisiciones de MS fueron seguidas por disociaciones inducidas por colisión (CID) de 3 segundos. Para cada espectro de MS, se seleccionaron para CID los picos con múltiples cargas más intensos que estuvieran sobre las 30 cuentas.

La energía de colisión para CID fue establecida automáticamente de acuerdo a la relación m/z y a la carga del ion parental. Una ventana de exclusión dinámica fue aplicada para evitar que un mismo m/z fuera adquirido para MS/MS dentro de un mismo minuto. Además el software permite ingresar listas de exclusión que impiden que se fragmenten las masas indicadas en ella. En nuestro caso excluimos las masas de los picos más comunes de queratinas y tripsina, que por lo general están presentes en todas las muestras y pueden apantallar la detección de los péptidos de interés. Además en algunos casos se utilizaron listas de inclusión, que estaban conformadas por las masas de los péptidos de p8, y la masa de estos péptidos con sus posibles modificaciones postraduccionales, de esta forma nos aseguramos que de estar presentes estos péptidos en la mezcla, fueran fragmentados a pesar de no ser los de mayor intensidad.

Los datos fueron analizados utilizando el AnalystQS software (Applied Biosystems/MDS Sciex, South San Francisco, CA) y las listas de picos fueron generadas usando el script Mascot dll. Los parámetros para el centroideo de MS fueron 50% de la altura del pico y una distancia de solapamiento de 0,002 amu. Para MS/MS se uso un 50% de altura y 0,05 amu de distancia.

Las listas de picos generadas fueron comparadas contra la base de datos UniProt utilizando Protein Prospector.

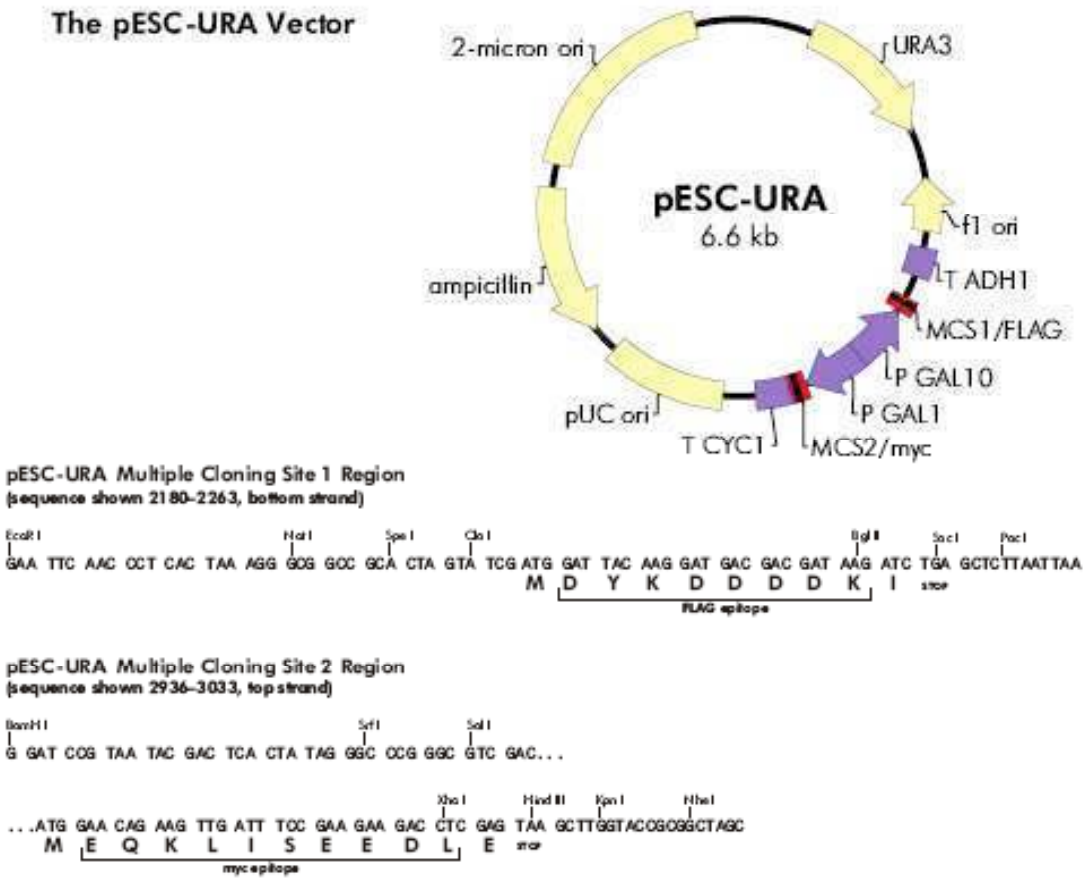
Las modificaciones variables permitidas en las búsquedas fueron: Carbamidometilación de cisteinas, N acetilación del extremo amino de las proteínas, oxidación de metioninas, fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas y acetilación de lisinas.

La tolerancia permitida para los peptidos en MS fue de 150 ppm, y en MS/MS fue de 0,2 Da. Los espectros de CID fueron analizados y confirmados manualmente.

Estudio de la sobre expresión de p8 en *Saccharomyces cerevisiae*

Construcción del vector p8-pESC-URA

Se subclonó p8 en un vector de expresión en levaduras inducible por galactosa con la auxotrofia uracilo, en los sitios NheI y XhoI.



Se utilizaron los primers:

F: 5' GGGCTCGAGATGGCCACCTTCCCACCA 3'

R: 5' GGGGGGCTAGCTCAGCGCCGTGCCCCTCG 3'

Se transformó la cepa de levaduras 1115 que presenta varios requerimientos auxotróficos y por lo tanto es incapaz de crecer en medio mínimo SD. Se seleccionaron las transformantes por el rescate de la auxotrofia ura y posteriormente se verificó la expresión de p8 por RT-PCR y por WB con anticuerpos anti myc.

Se realizaron curvas de crecimiento en medio con glucosa y galactosa comparando levaduras transformadas con el vector que expresa p8 y con el vector vacío, se midió gemación y mortalidad a lo largo de 24 hs. Se analizó si la sobreexpresión de p8 producía cambios fenotípicos, como resistencia al shock térmico o cambios en el metabolismo de glucosa.

Transformación de levaduras

Se estriaron levaduras provenientes de glicerol o de otra placa y se crecieron en placas con medio YPD-agar (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%) durante la noche. Se levantaron las células con espátula y se resuspendieron en agua estéril. Se centrifugó para precipitar las células, y se agregó el DNA y la solución ONESTEP (acetato de litio 0,2M, PEG 3350 40% y DTT 100mM). Se agitó en vortex 5 segundos y se incubó a 42°C durante 30 minutos. Luego se replaquean las células en medio selectivo.

Extracción de ARN levaduras

Se centrifugaron los cultivos de células y se resuspendió el pellet en buffer de extracción (EDTA 1mM, ClLi 0,1 M, Tris-HCl 0,1M pH 7,5). Se agregaron bolitas de vidrio y fenol/cloroformo/alcohol isoamilico, 25/24/1 (PCI)) Se agitó en vortex y centrifugó. Se repitió la extracción con PCI y luego se precipitó con acetato de potasio 40% pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol 100% a 30°C durante 30 minutos. Se centrifugó y luego se lavó el pellet con etanol 70%, y se resuspendio el RNA en agua.

Extracto para WB levaduras

Se centrifugaron los cultivos de células luego de un lavado con agua. Se resuspendieron las células en buffer extracto (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 5 mM; EGTA 3 mM; β-mercaptoetanol 10 mM; ClNa 0.5 M; inhibidores de proteasas) y se agregaron bolitas de vidrio para luego agitar en vortex y romper bien las células. Luego se centrifugó y recuperó el sobrenadante.

RESULTADOS Y DISCUSION

ESTUDIO DE LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE p8

Introducción

La traslocación nuclear de proteínas ocurre a través del Complejo del Poro Nuclear (NPC) [56]. Las proteínas pequeñas de tamaño menor a 45 kDa pueden difundir libremente, mientras que las proteínas más grandes necesitan de una señal de localización nuclear (NLS). La mayoría de los eventos de transporte a través del NPC están mediados por receptores solubles (importinas y exportinas) que reconocen a sus cargas específicamente y facilitan el paso de los complejos receptor-sustrato. A pesar del gran número de interacciones receptor-carga que han sido estudiados, la predicción de señales de importación y exportación nuclear en proteínas no resulta nada simple.

Existen dos NLS clásicas en eucariotas superiores: una señal monopartita que se compone de un solo grupo de amino ácidos básicos, y una bipartita compuesta por dos amino ácidos básicos, seguidos de una región espaciadora de 10-12 amino ácidos y un grupo básico donde tres de los cinco amino ácidos son básicos: $B_2X_{10}(B_3X_2)$ (B representa un amino ácido básico K o R y X representa cualquier residuo). En los últimos años se han descripto NLS ricas en argininas y glicinas y otras variantes. La clave para la importación, que es realizada por unas pocas variantes de importinas, son las kariofilinas, que son proteínas adaptadoras que adoptan diferentes conformaciones para unirse a los distintos sustratos y a las importinas.

La señal de importación nuclear bipartita clásica rica en lisinas, fue definida originalmente en el antígeno SV40 T. Esta señal es reconocida por el dímero de importina α/β directamente.

Las señales de exportación nuclear (NES) tambien son reconocidas específicamente por proteínas transportadoras exportinas. Algunas proteínas que no contienen NES son exportadas por karioferinas. La señal rica en leucinas NES, es la más estudiada y es reconocida por la exportina Crm1. Fue originalmente identificada en HIV Rev y en PKI, el inhibidor de PKA.

Señal de localización nuclear de p8

A pesar de que debido a su bajo peso molecular, p8 no debería necesitar de una NLS para poder entrar al núcleo, el programa PSORTII

predijo una NLS para p8 de acuerdo a su secuencia.

La figura 3 muestra un alineamiento de secuencias de p8 desde humanos a mosca.

Hemos determinado que la similitud entre humanos, ratas y ratónes es mayor al 70%, y hay una homología de alrededor de 40% con el resto de las especies. Es muy evidente que hay zonas de la secuencia que se encuentran altamente conservadas a través de las 7 especies comenzando en el amino ácido 25 de p8 humana. Se observa una señal de localización nuclear bipartita clásica, que se encuentra muy conservada en humanos, ratas, ratónes, y Xenopus, y con menos exactitud en mosquito y mosca.

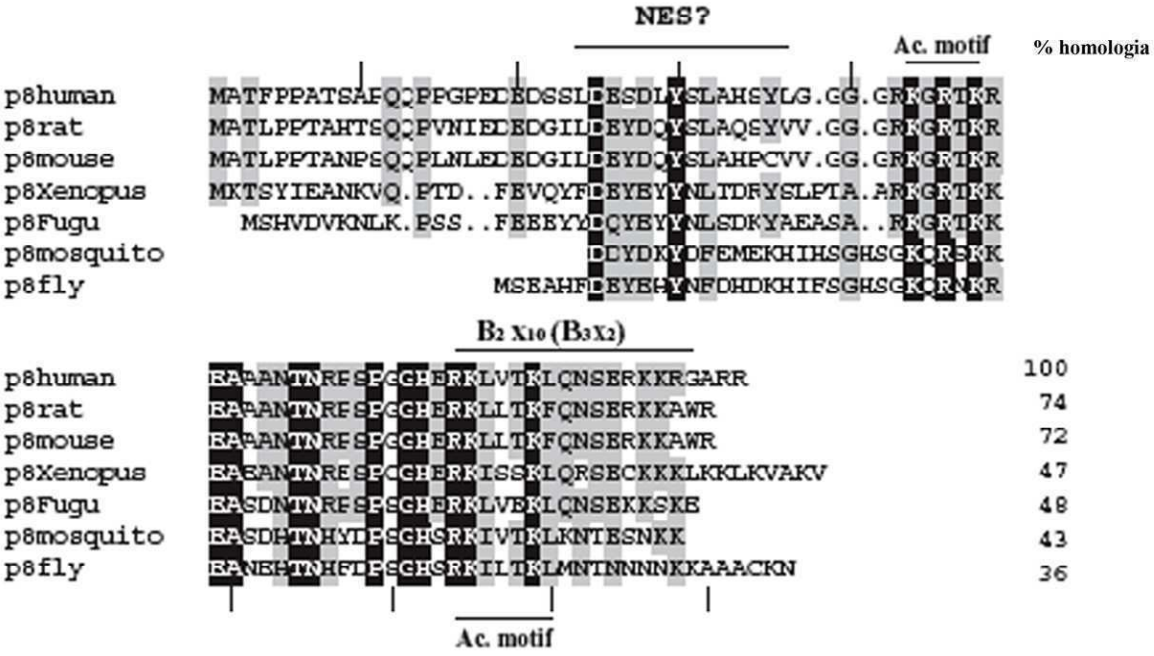


Figura 3: Homología en la secuencia de p8 en eucariotas superiores. p8 humana fue comparada por BLAST contra el genoma completo de diferentes especies usando el NCBI (National Center of Biotechnology information) con todas las bases de datos de genomas y proteínas disponibles. Secuencias similares a la de p8, encontradas en el 100% de los ortólogos están pintadas en negro, y 70% en gris. p8 humana: Homo sapiens NP_036517; p8 rata: Rattus norvegicus NP_446063; p8 ratón: Mus musculus NP_062712; p8 rana: Xenopus laevis BAB33387; p8 Fugu: Fugu rubripes JGI_27767; p8 mosquito: Anopheles gambiae XP_315506; p8 mosca: Drosophila melanogaster NP_609539.
Las marcas sobre el alineamiento muestran la señal de localización nuclear bipartita NLS (B2x10(B3x2)), una potencial NES (rica en aminoácidos hidrofóbicos) y dos motivos de acetilación. % de homologia esta indicado en el margen derecho. Las líneas verticales abajo y encima de la secuencia cada 10 aminoácidos son para facilitar la identificación de los aminoácidos.

Una potencial señal de exportación nuclear, y en particular las leucinas en mamíferos, también se encuentran altamente conservadas. Dos motivos consenso de acetilación por p300 (una lisina con un residuo cargado en +4 o -3) K65-K69, K76-K77 [57, 58] también se encuentran conservados y uno de esos motivos estaría dentro de la putativa NLS.

Es llamativo que una proteína pequeña, como p8, de 82 amino ácidos contenga en su secuencia una señal de localización nuclear conservada. Hasta el momento se había visto que p8 presentaba una localización nuclear al ser sobreexpresada en células Cos [3]. Decidimos estudiar más detalladamente la localización de esta pequeña proteína y la regulación de esta localización.

La localización subcelular de p8 depende de la densidad de células en cultivo

Para determinar la localización subcelular de p8, se utilizaron células HeLap8. Dado que las células HeLa no presentan niveles detectables de p8, utilizamos células transfectadas establemente que expresan p8 bajo la regulación del promotor de CMV (cytomegalovirus) y las líneas celulares humanas de cáncer de páncreas Panc-1 y MiaPaCa que presentan niveles endógenos de p8 evidenciables. p8 fue detectada en las líneas celulares por inmunofluorescencia indirecta, utilizando el anticuerpo anti p8 generado en conejo contra la proteína humana recombinante. Las células fueron observadas por microscopia de fluorescencia.

El protocolo clásico de inmunofluorescencia fue modificado ya que se agregó Triton X-100 0,2% a las soluciones para evitar el artificio de una exclusión nuclear cuando las células se encuentran superconfluentes. Pudimos observar que en ausencia de Triton X-100 en cultivos superconfluentes, la fluorescencia del segundo anticuerpo se encuentra siempre en el citoplasma, excluido del núcleo, pero esto no es consecuencia de la localización de la proteína sino porque el ingreso del anticuerpo al núcleo esta imposibilitado (datos no mostrados). El Triton X-100 permeabiliza a las células y permite la entrada del anticuerpo evitando este artificio [59].

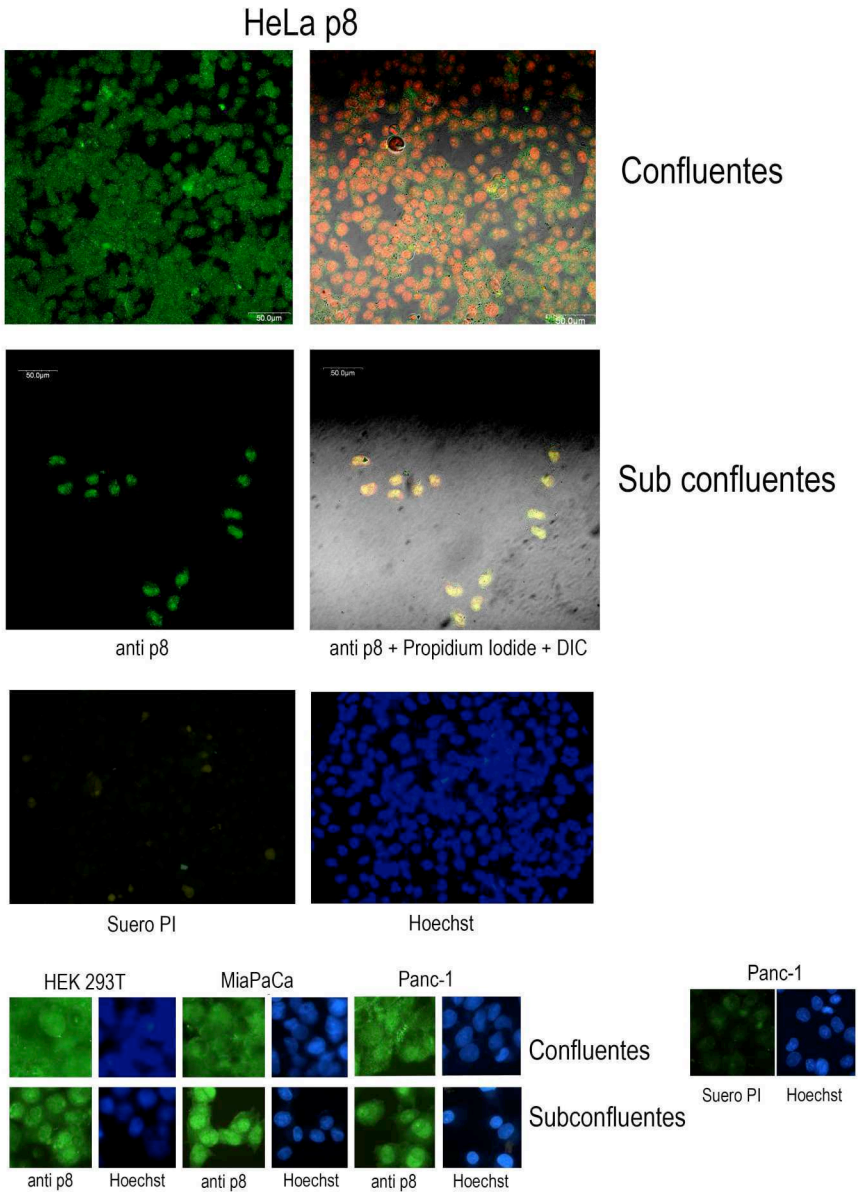


Figura 4: La localización de p8 depende de la densidad de células en cultivo. Células HeLa-p8, Panc-1 y MiaPaCa fueron crecidas a baja o alta densidad. p8 fue visualizada por microscopia de fluorescencia usando un anticuerpo policlonal anti p8 humana. Los núcleos de las células HeLap8 teñidos con loduro de propidio fueron visualizados por microscopia confocal y DIC (Contraste de diferencial de interferencia). El resto de las células fueron visualizadas usando microscopia de fluorescencia normal, con los núcleos teñidos con Hoechst 33248. Se muestran resultados representativos. Se realizaron controles en células HeLap8 y Panc-1 utilizando suero preinmune en vez de anticuerpo anti-p8.

La figura 4 muestra que la localización subcelular de p8 depende de la densidad de las células en cultivo. En cultivos subconfluentes, la localización

de p8 endógena y sobreexpresada es predominantemente nuclear, mientras que en células crecidas a superconfluencia la localización es homogénea entre el núcleo y el citoplasma.

Localización subcelular de p8 a lo largo del ciclo celular

El primer abordaje para estudiar la relación entre la localización subcelular de p8 y el ciclo celular, fue analizar en detalle las inmunofluorescencias realizadas sobre más de 500 células HeLa-p8 crecidas a baja densidad que de acuerdo a un análisis de FACS presentaban una distribución de 43.8% G_1, 19.8% S y 36.3% G_2/M (datos no mostrados).

La localización de p8 no cambió, fue siempre nuclear en estas células que estaban en activa división celular.

Un segundo abordaje fue sincronizar un cultivo subconfluente de células HeLa-p8 por deprivación de suero (0,1% SFB) durante 24h, o por tratamiento con hidroxiurea 1 mM durante 12h. Esta droga bloquea la síntesis de deoxinucleótidos y por lo tanto inhibe la síntesis de DNA e induce la sincronización de células en la etapa previa a S. Esto enriqueció a la población de células en el estadío G_1/G_0 (70% G_1, 15% S, 15% G_2/M). Las imágenes de la figura 5 muestran claramente que luego de estos tratamientos, p8 se deslocaliza del núcleo y se distribuye más homogéneamente entre el núcleo y el citoplasma a pesar de que las células están creciendo a baja densidad.

Una vez liberado el arresto, por reemplazo del medio sin suero por medio completo, o del medio con hidroxiurea por medio sin droga, se observó que la localización nuclear, como la que se observa usualmente, fue evidente a las 4 horas y completamente reestablecida a las 8 horas.

Los resultados obtenidos en los experimentos con deprivación de suero y tratamiento con hidroxiurea, junto con los experimentos de células crecidas a alta densidad sugieren que la localización citoplasmática de p8 correlaciona con un estado de arresto G_0 de las células, mientras que las células en división activa presentan una localización casi exclusivamente nuclear de p8.

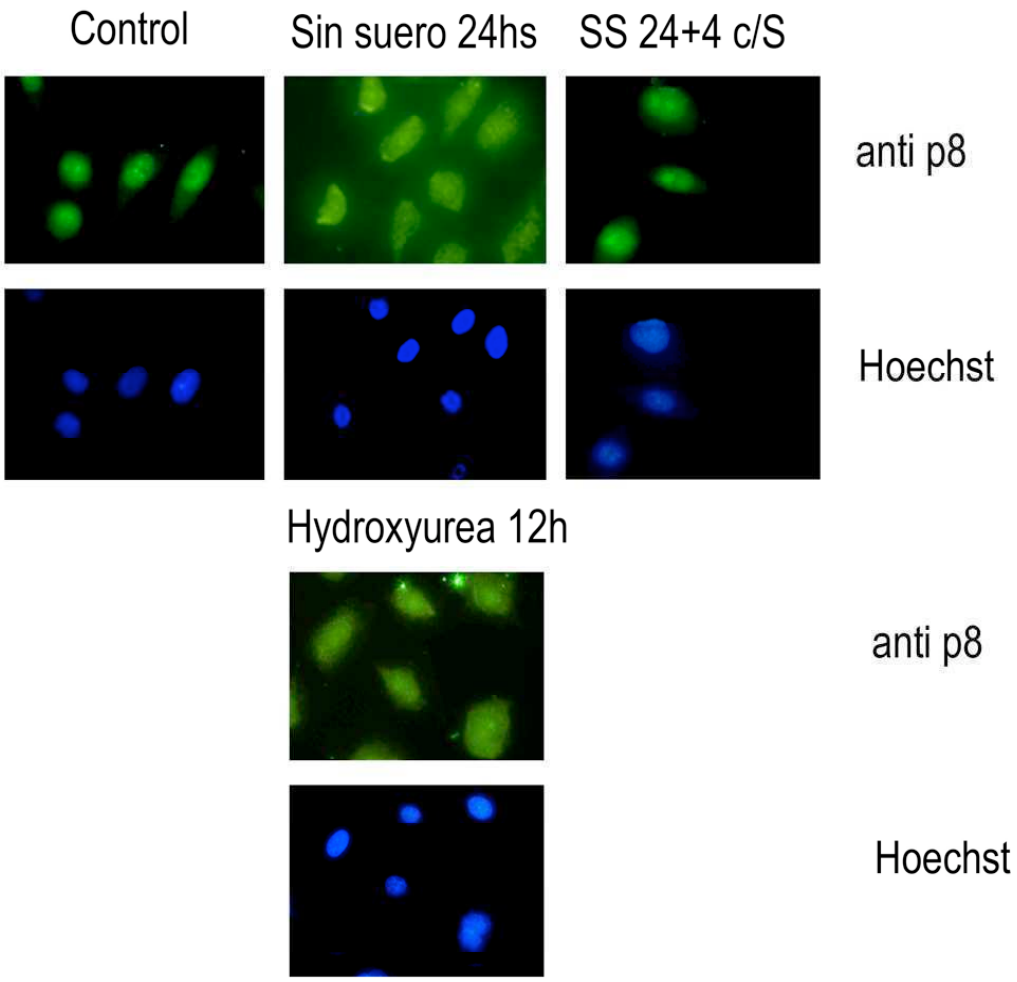


Figura 5: Localización subcelular de p8 en poblaciones enriquecidas en diferentes estadíos del ciclo celular. Células HeLap8 subconfluentes fueron arrestadas por deprivación de suero durante 24 hs. Luego se agregó medio completo para reiniciar el ciclo celular y las células fuero fijadas cada 4 hs. Células HeLap8 subconfluentes fueron arrestadas en la etapa G1/S por tratamiento con 1 mM de hidroxiurea durante 12 h. La localización de p8 fue analizada por inmunocitoquimica y los núcleos se visualizaron tiñendo con Hoechst 33248.

Importación nuclear de p8

El proceso de importación puede separarse en dos pasos separados: primero el anclaje de la proteína destinada a importación en la periferia del NPC y segundo, la traslocación activa de la proteína a través de un canal regulable que se encuentra en el centro del NPC. El primer paso no requiere de la hidrólisis de ATP y es independiente de la temperatura, mientras que el segundo paso si requiere de hidrólisis de ATP y es atenuado al disminuir la

temperatura. El transporte nuclear para proteínas con NLS es un proceso activo.

El nivel energético de las células HeLa-p8 fue disminuido por tratamiento con azida sódica 10 mM (inhibidor del transporte de electrones mitocondrial) y 2-deoxiglucosa 6 mM (inhibidor de glucólisis) durante 4 horas.

La figura 6 muestra que luego de 4 horas de tratamiento, se observa que p8, a pesar de estar presente en el núcleo, también se encuentra localizada en el citoplasma, lo que implicaría que la disminución del nivel energético de las células provoca una disminución de la importación de p8. Esto sugiere un proceso de importación activo para la proteína recién sintetizada o la que se encuentra migrando entre núcleo y citoplasma.

Como segundo abordaje, utilizamos un conocido método para predecir la funcionalidad de una NLS; en el cual la proteína de interés es fusionada a GFP que carece de NLS [58]. La figura 7 muestra la visualización directa de GFP en células HeLa y NIH3T3 transfectadas con GFP-p8 o con GFP. Es evidente que mientras GFP se distribuye homogéneamente en toda la célula (con una mínima predominancia en la zona del núcleo), la proteína de fusión GFP-p8 se encuentra localizada casi exclusivamente en el núcleo, sugiriendo que p8 posee una fuerte NLS en su secuencia que permite desplazar el equilibrio núcleo-citoplasmático hacia el núcleo. Con el fin de dilucidar más exactamente la secuencia exacta de la NLS, realizamos la construcción GFP-p8NLS en la cual fusionamos la putativa secuencia NLS compuesta por los amino ácidos 64-78 al extremo carboxilo de GFP. La figura 7 muestra que esta construcción también localizó a GFP en el núcleo de las células, indicando que la NLS de p8 es suficiente para retener a GFP en el núcleo. Al bajar la carga energética de las células por tratamiento con azida sodica y 2-deoxiglucosa, se vio que tanto GFP-p8 como GFP-p8NLS se redistribuyeron en toda la célula, mientras que la depleción de energía no tuvo ningún efecto sobre GFP (datos no mostrados).

Para determinar si los amino ácidos básicos presentes en esta secuencia son esenciales para su función NLS, mutamos las lisinas 65-69-76 y 77 por alaninas para generar la construcción GFP-p8NLSmut.

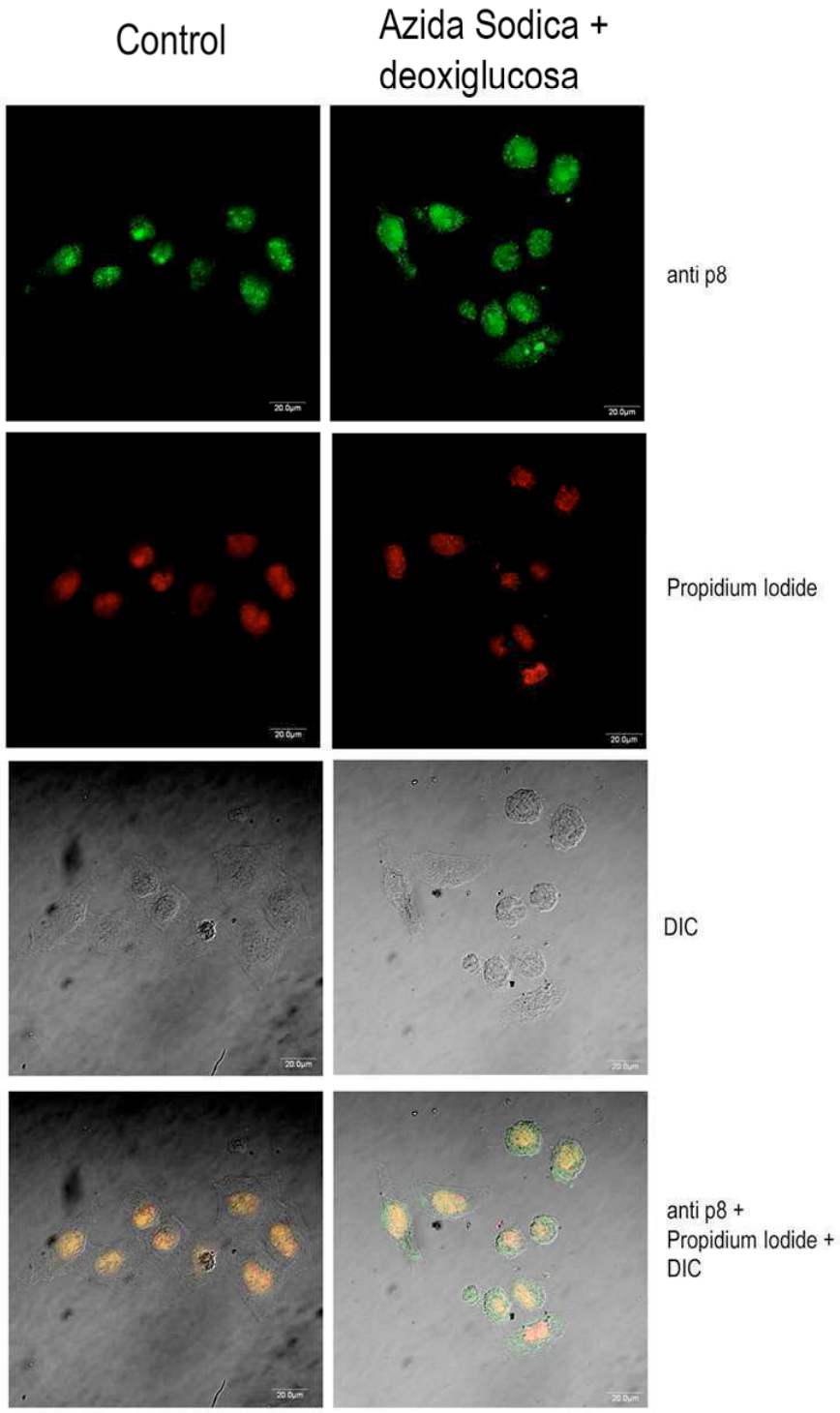


Figura 6: Efecto de la depleción de energía sobre la localización subcelular de p8. Células HeLap8 subconfluentes fueron tratadas con 10 mM de azida sodica y 6 mM de 2-deoxiglucosa durante 4 horas. Las células fueron visualizadas por microscopia confocal luego de fijación e inmunodetección anti p8 y teñido de núcleos con ioduro de propidio.

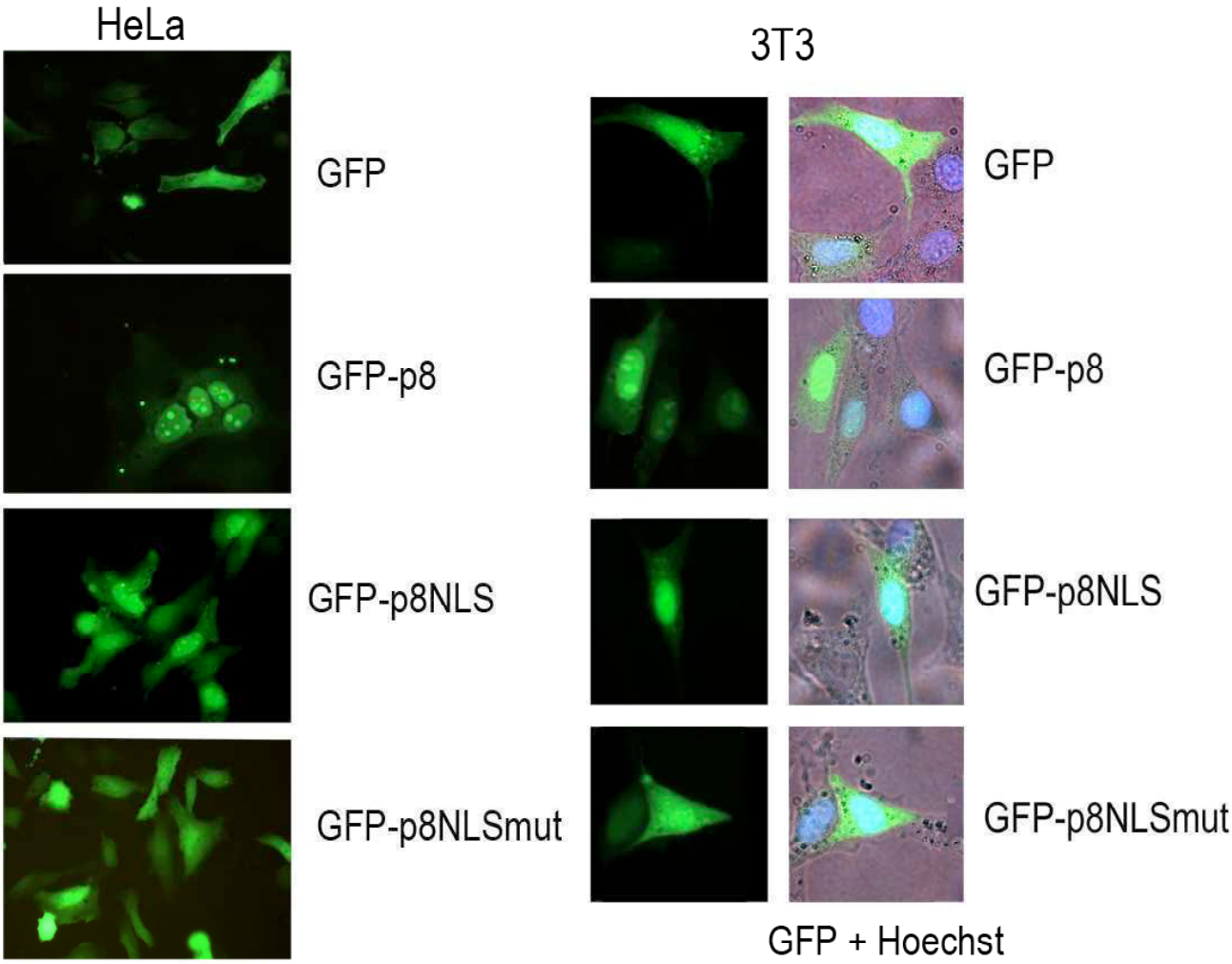


Figura 7: La NLS de p8 es necesaria y suficiente para retener a una proteína heteróloga en el núcleo. Células HeLa crecidas a baja densidad y expresando las proteínas de fusión GFP, GFP–p8, GFP–p8NLS, o GFP–p8NLSmut (paneles izquierdos) fueron visualizados por fluorescencia de la GFP. También se analizó la localización de estas proteínas en células NIH3T3 (paneles derechos). Se realizó la visualización por fluorescencia de GFP y por microscopia de contraste de fases. Los núcleos se visualizaron usando tinción con Hoechst 33248. La intensidad nuclear/citoplasmática fue analizada en dos experimentos separados de transfeccion, analizando 300 células para cada condición en cada experimento. En todos los experimentos los tiempo de exposición para la fluorescencia adquirida para las fotos fue el mismo.

Los resultados de la figura 7 muestran que tanto en células HeLa como NIH3T3, la distribución de GFP-p8NLSmut se parece a la de GFP ya que es más uniforme en toda la célula aunque se sigue observando una predominancia nuclear.

Combinados, estos resultados obtenidos con GFP-p8, GFP-p8NLS y GFP-p8NLSmut indican que la NLS de p8 es necesaria y suficiente para transportar y retener una proteína heteróloga en el núcleo.

Exportación de p8

Dado que p8 es una proteína con localización núcleo-citoplasmática, es posible que la acumulación citoplasmática dependiente de la densidad de las células en cultivo se deba a una exportación activa sostenida de la proteína. Para determinar si p8 se exporta activamente del núcleo, la distribución de p8 fue analizada en células HeLap8 crecidas a alta densidad y tratadas con 20 ng/ml de leptomicina B (LMB), un inhibidor especifico de la exportación nuclear dependiente del transportador Crm1 [60] . Si p8 migrara constantemente entre núcleo y citoplasma, y si su exportación nuclear fuera dependiente de Crm1, la Leptomicina agregada a las células a alta densidad, debería inducir la acumulación de p8 en el núcleo.

La figura 8 muestra que la localización de p8 no se altera luego de 8 horas de tratamiento con LMB. Este resultado permite dos interpretaciones posibles: podría ser que p8 no migre constantemente entre núcleo y citoplasma cuando las células están creciendo a alta densidad, o que la exportación de p8 sea independiente de Crm1. Se observó que LMB no impidió la traslocación de p8 al citoplasma cuando células crecidas a baja densidad fueron replaqueadas a alta densidad (datos no mostrados). Este resultado de nuevo tiene dos interpretaciones: o p8 sale del núcleo por un proceso que es independiente de Crm1 y por esta razón no es sensible a la LMB, o a altas densidades celulares la localización citoplasmática se debe a un bloqueo de la importación y no a un proceso de exportación activa.

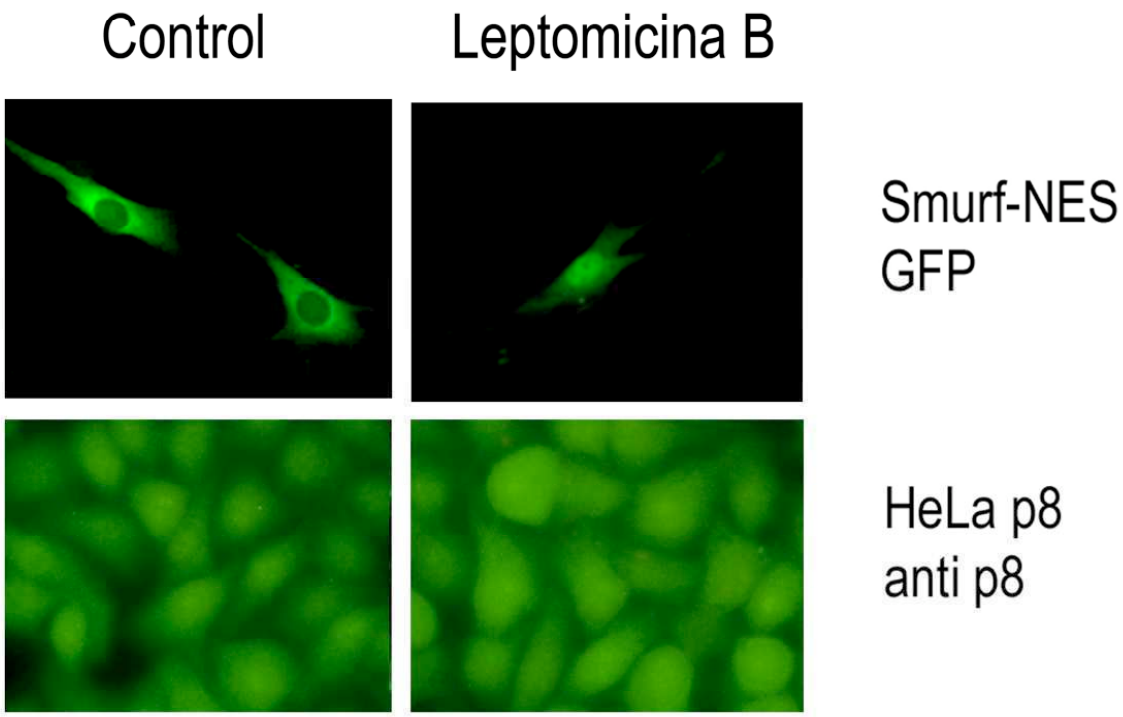


Figura 8: La leptomicina B no tiene efecto sobre la localización subcelular de p8. Panel superior: células HeLa transfectadas transientemente con la construcción pSmurf–NESGFP; panel inferior: células HeLap8 a alta densidad. Ambos cultivos fueron tratados con 20 ng/ml Leptomicina B durante 8 horas antes de ser fijados. La proteína de fusión Smurf–NESGFP fue visualizada por fluorescencia GFP y p8 por inmunofluorescencia.

Se incluyó un control positivo para el efecto de LMB en células HeLa. En este control las células fueron transfectadas con el plasmido Smurf-1NES-GFP (que contiene la señal de exportación nuclear de Smad ubiquitin regulatory factor 1). Se ha demostrado que la secuencia NES de Smurf-1 es una señal de exportación dependiente de Crm-1 y por ende es sensible a LMB [61]; este efecto se observa claramente en la figura.

Resultados complementarios sugieren que la localización citoplasmática de p8 se debe a un bloqueo de la importación más que a una activa exportación. Se realizaron experimentos con hidroxiurea, o con células crecidas a baja densidad y replaqueadas a alta densidad en presencia del inhibidor de la traducción, cicloheximida, y se observó que en lo casos en los que no hay síntesis de proteínas, la localización de p8 sigue siendo

predominantemente nuclear, lo que indicaría que lo que vemos en el citoplasma a alta densidad o en células arrestadas en ausencia de cicloheximida se debe a una inhibición de la importación de la proteína sintetizada recientemente.

Vías de transducción de señales y localización subcelular de p8

Experimentos previos demostraron que el mRNA de p8 se activa en casi todos los tipos celulares en respuesta a agentes de estrés [12]. Incluso un estrés mínimo como el cambio de medio a células en cultivo sin el agregado de ninguna sustancia adicional, puede disparar esta inducción [13] indicando que p8 es una proteína ubicua que se induce por estrés celular.

Quisimos probar si estos diferentes agentes tenían algún efecto sobre la localización subcelular de p8 al ser agregados a células sub o superconfluentes. Los resultados indican que los siguientes tratamientos no tuvieron efecto al ser agregados a células 293T o HeLap8: 20 h en presencia de 100 nM Dexametasona (Glucocorticoide antiinflamatorio), 0,8 μM Doxorrubicina (sinónimo de Adriamicina, agente intercalante del DNA con efecto inmunosupresor), 0,1μM Staurosporina (inhibidor de la PKC y de la formación de VEGF en células tumorales) o 120 mM ClNa para generar un shock hipotónico. Tampoco el tratamiento durante 1 hora con 100 μM H_2O_2 o con el inmunomodulador 100ng/ml TNF-α. En todos los casos mencionados, la localización de p8 se mantuvo constante a lo largo del experimento.

Se ha demostrado también que dos vías que estimulan el crecimiento celular como la vía Ras → Raf → MEK → ERK y la vía JNK disminuyen la expresión de p8 en células pancreáticas cancerígenas, mientras que vías como la de p38 que inhibe el crecimiento en estas células, aumenta la expresión de p8 [14]. Se ensayó el efecto de inhibidores comúnmente utilizados para estas vías (U0126 para Erk1/2, SP 600125 para JNK y SB 203580 para p38) en células HeLa bajo dos condiciones: adición de la droga durante 8-15 horas al replaquear células de alta densidad a baja densidad, e inversamente al plaquear células de baja densidad a alta densidad.

A pesar de que lo que visualizamos con la inmunocitoquimica es principalmente la p8 expresada bajo el promotor de CMV, estábamos

evaluando la posibilidad de que una modificación post traduccional disparada por alguna de estas vías e inhibida por alguna de estas drogas pudiera tener algún efecto sobre la localización subcelular de p8. No se observaron diferencias entre las células control y las tratadas con las drogas (datos no mostrados).

Acetilación de proteínas y localización subcelular de p8

Finalmente como los dominios conservados de p8 incluyen dos motivos de acetilacion (ver Fig. 3) y se demostró que p8 puede ser acetilada *in vitro* por p300 [45] , decidimos estudiar el efecto de agregar Tricostatina A 2 μM (TSA) un conocido inhibidor de deacetilasas que fue descubierto por su efecto sobre histonas [62], a células HeLap8 creciendo a alta o baja densidad. Dado que la mayoría de las lisinas de la secuencia de p8 se encuentran en su putativa señal de localización nuclear es lógico suponer que la acetilación podría afectar la funcionalidad de la putativa NLS como ocurre en otras proteínas [63].

Se eligió un tiempo corto de 4 hs para estos ensayos ya que en este tiempo y hasta 12 horas de incubación, TSA no tiene efecto sobre el crecimiento de las células HeLa [64, 65]. La figura 9 muestra que en presencia de TSA, se pierde la localización casi exclusivamente nuclear que se observa en células creciendo a baja densidad, y que p8 se distribuye homogéneamente en toda la célula. La localización de p8 en células crecidas a alta densidad no se vio afectada por el tratamiento con TSA; incluso 8 horas de tratamiento no mostraron efecto sobre la localización de p8 en células superconfluentes.

Para asegurarnos que el efecto de TSA sobre la localización de p8 era específico y no debido a un efecto generalizado sobre todas las proteínas nucleares, se tiñeron células HeLap8 tratadas con TSA durante 4 horas con un anticuerpo anti SF2/ASF, una proteína reguladora del procesamiento del RNA que pertenece a la familia SR y es constitutivamente nuclear. Como muestra la figura 9 vemos que TSA no tuvo efectos sobre la localización de esta proteína. Estos resultados sugieren que un aumento en el estado de

acetilación de las proteínas, puede directa o indirectamente, afectar el equilibrio núcleo citoplasmático de p8.

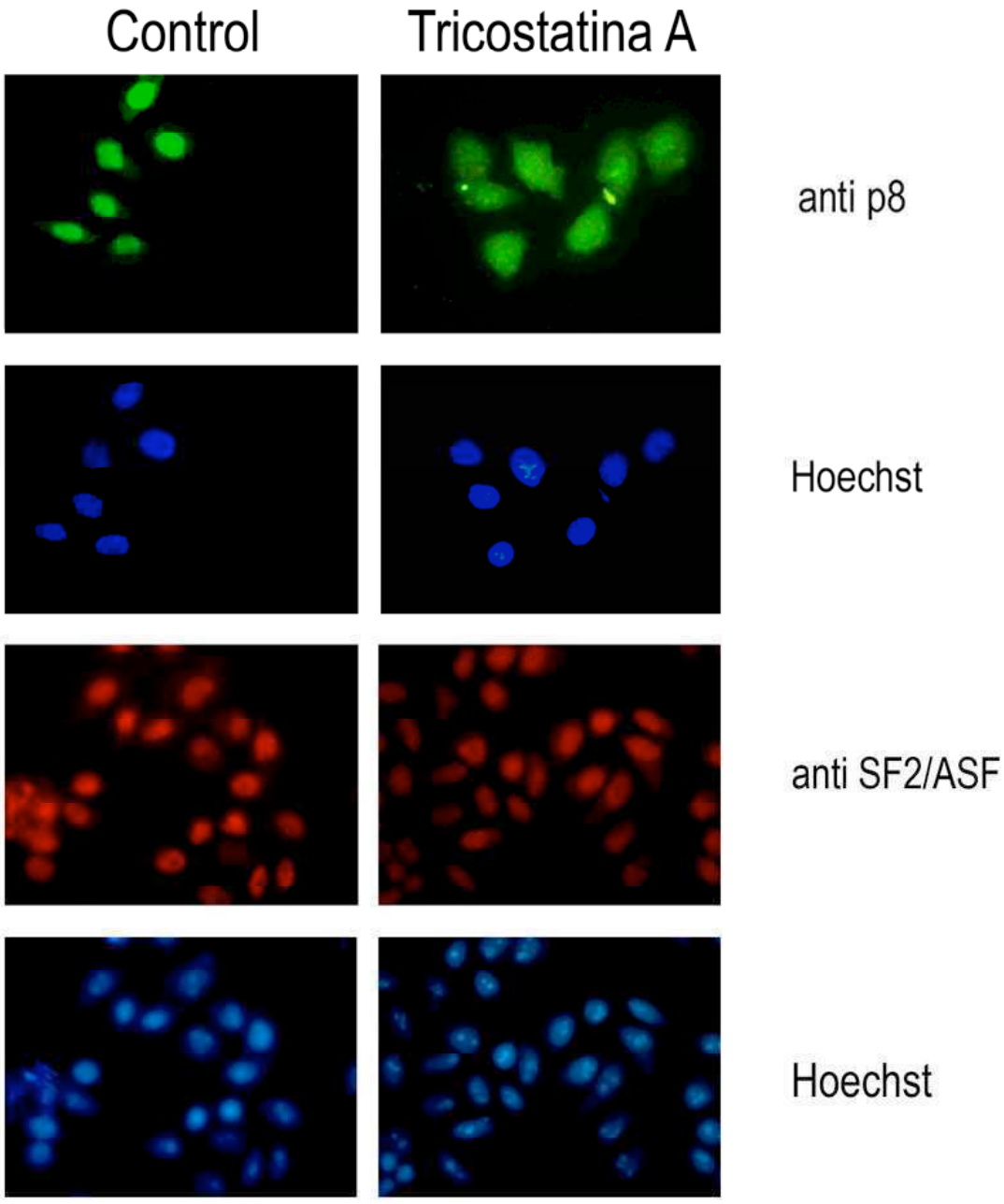


Figura 9: Cambio en la localización de p8 luego de la inhibición de la deacetilación. Células HeLap8 creciendo a baja densidad fueron tratadas con 2μM TSA durante 4 horas. Las células fueron fijadas y la inmunodetección se realizó con anticuerpos anti-p8 (paneles superiores) y anti SF2/ASF (paneles inferiores); los núcleos se tiñeron con Hoechst 33248.

Discusión

Hemos demostrado que p8 endógena, al igual que p8 expresada establemente a partir de un promotor heterólogo, se acumula en el núcleo de células humanas (HeLa, HEK 293T, MiaPaCa, Panc-1) cultivadas a baja densidad. Por el contrario, cuando las células crecen a confluencia, o son deprivadas de suero, o tratadas con hidroxiurea (inhibidor de la síntesis de DNA), todas condiciones que causan un arresto de las células en G0, p8 se localiza tanto en núcleo como en citoplasma. La literatura demuestra que cambios de distribución subcelular en respuesta a la densidad de células en cultivo, han sido demostrados para una gran variedad de proteínas de diferentes tamaños y funciones [66-73]

Un detallado análisis de la homologia de p8 de mosca a humano, indica que se puede predecir una señal de localización nuclear (NLS) del tipo clásica bipartita, en la secuencia. Hemos demostrado que la importación de p8 es un proceso activo que depende de energía, y la NLS predicha, resultó ser una verdadera señal de importación, que es necesaria y suficiente para retener a una proteína heteróloga en el núcleo. Se ha reportado la presencia de NLS activas en otras proteínas pequeñas como histonas [74] y las High Mobility Group proteins 1 (HMGB1) [63]

A pesar que a partir de la secuencia también se predijo una potencial NES, rica en leucinas, se vio que la exportación de p8 no depende de la vía de exportación de Crm1, ya que su localización no se vio modificada cuando las células fueron tratadas con leptomicina B.

Una proteína puede contener una NLS pero su importación al núcleo podría fallar debido a una interacción de alta afinidad con alguna proteína del citoplasma, que la mantuviera anclada y que incluso podría estar bloqueando su NLS. De la misma manera, una proteína que contiene una NES podría residir establemente en el núcleo debido a una fuerte interacción con una proteína nuclear que la retenga. En ambos casos la distribución intracelular de la proteína puede estar determinada por los cambios que controlan la afinidad por su proteína de anclaje, o la disponibilidad de esta(s) [75]. El hecho de que, tanto p8 endógena como p8 expresada en una construcción recombinante bajo un promotor viral, presenten la misma localización estaría

indicando que la regulación de la localización de p8 no depende en gran medida de los niveles o tiempos de expresión sino más probablemente depende de algún efecto post traduccional. Se estudió el efecto de distintas vías de transducción sobre la localización de p8 y ni el estrés inducido por diferentes agentes como tampoco ninguna de las siguientes vías: ERK1/2, JNK y p38 parecería estar involucrada. En cambio, la inhibición de la desacetilación por medio de TSA provoca un cambio en la localización nuclear de las células subconfluentes hacia una distribución homogénea en toda la célula.

Los resultados obtenidos en esta primera parte llevan a pensar en un modelo en el cual en células creciendo a baja densidad, la p8 sintetizada se importa al núcleo activamente y es retenida ahí, ya sea sola o en conjunto con otras proteínas con las que podría estar formando un complejo. El equilibrio núcleo-citoplasmático, en esos casos, está completamente desplazado hacia una acumulación nuclear. No podemos determinar si la exportación de p8 es activa o pasiva, o si depende de una secuencia en particular y de una maquinaria de exportación diferente a Crm1. La diferencia de la localización observada en células confluentes y en células subconfluentes tratadas con TSA, podría atribuirse a un aumento en la exportación, a un descenso de la importación o a una combinación de ambos procesos con un balance inclinado al lado citoplasmático.

Una especulación interesante, ilustrada en el modelo de la figura 10, es proponer que bajo ciertas condiciones fisiológicas, el estado de acetilacion de p8 se altera, provocando como consecuencia, una disminución de las cargas positivas en la NLS en el extremo C-terminal de p8. Esto podría estar inactivando a la NLS y de esta forma estar inhibiendo la importación activa de p8. Evidencias para esta especulación, se desprenden del hecho de que p8 contiene lisinas acetilables en su NLS, y del hecho de que se comprobó que p8 interactúa in vivo e in vitro con p300, el coactivador de la transcripción que posee actividad histona acetil transferasa, que además, es capaz de acetilar a p8 in vitro. Un mecanismo como el propuesto fue descrito para la High Mobility Group Protein 1 (HMGB1) [63] que pertenece a un grupo de

proteínas a las cuales se ha demostrado que p8 se parece tanto química como estructuralmente [6].

La interacción de p8 con sus putativos interactores podría también estar regulada por el estado de acetilación de p8, con una consecuencia en su localización subcelular.

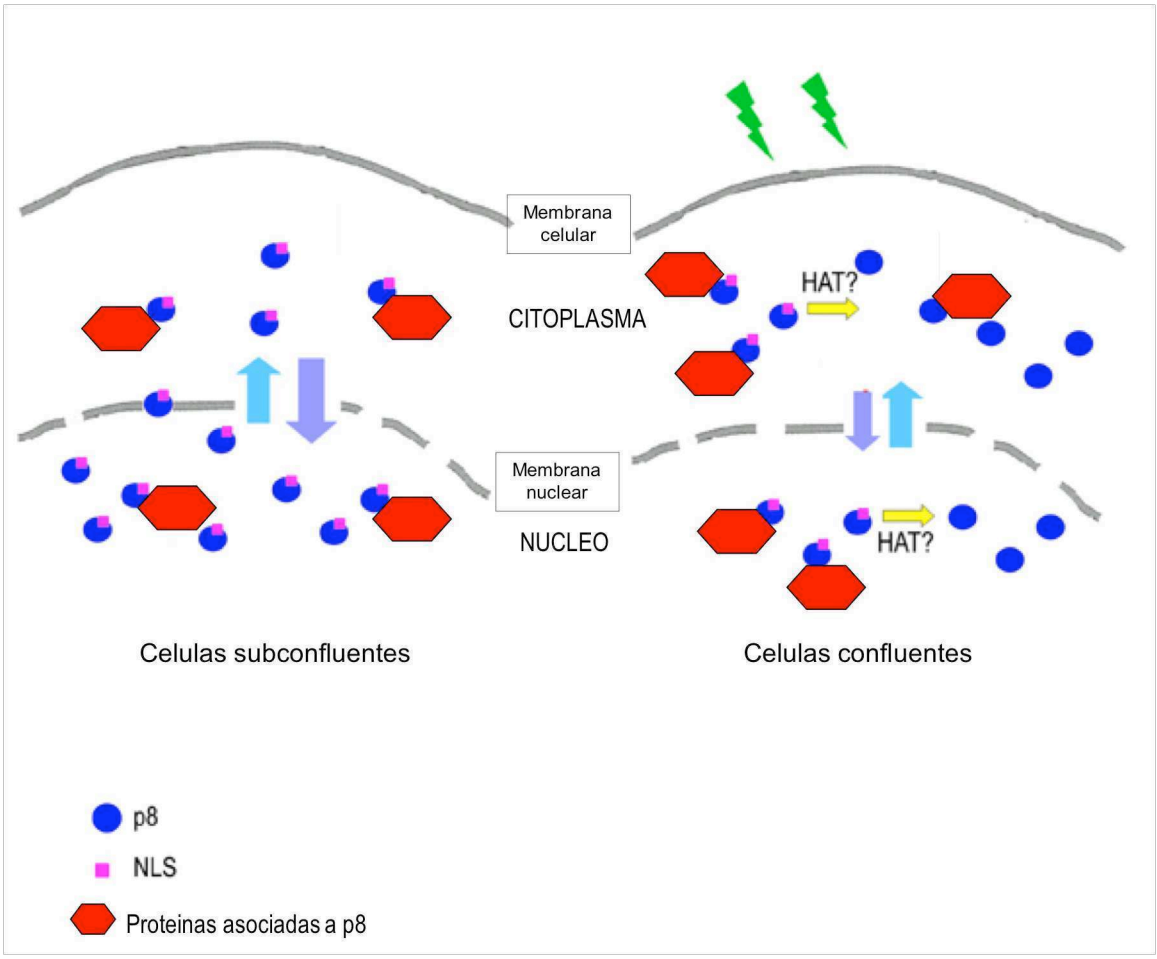


Figura 10: Esquema del modelo propuesto para el control de la regulación de la localización de p8.

Estudios recientes han demostrado que la función proteica está muchas veces regulada a nivel de localización durante procesos de señalización. Hay casos en los que las proteínas se encuentran retenidas en el núcleo para prevenir que estén activas y son liberadas al citoplasma o a la superficie de las membranas intracelulares en el momento que sea

necesario; o inversamente son inactivas en el citoplasma para luego ser liberadas al núcleo a cumplir su función.

Dado que p8 es una proteína con un peso molecular de alrededor de 9 kDa, que implica un tamaño lo suficientemente pequeño para que pueda difundir pasivamente entre núcleo y citoplasma, su distribución debiera ser uniforme por toda la célula si se encontrara libre. La localización polarizada de p8, dependiente de densidad celular y controlada por disponibilidad de energía, estadío del ciclo celular y estado de acetilación de las células, sugiere que en ambos compartimentos, tanto nuclear como citoplasmático, p8 se encuentra formando parte de un complejo.

p8 Y SACCHAROMYCES CEREVISIAE

p8 y *Saccharomyces cerevisiae*

Dado que en nuestro laboratorio se maneja la genética de levaduras, decidimos evaluar si era posible acercarse al estudio de la función de p8 en este modelo. Como primer paso se realizó un análisis exhaustivo de genomas o ESTs publicados y se buscó la secuencia de p8 en todas las bases de datos posibles.

Se encontró p8 en varios eucariotas superiores no reportados hasta ese momento, como Drosophila, Anopheles y Zebrafish, pero no se encontró ninguna secuencia homóloga a p8 en eucariotas inferiores. Dado que el genoma de S.cerevisiae no incluye el estudio sistemático de los ORFs de menos de 100 aminoácidos, se hizo un estudio de la posibilidad de expresión de p8 en cada una de las secuencias genómicas completas de cada uno de los cromosomas de la levadura, siendo el resultado negativo. Esto indica que p8 recién se expresa en organismos eucariotas multicelulares, con mayor complejidad y nivel de organización que los hongos y levaduras.

Como segundo paso abordamos el estudio de los posibles efectos que pudiera tener la sobre expresión de p8 en S.cerevisiae. Se subclonó p8 en el vector de expresión en levaduras pESC inducible por galacosa, en el cual la proteína queda etiquetada con el epítope myc. Mediante la técnica de RT PCR se verificó la expresión del mRNA de p8 en la cepa de levaduras transformada, asi como la expresión de la proteína por Western blot, utilizando un anticuerpo anti myc.

Un estudio cuidadoso de curvas de crecimiento de la levadura por 72 horas no mostró diferencias entre las células transformadas con el vector que contenía p8 y las transformadas con el vector vacío; tampoco hubo diferencias entre las cepas crecidas en presencia de galactosa que induce al promotor bajo el que está expresado p8 y las células crecidas en glucosa en las que p8 no esta expresándose. Tampoco se encontraron diferencias en el análisis de los siguientes fenotipos: contenido de glucógeno, resistencia a un shock térmico, y tasa de división celular. Dado que no se encontró modificado ningun parámetro, se abandonó en esta tesis, el uso de la levadura como posible modelo para estudiar a p8.

ESTUDIOS PROTEOMICOS DE p8 Y DE SUS PROTEINAS INTERACTORAS

Introducción

El hecho que p8 presente una localización estrictamente controlada con una localización nuclear bien definida en células en división activa, sugiere que la proteína no está libre dentro del núcleo sino que estaría formando un complejo con otras proteínas o ácidos nucleicos. Si esto no fuera así, seria más probable encontrar a p8 distribuida uniformemente a través de la célula, ya que un transporte nuclear/citoplasmático pasivo seria inevitable para p8 monomérica. El poro nuclear permite la difusión pasiva de proteínas con tamaños de hasta 40-50 kDa, y esto lleva a la pregunta de por qué p8, siendo una proteína de 9 kDa, contiene una NLS funcional?

Una explicación posible es que p8 existe en la célula como parte de un complejo proteico y que la NLS de p8 estaría encargada de mediar la traslocación al núcleo de todo el complejo.

Experimentos de cromatografía por tamiz molecular, muestran que p8 migra a un peso molecular mucho mayor al esperado, lo que también indicaría que esta formando complejos proteicos de mayor tamaño [39].

Algunas proteínas son activas solamente cuando se encuentran en el contexto de un complejo proteico mayor que coordina varias actividades bioquímicas. Las interacciones entre las proteínas de los complejos son generalmente reguladas en respuesta a estímulos ambientales o cambios en el estado celular. Este podría ser el caso de p8, que podría estar activa al estar asociada a otras proteínas y dirigiendo su localización subcelular. Hasta el momento no se sabe mucho sobre las funciones de p8 en la célula, o sobre las vías de señalización en las cuales podría estar involucrada. Se han propuesto varias funciones, muchas veces contradictorias entre si, dependiendo del modelo utilizado, que ya hemos mencionado en la introducción general.

Por esto consideramos que sería útil abordar esta pregunta a través del estudio de los interactores de p8, que podrían darnos una idea de las vías en las que p8 estaría involucrada y de sus funciones. Para esto encaramos la identificación de proteínas interactoras de p8 por espectrometría de masa.

Abordaje experimental para la purificación de complejos proteicos asociados a p8

El estudio de complejos multiproteicos permite organizar a muchas proteínas en unidades operativas y permite ubicar a ciertas proteínas de rol desconocido en contextos funcionales [76]. En los últimos años se ha comenzado a combinar la purificación de complejos proteicos con la espectrometría de masas para la identificación de las proteínas que conforman estos complejos. Básicamente lo que se hace es purificar por cromatografía de afinidad, a partir de una muestra biológica, a la proteína de interés junto con sus complejos asociados. Una vez purificados, se separan las proteínas y luego se digieren con enzimas proteolíticas sitio específicas que van a generar mezclas de péptidos que, al ingresar al espectrómetro de masas se ionizarán y volarán durante un tiempo que será proporcional a su relación masa/carga. El detector mide los tiempos de vuelo de cada péptido y a partir de esto produce una lista de masas que al ser comparadas con las digestiones teóricas de las bases de datos permiten la identificación de proteínas (figura 11). Entre estos pasos básicos generalmente se intercalan diferentes métodos separativos para disminuir la complejidad de las muestras.

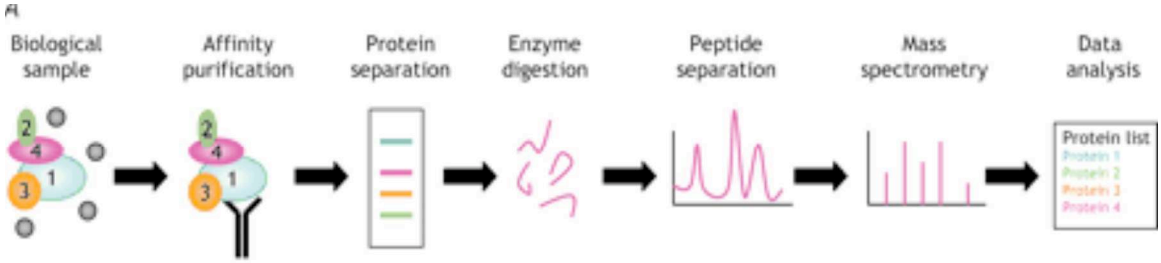


Figura 11: Esquema de trabajo general para la purificación e identificación de complejos proteicos por espectrometria de masas.

La espectrometría de masas ofrece una identificación rápida y precisa de las proteínas en una mezcla. Se pueden detectar hasta 100 fmoles de una proteína [77]. Dada la alta sensibilidad de esta técnica, el mayor desafío al utilizar muestras de alta complejidad, es lograr discernir entre las proteínas que verdaderamente forman parte del complejo en cuestión, y aquellas proteínas contaminantes. Por esto, el paso clave en la identificación de

proteínas de un complejo por espectrometría de masas, es la purificación de estos complejos, donde es necesario lograr la máxima especificidad para poder eliminar las proteínas contaminantes.

Se han probado y desarrollado varias estrategias para la purificación de complejos: los métodos clásicos, como tamices moleculares, cromatografía de intercambio de iones y cromatografía de afinidad de diversos tipos. Estos últimos son los que ofrecen mayor capacidad de discriminación. En estos métodos se inmoviliza en un soporte sólido una molécula y luego se purifica, desde un extracto celular u otra fuente proteica, la proteína de interés que tendrá alta afinidad por esta molécula inmovilizada, junto con sus proteínas interactoras.

En principio se utilizaban anticuerpos específicos, para purificar proteínas endógenas. El problema con estos anticuerpos es que muchas veces presentan afinidad cruzada por otras proteínas, o muchas veces solo interactúan con una sub población de la proteína de interés. Para sobrellevar estos problemas, comenzaron a utilizarse proteínas recombinantes fusionadas a etiquetas que permiten su purificación. La proteína se expresa e interactúa con las proteínas endógenas y luego puede ser purificada por afinidad de las etiquetas. Esto, además, facilita la estandarización de métodos de purificación que facilita la comparación de resultados obtenidos en la purificación de diferentes proteínas, y permite generar listas de proteínas contaminantes típicas inherentes al método.

En el año 2001, se desarrollo el método TAP, Tandem Affinity Purification. Este método contempla las cuestiones mencionadas arriba, y propone por primera vez agregar una doble etiqueta que estaría permitiendo la purificación secuencial en dos pasos de la proteína de interés [77]. Esto ofrece varias ventajas como la reducción de proteínas inespecíficas, y la posibilidad de establecer un protocolo estándar que puede ser utilizado para cualquier proteína que esté etiquetada. Otra gran ventaja es que el uso de dos pasos de purificación con afinidades altamente específicas junto con lavados y métodos de elución suaves, cercanos a condiciones fisiológicas permiten preservar interacciones entre nuestra proteína de interés y las proteínas asociadas.

Una desventaja del uso de esta técnica en eucariotas superiores es la necesidad de tener que clonar a la proteína en un vector que contenga estas etiquetas y sobre expresarla a partir de un promotor heterólogo, ya que seria muy complicado agregar la etiqueta a la versión cromosómica como se hace en levaduras, que es donde se originó el método. De todas formas, con los controles apropiados, este método sería uno de los más eficientes para purificar complejos proteicos libres de contaminantes.

Consideramos que el uso de una purificación secuencial era necesario para la purificación de p8 y sus proteínas asociadas, ya que los experimentos realizados previamente con anticuerpos anti-p8 indicaban que este anticuerpo no era el apropiado, ya que es poco sensible y presenta interacciones inespecíficas. El TAP tag, consiste en una porción de la proteína A (que interactuará con inmunoglobulinas que están inmovilizadas) seguida por el sitio de clivaje de la proteasa del virus del Tabaco (TEV) y por la segunda etiqueta que es el péptido de unión a calmodulina (CBP). Todo esto suma una masa de aproximadamente 21kDa. Dado que esta masa es considerablemente mayor a la masa de p8, pensamos que este abordaje no era adecuado, ya que el agregado de más del doble de la masa de p8, probablemente interferiría con sus funciones, su localización y su interacción con otras proteínas.

Por esto decidimos generar nuestro propio sistema de purificación en tandem. Se construyó un vector de expresión eucariota en el cual p8 quedó fusionado por su extremo amino terminal a un epítope de 6 histidinas y al péptido flag, que juntos agregan una masa de 2,1 kDa.

A partir de un vector (pQE-30) que ya contenía p8 fusionada a seis histidinas en su extremo N-terminal, agregamos por PCR el epitope Flag e insertamos la construcción en un vector de expresión en eucariotas superiores (pcDNA3). Nos pareció apropiado colocar las etiquetas en el extremo N-terminal ya que el extremo C-terminal es el que contiene las lisinas que parecerían estar más involucradas en la localización subcelular de p8, y por lo tanto esta zona podría ser la más importante para las interacciones (figura 12).

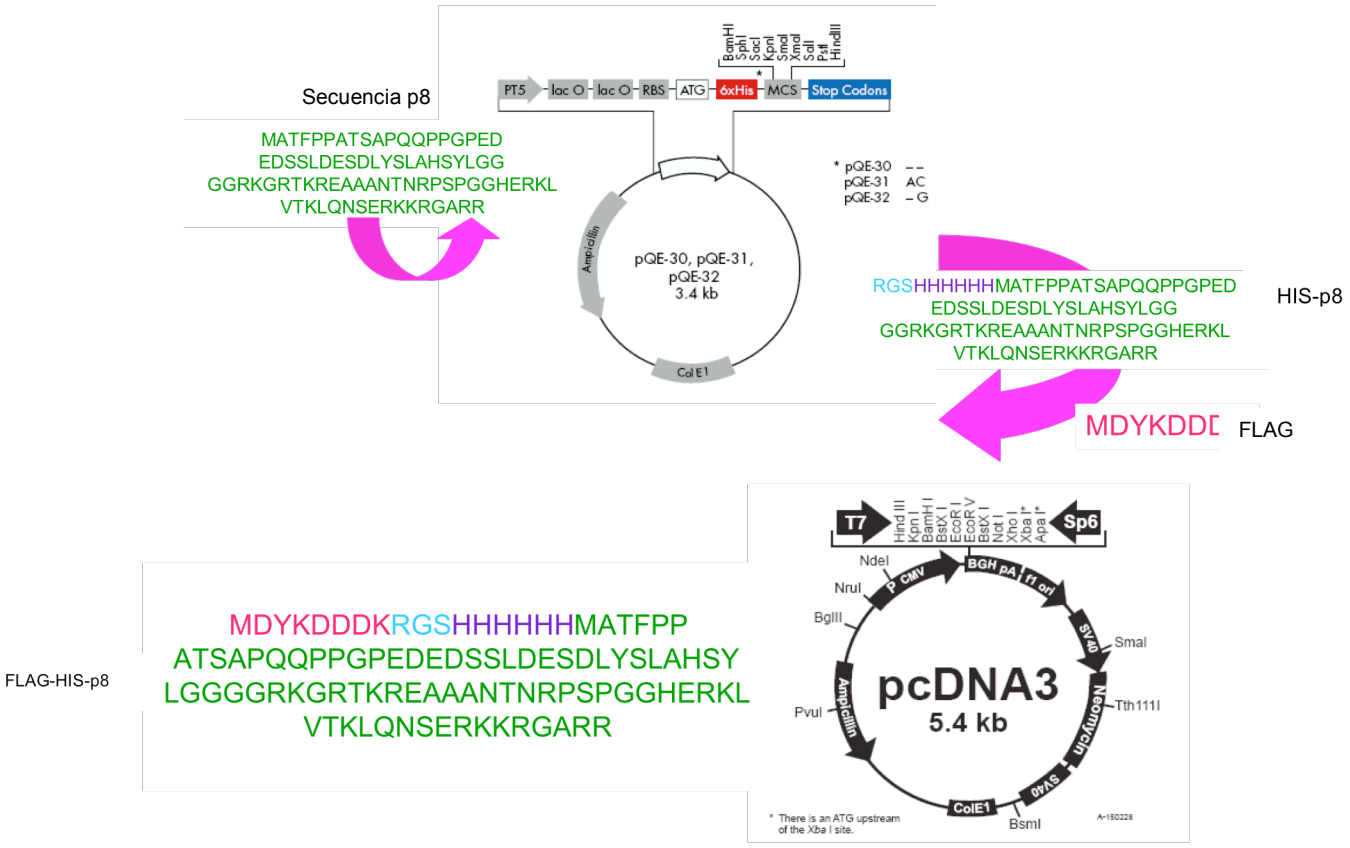


Figura 12: Esquema de la construcción del vector con dos etiquetas para la expresión y purificación de p8 a partir de células eucariotas.

Con esta construcción transfectamos células y seleccionamos con el antibiótico G418 para generar líneas estables de células HeLa y células HEK 293 que expresaran p8 recombinante fusionada a Flag-HIS. Se corroboró la expresión de p8 por Western Blot con anticuerpos anti-His y anti-p8 y se decidió trabajar con las células HEK 293 ya que en las células HeLa la expresión fue muy baja (datos no mostrados). Se verificó por inmunocitoquimica que la localización de la construcción, en la forma de transfección estable, conservara las mismas propiedades de localización que p8 endógena o que HeLap8 (en donde p8 se transfectó establemente, línea con la cual se hicieron los experimentos de localización). En el segundo panel de la figura 13 se muestran grupos de células HEK 293 transfectadas establemente. En el mismo panel se observan células subconfluentes (localización principalmente nuclear) y confluentes (localización uniforme en toda la célula) teñidas con el anticuerpo anti-p8.

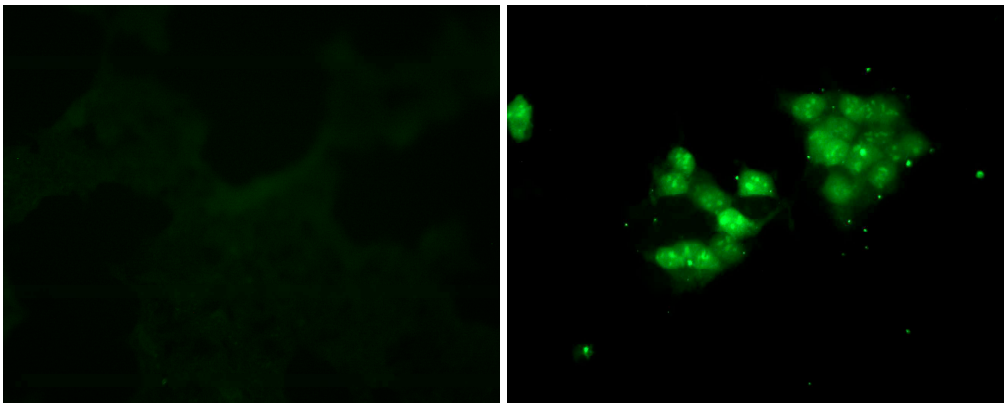


Figura 13: Control de expresión y localizacion de p8. células HEK 293 transfectadas con el vector FLAGHISp8, crecidas en 0,8 mg/ml de G418 durante 4 semanas reveladas por inmunocitoquimica con anticuerpos anti-p8 y un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceina. El primer panel muestra un control con células no transfectadas.

Se crecieron en paralelo, células HEK 293 transfectadas establemente con el vector que expresa FLAGHISp8 y células control, transfectadas establemente con el vector "Double Trouble" que contiene las dos etiquetas de interés bajo el promotor de CMV (Ver consideraciones en Materiales y Métodos) y el mismo marcador de selección que el vector pcDNA3. Este segundo grupo funciona como control negativo para discriminar entre las proteínas que llegan al eluído final por estar interactuando con p8 y las que llegan por interactuar con el sistema de purificación. De esta forma generamos una lista de proteínas inespecíficas inherentes a nuestro método de purificación.

Resultados de la purificación

Se prepararon extractos celulares en buffer fosfato, minimizando la ruptura de interacciones sin agregar altas concentraciones de sales ni detergentes.

El primer paso de purificación en tandem se realizó utilizando una columna de níquel-agarosa (Quiagen). El extracto se incubó con la resina en batch durante toda la noche en un buffer conteniendo bajas concentraciones de imidazol. El imidazol compite con las histidinas por los sitios de níquel de

la resina. Fue necesario ajustar la concentración de imidazol en los diferentes buffers, ya que siguiendo la condiciones propuestas por Quiagen (Buffer extracto con 10 mM de imidazol, Buffer Lavado 20mM de imidazol, Buffer de elución 250mM de imidazol) obteníamos un alto fondo de proteínas inespecíficas, pero al aumentar las concentraciones de imidazol a 50 mM para realizar lavados más rigurosos, no se lograba un pegado óptimo de la proteína a la resina y p8 comenzaba a eluir en los lavados, en lugar de permanecer pegada hasta el buffer de elución (figura 14).

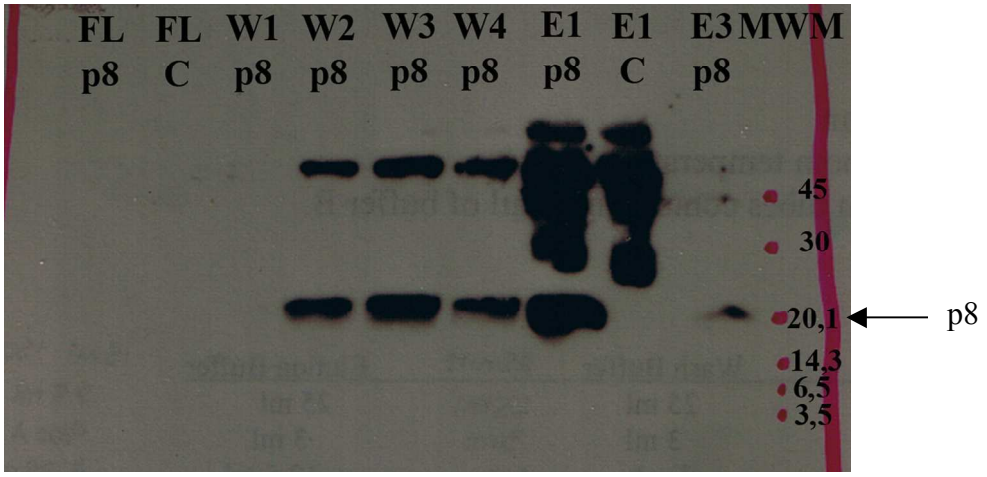


Figura 14: Western Blot de las alícuotas de los pasos de purificación de la columna de níquel utilizando un buffer lavado con imidazol 50 mM. Revelado con anti-HIS (Quiagen) y un segundo anticuerpo anti-ratón. La calles FL corresponden a los percolados, las calles W1, W2, W3 y W4 corresponden a los lavados 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Las calles E1, E2 y E3 corresponden a los eluídos 1, 2 y 3 respectivamente. Las calles que dicen p8 corresponden a los extractos provenientes de células transfectadas con el vector que expresa p8 fusionada a los tags, las que dicen C corresponden a las células control transfectadas con el vector "double trouble" vacío.

Es importante destacar que ya ha sido publicado y verificado que p8 no migra a la altura esperada, sino que lo hace a una altura del marcador de 20,1 kDa. No se sabe cual es la razón que justifica este fenómeno, no descartamos una modificacion post traduccional, o simplemente una consecuencia de su naturaleza altamente cargada y estructura desplegada.

Después de varias pruebas, decidimos aumentar la concentración de imidazol en el buffer extracto de 10 mM a 20 mM para reducir las interacciones inespecíficas. Por otro lado, también aumentamos de 20 mM a 25 mM de imidazol en la solución de lavado, ya que esto permitía un lavado

más riguroso, sin causar el despegado de la proteína. Para la elución de la resina vimos que 150 mM era suficiente para despegar totalmente la proteína de la resina, y no se necesitaban 250 mM que es lo recomendado por el fabricante.

En las fracciones eluídas de dichas columnas se siguió el perfil de elución de p8 a través del análisis de las fracciones por western blot con anticuerpos anti histidina y anti p8 (figura 15).

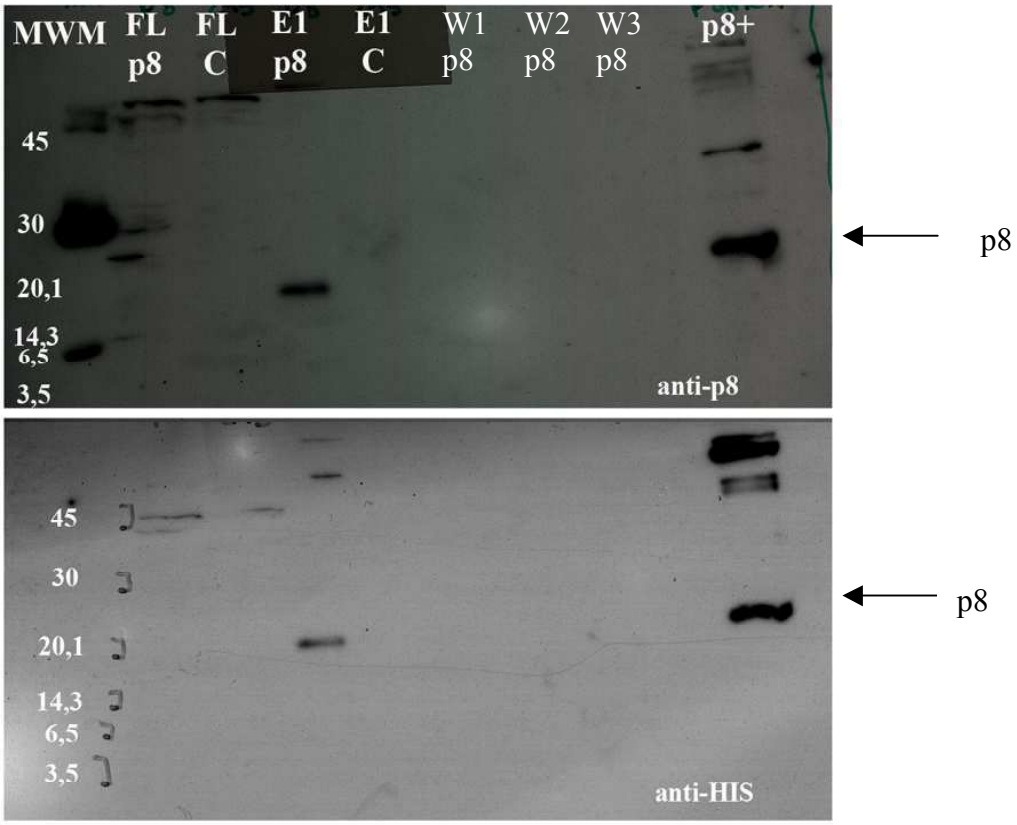


Figura 15: Western Blot de las alícuotas de los pasos de purificación de la columna de níquel, utilizando un buffer de lavado con 25 mM de imidazol y un buffer de elución con 150 mM de imidazol. Revelado de la misma membrana con anticuerpo anti-HIS (Quiagen) y anti-p8. La última calle es un control positivo que corresponde a una fracción que contiene p8, cuya identidad fue verificada por espectrometría de masas.

Una vez puesto a punto este paso se procedió al segundo paso de purificación que involucraba al anticuerpo monoclonal anti flag M2 unido a agarosa. Los lavados en este caso se realizaron con PBS, y la elución en principio se realizó con un buffer ácido para desarmar la interacción antígeno-anticuerpo, pero esto provocaba la elución de las inmunoglobulinas del

anticuerpo de la resina que contaminaban las muestras que iban a ser digeridas (figura 16).

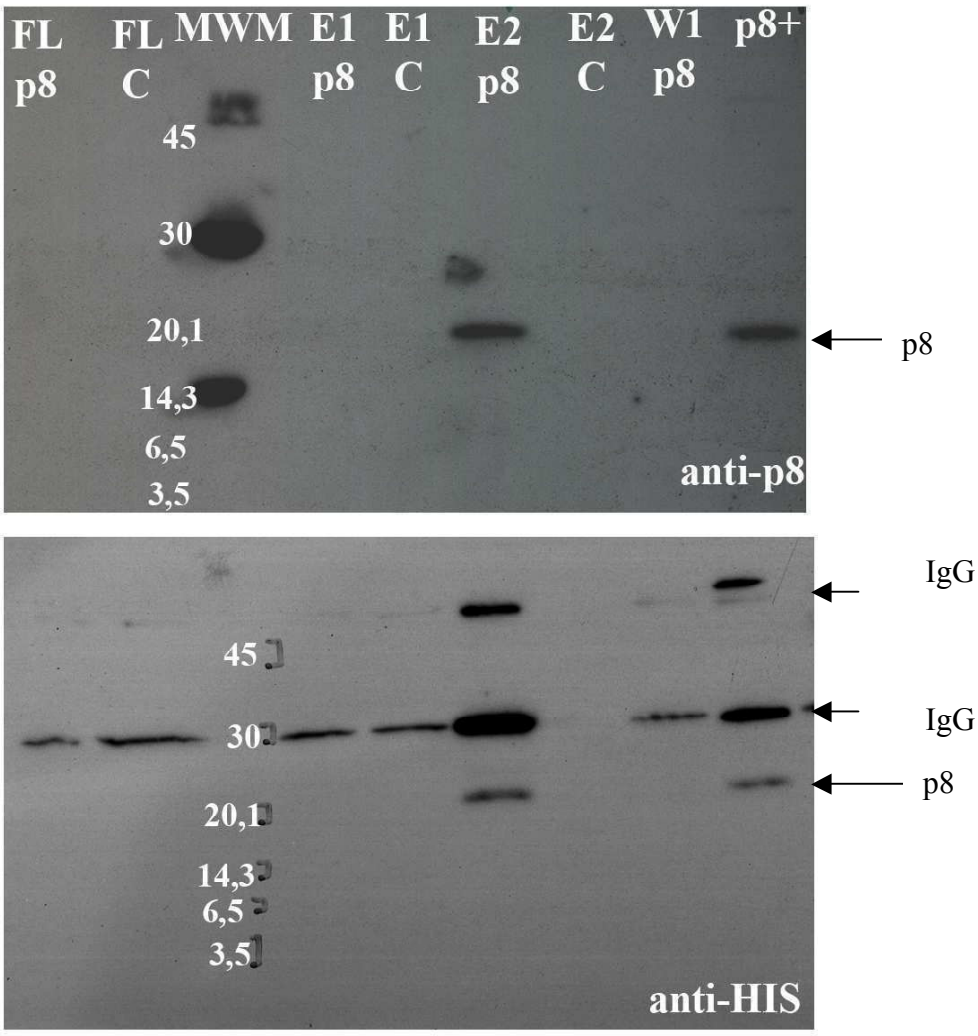


Figura 16: Western Blot de las distintas alícuotas de la purificación utilizando la resina anti-FLAG M2 (Sigma). Método de elución: Buffer ácido. La presencia de p8 se detectó utilizando anticuerpos anti-HIS y anti-p8.

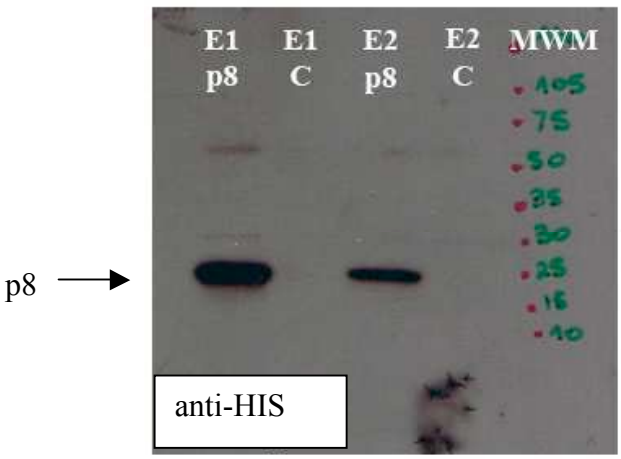


Figura 17: Alícuotas de los eluídos de la purificación con Anti-FLAG M2 eluídos con el péptido FLAG (Sigma). Revelado anti-HIS.

Es por esto que cambiamos el método de elución por la utilización del péptido flag, lo que permite una elución suave y específica de las proteínas de interés.

Los eluídos finales, fueron sembrados en geles de poliacrilamida y teñidos con Coomassie coloidal para comparar los patrones de bandas y las bandas diferenciales entre las células control y las que expresan p8. El Coomassie coloidal permite detectar bandas de hasta 100 ng de proteínas.

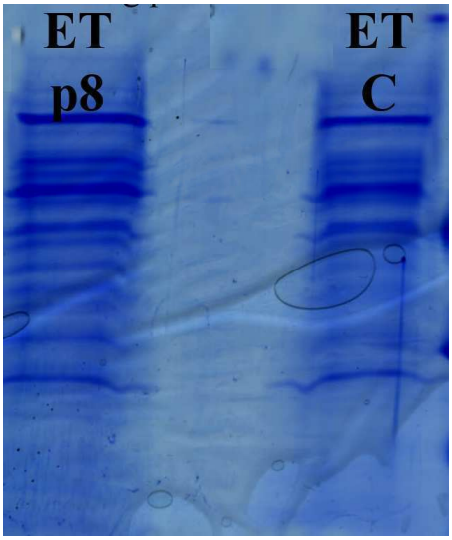


Figura 18: Proteínas observadas en el eluído final de la purificación Níquel-Flag. Tinción con Coomassie Coloidal 48 hs.

Los primeros abordajes generaban una alta cantidad de proteínas que no permitía observar bandas diferenciales entre las células control y las células que expresan p8. Es por esto que decidimos invertir el orden de los pasos de purificación ya que se sabe que la purificación con flag es más selectiva que la purificación con níquel [78] y de esta forma eliminaríamos los grandes contaminantes en el primer paso y refinaríamos la purificación con el segundo paso de níquel. Esto disminuyó considerablemente las proteínas inespecíficas que copurificaban con p8 en el eluído final (figura 19).

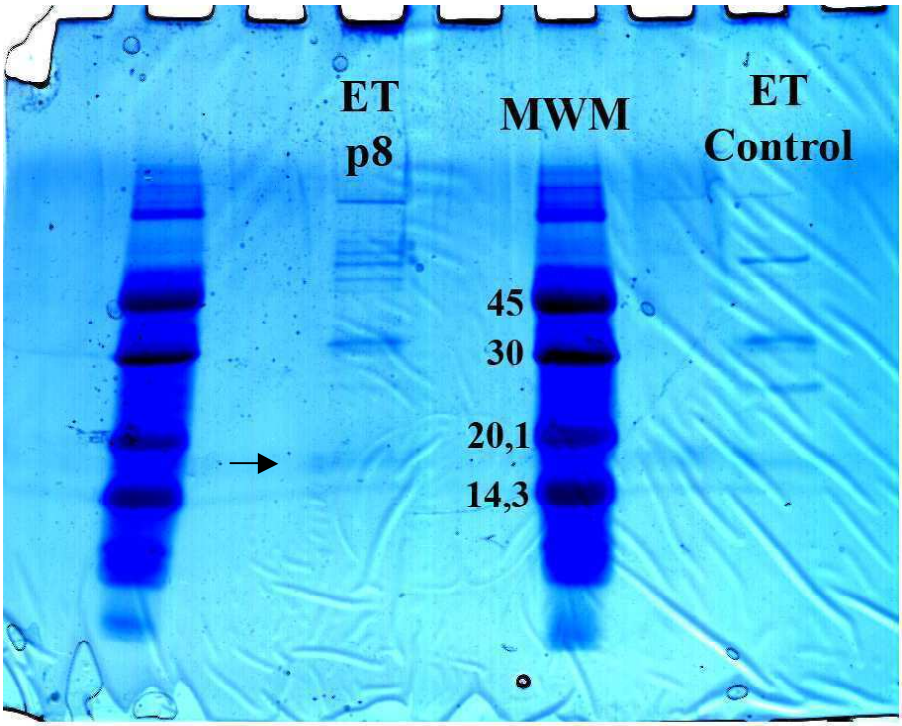


Figura 19: Proteínas observadas en el eluído final de la purificación Flag-Níquel. Tinción con Coomassie Coloidal 48 hs.

En el esquema de la figura 20 se detalla el protocolo final adoptado, incluyendo datos como material de partida (cantidad de células) y volúmenes de resinas y soluciones.

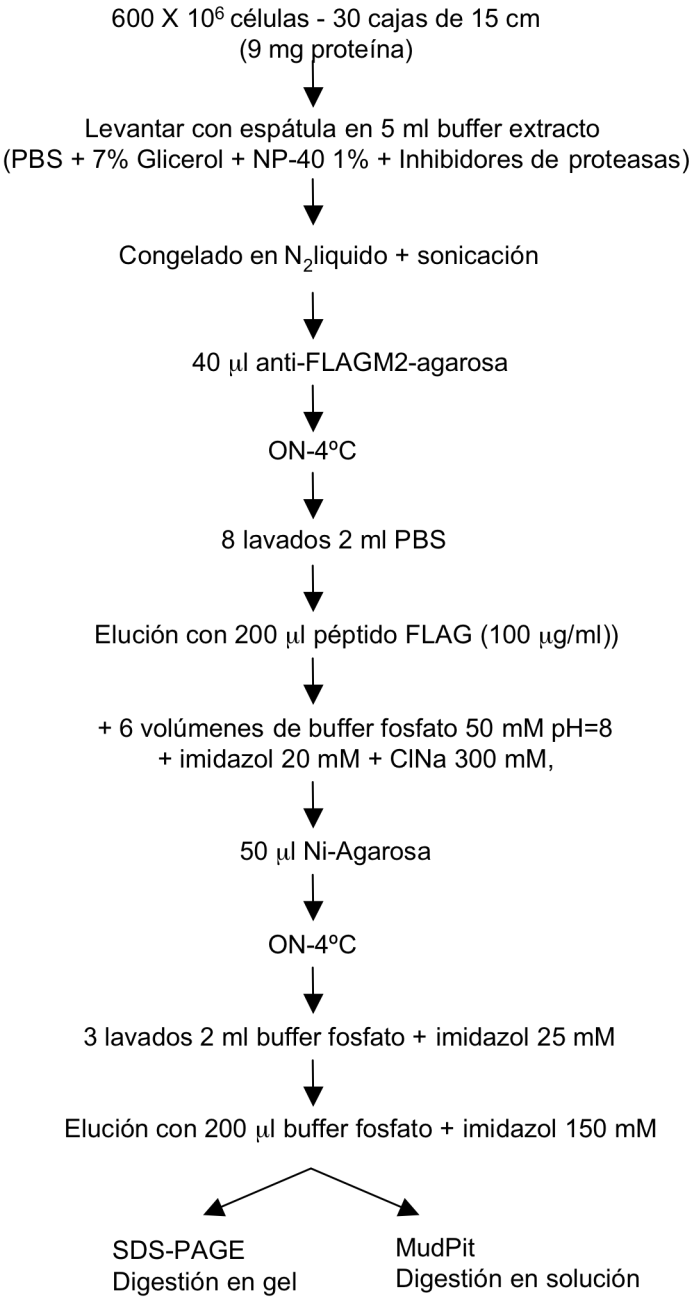


Figura 20: Esquema general del protocolo final de purificación.

Análisis e identificación por espectrometría de masa

Una vez purificados los complejos proteicos, el abordaje más común es proceder a su digestión. Generalmente, previo a la digestión, se siembran los eluídos de la purificación en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y se tiñe con Coomassie Coloidal.

Además de ser importante para la visualización de patrones de bandas diferenciales entre las diferentes muestras, el paso de las muestras por geles de poliacrilamida es también un paso adicional de fraccionamiento de la muestra que permite una reducción de la complejidad. Es por esto que generalmente se realizan geles preparativos que se tiñen y luego se cortan las bandas del gel para ser digeridas individualmente, y de esta forma generar diferentes grupos de péptidos, y una vez extraídos de los geles, cada grupo de péptidos proveniente de una banda del gel ingresará como muestra independiente al espectrómetro de masas.

Además de este clásico método de cortar las bandas visualizadas con Coomassie, para maximizar la digestión de proteínas presentes en el gel existe otra alternativa. Dado que el Coomassie presenta un límite mínimo de detección, una forma de seleccionar todas las proteínas, es realizando cortes continuos a lo largo de toda la calle del gel, sin importar si hay banda detectable de proteína o no, de forma tal que todo lo que está presente en el eluído será digerido y analizado por espectrometría de masas.

Otro abordaje mas novedoso es el MudPIT “Mutlidimensional Protein Identification Technology” en el que se evita la separación de proteínas en gel y se digieren los eluídos de la purificación directamente en solución, sin pasar por gel, y esto genera una gran mezcla de péptidos provenientes de todas las proteínas en la muestra. La mayor desventaja de este abordaje es la gran mezcla de péptidos que se generan luego de la digestión, ya que la mezcla de proteínas eluidas no recibe ningún paso de separación / fraccionamiento previo, y dada la sensibilidad absoluta y rango dinámico de los espectrómetros [79], someter una mezcla tan compleja al análisis por espectrometría de masas compromete la capacidad de detectar aquellos péptidos que se encuentren en menor proporción, pero esto puede compensarse realizando pasos de purificación adicionales posteriores a la digestión, como ser una HPLC monodimensional en la que se separan los

péptidos según hidrofobicidad, o una bidimensional en la que se separan por hidrofibicidad y por carga.

Una vez digeridas las proteínas, los péptidos se analizan por espectrometría de masas. Esta técnica se basa en la ionización de los péptidos, y en la capacidad del espectrómetro de medir su relación masa/carga en tiempo real [80].

Hoy en día los dos métodos mas utilizados para la ionización son MALDI y ESI. En la técnica MALDI (Matrix Assisted LASER Desorption Ionization), la muestra se cocristaliza con una matriz sobre una placa, y se utiliza un LASER, que excita a la matriz y ésta transmite energía a la muestra y produce su ionización. En el ESI (Electrospray ionization) los péptidos, que deberán estar disueltos en fase liquida y que generalmente estarán cargados positivamente si se usan buffers levemente ácidos, pasan por una fina aguja que es sometida a un alto potencial eléctrico y de esta forma se vaporizan (spray) en finas gotas (figura 21). El método MALDI genera partículas monocargadas, mientras que en este ultimo método se generan partículas multicargadas, en general +2, +3 y +4. Es común utilizar el ESI acoplado a un HPLC que permitirá la separación previa de los péptidos y su elución en el buffer adecuado para su posterior ionización.

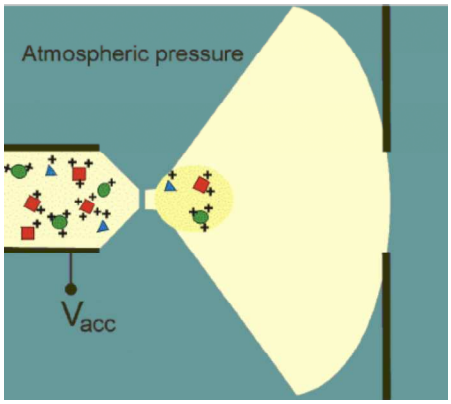


Figura 21: Esquema de ESI.

En ambos tipos de espectrómetros, una vez ionizados, los péptidos son enfocados y se evalúa su relación masa/carga de acuerdo al tiempo de vuelo dentro del espectrómetro. Esto permite generar espectros de MS, donde la combinación de masa/carga de varios péptidos permite generar una

huella peptídica que permite identificar a una proteína. A mayor cantidad de masas/cargas obtenidas de los diferentes péptidos más exacta será la identificación que se realiza por comparación con bases de datos en las que se digieran las proteínas *in silico*, usando la misma enzima para generar la lista de masas de los péptidos resultantes de la digestión.

Además de esto existe un análisis alternativo o complementario que se realiza con aparatos que permiten la espectrometría de masa en tandem o MSMS. En estos casos los péptidos ionizados que dan señal más intensa en el MS, son seleccionados para ser fragmentados a través de la colisión con partículas gaseosas (CID) que generaran la disrupción de las uniones peptidicas (figura 22).

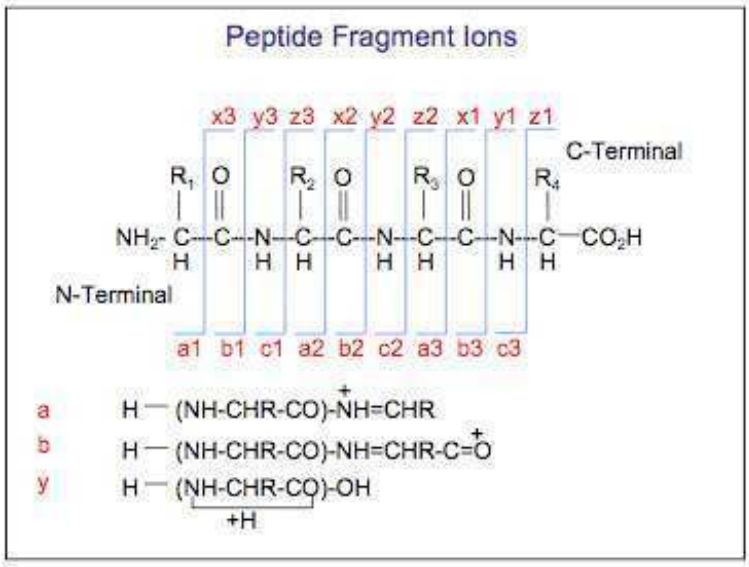


Figura 22: Posibles fragmentaciones de un péptido.

Los fragmentos serán detectados solamente si portan alguna carga, si esta carga es retenida en el extremo N-terminal del péptido este será clasificado como ion a, b o c. Si la carga queda en el C-terminal será llamado x, y o z.

La masa de estos fragmentos será medida por el detector, generando de esta forma una espectro de MS/MS que nos permitirá realizar una

comparación *in silico* contra los espectros generados a partir de las fragmentaciones teóricas de las bases de datos (figura 23), o en el caso de genomas no secuenciados, se podrá realizar una secuenciación *de novo* para reconstruir la secuencia del péptido y luego con esta secuencia tratar de identificar la proteína a la que corresponde (figura 24).

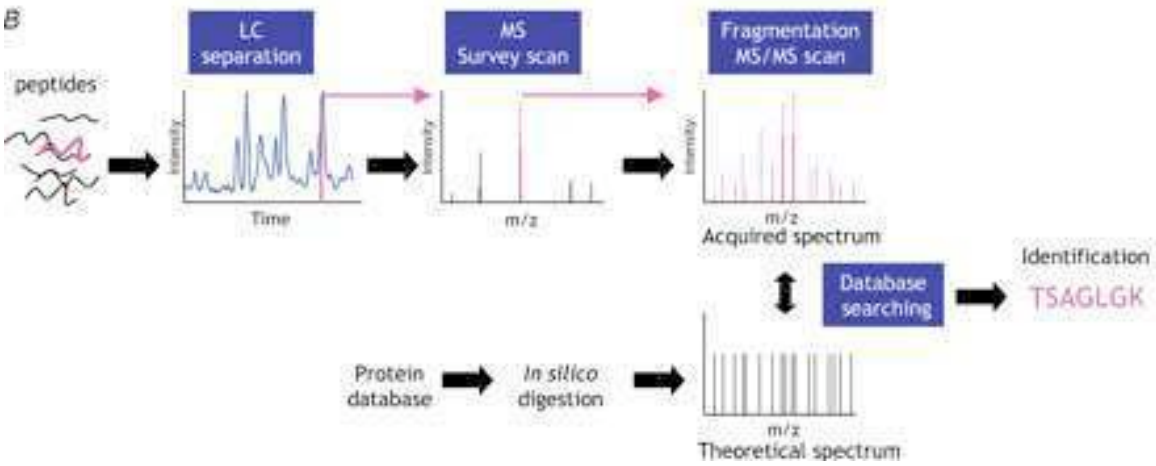


Figura 23: Esquema de trabajo de proteómica utilizado para la identificación de proteínas en una muestra por espectrometría de masa en tandem. Se seleccionan los picos de MS mas intensos de cada tiempo para ser fragmentados y así generar espectros de MSMS.

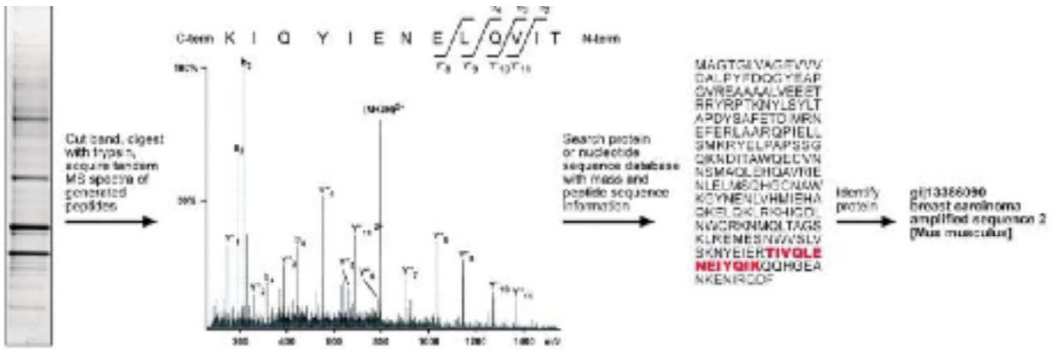


Figura 24: Reconstrucción de una secuencia a partir de un espectro de fragmentación: *de novo* sequencing.

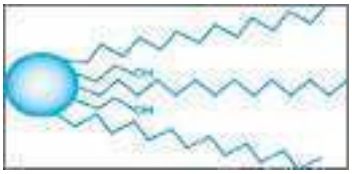
Estrategia de espectrometría de masas utilizada

Nosotros realizamos los tres tipos de abordajes previos a la digestión, es decir corte de las bandas del gel teñidas con Coomassie Coloidal, bandas provenientes del corte secuencial total de las calles del gel, o los eluídos intactos digeridos en solución, para no perder ninguna proteína en el paso adicional del gel. Las muestras fueron digeridas alternativamente con las proteasas tripsina o quimotripsina. La tripsina que corta el enlace peptídico en el extremo C-terminal de lisinas o argininas, es más eficiente y presenta menos "missed cleaveages" en general, pero dado que para p8 la tripsina genera péptidos demasiado cortos o demasiado largos para ser analizados en el tipo de espectrómetro utilizado, en muchas casos utilizamos la quimotripsina que corta en el C-terminal de tirosina, fenilalanina, triptofano y con menos eficiencia leucina, metionina, alanina, asparagina y glutámico. A pesar de ser menos eficiente, es más adecuada para la digestión de p8 ya que genera péptidos de 8-20 amino ácidos que tendrán mejor vuelo y estarán en el rango de masas/cargas que lee el espectrómetro utilizado (ver más abajo).

Luego de la digestión y, en el caso de digestiones en geles, luego de la extracción de péptidos; separamos los péptidos generados realizando una HPLC acoplada al espectrómetro, este paso adicional permite separar los péptidos según hidrofobicidad antes de que éstos entren al espectrómetro y reduce la complejidad de las muestras para optimizar su análisis.

Se realizó una cromatografía liquida de fase reversa (nanoRPLC), (figura 25) acoplada a un espectrómetro de masas QStar Pulsar que consiste en un ESI y tres cuadrupolos (figura 26).

La RPLC permite separar a los péptidos en base a su hidrofobicidad de forma tal que lleguen al espectrómetro separados en el tiempo en lugar de todos juntos, y así disminuye el apantallamiento entre péptidos, ya que el detector tiene un limite de detección en el tiempo. Utilizamos una columna de partículas de silica fusionadas a cadenas de 18 carbonos. Una vez cargada la columna, los péptidos se eluyen con concentraciones crecientes de solvente orgánico de forma tal que los péptidos mas hidrofílicos salen primero a la fase móvil y los más hidrofóbicos eluyen más tardíamente.



$C_{18}H_{37}(CH3)_2SiCl$

Figura 25: Esquema de la estructura de la columna utilizada para la RPLC.

El aparato de cromatografía utilizado, permite la elución de los péptidos en volúmenes muy bajos (nanolitros) y así se encuentran altamente concentrados.

Al eluir de la cromatografía, los péptidos, que estarán cargados positivamente ya que la fase acuosa del buffer de elución es levemente ácida, pasan por la aguja de ESI y se ionizan.

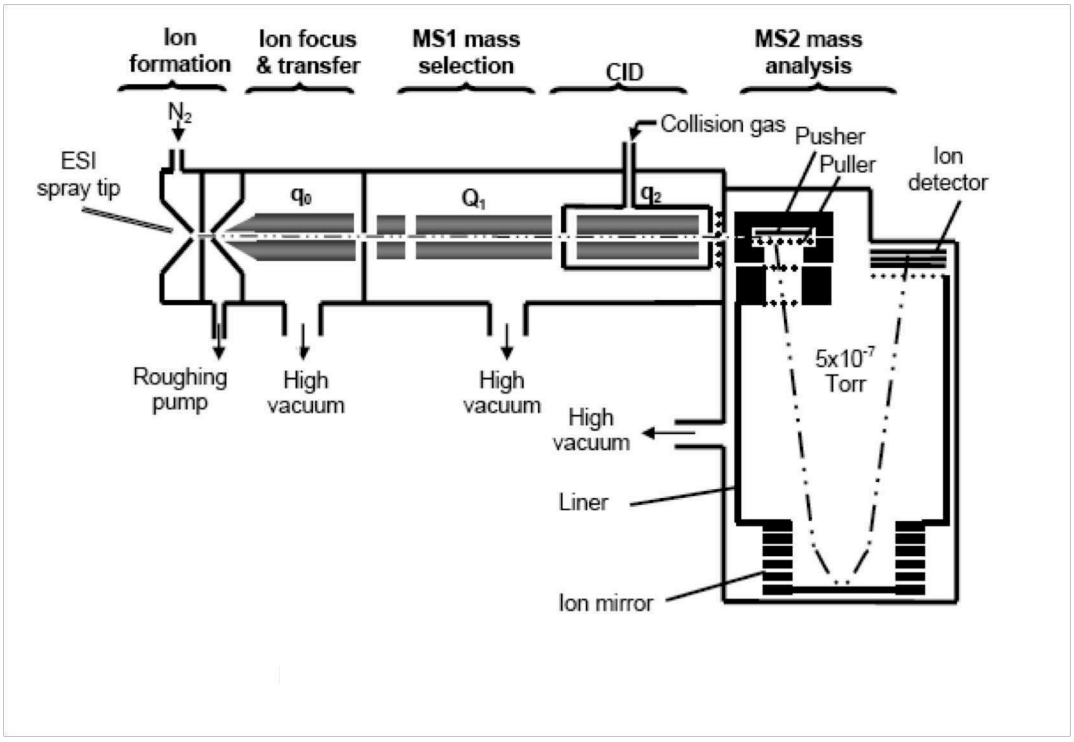


Figura 26: Esquema del espectrómetro de masas TripleQuadrupolo. En el primer cuadrupolo se enfocan los iones que fueron generados en la aguja de ESI. En el segundo cuadrupolo se seleccionan las masas de interés. En el tercero se fragmentan los péptidos seleccionados, y en el analizador se mide el tiempo de vuelo de los fragmentos.

En nuestro caso, utilizamos un espectrómetro de tipo hibrido, que se compone del ESI, seguido del triple cuadrupolo seguido de un TOF (figura 26), que no se utilizó para realizar identificaciones por huellas peptídicas, sino que se realizó espectrometría de masa en tandem (MS/MS) por fragmentación [81].

Finalmente se uso el software Analyst de Applied Biosystems, que integra los resultados de MSMS de toda la corrida y permite generar listas de picos; que utilizando programas de búsqueda como Protein Prospector, pueden ser comparadas con los espectros teóricos generados a partir de las secuencias proteicas de las bases de datos y así generar una lista de las proteínas presentes en la mezcla analizada.

Modificaciones post traduccionales de p8

La espectrometría de masas también permite identificar y localizar modificaciones post traduccionales en las proteínas analizadas ya que estas modificaciones generan una alteración en la masa de los péptidos. La espectrometría de masas en tandem, incluso permite asignar una modificación a un amino ácido especifico, siempre y cuando se obtenga un buen espectro de fragmentación del péptido [82].

Para el estudio de modificaciones post traduccionales de p8, se digirieron los eluídos de las purificaciones de p8 con quimotripsina en vez de tripsina, ya que el patrón de digestión con esta última permite en este caso, un análisis más completo por espectrometría de masas.

En las figuras 27 y 28 se muestra el patrón de digestión teórica de p8 con tripsina y quimotripsina respectivamente.

MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDLYSLAHSYLGGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKLVTKLQNSERKKRGARR

Number	m/z (mi)	m/z (av)	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	874.4741	874.9779		70	76	1	(K) LQNSERK (K)
1	1002.5691	1003.1531		70	77	2	(K) LQNSERKK (R)
1	1187.6743	1188.3775		66	75	1	(K) LVTKLQNSER (K)
1	1315.7692	1316.5527		66	76	2	(K) LVTKLQNSERK (K)
1	1315.7692	1316.5527		65	75	2	(R) KLVTKLQNSER (K)
1	1663.7895	1664.7451		49	64	0	(R) EAAANTNRPSPGGHER (K)
1	1791.8845	1792.9203		49	65	1	(R) EAAANTNRPSPGGHERK (L)
1	1819.8906	1820.9337		48	64	1	(K) REAAANTNRPSPGGHER (K)
1	1947.9856	1949.1089		48	65	2	(K) REAAANTNRPSPGGHERK (L)
1	2049.0333	2050.2146		46	64	2	(R) TKREAAANTNRPSPGGHER (K)
1	2233.1796	2234.4951		49	69	2	(R) EAAANTNRPSPGGHERKLVTK (L)

Figura 27: Digestión teórica de p8 utilizando la enzima tripsina. Se muestran los péptidos de entre 800 y 4000 daltons de masa, ya que son las masas detectadas en el modo de uso del espectrómetro. El péptido N-terminal, es indetectable debido a su gran tamaño, y otros del extremo C-Terminal debido a su pequeño tamaño.

MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSS LDESDLYSLAHSYLGGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERK LVTKLQNSERKKRGAR R

nber	m/z (mi)	m/z (av)	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
	840.3886	840.9163		30	36	2	(L)YSLAHSY (L)
	941.4098	941.9728		25	32	2	(L)DESDLYSL (A)
	1468.8204	1469.6594	pyroGlu	71	82	0	(L)QNSERKKRGARR(-)
	1485.8469	1486.6901		71	82	0	(L)QNSERKKRGARR (-)
	1927.1420	1928.2649		67	82	1	(L)VTKLQNSERKKRGARR (-)
	2381.0779	2382.5148	AcetN	1	24	0	(-)ATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSL(D)
	2470.1079	2471.6750		1	24	0	(-)MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSL (D)
	2486.1028	2487.6744	1Met-ox	1	24	0	(-)MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSL(D)
	2940.2905	2942.0484	AcetN	1	29	1	(-)ATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDL(Y)
	3015.6168	3017.3639		38	66	0	(L)GGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKL (V)
	3029.3204	3031.2087		1	29	1	(-)MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDL (Y)
	3045.3153	3047.2081	1Met-ox	1	29	1	(-)MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDL(Y)
	3103.3538	3105.2256	AcetN	1	30	2	(-)ATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDLY(S)
	3128.7009	3130.5244		37	66	1	(Y)LGGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKL (V)
	3192.3838	3194.3859		1	30	2	(-)MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDLY (S)
	3208.3787	3210.3853	1Met-ox	1	30	2	(-)MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDLY(S)
	3456.9119	3458.9387		38	70	1	(L)GGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKLVTKL (Q)
	3569.9960	3572.0992		37	70	2	(Y)LGGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKLVTKL (Q)
	3586.8922	3589.0016		33	66	2	(L)AHSYLGGGGRKGRTKREAAANTNRPSPGGHERKL (V)

Figura 28: Digestión teórica de p8 utilizando la enzima quimotripsina. Se muestran los péptidos de entre 800 y 4000 daltons de masa, ya que son las masas detectadas en el modo de uso del espectrómetro.

Una vez realizada la digestión se analizaron las muestras utilizando una herramienta adicional del software del espectrómetro que permite generar una lista de inclusión, que permite seleccionar manualmente las masas de los péptidos parentales a ser fragmentados (ver Materiales y Métodos), de forma tal que, aunque los péptidos derivados de p8 no fueran los de mayor intensidad en el MS, éstos serian fragmentados de todas formas, para obtener mayor cobertura de la secuencia de p8 y aumentar la probabilidad de ver las modificaciones post traduccionales de la proteína.

La combinación de los resultados obtenidos de digestiones con tripsina y quimotripsina, permitió alcanzar una identificación de péptidos que representan una cobertura del 72% de la secuencia de p8, pero sin embargo no se observaron modificaciones post traduccionales. Esto no significa que p8 no está modificada, ya que es muy posible que la estequiometría de las modificaciones sea muy baja, o que estas modificaciones se rompan al producirse la fragmentación de los péptidos [82].

A continuación se muestra (figura 29) la cobertura de la secuencia de p8 encontrada a partir de la identificación de péptidos trípticos o quimotrípticos.

M**ATFPPATSA PQQPPGPEDE DSSLDESDLY SLAHSY**LGGG **GRKGRTKREA AANTNRPSPG GHERKLVTKL QN**SERKKRGA RR

Figura 29: Secuencia amino acidica de p8 identificada por MSMS: 72% cobertura de secuencia

A continuación se incluyen los espectros de fragmentación de los péptidos que permitieron esta identificación, para demostrar su calidad. Podemos observar que la serie de iones y esta casi completa en todos, y que la serie de iones b esta bien representada.

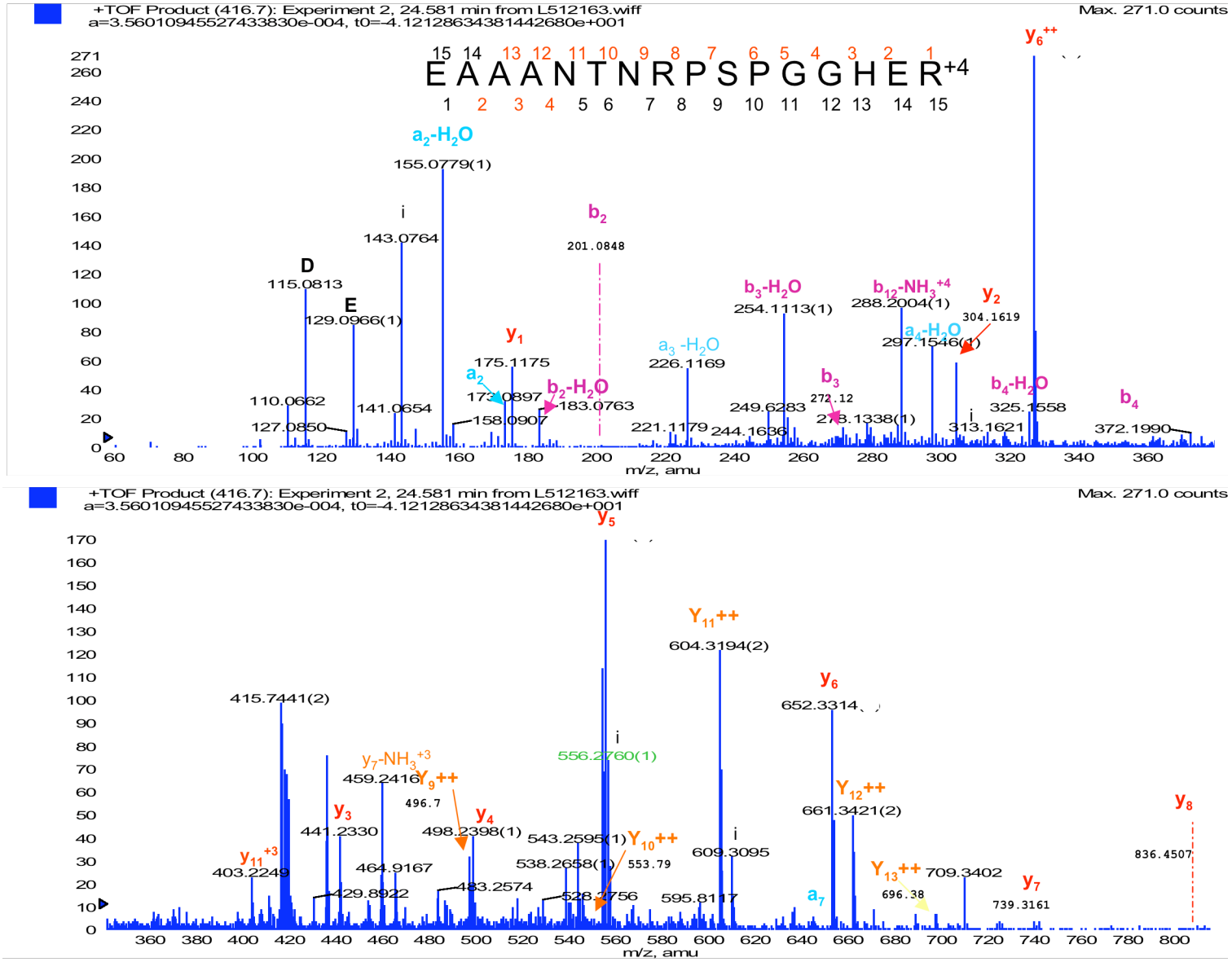


Figura 30: Espectro de MSMS del péptido EAAANTNRPSPGGHER correspondiente a la secuencia de p8 digerida con tripsina. En la secuencia se muestra con números rojos, los iones y, b y a que fueron identificados en el espectro.

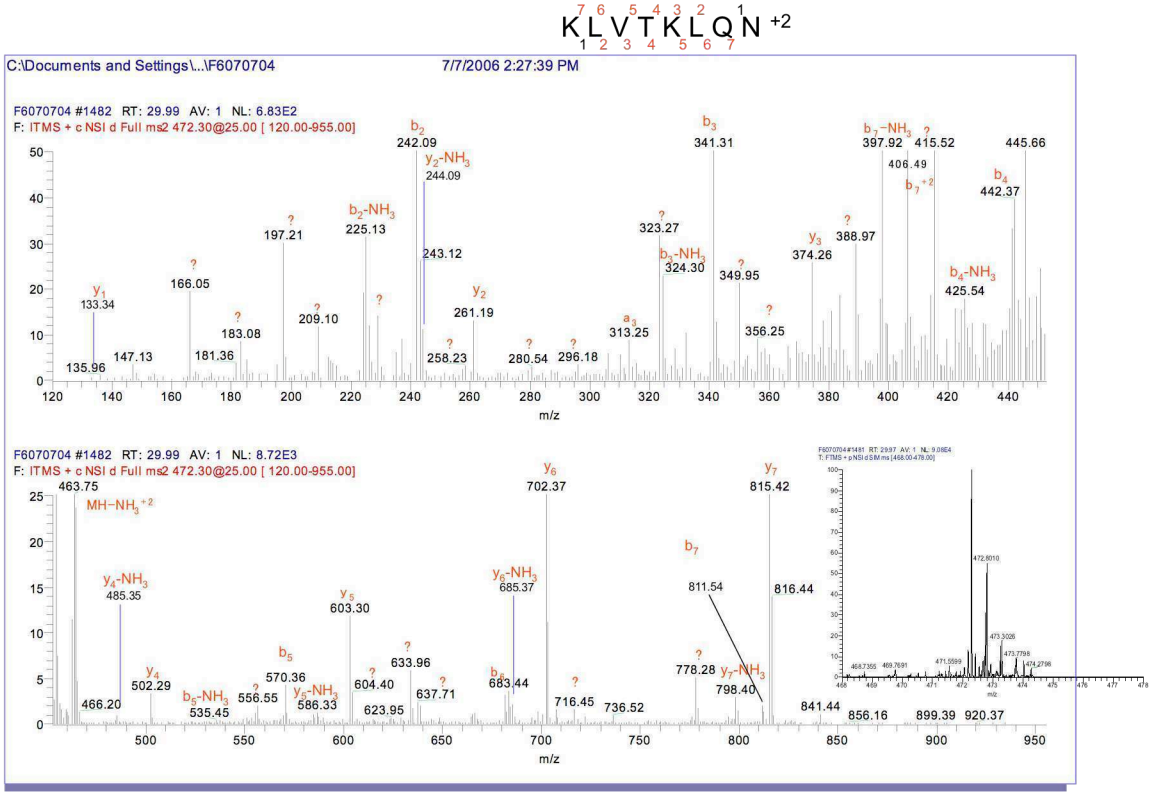


Figura 31: Espectro de MSMS del péptido KLVTKLQN correspondiente a la secuencia de p8 digerida con quimotripsina. En el recuadro se observa el espectro de MS que se utilizó para la selección del ion parental.

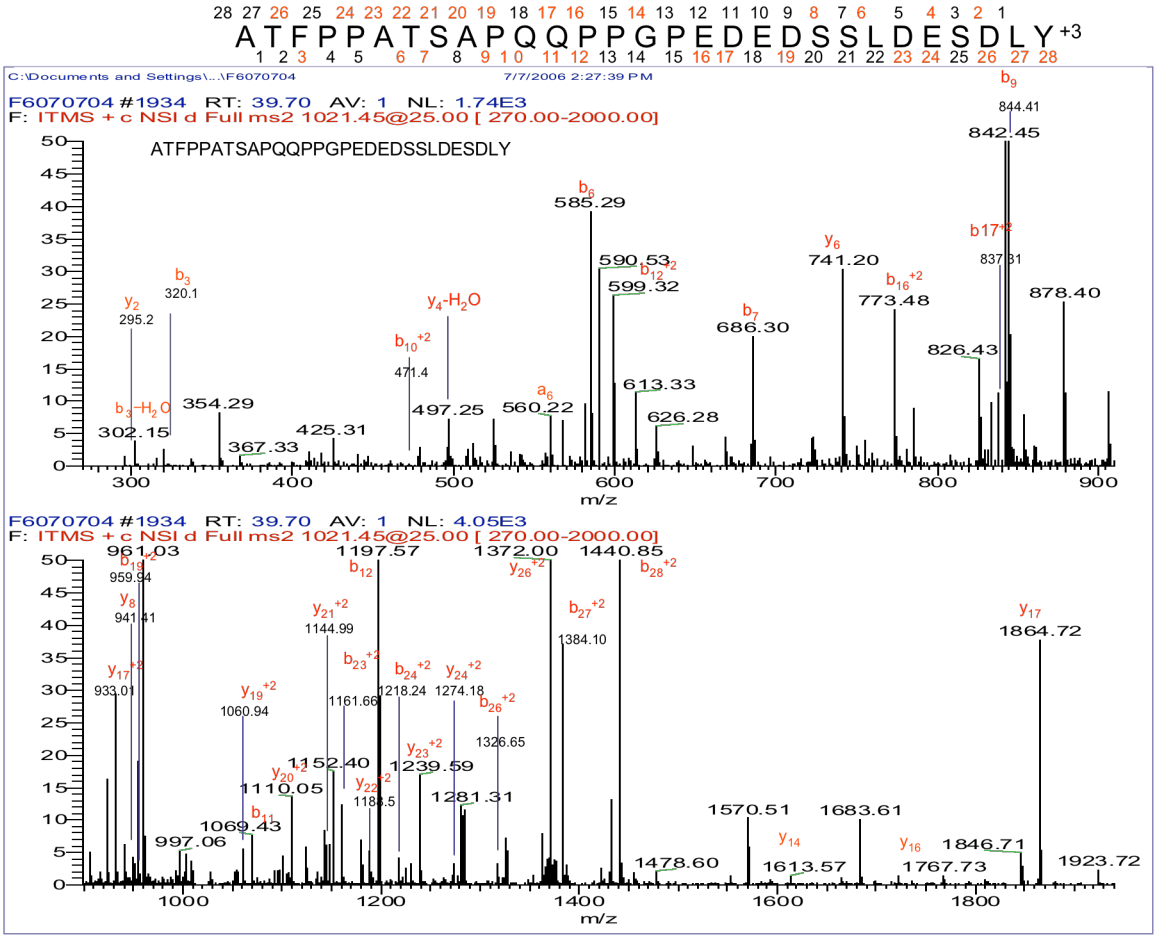


Figura 32: Espectro de MSMS del péptido ATFPPATSAPQQPPGPEDEDS SLDESDLY correspondiente a la secuencia de p8 digerida con quimotripsina.

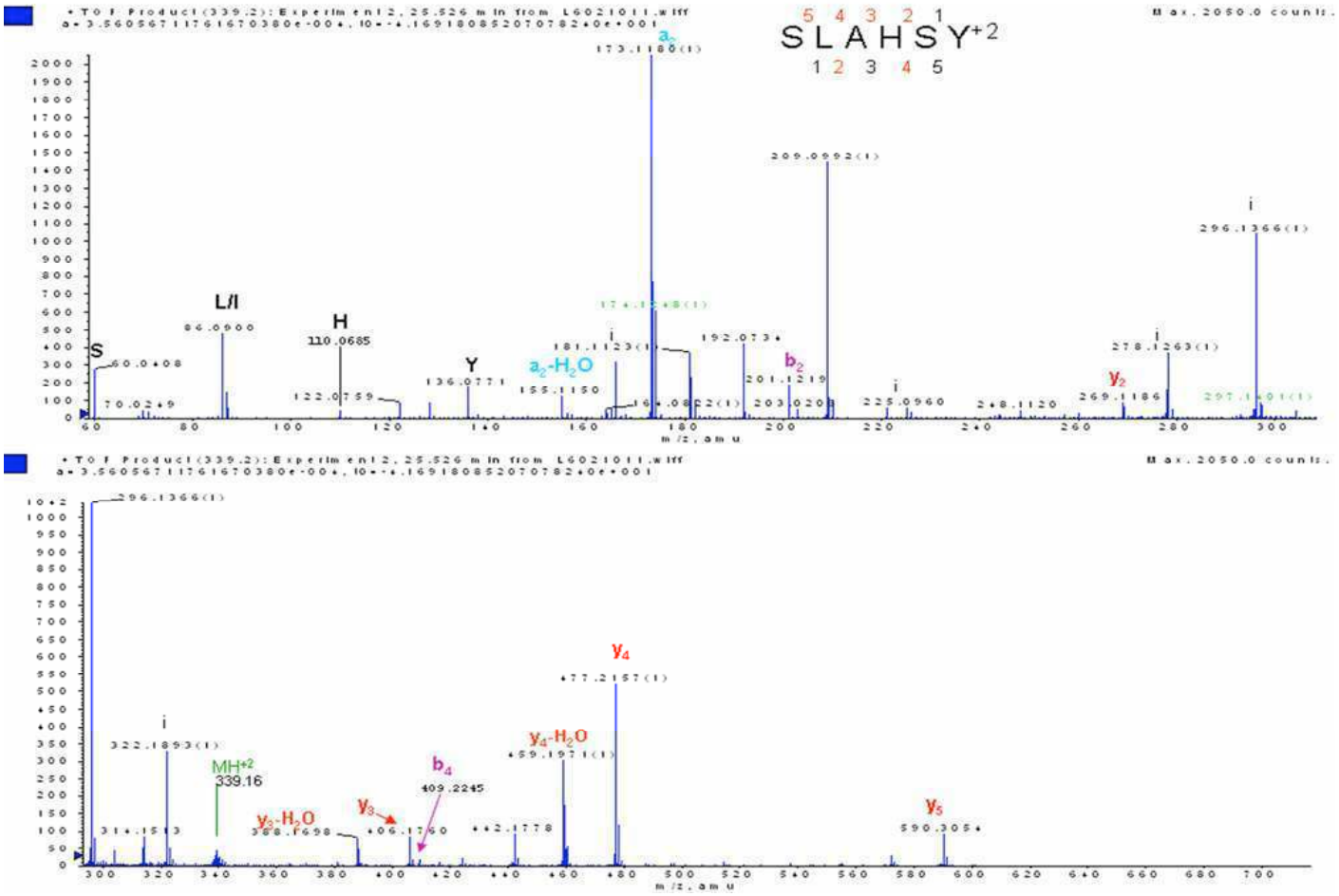


Figura 33: Espectro de MSMS del péptido SLAHSY correspondiente a la secuencia de p8 digerida con quimotripsina.

Proteínas que interactúan con p8 de forma directa o indirecta

Para generar la lista de proteínas interactoras de p8 se utilizaron los resultados de los distintos experimentos, ya fueran digestiones en gel o en solución, con tripsina o quimotripsina, provenientes de purificaciones con diferentes protocolos. Se tomaron en cuenta las listas de proteínas obtenidas en los eluídos de los experimentos en los cuales se verificó por WB que p8 se purificó en las fracciones esperadas.

Se obtuvieron largas listas, pero la clave en esta instancia fue depurar la lista de supuestos partners de p8 obtenidos en la purificación de las células que expresan p8, restándole la lista de proteínas inespecíficas obtenidas a partir de las células que fueron transfectadas con el vector vacío.

Primero se comparó y depuró individualmente cada lista proveniente de la purificación de células que expresaba p8 con la lista obtenida en su experimento control, y luego la lista de interactores de cada experimento se depuró en base a una lista de proteínas inespecíficas totales generada a partir de la unión de todas las listas de los controles negativos,

Las proteínas diferenciales, que sólo aparecieron en los eluídos provenientes de las células que expresan p8 fueron consideradas en primera instancia como candidatas interactoras de p8.

Luego esta lista fue nuevamente depurada según varios criterios:

- Que las proteínas estén identificadas por más de un péptido o que hayan aparecido en más de un experimento.
- Que los péptidos que la identifican sean confiables: expectation value menor a 0.05, buena calidad de espectros, serie y casi completa, serie b presente, pocos picos de alta intensidad sin asignar.
- Que las masas teóricas de las proteínas tengan coherencia con la altura de la banda del gel de la cual proviene esa muestra; a partir de la cual se obtiene un peso molecular aproximado.
- Que los péptidos que identifican la proteína sean únicos/exclusivos para esa proteína en las bases de datos.

Las proteínas candidatas a ser interactoras de p8 se muestran en la Tabla 2.

# Acceso	#max pept	% Cobertura	best e-value	Peso molecular	Nombre	# experim
P35637	4	8.5	2.50E-07	53426.2	FUS, TLS, 75 kDa DNA-pairing protein, CHOP, FUS1, FUS-CHOP, hnRNP-P2, Oncogene FUS, Oncogene TLS, POMp75, RNA-binding protein FUS, TLS/CHOP, Translocated in liposarcoma protein	2
Q7KZF4	1	1.2	1.60E-04	101997.8	p100 co-activator, 100 kDa coactivator, EBNA2 coactivator p100, p100, staphylococcal nuclease domain containing 1, Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1, TDRD11, Tudor domain-containing protein 11	2
P25490	1	1.9	0.0019	44712.9	YY-1, DELTA, Delta transcription factor, INO80S, NF-E1, Transcriptional repressor protein YY1, UCRBP, Yin and yang 1, YIN-YANG-1	2
Q676U5	1	2.1	0.013	68265.6	Apg16, Autophagy-related protein 16-1	2
O14862	1	4.4	0.14	38953.9	AIM2, Absent in melanoma 2, Interferon-inducible protein AIM2, PYHIN4	2
Q9H3K6	2	20.9	9.40E-05	10116.6	BolA-like protein 1, CGI-143, MGC75015, RP11-196G18.18	1
P63279	2	7.6	2.40E-04	18007	UBC9, C358B7.1, p18, P18, SUMO-1-conjugating enzyme, SUMO-1-protein ligase, SUMO-conjugating enzyme UBC9, SUMO-protein ligase, UBCE9, Ubiquitin carrier protein 9, Ubiquitin carrier protein I, Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I, Ubiquitin-protein ligase I	2
P30042	6	31	1.30E-08	28142.6	KNP1, ES-1, D21S2048E, ES1 protein homolog, mitochondrial precursor, GT335, HES1, KNPH, KNPI, KNP-I, KNP-Ia, Protein GT335, Protein KNP-I	1
P47929	4	33.3	6.10E-06	14944	Galectin-7, GAL7, Gal-7, HKL-14, LGALS7A, p53-induced protein 1, PI7, PIG1, TP53I1	1
P49458	2	25.9	3.10E-05	9980.6	SRP9, ALURBP, MGC110981, Signal recognition particle 9 kDa protein	1
Q15019	3	10.5	4.90E-05	41487.8	Septin-2, DIFF6, hNedd5, KIAA0158, NEDD5, Pnutl3, Protein NEDD5	1
Q3MHD2	2	9.9	4.20E-04	14328.4	LSM12 homolog (S. cerevisiae), FLJ30656, MGC104211, PNAS-135	1
Q5J8M4	2	8	8.80E-04	39478.9	RAE1, Migration-inducing gene 14, RAE1 RNA export 1 homolog (S. pombe), dJ481F12.3, dJ800J21.1, FLJ30608, MGC117333, MGC126076, MGC126077, MIG14, Mnrp41, mRNA-associated protein mrnp 41, mRNA export factor, MRNP41, Rae1 protein homolog	1
Q6IB30	2	8.2	0.0015	31895.1	FHL1 protein, bA535K18.1, FHL1B, FLH1A, Four and a half LIM domains protein 1, KYO-T, MGC111107, Skeletal muscle LIM-protein 1, SLIM, SLIM1, SLIM 1, XMPMA	1
O75934	2	11.6	0.0031	26131.7	BCAS2, Breast carcinoma amplified sequence 2, DAM1, DNA amplified in mammary carcinoma 1 protein, Spliceosome-associated protein SPF 27	1

Tabla 2: Potenciales proteínas interactoras de p8 identificadas por espectrometría de masas.

En la tabla podemos observar el número de acceso según UniProt, un repositorio central de datos sobre proteínas creado por la combinación de Swiss-Prot, TrEMBL y PIR; también vemos el número de péptidos identificados que corresponden exclusivamente a esa proteína, la cobertura que se obtuvo de la secuencia total de la proteína, el "expectation value" que nos da una idea de la probabilidad de obtener ese péptido por azar, y el

número de experimentos independientes en los que encontramos esa proteína. Se mencionan todos los sinónimos de las proteínas encontradas, no solamente los de la base de datos Uniprot que fue la que utilizamos. El primer nombre es el que utilizaremos al confeccionar el interactoma de p8.

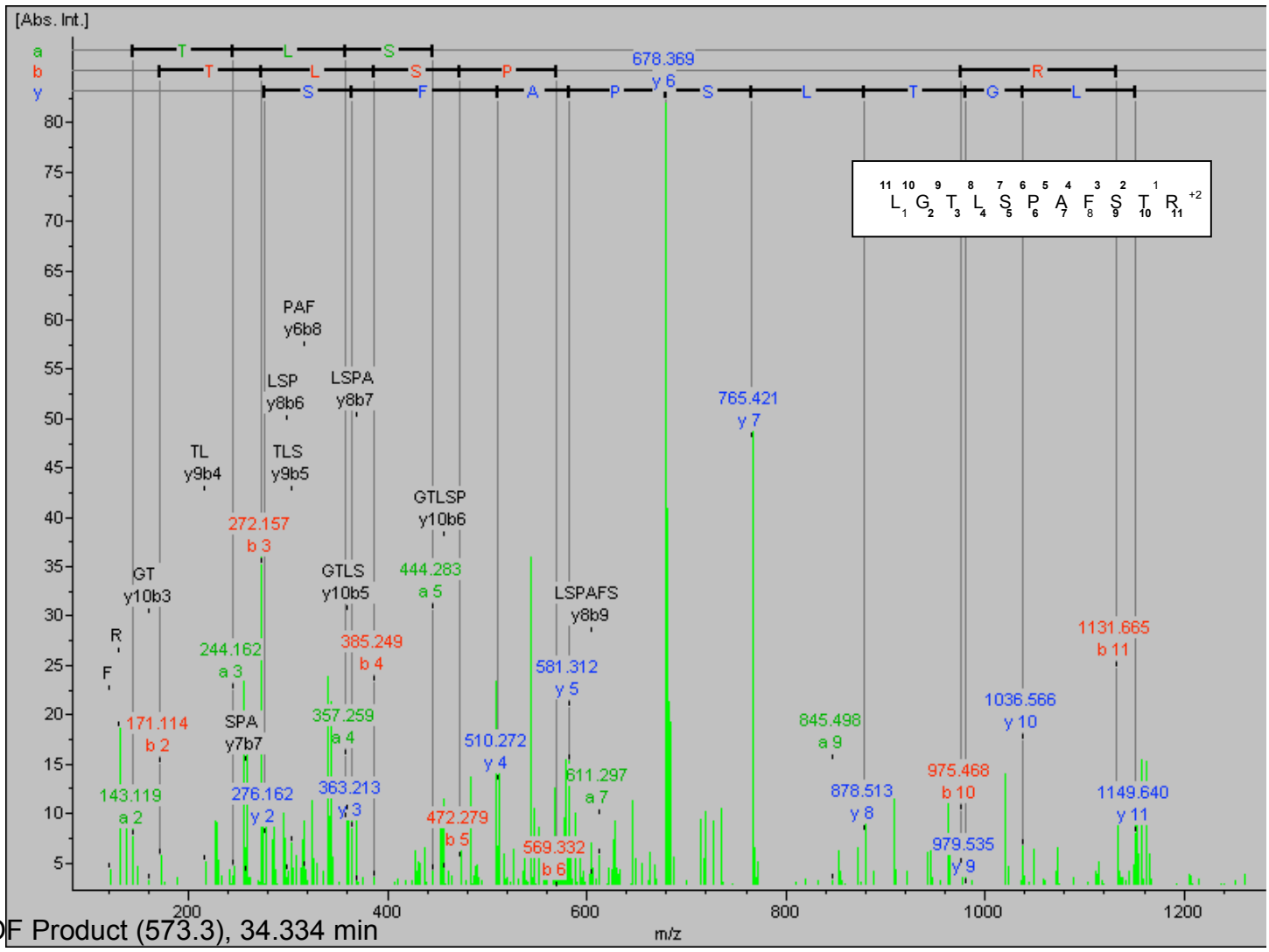
Es importante destacar que la mayoría de estas proteínas provienen de experimentos en los cuales se cortaron secuencialmente los geles para ser digeridos con tripsina. Además el 65% de los resultados provienen de purificaciones realizadas con la resina de Níquel en primer lugar, usando los buffers mencionados en el esqueme de la purificacion (figura 20), y la de Flag en segundo lugar, haciendo eluciones con el péptido Flag. El resto de los resultados corresponden al protocolo final esquematizado en la figura 20.

Incluimos a AIM2 que presenta una identificación a partir de un péptido cuyo e-value es mayor al limite (0.05) ya que al analizar el espectro manualmente pudimos observar que el programa Protein Prospector había salteado algunas asignaciones de picos y esto resultó en una subestimación del valor otorgado al péptido por el software.

También hay que mencionar que en el caso de FUS, la cobertura obtenida, de 8.5%, corresponde a la mayoría de los péptidos que se pueden obtener, ya que por su secuencia, la digestión in silico indica que los péptidos teóricos son o muy grandes o muy chicos para ser detectados por el espectrómetro.

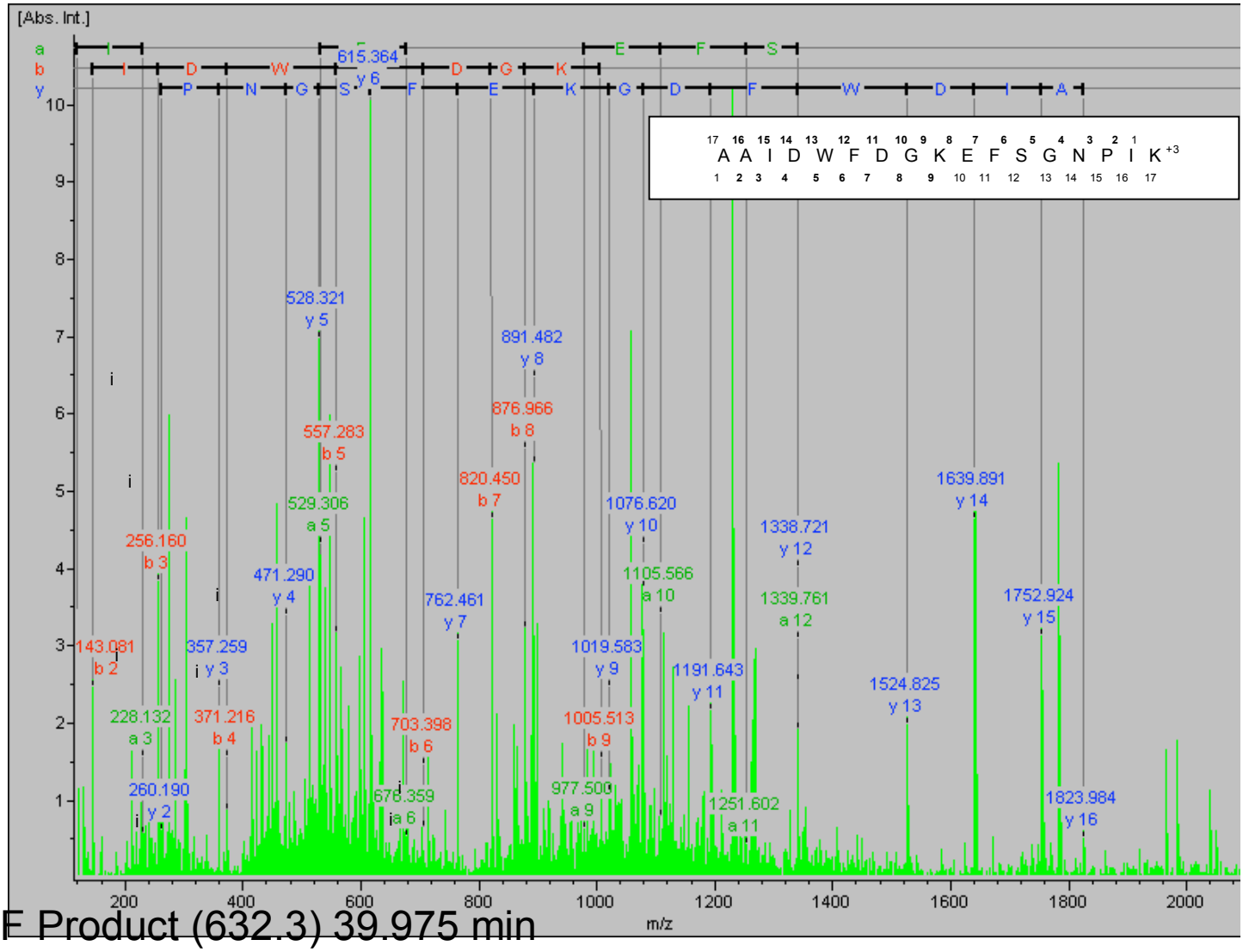
También incluimos YY1 cuando en realidad, debido al péptido identificado, no se puede distinguir si este corresponde a la proteína YY1 o a YY2 o a Znfinger protein42. Por el peso molecular, estimado de la altura de la banda de la cual proviene en la corrida en el gel (aproximadamente 45 kDa), podemos inferir que correspondería a YY1 (PM= 44kDa), pero no podemos descartar las otras dos opciones (YY2= 41, Znfp-42= 34).

A continuación se muestran algunos espectros a modo de ejemplo del estilo de los espectros obtenidos.



TOF Product (573.3), 34.334 min

Figura 34: Espectro de MSMS del péptido LGTLSPAFSTR correspondiente a la secuencia de la proteína p100 coactivator.



TOF Product (632.3) 39.975 min

Figura 35: Espectro de MSMS del péptido AAIDWFDGKEFSGNPIK correspondiente a la secuencia de la proteína FUS.

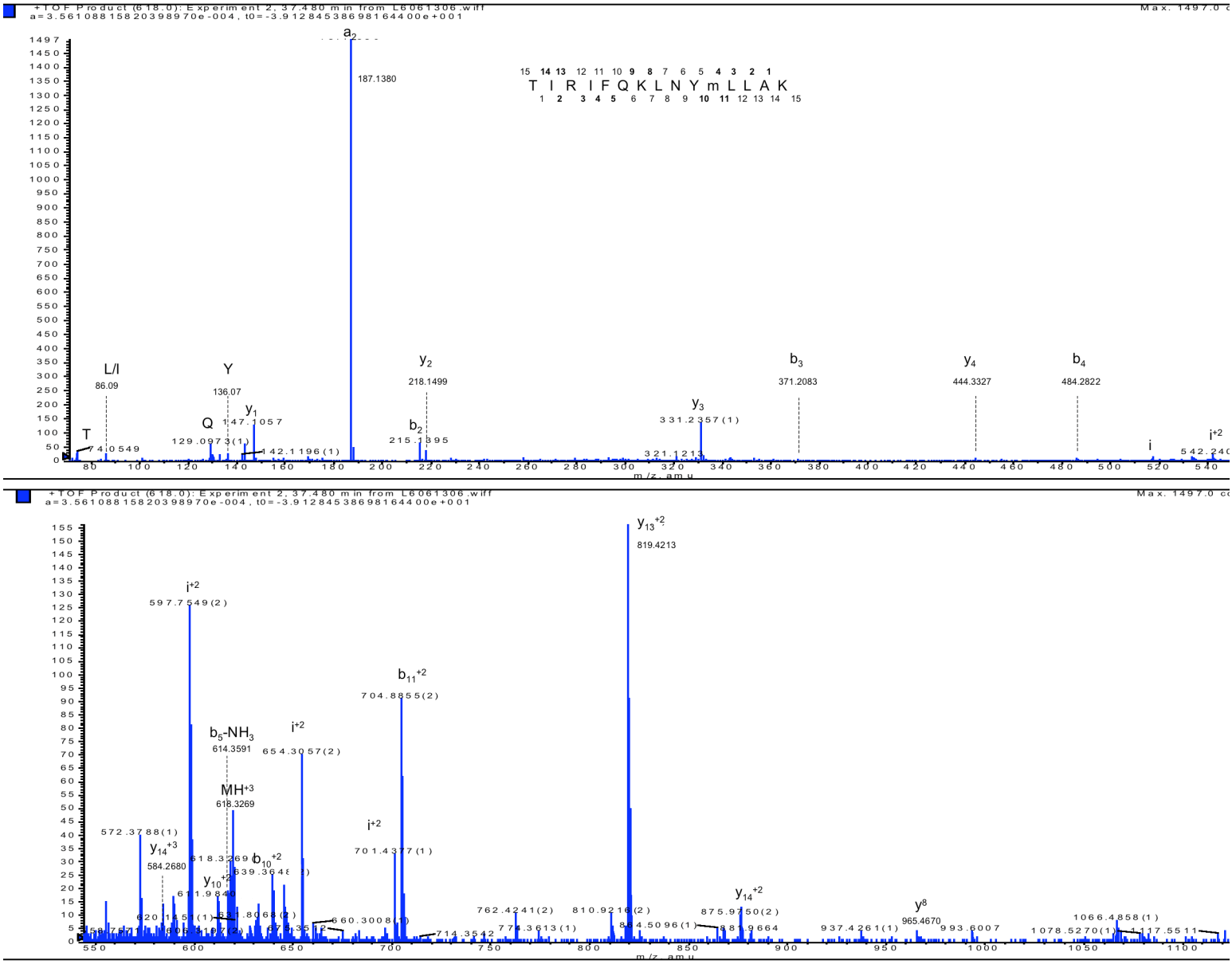


Figura 36: Espectro de MSMS del péptido TIRIFQKLNYmLLAK correspondiente a la proteína AIM2.

Construcción del interactoma de p8

A través del estudio proteómico realizado en este trabajo hemos identificado 12 proteínas interactoras de p8.

Estos resultados, junto con otros experimentos tales como ensayos de precipitación y ensayos de doble híbrido, combinados con datos bibliográficos, nos han permitido elaborar por primera vez el interactoma de p8, que ofrece información importante sobre las vías en las que p8 estaría involucrada y aporta nuevas claves sobre su función en la célula.

El grupo de Iovanna, con el cual colaboramos, ha estado realizando, durante los últimos años, ensayos de doble híbrido que complementan nuestros resultados. Se han utilizado dos enfoques diferentes, el clásico « Matchmaker Gal4 two hybrid » (Clontech) y uno más novedoso que es el Cyto-Trap (Stratagene). En el clásico, la proteína de interés se expresa como proteína de fusión junto con el dominio de unión al DNA (DNA-BD) y las proteínas de la biblioteca a ser analizada se fusionan al dominio de activación de Gal4 (AD). De esta forma, si la proteína de interés interactúa con la proteína de la biblioteca que está siendo analizada, el BD y el AD se encontrarán lo suficientemente cerca como para activar la transcripción de los genes reporteros.

El primer enfoque realizado con bibliotecas de hígado y testículo humano generó una lista de proteínas (Tabla 3) entre las cuales se remarcan Ubc9, (por haber vuelto a aparecer como interactor en el estudio proteómico) y COP9, también conocida como JAB1/CSN5 (Jun activating binding protein) porque ya ha sido verificada como proteína interactora de p8.

gi|14764956	Homo sapiens wee1+	6
gi|14749310	COP9 (constitutive photomorphogenic, Arabidopsis, homolog)	4
gi|13631462	testis-specific ankyrin motif containing protein	3
gi|15718528	chromosome 5 clone CTD-2087C24	3
gi|15990563	Similar to actin, gamma 1,	2
gi|5679448	Human DNA sequence from clone 1055C14 on chromosome Xq22.1-22.3	2
gi|15451643	chromosome 19 clone CTD-2525J15	2
gi|15638936	chromosome 2 clone RP11-780I14	2
gi|14776580	ubiquitin-conjugating enzyme E2I (homologous to yeast UBC9) (UBE2I)	1
gi|14732490	nuclear receptor binding protein	1
gi|14759179	TATA box binding protein (TBP)-associated factor,	1
gi|14732547	glucokinase (hexokinase 4) regulatory protein (GCKR),	1
gi|14785885	hypothetical protein FLJ22329	1
gi|338446	ribosomal protein S16	1
gi|16303404	chromosome 5 clone CTD-2310F14	1
gi|16306514	chromosome 2 clone RP11-401O19,	1
gi|4758027	collagen, type VI, alpha 3	1
gi|7019608	chromosome 5 clone CTC-365H24	1
gi|4827328	PAC clone RP4-673M15 from 7p13-p11.2,	1
gi|15638780	chromosome 4 clone RP11-196J14	1
gi|13959823	Human mitochondrion, complete genome	2
gi|14627281	Homo sapiens, Similar to NADH dehydrogenase 1	1
gi|248647	transferrin	1
gi|15990563	Similar to actin, gamma 1	1
gi|15304412	Homo sapiens nucleobindin 1 (NUCB1)	1
gi|15383858	chromosome 4 clone RP11-196J14	1

Tabla 3: Proteínas que interactúan con p8 obtenidas con el sistema Matchmaker 2-hybrid system, utilizando una biblioteca de testículo humano (en la lista desde Homo sapiens wee1 hasta Chromosome 4 clone RP11-196J14) y una biblioteca de hígado humano (desde Chromosome 4 clone RP11-196J14 hasta el final). Se recuadra en negro, las proteínas que fueron verificadas como interactores de p8, y en gris las proteínas que volvieron a surgir como interactores en el abordaje proteómico.

El grupo de Iovanna continuó investigando la función de Jab1/COP9 como interactora de p8; y como ya mencionamos en la introducción, se verificó la interacción y se demostró que la traslocación al núcleo de p27 es

dependiente de Jab1 y que esta traslocación depende de la interacción ente Jab y p8 [83]. También demostró que Jab1 puede unirse a p53 y exportarla hacia el citoplasma; se sugirió que esto podría ayudar a mantener bajos niveles de p53 en condiciones normales [84].

Dado que p8 podría estar involucrada en la regulación de la transcripción, el grupo de Iovanna [37] también ha estado utilizando el CytoTrap 2-Hybrid method (Stratagene). Este método no está basado en la regulación de la transcripción de genes como el "Matchmaker". En este método se utiliza una cepa mutada de *S cerevisiae* (cdc25H) con una alteración en el gen CDC25 (homologo al gen hSos en humanos). Esta mutación provoca una inactivación de la vía Ras que impide el crecimiento a una temperatura restrictiva de 37°C y por lo tanto la cepa sólo es capaz de crecer a la temperatura permisiva de 25°C. Este método se basa en la habilidad que ofrece la proteína Sos de compensar esta incapacidad. Sos estará fusionada a la proteína de interés. Sos necesita estar localizada en la membrana para permitir el crecimiento en la temperatura restrictiva. La biblioteca se subclona en el vector pMyr que genera proteínas con un dominio de miristoilacion que las ancla a la membrana plasmática. De esta forma, la vía Ras estará activada, permitiendo el crecimiento a 37°C, si Sos se encuentra localizada en membrana, y esto ocurrirá solamente si la proteína de interés está interactuando físicamente con la proteína de la biblioteca.

Este método elimina la posibilidad que p8 active los genes reporteros directamente en la ausencia de proteínas interactoras, y de esta forma elimina los falsos positivos y permite la detección de interacciones que ocurren en el citoplasma.

Este segundo abordaje generó una lista (Tabla 4) en la que se encuentran remarcadas proteínas como la protimosina α [85], Ran y una proteína denominada LOC339287 o Msl1, que fueron verificadas como interactores, y la proteína Fusion (FUS), que surgió entre los posibles partners de p8 durante el abordaje proteómico.

Accession no.	Nombre	N clones
BC051908	RAN	19
NM_002823	Prothymosin a	6
NM_012325	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	3
NM_005792	M-phase phosphoprotein 6	4
NM_005594	Nascent polypeptide-associated complex	7
NM_153822	Macropain	1
NM_014300	Signal peptidase complex 18 kDa	1
D38076	Ran-binding protein 1	2
BT020135	Syntaxin 18	1
BC032643	Synaptogamin binding protein	1
NM_004960	Fusion	1
XM_496217	Hypothetical protein LOC339287	2
XM_031561	Chromosome 15 open reading frame 23	1
NM_021104	Ribosomal protein L41	1
BC025352	Non-POU domain containing octamer-binding	1

Tabla 4: Proteínas interactoras identificadas con el sistema CytoTrap two hybrid. El cDNA de p8 fue subclonado en el vector pSos vector y utilizado como carnada contra una biblioteca de cDNA de testículos. Se recuadra en negro, las proteínas que fueron verificadas como interactores de p8, y en gris las proteínas que volvieron a surgir como interactores en el abordaje proteómico.

Es sabido que proteínas identificadas como interactoras de otras a través de un mecanismo, no necesariamente deben aparecer al utilizar otro método. Cada sistema tiene sus limitaciones y su sensibilidad y utiliza diferentes modelos experimentales y diferentes bibliotecas de genes que presentan distintos patrones de expresión. La combinación de los resultados obtenidos a través de diferentes métodos nos ofrece una visión más amplia y comprehensiva de las interacciones que están ocurriendo. El análisis proteómico realizado en esta tesis permite una descripción más fisiológica, ya que las interacciones observadas están ocurriendo en un contexto celular, sin el uso de bibliotecas ni sistemas heterólogos. La única desventaja de nuestro modelo, es el uso de una construcción para sobreexpresión, pero esto es necesario para poder obtener una proteína más estable que pueda ser purificada por técnicas de purificación en tandem. Para hacer que el sistema fuera lo más fisiológico posible, elegimos etiquetas pequeñas, que fueron

colocadas en el extremo N-terminal de la proteína y realizamos los controles pertinentes para verificar que la proteína recombinante se comportara como la endógena, particularmente con respecto a su localización subcelular.

Para poder construir el interactoma de p8, se realizaron búsquedas bibliográficas de los miembros de la lista generada. Es importante entender las funciones conocidas de los distintos participantes, y las redes de interacción que los unen para poder comprender como se compone el interactoma. A continuación se realiza una descripción de los interactores y de los vínculos que los unen.

Ubc9

Uno de los candidatos más prometedores en nuestra lista es Ubc9. Ubc9 apareció por primera vez como un interactor de p8 al realizar el ensayo de doble hibrido Matchmaker. Esta es la segunda vez que p8 y Ubc9 aparecen como interactores.

Ubc9 es la única enzima conjugadora (E2) en la cascada de sumoilación. Su localización es principalmente citoplasmática, y se ha visto que muchas proteínas que son modificadas por SUMO interactúan con Ubc9. Se ha demostrado que la interacción de una proteína con Ubc9 indicaría que la proteína en cuestión podría estar interactuando con Ubc9 como sustrato de sumoilación, y que la sumoilación regularía las funciones de esta proteína sustrato, como es el caso de la proteína HMG2 [86].

La expresión de genes es controlada a varios niveles: a nivel transcripcional (síntesis de RNA), a nivel traduccional (síntesis de proteínas) y a nivel post-traduccional. Es a través de este ultimo nivel que se puede regular la conformación de proteínas, su localización subcelular, las interacciones proteína proteína, y la estabilidad proteica.

La sumoilación es el agregado covalente de un péptido de 101 amino ácidos a una proteína. Ocurre en ciertas lisinas de la proteína blanco a través de una unión isopeptídica. El péptido que se agrega es conocido como SUMO (Small Ubiquitin like Modifier) en mamíferos, donde encontramos 3 formas altamente homólogas, y recientemente se ha identificado una cuarta forma, SUMO 4 que se sabe esta involucrada en la regulacion de la diabetes tipo I. La sumoilación es comparable al proceso de ubiquitinación ya que

ocurre en diferentes etapas de conjugación. La cascada enzimática de sumoilación involucra una enzima de activación E1 (que está conformada por el heterodímero Uba/Aos1), una enzima conjugadora E2 (Ubc9) y tres familias de ligasas E3 (RanBP2, PIAS y Pc2) que no parecerían ser esenciales, al menos, para la sumoilación in vitro [87-89]. Como la ubiquitinación, este proceso es reversible y hay enzimas capaces de clivar el péptido SUMO de la proteína. Encontramos 7 de estas proteínas en humanos [89].

A diferencia de la ubiquitinación, la sumoilación no está relacionada con vías de degradación, sino que regula diferentes procesos, como el transporte subcelular, la estabilización de proteínas, transcripción, el mantenimiento de la integridad genómica, interacciones proteína-proteína y vías de transducción de señales [90].

La secuencia consenso de sumoilación es φKXD/E, donde φ es un amino ácido hidrofóbico, K es la lisina que será modificada, x corresponde a cualquier amino ácido y D/E a un amino ácido ácido, pero cada vez se identifican mas proteínas que se sumoilan, a pesar de no contener la secuencia consenso. Un análisis de la secuencia de p8 nos sugiere que p8 podría ser un sustrato de esta modificación. Los candidatos más probable son la lisina 47 con probabilidad de Sumoilación baja según SUMOsp 2.0 (http://bioinformatics.lcd-ustc.org/sumosp/prediction.php) y la lisina 77 con probabilidad de Sumoilación baja según SUMOplot (http://www.abgent.com/tools/sumoplot)

Durante nuestra búsqueda de modificaciones postraduccionales de p8 por espectrometría de masas, no detectamos moléculas de p8 sumoilada, lo cual no descarta que pudiera haber moléculas con esta modificación. A diferencia de la ubiquitina, cuyo extremo carboxilo terminal es RGG, el tripéptido carboxilo terminal de SUMO es TGG. La presencia del residuo arginina en el extremo de la ubiquitina (figura 37), permite una digestión tríptica que le confiere al péptido modificado una señal clara para ser identificada por espectrometría de masas, que es el aumento de 114.1 por el agregado de este dipéptido de glicinas proveniente de la ubiquitina digerida con tripsina. La ausencia de residuos lisina o arginina en el extremo carboxilo de SUMO hacen que la detección de sitios sumoilados con digestiones

trípticas sea más complicada porque no se genera un péptido señal de fácil identificación (figura 37).

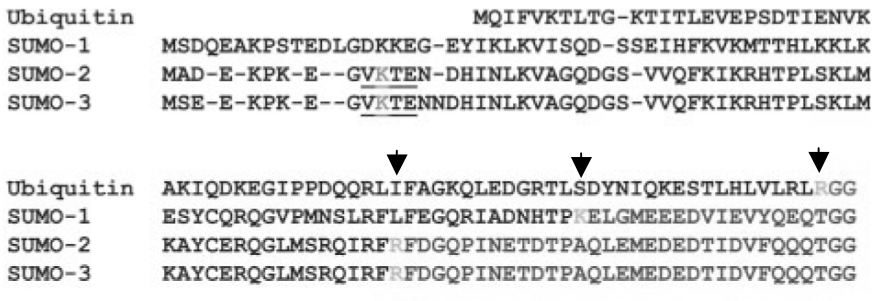


Figura 37: Sitios de digestión para tripsina en ubiquitina y SUMO.

Estudios preliminares de colocalización y sumoilación de proteínas recombinantes en células HeLa, realizados en los laboratorios de Iovanna en Marsella y de Hoffmeister en Leipzig indican que p8 estaría sumoilada (datos no publicados). Se sabe que la sumoilación tiene un rol muy activo en la localización subcelular de proteínas [11, 91-93] con lo cual este mecanismo podría ser el encargado de los patrones de localización de p8 y por ende ser un regulador clave de la función de p8. También podría estar relacionado a la estabilidad de p8, ya que se ha demostrado que p8 contiene una secuencia PEST en su extremo N-terminal 1-27 (MATFPPATSAPQ QPPGPEDEDSSLDES) que es un consenso conocido para ubiquitinación y una característica típica de proteínas con vida media corta [11]. Hay evidencias que demuestran que la vida media de p8 es corta [13] y que esto es debido, al menos parcialmente, a que p8 es degradada por el sistema del proteasoma [11]. Ha sido reportado que el balance entre ubiquitinación y sumoilación puede controlar la actividad y estabilidad de algunas proteínas [94] y especulamos que este podría ser el caso para p8. En la figura 38 se esquematiza lo que seria la cascada de sumoilación de p8.

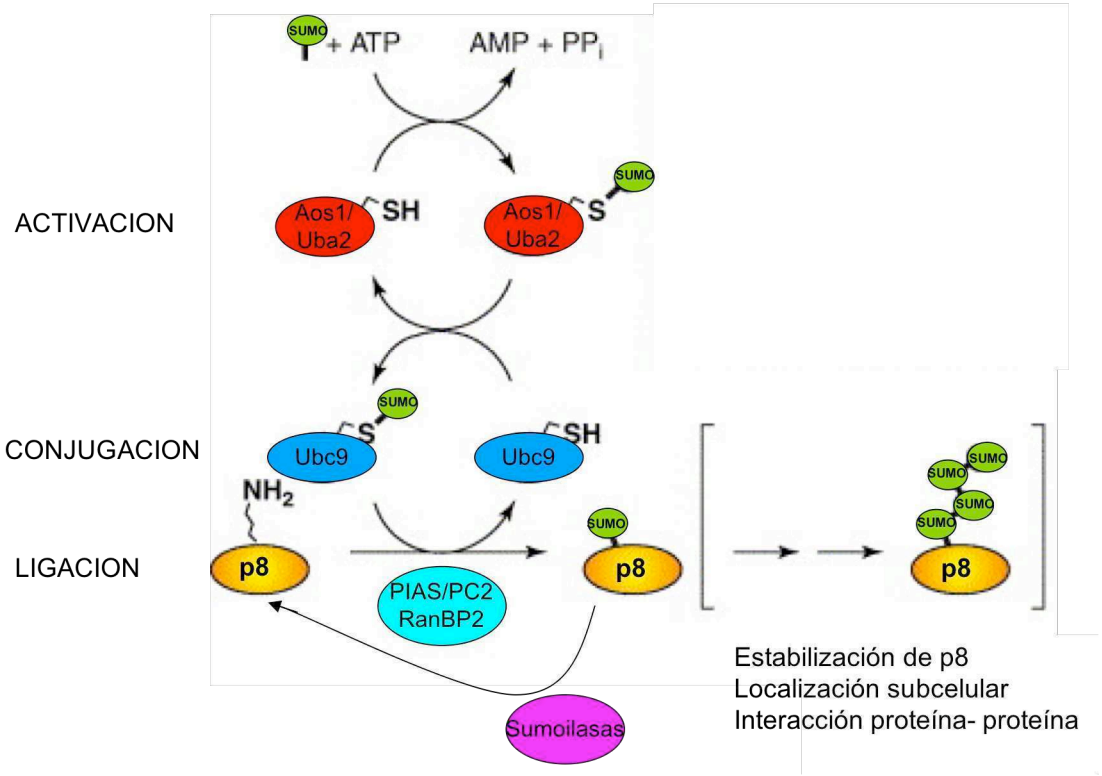


Figura 38: Esquema de la posible sumoilación de p8 y sus consecuencias

Relación entre p8 y p53

Hay varias proteínas que aparecen como interactores en este "screening" que sugieren una conexión entre p8 y p53.

Una relación entre p8 y p53 ya ha sido reportada por el grupo de Iovanna. Se ha demostrado que p8 aumenta los niveles intracelulares de p53 y su capacidad de transactivación, y que p53 podría ser un transactivador negativo de p8 [10]. También se propuso una interacción entre p8 y p53 a través del interactor de ambos, Jab1, (se sabia que Jab interactúa con p53 [84], y el grupo de Iovanna verificó que Jab interactúa con p8).

Recientemente se propuso una interaccion directa entre p8 y p53 en lineas celulares de cancer de mama, donde p8 estaría promoviendo la supervivencia celular y la resistencia a drogas antitumorales [20].

Otro punto de contacto entre p8 y p53 podría ser Msl1. El ensayo de doble hibrido "CytoTrap" junto con experimentos adicionales, demostraron que Msl1 es un interactor confirmado de p8 (Iovanna, resultados no publicados). Msl1 forma parte de un complejo multimérico que acetila

histonas hMSL [95]. En *Drosophila*, se ha demostrado que este complejo esta involucrado con la compensación de dosis, que se realiza aumentando la transcripción de genes ligados al cromosoma X en machos, donde apunta a genes blanco específicos [96] y aumenta los niveles de expresión acetilando dominios de transcripción completos. [97]. En humanos, el complejo no se asocia a cromosomas específicos y parecería tener una distribución genómica más dispersa y ubicua.

Se ha demostrado que Msl1 interactúa directamente con 53bp1 (un interactor directo de p53) y se ha propuesto que Msl1 estaría ligada a la reparación del DNA dependiente de 53bp1, en respuesta a radiación gamma.

AIM2

Una de las proteínas que sugiere otra conexión entre p8 y p53 es AIM2.

La proteína AIM2 (Absent in Melanoma 2), de 39 kDa [98] fue identificada inicialmente debido a la ausencia de su expresión en una línea celular de melanoma humano. Pertenece a una familia de proteínas humanas y murinas homólogas cuya expresión es inducible por interferón, que han sido relacionadas con la regulación del ciclo celular y la diferenciación celular. Cada una está compuesta por al menos un motivo común de 200 amino ácidos de función desconocida y se las denominó como la familia HIN-200 (hemopoietic IFN-inducible Nuclear/200-amino acid repeat).

Se ha demostrado [99, 100] que la expresión de AIM2 suprime la proliferación y tumorigenicidad de células de cáncer de mama humano, y que la terapia génica con AIM2 inhibe el crecimiento tumoral mamario. La expresión de AIM2 produce un aumento significativo en la población sub-G1, indicando que AIM2 podría estar induciendo apoptosis en las células tumorales, sugiriendo un rol supresor de tumores.

Con respecto a la localización subcelular de AIM2 se han reportado resultados contradictorios. Por un lado se informó que todas las proteínas de la familia HIN-200 están localizadas exclusivamente en el núcleo [98] con excepción de las dos proteínas del grupo que no contienen una señal de localización nuclear: p202 (también conocida como 53bp1) y AIM2, que cuando su expresión es basal, presentan una localización citoplasmática y

recién al inducirse su expresion por tratamiento con interferón se localizan en el núcleo [101- 103]. Por otro lado se demostró que AIM2 presenta una localización exclusivamente nuclear cuando se expresa constitutivamente en las líneas humanas de melanoma [104].

Es común que los miembros de esta familia formen dímeros; AIM2 puede heterodimerizar con 53bp1 *in vitro* [105]. 53bp1 es uno de los miembros de esta familia que ha sido más estudiado, se sabe que suprime el crecimiento tumoral y metástasico de células cancerosas mamarias, pancreáticas y de próstata. 53bp1 interactúa con el dominio de unión al DNA de p53 y se la ha relacionado con vías de reparación del DNA [106-108].

También se demostró que AIM2 puede homodimerizar a través de su extremo amino terminal y que puede heterodimerizar con IFI 16 (otro miembro de la familia HIN-200) que a su vez se une a la zona C-terminal de p53 y activa la transcripción mediada por p53 sin alterar los niveles de p53 [104]

De estos resultados se deduce una posible relación entre p8 y la activación de genes mediada por p53, y la estimulación por interferón. Especulamos que p8 podría ser responsable de la entrada de AIM2 y 53bp1 al núcleo ya que no se ha reportado una NLS para estas proteínas.

FUS

Otro candidato interesante que nos vuelve a acercar a p53 es FUS. FUS apareció por primera vez como candidato interactor de p8 en el doble hibrido CytoTrap, y ahora lo encontramos nuevamente utilizando el abordaje proteómico. FUS (también llamado “Translocated in Liposarcoma”) es un prooncogen, que fue identificado por estar fusionado al factor de transcripción CHOP, como consecuencia de una traslocación cromosómica en liposarcomas [109].

FUS pertenece a la familia TET, una familia de proteínas relacionadas estructural y funcionalmente, que se unen al RNA y que se definen por la presencia de un región N-terminal rica en SYGQ, un motivo de reconocimiento de RNA, un motivo de dedos de zinc C2/C2 y al menos una zona de repeticiones RGG-repeat [110]. Se ha demostrado que son de las pocas proteínas que además de unirse al RNA, se unen al DNA simple o

doble cadena [111- 115] . Se sabe que pueden ser potentes activadores de la transcripción en mamíferos, y es por eso que se cree que su fusión a dominios de unión al DNA de factores de transcripción es la principal causa de los canceres asociados, generalmente sarcomas.

Se ha demostrado que se asocian con componentes integrales del complejo de pre-iniciación de la transcripción, interactuando específicamente con la enzima RNA polimerasa II y el complejo TFIID, un componente de la maquinaria general de la transcripción que se une al DNA, y por esto han sido implicados en estadíos tempranos de la iniciación de la transcripción y elongación [111, 116, 117] y pueden tener un rol importante en el reclutamiento tanto de factores generales como de factores específicos, necesarios para la iniciación de la transcripción.

También se ha reportado que estas proteínas participan en el splicing [118] y en el transporte del RNA [119, 120].

FUS interactúa con varios receptores nucleares [121]. Tambien se une al factor de transcripción Y-box binding protein-1 (YB-1) a través de su dominio C-terminal. [122]. YB-1 (Y-box binding) es una proteína multi funcional que esta involucrada en la regulación transcripcional y procesamiento del mRNA. Se sabe que migra entre el núcleo y el citoplasma [123]. En el citoplasma se une al mRNA y regula su estabilidad y la eficiencia de traslocación de los mensajeros. En el núcleo YB-1 se une a secuencias promotoras específicas y regula la transcripción de diversos genes blanco, que incluyen al gen multidrug resistance-1, que participa en la resistencia a la quimioterapia en cáncer de mama humano y osteosarcoma [124- 125]. Dado que FUS e YB-1 se asocian tanto a la maquinaria transcripcional como a la de splicing, se especula que podrían actuar como un puente entre transcripción y splicing [126].

YB1 también interactúa con la proteína supresora de tumores p53 y se ha reportado una relación entre la respuesta al daño al DNA mediada por p53, y la localización nuclear de YB-1. De la secuencia de YB-1 se predice una NLS activa. La localización nuclear y altos niveles de YB1 son importantes indicadores de una mala prognosis de tumores asociada a resistencia a drogas.

Como se ilustra en la figura 39, estos datos, al igual que la interacción de p8 con AIM2, nos llevan nuevamente a p53 y sugieren que p8 podría estar formando parte de complejos dinámicos de proteínas junto con p53, 53bp1, YB-1, IFI-16, Msl1, AIM2 y FUS.

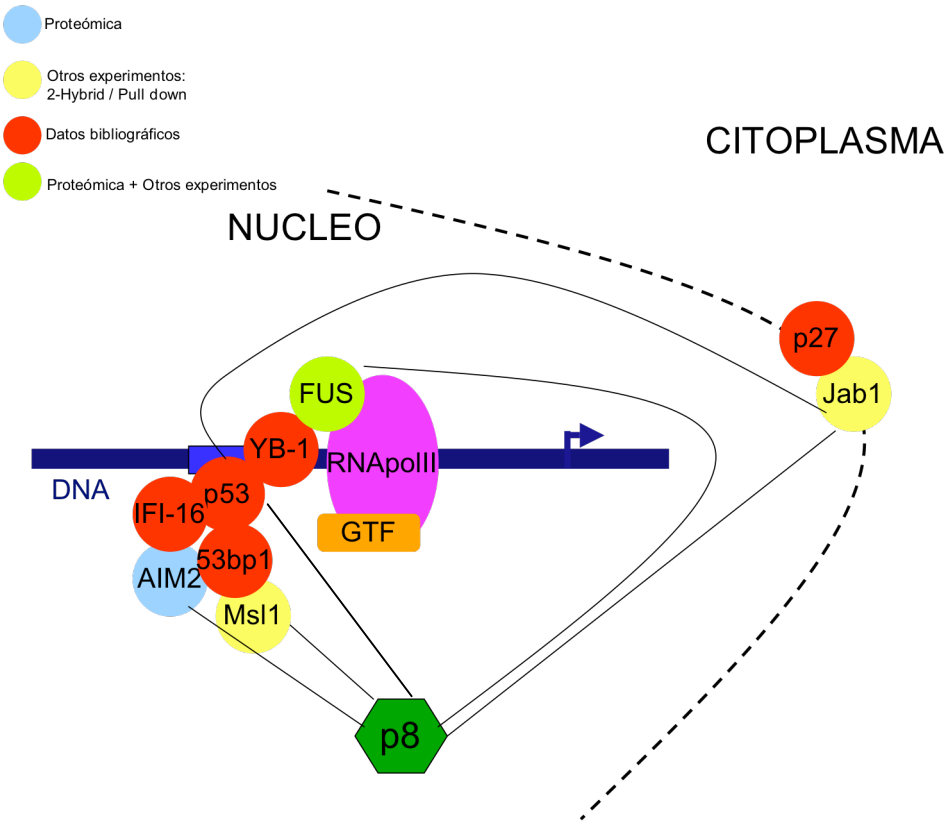


Figura 39: Red de interacción entre p8 y proteínas relacionados a p53.

Estos complejos podrían ser algunos de los encargados de regular la expresión génica y el procesamiento del mRNA relacionado al crecimiento celular y a la progresión tumoral. p8 también podría estar involucrada en la reparación del DNA en respuesta a la radiación UV. Se sabe que p53 está encargada del arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA, y dado que FUS, Msl1, YB-1 y 53bp1 han sido vinculadas a la reparación del DNA, el hecho de que p8 esté interactuando directa o indirectamente con ellas, sumado a resultados no publicados aun del grupo de Iovanna que indican que p8 podría estar mediando la actividad reparadora del DNA de 53bp1

asociada a Msl1, indican que p8 podría también estar involucrado en estas funciones.

Relación de p8 con correguladores de la transcripción

Se ha demostrado que p8 interactúa con y es acetilada por el coactivador de la transcripción p300/CBP in vitro [45]. A continuación se describen otras interacciones que indicarían un vínculo entre p8 y otros correguladores de la transcripción.

p100

p100 fue caracterizada originalmente como un coactivador transcripcional del antigeno nuclear 2 del virus Epstein-Barr. La estructura de p100 consiste de cuatro dominios repetidos similares a los dominios SN-like domains de las nucleasas de *staphylococcos* (SN), y un dominio tudor (TD) [127]. Las SNs son enzimas pequeñas dependientes de calcio con actividad de nucleasa que hidrolizan tanto DNA como RNA.

p100 interactúa con el factor de transcripción Stat5 y es capaz de aumentar su actividad transcripcional, lo que indicaría que p100 funciona como un coactivador de Stat5. Dado que se ha detectado p100 tanto en el núcleo como en el citoplasma, se ha propuesta que la interacción ocurre en el citoplasma y las dos proteínas traslocan juntas formando un complejo al núcleo [128], pero es importante remarcar que ninguna de las dos proteínas parecería tener una señal de localización nuclear en su secuencia.

p100 podría modular la actividad transcripcional de Stat5 a través de varios mecanismos. La remodelación de la cromatina por acetilación de histonas es un paso crítico para la activación de la transcripción, y muchos coactivadores como p300/CBP, presentan actividad de histona acetil transferasas (HAT). Se ha visto que p100 no presenta actividad HAT [129] y la función de p100 parecería no estar involucrada en la modulación directa de la cromatina. Los coactivadores también pueden funcionar como puentes hacia la maquinaria de transcripción basal. Se vio que p100 puede interactuar con Stat6 *in vitro* e *in vivo* a través del dominio SN, y también interactúa con la RNA polimerasa II [128]. Dado que p100 aumenta la actividad transcripcional de Stat6 inducida por IL-4 posiblemente actuando como

puente entre Stat6 y la RNA polimerasa II [130] es probable que p100 actúe en forma similar como mediador entre Stat5 y la maquinaria basal de transcripción.

Se vio que las proteínas Stat interactúan con las histonas acetil transferasas (HATs), especialmente CBP/p300 [131] pero Stat también se une a otras proteínas coreguladoras. Entre las proteínas que se han reportado como interactoras de Stat5 aparece Ying Yang-1 (YY1) [132].

Nuestro análisis proteómico revela a YY1, una de las proteínas que interactúa con Stat5, como probable interactor de p8.

YY1

YY1 es un factor de transcripción ubicuo multifuncional que presenta un dominio de dedos de Zn de unión al ADN. [133, 134]. Su sobreexpresión está asociada a división celular descontrolada, resistencia a apoptosis y tumorigenesis. Además de su interacción con p300 [135, 136] y RNApolII [137] también se ha reportado que interactúa con p53 [138] y Smads [139, 140], y que está asociada a la matriz nuclear. Al igual que p8 presenta una localización subcelular asociada a la progresión del ciclo celular [141], a pesar de que no se ha reportado una NLS en su secuencia.

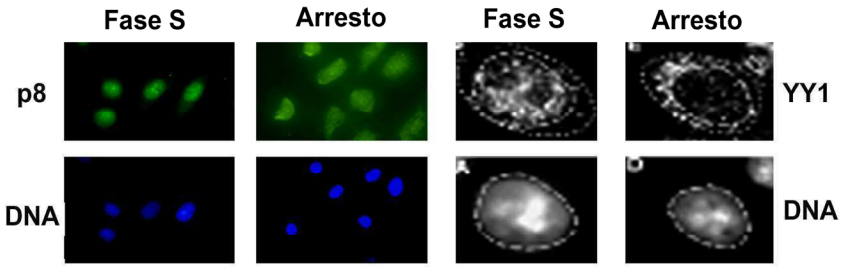


Figura 40: La localización subcelular de YY1 coincide con la de p8 a lo largo del ciclo celular.

La figura 41 ilustra las posibles interacciones entre p8 y los reguladores de la tanscripción mencionados.

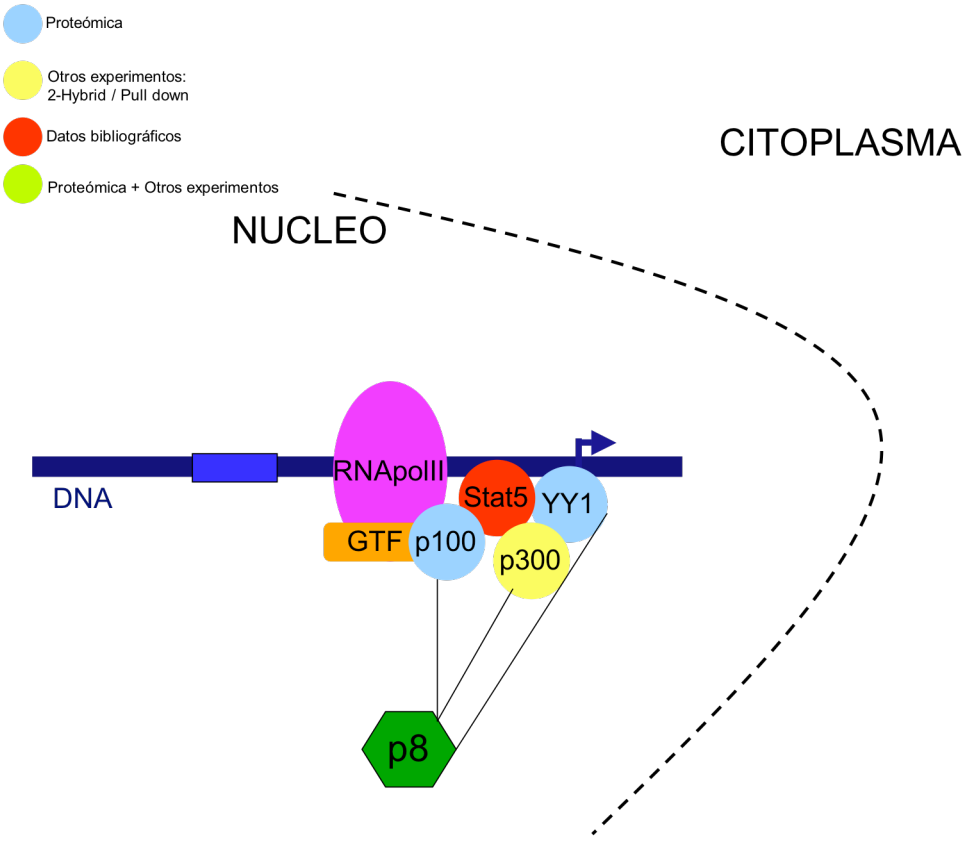


Figura 41: Redes de interacción entre p8 y algunos reguladores de la transcripción.

Es muy probable que p8, junto con p300, YY1 y p100 estuviera formando complejos involucrados en la activación de la transcripción de genes específicos, y podría ser que p8 fuera el responsable de la importación de alguno de estos componentes al núcleo.

Otros interactores

Nuestro análisis también reveló otros candidatos a ser interactores de p8; la lista incluye:

FHL1

Pertenece a una familia de proteínas “Four and a Half Lim domain” que contienen un dominio único, conservado en eucariotas, rico en cisteinas denominado LIM. Están relacionadas con la transcripción, la transducción de señales y la supervivencia celular. No hay evidencias de que los dominios

LIM permitan interacciones con el DNA, pero si ofrecen una interfase para la interacción proteína-proteína. Los dominios LIM podrían funcionar como adaptadores o andamios, para la construcción de complejos multiproteicos. Se sabe que, FHL2, el miembro más estudiado de esta familia presenta una localización subcelular variada, y se ha propuesta que ésta podría estar regulada por diferentes estímulos. También se demostró que FHL2 interactúa con más de 50 proteínas y es considerada una proteína multifuncional ya que estaría involucrada en diversos procesos celulares.

FHL1 es un coactivador de la transcripción relacionado al desarrollo de procesos cancerosos que se ha demostrado interactúa con factores de transcripción como p21 [142].

BolA

Es una proteína que se encuentra altamente conservada desde procariotas a eucariotas. En bacterias se vio que actúa como morfógeno y que es inducido por estrés durante los estadíos temprano del crecimiento, y que cumple un rol general en la respuesta al estrés, produciendo células osmóticamente estables. En levaduras, el homólogo a BolA se identificó como un gen inducible por UV.

Presenta un motivo hélice-vuelta-hélice pero hasta el momento no se ha demostrado una interacción con el DNA, y en el caso de BolA en eucariotas se ha propuesto que se secreta por mecanismos no convencionales (no dependiente de Golgi) [143].

Rae1

También conocido como Migration inducing gene 14, está a cargo de la exportación nuclear de mRNA. Se pega al mRNA durante la transcripción, elongación o splicing y junto con otras proteínas y el mRNA forma complejos ribonucleoproteicos que permiten acoplar estos procesos a la exportación de los mensajeros al citoplasma, contribuyendo a la disociación de mRNAs de los factores de retención nuclear. Cuando los complejos llegan a la cara citoplasmática del poro nuclear, sufren remodelaciones que permiten liberar los mRNA al citoplasma y el reciclado de los factores de exportación al núcleo [144].

No se conoce el mecanismo exacto por el cual Rae1 contribuye a la exportación, pero se sabe que Rae interactúa con nucleoporinas como Nup98, que facilitan el transporte a través del poro nuclear. y con la proteína NFX, que posee dominios de unión al mRNA y dominios de unión al poro nuclear. Se ha propuesto que Rae1 es la encargada de acercar la proteína NFX a la nucleoporina Nup98 y que éste es uno de los pasos iniciales para la formación del complejo de exportación [144].

LSM12

LSM12 pertenece a la familia Like Sm domain family. Estas proteínas contienen motivos de unión al RNA y han sido relacionadas con tareas de procesamiento del RNA. Muchas forman parte de las pequeñas ribonucleoproteínas nucleares de splicing, mientras que otras están encargadas del de-capping y degradación de los mRNA. Presentan localización tanto nuclear como citoplasmática Se vio que LSM12 es una proteína altamente conservada en eucariotas, presenta un dominio de unión a tRNA y un dominio metiltransferasa en su extremo C-terminal. Interactúa con proteínas involucradas en la degradación de mRNA como la guanyl transferasa CEG y PUF3, una proteína que se pega a los mRNA. También se encontró asociada al factor de transcripción STB5 [145].

Apg16

Autophagy related protein 16-1 forma parte de la cascada de conjugación requerida para la formación del autofagosoma.

La autofagia es un proceso de degradación que transporta componentes citoplasmáticos a los autolisosomas y de esta forma controla la degradación de proteínas de vida larga, de agregados insolubles de proteínas y de microbios invasores; y la reutilización de compuestos intracelulares. Se ha sugerido que la autofagia está involucrada en la regulación de la inflamación y de procesos como la muerte celular por apoptosis y de diferenciación celular[146].

Apg16 es una proteína coiled coil que se pega al complejo Apg12-Apg15 y que estaría encargada de regular la localización de ésta. El gen de Apg16 es candidato a ser el responsable de la susceptibilidad a la

enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria intestinal. Se vio que células que sobreexpresan p8, presentan niveles más altos de autofagia (resultados no publicados), lo que sugiere que p8 podria intervenir en la regulación de la formación del autofagosoma (ya sea regulando su localización o de alguna otra forma) y alterando los procesos inflamatorios mediados por Apg16 [146].

SRP9

La partícula de reconocimiento de señal 9 forma un complejo RNA-multiproteína que está a cargo de dirigir ribosomas a los poros de traslocación de membrana en el retículo endoplasmático. Esto ocurre durante la traducción de proteínas de exportación o de integración a la membrana citoplasmática. Los complejos SRP, reconocen el péptido señal de las proteínas de exportación, y esto provoca una pausa en la traducción que se mantiene hasta que SRP se une al receptor en la membrana de destino, allí se forma el complejo formado por ribosoma y poro de traslocación de membrana, y en ese momento se reanuda la traducción acoplada a la traslocación del péptido naciente. Una vez que esto ocurre se libera las SRP al citoplasma para ser reutilizadas [147].

Galectina 7

Pertenece a la familia de lectinas que se unen a β-galactosidasa a través de un dominio de reconocimiento de carbohidratos CRD. Es un blanco transcripcional temprano de p53 y se ha descrito como proteína proapoptótica. Se expresa en epitelios estratificados y epidermis, y su expresión está disminuida en tumores epidérmicos [148].

KNP-1

También conocido como HES-1, es un represor de la transcripción de la familia básica hélice-vuelta-hélice, con características estructurales conservadas de *Drosophila* a humanos. Se expresa en muchos tejidos como SNC, pulmón, riñón e intestino. Al heterodimerizar con HERP-1/HERP-2, se aumenta su afinidad por el DNA y su actividad represora. Se vio que el derivado natural de la vitamina A (atRetinoic Acid), que tiene efectos

antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de mama, induce la expresión de KNP-1 y que además, este último actúa como represor del regulador del ciclo celular E2F, lo que indica que podría ser un gen supresor de tumores. Contradictoriamente se ha observado que KNP-1 se expresa en varias líneas celulares tumorales, por lo cual queda por identificar las vías de inactivación de KNP-1 en procesos malignos [149].

Septin-2

Es una GTPasa importante para la división celular. Juega un papel esencial en la citoquinesis, y se localiza en el surco de células en división, junto con la actina.

BCAS2

Breast Cancer Amplified Sequence 2 fue identificada debido al aumento de este gen por amplificación génica en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-20. Esta amplificación también ocurre en tejidos primarios de cáncer de mama y no en tejidos de otros canceres ginecológicos. BCAS2 presentaría una localización nuclear, y se ha propuesto una relación entre ésta y el splicing, ya que presenta 100% de homología con una proteína asociada al spliceosoma [150].

Interactoma de p8

Con los resultados de este estudio proteómico, junto a los del grupo de Iovanna y los datos bibliográficos encontrados podemos construir el siguiente interactoma para p8 (Figura 42), donde vemos que p8 estaría formando distintos complejos tanto en el núcleo como en el citoplasma.

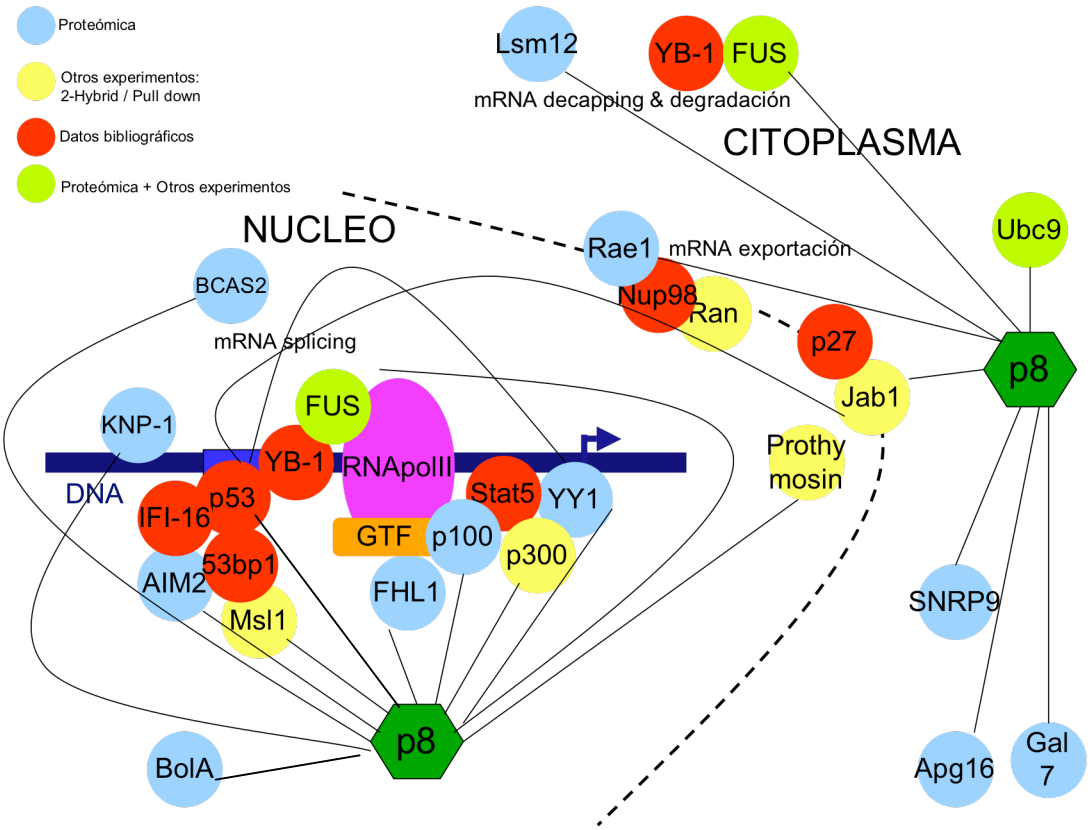


Figura 42: Interactoma de p8, construido a través de la combinación de resultados obtenidos por ensayos de doble hibrido y estudios proteómicos.

Considerando la lista de proteínas interactoras, podemos decir que p8 estaría muy involucrada con proteínas nucleares como YB-1, 53bp1, AIM2, p300, YY1, p100, FHL1, Bol-A, que están encargadas de regular la expresión génica que a su vez controla el crecimiento celular, la progresión del ciclo celular y la apoptosis. p8 podría estar regulando la importación de estos factores al núcleo.

En el citoplasma, podría estar reteniendo a algunos de estos activadores fuera del núcleo para evitar que realicen su función. Además, su

asociación con proteínas como TLS, YB-1, Rae1 y LSM12 sugieren que también podría estar involucrada en el procesamiento de mRNA; y su asociación a Ubc9, Apg16, SRP9, sugiere roles en otros procesos celulares.

En la siguiente tabla se agruparon las proteínas interactoras segun su funcion general y se indica su localizacion subcelular reportada hasta el momento.

Nombre	Localización	Funciones	NLS?
FUS	N/C	Procesamiento mRNA-prooncogen-reparación del DNA	-
BCAS2	N	Procesamiento de mRNA-Amplificado en líneas celulares tumorales	-
LSM12	N/C	Procesamiento de mRNA	-
RAE1	N/C	Exportación de mRNA	-
KNP-I	N	Regulación de la transcripción-Gen supresor de tumores	básica
p100 co-activator	N	Regulación de la transcripción	-
YY-1	N/C	Regulación de la transcirpción-sobreexpresión asociada a tumorigénesis	-
FHL1	N/C	Regulación de la transcripción- relacionado al desarrollo de procesos cancerosos.	bipartita
AIM2	N/C	Reparación del DNA- Antitumoral-Reparación DNA	-
BolA	N/C	Respuesta a stress	-
UBC9	N/C	Sumoilación	-
APG16	C	Formación del autofagosoma-Regula procesos inflamatorios, diferenciación celular y muerte celular por apoptois	básica
Galectin-7	C	Proapoptotico	-
SRP9	C	Traducción de proteínas de exportación y membrana	-
Septin-2	C	Citoquinesis	-

Tabla 5: Interactores de p8 agrupados por función. Se indica también la localización subcelular reportada hasta el momento, y la predicción de NLS a partir de la secuencia de la proteínas.

INTEGRACION DE RESULTADOS

p8: proteína multifuncional

Los experimentos de localización muestran que, durante la etapa de crecimiento, cuando las células están proliferando y dividiéndose activamente, p8 se encuentra principalmente en el núcleo en todos los estadíos del ciclo celular. Pero cuando las células están arrestadas en un estadío G_0, p8 se distribuye homogéneamente en toda la célula. Esta localización ha sido reportada para otras proteínas asociadas a la remodelación de la cromatina, o asociadas a la matriz nuclear [151]. Hay otros ejemplos de proteínas cuya localización subcelular depende del estadío del ciclo celular [73], y es importante remarcar que una de estas proteínas es Ying-yang 1 [141] que es una proteína que parecería ser uno de los interactores de p8.

Como ya mencionamos, dado que p8 es una proteína de 9 kDa debería poder difundir libremente entre el núcleo y el citoplasma, y el hecho de que presente un estricto control de su localización y una NLS activa indica que debería estar asociada a complejos proteicos de mayor tamaño.

En el núcleo se asociaría a diferentes complejos de transcripción que incluyen histona acetil transferasas y RNA polimerasas y que estan relacionados al control del ciclo celular y la regulación del crecimiento; lo que indicaría que p8 está involucrada en la transcripción de ciertos genes que controlan el crecimiento celular. Nuestros resultados indican que p8 estaría cumpliendo también un rol en el citoplasma; este rol podría estar relacionado al procesamiento del RNA y quizás tambien a la sumoilación, a la inflamación, apoptosis y traslocación de proteínas de membrana.

La localización de p8 es un proceso complejo que está controlado por el estado de proliferación de la célula. Proponemos el siguiente mecanismo: Cuando las células no han llegado a confluencia, p8 debería poder importar, a través de su NLS activa, factores esenciales para la proliferación celular. En estas situaciones el equilibrio de importación-exportación de p8 se ve desplazado hacia el núcleo. Inversamente, cuando las células llegan a confluencia, la importación de p8 al núcleo se vería disminuida o anulada debido a la acetilación de p8, o a su sumoilación, o debido a su interacción con proteínas citoplasmáticas, esto podría ocurrir con el fin de mantener a los factores de transcripción fuera del núcleo.

TLS, YB-1, YY1 y FHL1, algunas de las nuevas proteínas interactoras de p8, han sido consideradas proteínas multifuncionales. Las proteínas multifuncionales son esenciales para actuar como puentes o conectores de procesos celulares que proveen caminos para la comunicación entre los componentes esenciales de procesos individuales. El mecanismo exacto que permite que una sola proteína participe en múltiples niveles no se conoce. p8 parecería ser una proteína multifuncional también, a juzgar por sus características bioquímicas y evidencias experimentales.

Una característica llamativa de p8 es su falta de estructura secundaria. En los últimos años, el número de proteínas o dominios que carecen de estructura secundaria descriptos en la literatura ha crecido exponencialmente [152]. Las funciones predichas para proteínas sin estructura son variadas y complejas, pueden estar involucradas en la fosforilación de proteínas y en la transducción de señales, regulación de la transcripción o traducción y del ciclo celular.

También se ha propuesto que las proteínas sin estructura pueden actuar como chaperonas para otras proteínas o moléculas de RNA [153]. Muchas proteínas sin estructura son capaces de adquirir una estructura al interactuar con otra proteína. Un ejemplo de esto es el dominio KID (kinase-inductible transcriptional-activation domain) del factor de transcripción CREB [154, 155]. Muchas proteínas que se unen al DNA presentan una ausencia de estructura que probablemente permita resolver problemas cinéticos y termodinámicos asociados al reconocimiento y unión a secuencias específicas. Spolar y Record [156] propusieron que la estructura proteica adquirida luego de la unión al DNA permitiría que estas proteínas adquieran una función.

Una ausencia de estructura secundaria hace que una proteína sea más inestable y la interacción con otras proteínas hace que se vuelva más estable haciendo que su degradación sea menos probable. Este es el caso para p8, ya que se vio que es más estable en presencia de sus compañeras Ran y Msl1 (Neme Tauil 2007, Gironella 2008; resultados no publicados).

Las proteínas sin estructura son más flexibles por definición, y toda o parte de su estructura puede ser modelada de acuerdo al ambiente que la rodea. Esta plasticidad permitiría que una proteína pueda interactuar con

distintas proteínas, formando complejos diferentes con funciones distintas. La idea que proteínas sin estructura componen los nodos centrales de un interactoma se está afianzando cada vez más. Este es el caso de la proteína p21, que puede inhibir diferentes ciclinas dependientes de quinasas [157].

El pequeño tamaño de p8, su composición aminoacidica particular, su carencia de estructura secundaria le ofrecen características bioquímicas originales. Estas características, junto con la habilidad de p8 de migrar entre el núcleo y el citoplasma, permitirían que p8 estuviera involucrada en diferentes mecanismos, como proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular y respuesta al estrés, con efectos diferentes dependiendo del medio circundante determinado por el tipo celular, el estadío de proliferación y condición de las células.

La combinación de ensayos proteómicos y de doble hibrido presentan un número de candidatos interactores de p8, e indican que p8 seria una pequeña proteína capaz de interactuar con diferentes moléculas, dando así evidencias de que participaría en diferentes complejos proteicos y vías de señalización. La activa NLS de p8, podría ser la responsable, de la traslocacion al núcleo de muchas de sus proteínas interactoras, ya que muchas de ellas no presenten señales de localización.

Algunos de estos interactores son proteínas nucleares que actúan como factores y cofactores de transcripción que regulan expresión génica, en muchos casos relacionada con la proliferación celular y la apoptosis. p8 también interactúa con proteínas que forman parte de las vías responsables de la supervivencia celular, de la reparación del DNA, de la exportación y procesamiento de los mRNA, e incluso con proteínas involucradas en otros procesos celulares, como la autofagia y la sumoilación.

Esta gran diversidad de funciones de sus proteínas interactoras, podría explicar las propiedades multifuncionales de p8.

Los mecanismos que permiten que p8 pueda distinguir y discriminar su interacción con las diferentes proteínas no esta resuelto todavía. Su expresión celular específica, la localización subcelular regulada de p8, y la concentración disponible de los distintos interactores podrían estar favoreciendo diferentes interacciones, pero también deberían existir otros mecanismos de regulación mas fina que controlen estas interacciones y sus

efectos.

La importancia biológica de muchas de estas interacciones proteína-proteína no ha sido determinada aún, pero esta información contribuirá a esclarecer los roles de p8 en la célula.

BIBLIOGRAFIA

1. Mallo, G.V., et al., *Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth.* J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32360-9.
2. Ree, A.H., et al., *Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential.* Cancer Res, 1999. **59**(18): p. 4675-80.
3. Vasseur, S., et al., *Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity.* Eur J Biochem, 1999. **259**(3): p. 670-5.
4. Vasseur, S., et al., *Structural and functional characterization of the mouse p8 gene: promotion of transcription by the CAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) and C/EBPbeta trans-acting factors involves a C/EBP cis-acting element and other regions of the promoter.* Biochem J, 1999b. **343 Pt 2**: p. 377-83.
5. Igarashi, T., et al., *Cloning and characterization of the Xenopus laevis p8 gene.* Dev Growth Differ, 2001. **43**(6): p. 693-8.
6. Encinar, J.A., et al., *Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation.* J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2742-51.
7. Bustin, M. and R. Reeves, *High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1996. **54**: p. 35-100.
8. Bustin, M., *Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5237-46.
9. Garcia-Montero, A.C., et al., *Transforming growth factor beta-1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression.* Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 249-53.
10. Vasseur, S., et al., *p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis.* Oncogene, 2002b. **21**(11): p. 1685-94.
11. Goruppi, S. and J.M. Kyriakis, *The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4.* J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20950-8.
12. Jiang, Y.F., et al., *Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(3): p. 686-90.
13. Garcia-Montero, A., et al., *Expression of the estrés-induced p8 mRNA is transiently activated after culture medium change.* Eur J Cell Biol, 2001. **80**(11): p. 720-5.
14. Malicet, C., et al., *p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth.* Mol Cancer, 2003. **2**: p. 37.
15. Lee, S. and D.M. Helfman, *Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway.* J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1885-91.
16. Su, S.B., et al., *Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer.* Clin Cancer Res, 2001b. **7**(5): p. 1320-4.
17. Mohammad, H.P., et al., *Reexpression of p8 contributes to tumorigenic properties of pituitary cells and appears in a subset of prolactinomas in*

transgenic mice that hypersecrete luteinizing hormone. Mol Endocrinol, 2004. **18**(10): p. 2583-93.
18. Ree, A.H., et al., *Clinical and cell line specific expression profiles of a human gene identified in experimental central nervous system metastases.* Anticancer Res, 2002. **22**(4): p. 1949-57.
19. Ito, Y., et al., *Expression of p8 protein in breast carcinoma; an inverse relationship with apoptosis.* Anticancer Res, 2005. **25**(2A): p. 833-7.
20. Clark, D.W., et al., *NUPR1 interacts with p53, transcriptionally regulates p21 and rescues breast epithelial cells from doxorubicin-induced genotoxic estrés.* Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(5): p. 421-30.
21. Bratland, A., et al., *Expression of a novel factor, com1, is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells.* Cancer Res, 2000. **60**(19): p. 5578-83.
22. Ito, Y., et al., *Expression and cellular localization of p8 protein in thyroid neoplasms.* Cancer Lett, 2003. **201**(2): p. 237-44.
23. Vasseur, S., et al., *p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene.* EMBO Rep, 2002. **3**(2): p. 165-70.
24. Jiang, W.G., et al., *Com-1/p8 acts as a putative tumour suppressor in prostate cancer.* Int J Mol Med, 2006. **18**(5): p. 981-6.
25. Ishida, M., et al., *The SYT-SSX fusion protein down-regulates the cell proliferation regulator COM1 in t(x;18) synovial sarcoma.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(4): p. 1348-55.
26. Santarelli, J.G., et al., *Molecular events of brain metastasis.* Neurosurg Focus, 2007. **22**(3): p. E1.
27. Carbone, M. and H.I. Pass, *Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen?* Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 399-405.
28. Yokota, J. and T. Kohno, *Molecular footprints of human lung cancer progression.* Cancer Sci, 2004. **95**(3): p. 197-204.
29. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
30. Ree, A.H., et al., *Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1778-83.
31. Manrow, R.E., et al., *Nuclear targeting of prothymosin alpha.* J Biol Chem, 1991. **266**(6): p. 3916-24.
32. Trumbore, M.W., et al., *Prothymosin alpha in vivo contains phosphorylated glutamic acid residues.* J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26394-404.
33. Smith, M.R., *Prothymosin alpha: in search of a function.* Leuk Lymphoma, 1995. **18**(3-4): p. 209-14.
34. Gomez-Marquez, J., et al., *The expression of prothymosin alpha gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation.* J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 8451-4.
35. Eschenfeldt, W.H., et al., *Isolation and partial sequencing of the human prothymosin alpha gene family. Evidence against export of the gene products.* J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7546-55.
36. Pineiro, A., O.J. Cordero, and M. Nogueira, *Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons.* Peptides, 2000. **21**(9): p. 1433-46.
37. Malicet, C., et al., *Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2671-6.

38. Giroux, V., et al., *p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 235-41.
39. Chowdhury, U.R., et al., *Emerging role of nuclear protein 1 (NUPR1) in cancer biology.* Cancer Metastasis Rev, 2009.
40. Quirk, C.C., D.D. Seachrist, and J.H. Nilson, *Embryonic expression of the luteinizing hormone beta gene appears to be coupled to the transient appearance of p8, a high mobility group-related transcription factor.* J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1680-5.
41. Passe, C.M., G. Cooper, and C.C. Quirk, *The murine p8 gene promoter is activated by activating transcription factor 4 (ATF4) in the gonadotrope-derived LbetaT2 cell line.* Endocrine, 2006. **30**(1): p. 81-91.
42. Path, G., et al., *Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth.* Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S82-5.
43. Goruppi, S., J.V. Bonventre, and J.M. Kyriakis, *Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy.* Embo J, 2002. **21**(20): p. 5427-36.
44. Zinke, I., et al., *Nutrient control of gene expression in Drosophila: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response.* Embo J, 2002. **21**(22): p. 6162-73.
45. Hoffmeister, A., et al., *The HMG-I/Y-related protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter.* J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22314-9.
46. Jiang, W.G., et al., *Expression of Com-1/P8 in human breast cancer and its relevance to clinical outcome and ER status.* Int J Cancer, 2005. **117**(5): p. 730-7.
47. Su, S.B., et al., *Expression of p8 in human pancreatic cancer.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(2): p. 309-13.
48. Carracedo, A., et al., *The estrés-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells.* Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 301-12.
49. Himes, S.R., et al., *The role of high-mobility group I(Y) proteins in expression of IL-2 and T cell proliferation.* J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3157-68.
50. Bandiera, A., et al., *Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix.* Cancer Res, 1998. **58**(3): p. 426-31.
51. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
52. Robeva, A.S., et al., *Double tagging recombinant A1- and A2A-adenosine receptors with hexahistidine and the FLAG epitope. Development of an efficient generic protein purification procedure.* Biochem Pharmacol, 1996. **51**(4): p. 545-55.
53. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.* Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
54. Neuhoff, V., et al., *Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution.* Electrophoresis, 1990. **11**(2): p. 101-17.
55. Neuhoff, J.G., *Perceptual bias for rising tones.* Nature, 1998. **395**(6698): p. 123-4.

56. Macara, I.G., *Transport into and out of the nucleus.* Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(4): p. 570-94, table of contents.
57. Thompson, P.R., et al., *Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity.* J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33721-9.
58. Damelin, M., P.A. Silver, and A.H. Corbett, *Nuclear protein transport.* Methods Enzymol, 2002. **351**: p. 587-607.
59. Brandon, C., D.M. Lam, and J.Y. Wu, *The gamma-aminobutyric acid system in rabbit retina: localization by immunocytochemistry and autoradiography.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3557-61.
60. Fornerod, M., et al., *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.* Cell, 1997. **90**(6): p. 1051-60.
61. Tajima, Y., et al., *Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7.* J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10716-21.
62. Yoshida, M., et al., *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A.* J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17174-9.
63. Bonaldi, T., et al., *Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion.* Embo J, 2003. **22**(20): p. 5551-60.
64. Hoshikawa, Y., et al., *Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines.* Exp Cell Res, 1994. **214**(1): p. 189-97.
65. Wu, P., et al., *Role of hTERT in apoptosis of cervical cancer induced by histone deacetylase inhibitor.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(1): p. 36-44.
66. Lee, S., et al., *Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1770-5.
67. Sierra-Honigmann, M.R., J.R. Bradley, and J.S. Pober, *"Cytosolic" phospholipase A2 is in the nucleus of subconfluent endothelial cells but confined to the cytoplasm of confluent endothelial cells and redistributes to the nuclear envelope and cell junctions upon histamine stimulation.* Lab Invest, 1996. **74**(3): p. 684-95.
68. Petridou, S., et al., *TGF-beta receptor expression and smad2 localization are cell density dependent in fibroblasts.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(1): p. 89-95.
69. Sussman, J., et al., *Protein kinase B phosphorylates AHNAK and regulates its subcellular localization.* J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 1019-30.
70. Zhang, F., R.L. White, and K.L. Neufeld, *Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8143-56.
71. Bui, M., J.E. Myers, and G.R. Whittaker, *Nucleo-cytoplasmic localization of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation.* Virus Res, 2002. **84**(1-2): p. 37-44.
72. Dietrich, C., et al., *Subcellular localization of beta-catenin is regulated by cell density.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(1): p. 195-9.

73. Fagman, H., et al., *Nuclear accumulation of full-length and truncated adenomatous polyposis coli protein in tumor cells depends on proliferation.* Oncogene, 2003. **22**(38): p. 6013-22.
74. Baake, M., et al., *Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways.* Eur J Cell Biol, 2001. **80**(11): p. 669-77.
75. Cyert, M.S., *Regulation of nuclear localization during signaling.* J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 20805-8.
76. Bauer, A. and B. Kuster, *Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes.* Eur J Biochem, 2003. **270**(4): p. 570-8.
77. Puig, O., et al., *The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification.* Methods, 2001. **24**(3): p. 218-29.
78. Lichty, J.J., et al., *Comparison of affinity tags for protein purification.* Protein Expr Purif, 2005. **41**(1): p. 98-105.
79. Link, A.J., et al., *Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry.* Nat Biotechnol, 1999. **17**(7): p. 676-82.
80. Cutillas, P., A. Burlingame, and R. Unwin, *Proteomic strategies and their application in studies of renal function.* News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 114-9.
81. Bradshaw, R.A. and A.L. Burlingame, *From proteins to proteomics.* IUBMB Life, 2005. **57**(4-5): p. 267-72.
82. Medzihradszky, K.F., *Peptide sequence analysis.* Methods Enzymol, 2005. **402**: p. 209-44.
83. Malicet, C., et al., *Interaction of the estrés protein p8 with Jab1 is required for Jab1-dependent p27 nuclear-to-cytoplasm translocation.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 284-9.
84. Lee, E.W., W. Oh, and J. Song, *Jab1 as a mediator of nuclear export and cytoplasmic degradation of p53.* Mol Cells, 2006. **22**(2): p. 133-40.
85. Malicet, C., et al., *p8 and prothymosin alpha: unity is strength.* Cell Cycle, 2006. **5**(8): p. 829-30.
86. Cao, X., et al., *SUMOylation of HMGA2: selective destabilization of promyelocytic leukemia protein via proteasome.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(4): p. 923-34.
87. Melchior, F., *SUMO--nonclassical ubiquitin.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 591-626.
88. Schwartz, D.C. and M. Hochstrasser, *A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers.* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 321-8.
89. Johnson, E.S., *Protein modification by SUMO.* Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 355-82.
90. Gill, G., *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2046-59.
91. Muller, S., A. Ledl, and D. Schmidt, *SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity.* Oncogene, 2004. **23**(11): p. 1998-2008.
92. Melchior, F., M. Schergaut, and A. Pichler, *SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores.* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 612-8.
93. Seeler, J.S. and A. Dejean, *Nuclear and unclear functions of SUMO.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 690-9.
94. Buschmann, T., et al., *SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53.* Cell, 2000. **101**(7): p. 753-62.

95. Smith, E.R., et al., *A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9175-88.
96. Sass, G.L., A. Pannuti, and J.C. Lucchesi, *Male-specific lethal complex of Drosophila targets activated regions of the X chromosome for chromatin remodeling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8287-91.
97. Smith, E.R., C.D. Allis, and J.C. Lucchesi, *Linking global histone acetylation to the transcription enhancement of X-chromosomal genes in Drosophila males.* J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31483-6.
98. Choubey, D., et al., *Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family.* FEBS Lett, 2000. **474**(1): p. 38-42.
99. Chen, I.F., et al., *AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model.* Mol Cancer Ther, 2006. **5**(1): p. 1-7.
100. Choubey, D. and P. Lengyel, *Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein.* J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 6134-40.
101. Johnstone, R.W. and J.A. Trapani, *Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 5833-8.
102. Ding, Y., et al., *Antitumor activity of IFIX, a novel interferon-inducible HIN-200 gene, in breast cancer.* Oncogene, 2004. **23**(26): p. 4556-66.
103. Landolfo, S., et al., *The Ifi 200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes.* Biochimie, 1998. **80**(8-9): p. 721-8.
104. Cresswell, K.S., et al., *Biochemical and growth regulatory activities of the HIN-200 family member and putative tumor suppressor protein, AIM2.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(2): p. 417-24.
105. Asefa, B., et al., *The interferon-inducible p200 family of proteins: a perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation.* Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**(1): p. 155-67.
106. Xia, Z., et al., *Negative cell cycle regulation and DNA damage-inducible phosphorylation of the BRCT protein 53BP1.* J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2708-18.
107. Schultz, L.B., et al., *p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks.* J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1381-90.
108. Anderson, L., C. Henderson, and Y. Adachi, *Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1719-29.
109. Law, W.J., K.L. Cann, and G.G. Hicks, *TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression.* Brief Funct Genomic Proteomic, 2006. **5**(1): p. 8-14.
110. Morohoshi, F., et al., *Genomic structure of the human RBP56/hTAFII68 and FUS/TLS genes.* Gene, 1998. **221**(2): p. 191-8.
111. Bertolotti, A., et al., *hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II.* Embo J, 1996. **15**(18): p. 5022-31.
112. Crozat, A., et al., *Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma.* Nature, 1993. **363**(6430): p. 640-4.

113. Prasad, D.D., et al., *TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain.* Oncogene, 1994. **9**(12): p. 3717-29.
114. Perrotti, D., et al., *TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis.* Embo J, 1998. **17**(15): p. 4442-55.
115. Ohno, T., et al., *The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains.* Oncogene, 1994. **9**(10): p. 3087-97.
116. Bertolotti, A., et al., *EWS, but not EWS-FLI-1, is associated with both TFIID and RNA polymerase II: interactions between two members of the TET family, EWS and hTAFII68, and subunits of TFIID and RNA polymerase II complexes.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1489-97.
117. Yang, L., L.J. Embree, and D.D. Hickstein, *TLS-ERG leukemia fusion protein inhibits RNA splicing mediated by serine-arginine proteins.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(10): p. 3345-54.
118. Yang, L., et al., *Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing.* J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 27761-4.
119. Zinszner, H., et al., *TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling.* J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 15)**: p. 1741-50.
120. Fujii, R., et al., *The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology.* Curr Biol, 2005. **15**(6): p. 587-93.
121. Powers, C.A., et al., *TLS (translocated-in-liposarcoma) is a high-affinity interactor for steroid, thyroid hormone, and retinoid receptors.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(1): p. 4-18.
122. Rapp, T.B., et al., *RNA splicing mediated by YB-1 is inhibited by TLS/CHOP in human myxoid liposarcoma cells.* J Orthop Res, 2002. **20**(4): p. 723-9.
123. Matsumoto, K. and A.P. Wolffe, *Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation.* Trends Cell Biol, 1998. **8**(8): p. 318-23.
124. Bargou, R.C., et al., *Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression.* Nat Med, 1997. **3**(4): p. 447-50.
125. Ohga, T., et al., *Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic estrés-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene.* J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 5997-6000.
126. Chansky, H.A., et al., *Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein.* Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3586-90.
127. Callebaut, I. and J.P. Mornon, *The V(D)J recombination activating protein RAG2 consists of a six-bladed propeller and a PHD fingerlike domain, as revealed by sequence analysis.* Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(8): p. 880-91.
128. Paukku, K. and O. Silvennoinen, *STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5.* Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(6): p. 435-55.

129. Wang, L., S.R. Grossman, and E. Kieff, *Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 430-5.
130. Yang, J., et al., *Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II.* Embo J, 2002. **21**(18): p. 4950-8.
131. Paulson, M., et al., *Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences.* J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25343-9.
132. Bergad, P.L., H.C. Towle, and S.A. Berry, *Yin-yang 1 and glucocorticoid receptor participate in the Stat5-mediated growth hormone response of the serine protease inhibitor 2.1 gene.* J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 8114-20.
133. Shi, Y., et al., *Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein.* Cell, 1991. **67**(2): p. 377-88.
134. Park, K. and M.L. Atchison, *Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9804-8.
135. Galvin, K.M. and Y. Shi, *Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3723-32.
136. Wang, H.G., et al., *The E1A products of oncogenic adenovirus serotype 12 include amino-terminally modified forms able to bind the retinoblastoma protein but not p300.* J Virol, 1993. **67**(8): p. 4804-13.
137. Abraham, S.E., et al., *p300, and p300-associated proteins, are components of TATA-binding protein (TBP) complexes.* Oncogene, 1993. **8**(6): p. 1639-47.
138. Thomas, M.J. and E. Seto, *Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?* Gene, 1999. **236**(2): p. 197-208.
139. Kurisaki, K., et al., *Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4494-510.
140. Morgan, M.J., et al., *YY1 regulates the neural crest-associated slug gene in Xenopus laevis.* J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46826-34.
141. Palko, L., et al., *The Yin Yang-1 (YY1) protein undergoes a DNA-replication-associated switch in localization from the cytoplasm to the nucleus at the onset of S phase.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 3): p. 465-76.
142. Johannessen, M., et al., *The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2.* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(3): p. 268-84.
143. Zhou, Y.B., et al., *hBolA, novel non-classical secreted proteins, belonging to different BolA family with functional divergence.* Mol Cell Biochem, 2008. **317**(1-2): p. 61-8.
144. Chakraborty, P., N. Satterly, and B.M. Fontoura, *Nuclear export assays for poly(A) RNAs.* Methods, 2006. **39**(4): p. 363-9.
145. Albrecht, M. and T. Lengauer, *Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases.* FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 18-26.
146. Saitoh, T., et al., *Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production.* Nature, 2008. **456**(7219): p. 264-8.
147. Stroud, R.M. and P. Walter, *Signal sequence recognition and protein targeting.* Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(6): p. 754-9.
148. Hsu, D.K., R.Y. Yang, and F.T. Liu, *Galectins in apoptosis.* Methods Enzymol, 2006. **417**: p. 256-73.

149. Hartman, J., et al., *HES-1 inhibits 17beta-estradiol and heregulin-beta1-mediated upregulation of E2F-1.* Oncogene, 2004. **23**(54): p. 8826-33.
150. Neubauer, G., et al., *Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex.* Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 46-50.
151. Muchardt, C. and M. Yaniv, *The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth.* Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(2): p. 189-95.
152. Uversky, V.N., *Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics.* Protein Sci, 2002. **11**(4): p. 739-56.
153. Tompa, P. and P. Csermely, *The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones.* Faseb J, 2004. **18**(11): p. 1169-75.
154. Radhakrishnan, I., et al., *Conformational preferences in the Ser133-phosphorylated and non-phosphorylated forms of the kinase inducible transactivation domain of CREB.* FEBS Lett, 1998. **430**(3): p. 317-22.
155. Richards, J.P., et al., *Analysis of the structural properties of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and phosphorylated CREB.* J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13716-23.
156. Spolar, R.S. and M.T. Record, Jr., *Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA.* Science, 1994. **263**(5148): p. 777-84.
157. Gartel, A.L., M.S. Serfas, and A.L. Tyner, *p21--negative regulator of the cell cycle.* Proc Soc Exp Biol Med, 1996. **213**(2): p. 138-49.