

Tesis Doctoral

Estudio de los caminos de señalización involucrados en la terminación de la señal de c-fos. Apagado de la activación a nivel del ARN mensajero

Degese, María Sol

2012

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:

Degese, María Sol. (2012). Estudio de los caminos de señalización involucrados en la terminación de la señal de c-fos. Apagado de la activación a nivel del ARN mensajero. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Degese, María Sol. "Estudio de los caminos de señalización involucrados en la terminación de la señal de c-fos. Apagado de la activación a nivel del ARN mensajero". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

“Estudio de los caminos de señalización involucrados en la terminación de la señal de *c-fos*. Apagado de la activación a nivel del ARN mensajero.”

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

Maria Sol Degese

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

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

Buenos Aires, 2012.

RESUMEN en CASTELLANO

“Estudio de los caminos de señalización involucrados en la terminación de la señal de *c-fos*. Apagado de la activación a nivel del ARN mensajero.”

Resumen

La llegada de distintos tipos de señales a la superficie de las células altera la expresión génica mediante la activación de distintos caminos de transducción de señales. En este trabajo, nos enfocamos en el estudio de estímulos proliferativos y en como estos alteran la expresión del gen de respuesta inmediata, *c-fos*, factor de transcripción considerado como un proto-oncogén. Si bien tanto mensajero como la proteína Fos están ausentes en la mayor parte del ciclo celular, ambos aparecen y desaparecen rápidamente luego del estímulo. Nos hemos propuesto investigar la regulación de la estabilidad del ARN mensajero de *c-fos* dada por MAPKs.

Una de las proteínas reguladoras de la estabilidad de los ARNm en la que centramos nuestro estudio es HuR, la cual se une al mensajero de *c-fos* en su región ARE o rica en adeninas y uracilos presente en la parte 3'UTR. Encontramos que p38 SAPK regula la asociación de HuR promoviendo su liberación del ARNm y llevándolo a degradación. Además p38 SAPK inhibe la fosforilación de HuR, sugiriendo la posible acción de alguna fosfatasa p38 dependiente.

Encontramos también que KSRP se uniría al ARE de *c-fos* en los mismos sitios que HuR y su asociación puede revertir la estabilización dada por HuR o por la inhibición de p38, sugiriendo un rol positivo en la degradación del ARNm de *c-fos*.

Palabras Clave

c-fos, AP-1, HuR, decaimiento del ARNm, AUBP, KSRP, caminos de transducción de señales, p38 SAPK.

RESUMEN en INGLÉS

“Signaling pathways involved in the termination of the *c-fos* signaling. Shutting down of the activation at the mRNA level”

Abstract

Signals arriving to the cell surface may alter gene expression through the activation of different signaling pathways. In this work we focus in the study of proliferative stimuli and how they alter the expression of the immediate-early responsive gene *c-fos*, a transcription factor considered, as well, a proto-oncogene. Both messenger RNA and Fos protein are absent in most of the cell cycle, but they appear and disappear very fast upon stimulation. We have proposed to investigate the MAPKs'-dependent mRNA stability regulation.

One of the most important regulators of the mRNA stability in which we focus our study is HuR that binds to the *c-fos* mRNA's ARE (Adenine and uracil rich region) present in its 3'UTR. We found that p38 SAPK regulates the binding of HuR, promoting its dissociation from the mRNA and leading it to degradation. Besides, p38 SAPK inhibits HuR phosphorylation, suggesting a possible action of a p38 dependent phosphatase.

We also found that KSRP may be binding to the *c-fos* ARE in the same sites as HuR and its association to this region is sufficient to revert the stabilization due both to HuR binding and to p38 activity inhibition, suggesting a positive role in *c-fos* mRNA degradation process.

Key words

c-fos, AP-1, HuR, mRNA decay, AUBP, KSRP, signaling transduction pathways, p38 SAPK.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que contribuyeron de una manera u otra a la producción de esta tesis...y a que no me volviera tan loca en el camino.

Gracias Omar, principalmente por tu calidad como persona. Siempre estuviste ahí y no me dejaste bajar los brazos. Gracias por las oportunidades que me diste a lo largo de estos años y por tu confianza en mi trabajo.

Gracias Tama, me enseñaste un montón de cosas! Siempre te voy a llevar en mi corazón, te quiero muchísimo.

Gracias a todos mis compañeros de grupo y a todos los chicos que trabajan o trabajaron del lado Sur: Dai, Juli, Angie, Pau, Martin, Flor, Eli, Berni, Yang. Son excelentes personas y me sentí feliz de compartir estos años con ustedes. Gracias a los jefes del sur: Lidia, Susana, Paula y Alberto. Gracias a Javier por su aporte al grupo.

Gracias Diegui...¿pensaste que me había olvidado de ti? Sos lo más, siempre ahí empujándome para ser un poquito mejor. Te quiero mucho! Espero que no te pierdas en los esteros correntinos para siempre.

Gracias Lu, por tu compañía y por haber compartido todo este camino conmigo, desde el principio y hasta el final, con hijos y casamientos incluidos.

Gracias a todos los integrantes de los grupos del IFIBYNE que de alguna manera siempre estuvieron ahí para darme una mano con lo que necesitara: Guille, Petry, Nacho, Mati, Alan, Ana, los chicos EA: Marian, Maria, Carla, Jose, Juan, Marian H., Andrés, a los grupos Kordon, Pecci, Jares y tantos otros que siempre dieron una mano.

Gracias Pablo por ayudarme a concluir la tesis y a darle un toque más copado con el illustrator!

Gracias Xe, Sofi y Maru por estar ahí y perdonarme mis metidas de pata. Las quiero chiquis.

Gracias a mi familia por alentarme a seguir mi vocación y por apoyarme en todas mis decisiones, gracias a mi mamá Adriana, a mi papá Mario, a mi Tía Susana, a Juan carlos y a Juan José, a mi abuela Marta. Gracias Juli y Sebas, son los mejores hermanos que alguien pudiera tener, los adoro y quisiera siempre tenerlos conmigo. Les deseo lo mejor de lo mejor. Los amo.

Gracias a la familia Canepa-Calabretta-Pzyk-Carubia por su apoyo incondicional.

Y finalmente, gracias Gas, sos el amor de mi vida, siempre ahí para sostenerme y apuntalarme en todo, no sé qué haría sin vos. Esta tesis la pude terminar gracias a tu compañía y tu amor. Te adoro. Gracias por el bebé hermoso que tenemos, Santi, la personita más adorable del universo. Los amo a los dos con toda mi alma!!

Gracias, gracias, gracias!

ABREVIATURAS

ADNc: ADN Copia	MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
AMPc: Adenosina mono fosfato cíclico	MK: MAPK activated protein kinase
AP-1: Activating protein 1	MNK: MAPK interacting kinase
ARE: AU-rich element	MSK: mitogen and stress activated kinase
ARNm: ARN mensajero	MUT: Mutante
ATF: Activating transcription factor	NB: Northern Blot
AUBP: AU-rich element binding protein	NGD: No-go decay
AUF1: AU-rich element RNA-binding protein 1	NMD: Non-sense mediated decay
BRF1: Butyrate response factor 1	NPM-ALK: Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase
bZip: Basic leucine zipper domain	NSD: Non-stop decay
c-Fos: Cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	PDGF: Platelet Derived Growth Factor
Ch: Carbachol	PKA: Protein Kinase A
c-Jun: Cellular transforming gene of avian sarcoma virus 17 homolog	PKC: Protein Kinase C
COX-2: Ciclooxygenasa 2	PP1: Protein phosphatase 1
CRD: Coding region determinant	PP2A: Protein phosphatase 2A
CRE: Calcium Response Element	RSK: Ribosomal S6 Kinase
CREB: Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	SAPKs: Stress Activated Protein Kinases
DBD: DNA binding domain	siRNA: ARN de interferencia
DSP: Dual specificity phosphatase	SIE: c-Sis Inducible Element
EGF: Ephermeral Growth Factor	SOS: Son of sevenless
ELK1: ETS domain-containing protein	SRE: Serum Response Element
ERK: Extracellular regulated kinase	STATs: Signal transducers and activators of transcription
FL: Full Length o forma completa	TAD: Transactivation domain
GDP: Guanosina di fosfato	TCF: Ternary Complex Factor
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	TFII: Transcription Factor II
GPCR: G Protein coupled receptor	TKR: Tyrosine kinase receptor
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β	TNF: Tumor Necrosis Factor
GTP: Guanosina tri fosfato	TPA: Tetradecanoyl phorbol acetate
HuR: Hu related antigen	TRE: TPA Responsive Element
IEGs: Immediate-Early responsive genes	TTP: Tristetraprolin
JDP: c-Jun dimerization protein	UTR: Untranslated region
JNK: c-Jun NH ₂ -terminal kinase	UV: Ultravioleta
KO: Knock-out	WB: Western Blot
KSRP: KH type-splicing regulatory protein	WT: Wild Type o forma salvaje
LPA: 1-oleoyl-lyso-phosphatidic acid	

INTRODUCCIÓN

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

En particular la llegada de señales proliferativas a células en cultivo induce la rápida expresión de una serie de genes llamados colectivamente “Immediate-Early Responsive Genes” o IEGs entre los cuales se encuentran una variedad de factores de transcripción incluyendo los de las proteínas de la familia AP-1 como c-Jun y c-Fos.

Durante los últimos diez años hemos venido estudiando cómo cascadas de señalización, que involucran a proteínas que unen GTP y proteínas quinasas, conectan receptores para factores de crecimiento con los promotores de IEGs. Utilizando distintos modelos celulares hemos visto como el agregado de agonistas específicos inducen la rápida entrada de las células en el ciclo celular, lo que es precedido por una rápida y marcada inducción de una variedad de ARN mensajeros, principalmente los de *c-jun* y *c-fos*. Hemos caracterizado componentes de los mecanismos de las cascadas de señales que median esas respuestas así como elementos singulares en la secuencia de los promotores de esos genes donde convergen las señales. Por otro lado, hemos identificado y caracterizado componentes de los mecanismos regulatorios que controlan la fosforilación de las correspondientes proteínas c-Jun y c-Fos, incluyendo las proteínas quinasas que los fosforilan de modo directo.

Más recientemente nos hemos enfocado al estudio de la regulación de la expresión génica y de la actividad transcripcional de *c-fos* como modelo de una proteína blanco de múltiples caminos de transducción de señales. Como hemos mencionado anteriormente, el proto-oncogen *c-fos* pertenece a una familia de genes, los IEGs, que aparecen inmediatamente luego de la estimulación, pero sólo por un breve lapso de tiempo. Ello se debe, no sólo a tiempos cortos de transcripción activa, sino también a la corta vida media de sus transcritos (de no más de 40 minutos en el caso de *c-fos* (1)), a diferencia del resto de los transcritos que presentan una mayor estabilidad estando presentes horas o hasta días dentro de la célula. Una vez sintetizado, el nuevo mensajero viaja al citoplasma donde es traducido por un breve período antes de ser degradado rápidamente. Además, luego de un corto tiempo de activación del promotor, la transcripción de *c-fos* se interrumpe. La interrupción de la transcripción así como la degradación contribuyen a que el mensaje de *c-fos* sea transitorio. Y aunque se han

realizado estudios acerca de aquellas características estructurales del mensajero de *c-fos* que le otorgan esta labilidad, poco se sabe sobre las vías de transducción de señales que determinan su rápida degradación. Por lo tanto es de interés determinar cuáles son las quinasas que intervienen y con qué factores interactúan para que finalmente se decida el destino del mensajero de *c-fos*.

La integración entre los estudios realizados sobre las características de las cascadas de señalización que regulan la activación e inducción génica luego de un estímulo, junto con aquellos realizados sobre los caminos involucrados en el apagado de la señal, nos pueden dar una imagen más completa acerca de eventos celulares clave. Es decir, que tanto el conocimiento de las quinasas y de las proteínas regulatorias encargadas de la activación, así como de aquellas que regulan el apagado de una determinada señal extracelular, nos brindarán información del mecanismo que lleva a una célula al destino que sufrirá luego de recibir dicha señal. El aporte de esta tesis se centra justamente en una profundización del conocimiento de las vías de señalización que regulan el apagado de una determinada señal: la activación transcripcional del proto-oncogén *c-fos*.

1. El Factor de Transcripción c-Fos

c-Fos es una proteína con actividad de activador transcripcional perteneciente a la familia de factores de transcripción AP-1 (Activator protein 1). El factor AP-1, en principio identificado como un polipéptido de 47 kDa, fue relacionado con la activación transcripcional de genes cuya expresión es estimulada por tratamientos con ésteres de forbol como el TPA (acetato de tetradecanoilforbol). Las regiones de ADN en donde se encontró unido a AP-1 se denominaron elementos TRE por "TPA responsive element" y se estableció como su secuencia de consenso TGA(G/C)TCA o TGA(G/C)TAA (2,3).

Los distintos componentes proteicos que integran al factor AP-1 fueron purificados utilizando columnas de afinidad con oligonucleótidos para la secuencia TRE: 5'-TGA(G/C)TCA-3'. Estos ensayos permitieron identificar al producto del proto-oncogen *c-fos* y a una proteína asociada, *c-Jun* como los componentes principales de AP-1 (4). El factor de transcripción AP-1 es un complejo dimérico compuesto principalmente por proteínas de la familia Fos (*c-Fos*, FosB, Fra-1 y Fra-2) y proteínas de la familia Jun (*c-Jun*, Jun B y Jun D). Pero mientras las proteínas de la familia Jun pueden formar homodímeros o heterodímeros con proteínas de la familia Fos, estas últimas sólo puede formar heterodímeros con miembros de la familia Jun. Por otra parte, algunos miembros de la

familia ATF (ATFa, ATF-2 y ATF-3), JDP (JDP-1 y JDP-2) y CREB (cAMP “response element-binding protein”) pueden unirse a secuencias similares a las TRE formando complejos heterodiméricos con proteínas de las familias Fos y Jun (4,5) (6,7).

Estructuralmente, el gen *c-fos* tiene 4 exones altamente conservados en diferentes especies animales que codifican para una proteína de 380 aminoácidos con un peso molecular aparente de entre 55 y 65 KDa (8). Previo al descubrimiento de la proteína c-Fos, se había detectado la presencia de su versión viral, v-Fos, aislada de un retrovirus murino y responsable de la patología denominada osteosarcoma murino (9,10). Una de las diferencias principales entre las proteínas c-Fos y v-Fos, es una delección de 104 pares de bases presente en la versión viral que corresponden a los aminoácidos del extremo carboxilo terminal (11). En esta delección, se pierde una región desestabilizante de c-Fos que incluye dos sitios de fosforilación, la Serina 362 y la Serina 374. El resultado final es una proteína que presenta una mayor estabilidad y un incremento en su actividad transformante (12). Además de la diferencia en la secuencia aminoacídica, v-Fos también presenta una disrupción de la región 3'UTR (“untranslated region” o región no traducida), que elimina la acción de la región ARE así como el pegado de micro ARNs, determinantes en el proceso de degradación de su ARN mensajero (11,13) (ver Introducción, sección 1.2).

c-Fos es expresado a muy bajos o indetectables niveles en casi todos los tipos celulares estudiados, pero su transcripción aumenta de manera abrupta al ser inducido por una gran variedad de estímulos (5,12,14). Si bien en niveles bajos, su expresión varía durante los distintos estadios del ciclo celular (15) y se observó que se requiere de la expresión de c-Fos para la progresión del ciclo (16). Al producirse la inducción de *c-fos* como respuesta a diversos estímulos asociados a diferentes procesos celulares como la diferenciación, la proliferación o la muerte celular programada, se cree que regula distintos genes blanco dependiendo del tipo celular y de la circunstancia particular en que se encuentra la célula en ese momento (17).

c-Fos presenta tres dominios proteicos funcionales: de amino a carboxilo terminal presenta el dominio de unión al ADN o DBD (“DNA Binding Domain”) (necesario para la unión a los elementos TRE presentes en distintos promotores), el dominio de dimerización o bZip (gracias a él puede asociarse con proteínas de la familia Jun) y el dominio de transactivación o TAD (“transactivation domain”) (que, luego de ser modificado, permite la activación transcripcional de los genes blanco), como se observa en la Figura 11. Analizando su estructura primaria, se puede notar tanto el alto número de aminoácidos cargados negativamente presentes en la secuencia de c-Fos, comparándolo, por ejemplo con c-Jun (50 presentes en c-Fos versus 27 presentes en c-

Jun) así como el alto porcentaje de prolinas (11). Estas características y su capacidad de ser hiperfosforilada, podría resultar en deficiencias para lograr una estructura estable, que quizás contribuyan tanto a su incapacidad para homodimerizar como a su labilidad y corta vida media.

Más adelante nos referiremos a todos los elementos señalados en la Figura I1 en mayor profundidad.

c-Fos

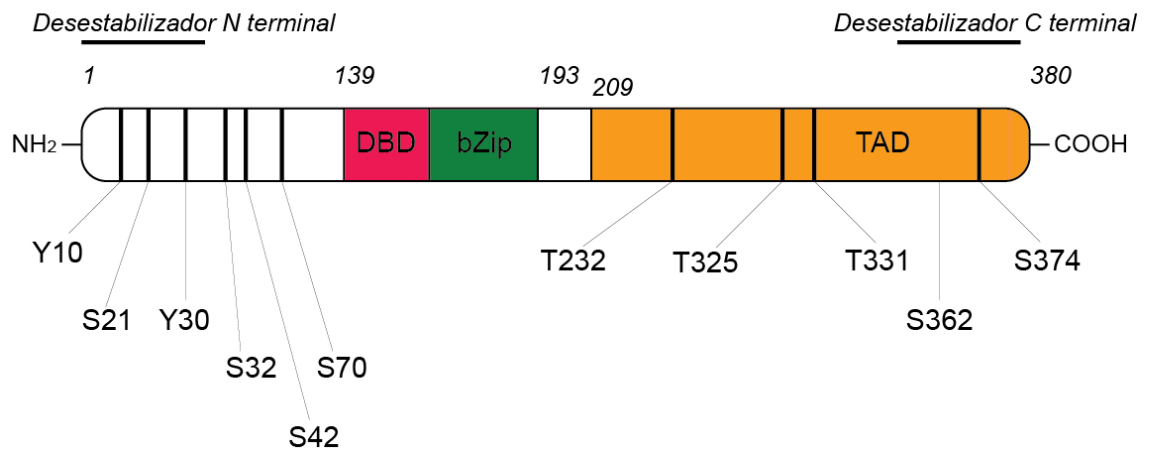


Figura I1. Esquema de la proteína c-Fos. Representación del factor de transcripción c-Fos, desde el extremo amino (NH₂) al extremo carboxilo terminal (COOH). En total presenta 380 aminoácidos y se señalan los dominios de unión al ADN (DBD o “DNA binding domain”), de dimerización (bZip), de transactivación (TAD o “transactivating domain”) y aminoácidos importantes en su regulación (treoninas y serinas seguidas de prolinas o tirosinas como probables sitios de fosforilación). Las tirosinas 10 y 30 han sido reportadas como reguladores de las funciones citoplasmáticas de c-Fos, las treoninas 232, 325, 331 y 374 han sido reportadas como blanco de MAPKs (ERK2 y p38s SAPKs) y la serina 362 ha sido reportada como fosforilada por la quinasa RSK. Los sitios restantes no han sido reportados aún pero al constituirse como serinas seguidas de prolinas podrían representar potenciales residuos fosforilados por MAPKs. También se observan 2 dominios encontrados como desestabilizantes, que contribuyen a la degradación proteica.

1.1. Regulación de la expresión de c-fos a nivel de la activación transcripcional

El promotor de *c-fos* contiene varios elementos transcripcionales regulados por distintos factores de transcripción. Presenta un elemento SRE (Elemento de Respuesta a Suero o “Serum Response Element”), un elemento SIE (Elemento Inducible por c-Sis o “c-Sis Inducible Element”), un elemento TCF (Complejo Ternario de Factores o “Ternary Complex Factor”) un elemento CRE (Elemento de Respuesta a Calcio o “Calcium Response Element”) y un sitio AP-1/CRE (18) (Figura I2). Una gran variedad de

estímulos son capaces de inducir el promotor de *c-fos*, entre ellos múltiples factores de crecimiento como el EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico o “Epidermal Growth Factor”) a través de su receptor EGFR, un receptor de tipo tirosina quinasa (TKR), el PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas o “Platelet Derived Growth Factor”) también mediado por su receptor TKR, el suero, y otros factores que activan diferentes tipos de receptores como, por ejemplo, receptores acoplados a proteína G o GPCR (“G Protein Coupled Receptor”) o ésteres de forbol como el TPA a través de la activación de la vía de PKC (“Protein-Kinase C”). Además de todos estos mitógenos, el promotor de *c-fos* también es inducido dentro de la célula, luego de eventos desencadenantes de estrés como la radiación ultravioleta o UV (19).

El elemento SRE está involucrado en la inducción de *c-fos* en respuesta a factores de crecimiento y a ésteres de forbol; el SRE une a la proteína SRF (“Serum Response Factor”) en asociación con TCF (“Ternary Complex Factor”), un complejo proteico que contiene a la proteína ELK-1 (ETS-“domain Transcription Factor”) o a SAP-1 (SRF “Accessory Protein”), ambos blancos de fosforilación mediada por ERK2 y PKC (20-22) en respuesta a factores de crecimiento. Por otra parte, se observó que ELK-1 es fosforilada por JNK en respuesta a UV, induciendo la transcripción de *c-fos* independientemente de la vía de ERK2 (23). ELK1 también es fosforilada por p38 SAPK en respuesta a LPA (o Ácido Lisofosfatídico, que presenta gran afinidad por receptores de tipo GPCR) en células de la glía (24). El elemento SRE responde también a la activación por el receptor muscarínico M1, un receptor acoplado a proteína G (25).

En el elemento SIE se unen tanto factores de transcripción de la familia de las STATs (“Signal Transducers and Activators of Transcription”) como TFII (“Transcription Factor II”) (26) y contribuiría a la inducción de *c-fos* en respuesta a PDGF y a interferón gamma (27,28).

El sitio CRE responde a aumentos en los niveles de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico) activándose a través de la fosforilación de la proteína CREB mediada por PKA (29); o de CaM quinasa, en respuesta a cambios en el calcio intracelular (30).

Finalmente, el sitio AP-1, adyacente al SRE, uniría heterodímeros AP-1 como así también factores de transcripción CREB/ATF2, y actuaría regulando negativamente la transcripción de *c-fos* por retroalimentación negativa (31).

Así como los factores de transcripción que activan al promotor de *c-fos* deben estar fosforilados para inducir la transcripción del mismo, también deben eliminarse esas fosforilaciones para poder terminar con la señal. La desfosforilación de los factores de

transcripción involucrados en la activación transcripcional de *c-fos* sería un importante paso regulatorio para evitar la persistencia de los efectos celulares desencadenados por c-Fos. Algunos ejemplos que se pueden nombrar son la fosfatasa PP1 (“Protein Phosphatase 1”, una serin-treonin fosfatasa formada por 2 subunidades, una catalítica y otra regulatoria), desfosforila a CREB (32) y PP2A (“Protein Phosphatase 2A”, también es una serin-treonin fosfatasa compuesta por 3 subunidades) que actúa desfosforilando a TCF-ELK-1 (33). Estos factores de transcripción desfosforilados no son capaces de activar la transcripción de sus genes blanco, lo que impide que la transcripción continúe en el tiempo.



Figura I2. Esquema del promotor de *c-fos*. En este esquema se muestran los distintos elementos de unión a factores de transcripción del promotor de *c-fos* y la ubicación de los mismos; de 5´ a 3´ el elemento SIE (-348), un elemento TCF (-321), un elemento SRE (-319), un elemento AP-1/CRE (-211) y el elemento CRE (-63).

Todos los estímulos previamente mencionados, pero en particular aquellos que llevan a la proliferación celular, inducen de manera rápida y transitoria la expresión del ARNm de *c-fos*. Utilizando células NIH3T3 (fibroblastos murinos) o NIH3T3 que expresan establemente el receptor muscarínico M1 (un tipo de receptor de acetilcolina de tipo GPCR) (células NIH3T3 m1.2), pudimos constatar esta rápida y transitoria aparición del ARN mensajero de *c-fos* luego del tratamiento con agentes mitógenos (PDGF y Carbacol o Ch respectivamente). En la Figura I3 evaluamos la cantidad de ARNm de *c-fos* endógeno luego de una curva de tiempo de activación tanto de PDGF, Figura I3 B, como de carbacol, Figura I3 A. En ambos casos, se observa un pico máximo de mensajero aproximadamente a los 30 minutos luego del estímulo, que rápidamente comienza a disminuir hasta llegar a menos del 50 % de esa cantidad a los 60 minutos y que luego disminuye hasta valores menores que los basales a las 2 o 4 horas. Por las características de esta inducción es que se ha denominado a *c-fos* como uno de los genes modelo denominados de respuesta temprana (“Early Responsive Genes”, ERGs) o de respuesta inmediata (“Immediate-Early Responsive Genes” IEGs).

Si bien, como se ha mencionado en párrafos anteriores, las características de la activación transcripcional están descritas o al menos se han producido una multiplicidad de reportes al respecto, no muchos estudios se han abocado a tratar de explicar el porqué de la rápida degradación del ARNm de *c-fos*. Esta fue una de las motivaciones iniciales para este trabajo, dado que el apagado de la actividad del promotor no alcanza para explicar la disminución casi inmediata del ARNm, nos interesamos en dilucidar cuáles eran los caminos de transducción que regulan este proceso.

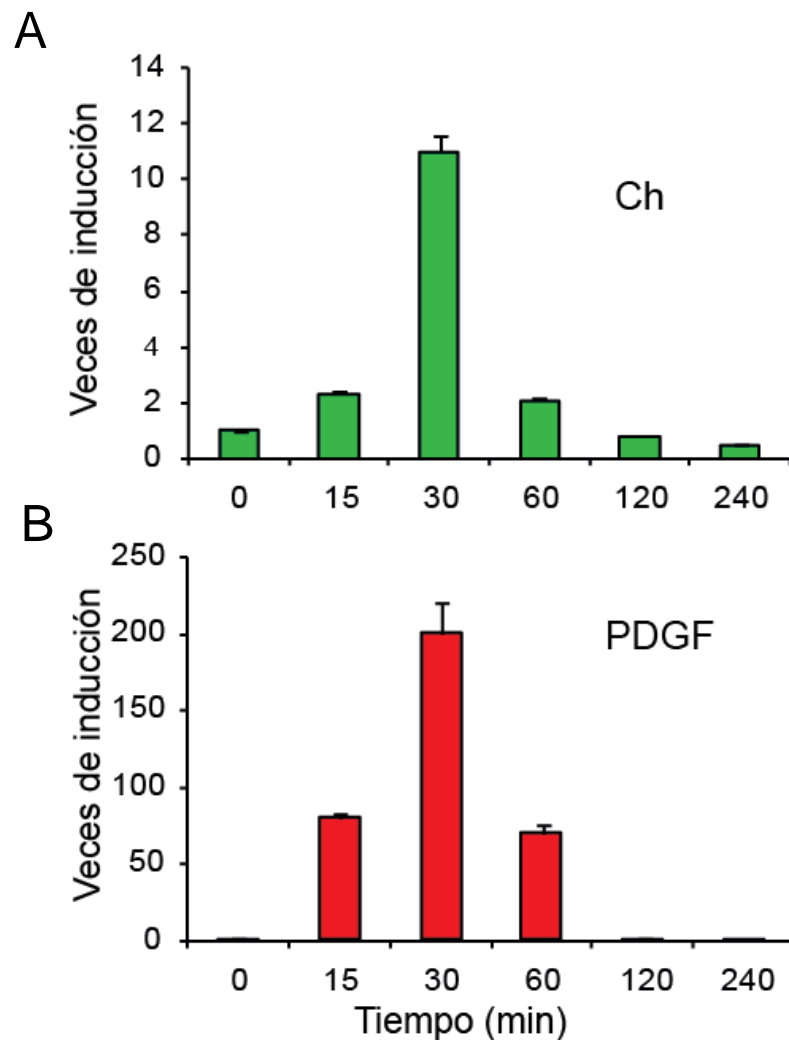


Figura I3. Inducción de la expresión de *c-fos*. A, Células NIH 3T3 que expresan establemente el receptor muscarínico M1 (m1.2) fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas y luego estimuladas durante los tiempos indicados con el agonista carbacol (Ch) a una concentración final de 100 mM. El ARN de estas células fue extraído y se analizó la presencia del mensajero de *c-fos* mediante RT-qPCR, se normalizaron los valores midiendo ARNm de actina. B, Idem A pero en células NIH3T3 y tratando con PDGF a una concentración final de 100 ng/mL.

1.2. Regulación de la expresión de *c-fos* a nivel del ARN mensajero

El nuevo mensajero de *c-fos* sintetizado en el núcleo viaja al citoplasma donde es traducido, pero sólo por un breve período antes de ser degradado rápidamente. La interrupción de la transcripción así como la degradación contribuyen a que el mensaje de *c-fos* sea transitorio.

Estudiando las características estructurales de su ARN mensajero, se han determinado varios elementos importantes que determinan su destino final. En principio, experimentos realizados en células NIH3T3 demostraron que existen 2 regiones que son esenciales para seguir la vía de degradación dentro de la secuencia de nucleótidos del mensajero de *c-fos*: una región rica en adeninas y uracilos en su extremo 3' no traducible o 3'UTR (ARE, "Adenin and Uracil Rich Element"); y otra rica en purinas (CRD, "Coding Region Determinant") presente en la secuencia codificante. Estas 2 regiones actuarían mediante vías de degradación diferente (1) (Figura I4). Inicialmente se observó que eliminando una región de 67 pares de bases (pb) presentes en la región 3'UTR de *c-fos* y a una distancia de 120 pb de la señal de poliadenilación, le otorgaba al gen *c-fos* la capacidad de transformar células (34). Este fue un primer indicio de la posible evolución de estas de regiones regulatorias dentro de la secuencia del ARNm de *c-fos* que pueden impedir que este actúe como un oncogén.

El tratamiento de células NIH3T3 con actinomicina D afecta de manera diferencial la degradación de reporteros quimera con las regiones CRD o ARE. En el caso del ARE, la inhibición de la transcripción con este agente farmacológico afecta de manera significativa la tasa de degradación, mientras que este efecto no se observa en reporteros que expresan el CRD en su secuencia (1). Posteriormente se elucidó que en la región rica en purinas o CRD se asocian factores que favorecen un mecanismo de degradación del ARNm de *c-fos* acoplado a la traducción y que requeriría de la misma (35,36). Se han reportado algunas proteínas que estarían formando complejos entre la CRD y la cola de poli(A) y que serían las responsables de esta degradación acoplada a la traducción, ellas son: AUF1 (una proteína también reportada como asociada a regiones ricas en adeninas y uracilos o AREs), PABP1 (Proteína de unión a poli(A)), PAIP1 (Proteína asociada a PABP1), SYNCRIP o hnRNP Q (en principio denominada NSAP1, Ribonucleoproteína Heterogénea Nuclear Q) y UNR o CSDE1 (Proteína con dominio "Cold Shock" E1) (37).

En cuanto a las características de los procesos que involucran a cada uno de los elementos, tanto la degradación mediada por el ARE como aquella provocada por el CRD presentan cinéticas bifásicas: 1) Fase de retardo o "lag": se acorta la cola de

poli(A), evento que no produce una disminución de las moléculas totales de ARNm, ya que todas las moléculas se acortan hasta una cierta longitud mínima (en general quedan entre 10 y 60 adeninas); 2) posteriormente esos mensajeros con colas de poli(A) pequeñas son degradados por completo siguiendo una cinética de primer orden (38).

Sobre el ARE se sabe que se asocian al menos 3 factores proteicos distintos. Estas proteínas se denominan AUBPs (dado que se unen a esas regiones ricas en Adeninas y Uracilos). Algunas de ellas se expresan de manera constitutiva, mientras otras son inducidas en momentos particulares. Se ha reportado la unión de AUF1 (39,40) y KSRP (41,42) a esta región. Ambos factores promueven la degradación del ARNm de *c-fos*, y en el caso de KSRP, a través de su asociación con factores que componen el complejo exosomal, encargado de degradar mensajeros (43). Muchos reportes han evidenciado la unión de la AUBP HuR como proteína estabilizadora general y particular en el caso del mensajero en cuestión (44,45).

No hay información detallada acerca de las vías de señalización que se encontrarían regulando el pegado y despegado de estos factores a los elementos presentes en la secuencia del ARNm de *c-fos*. Una revisión de estudios en distintos sistemas nos brinda algunas claves. HuR parece ser regulada por quinasas del ciclo celular, como la Quinasa del Checkpoint 2 o Chk2 (46,47), o la Quinasa Dependiente de Ciclinas 1 o Cdk1 (48). También parece ser fosforilada por PKC (49-52) y por p38 α SAPK (53). Por otra parte KSRP sería regulada por p38 β SAPK (54). También se han propuesto modelos para poder explicar como es que estos factores podrían estar modulando la degradación post-transcripcional de los mensajeros que poseen AREs, algunos de los cuales indicarían que podría existir un pegado excluyente de las AUBPs, en donde el balance de pegado entre proteínas estabilizadoras y desestabilizadoras determina el destino de los mensajeros (55). Este balance en el pegado puede tener que ver tanto con modificaciones post-traduccionales de las AUBPs u otras proteínas involucradas, como con su localización subcelular y la cantidad relativa de las mismas.

1.3. Regulación de la vida media de c-Fos

Así como su mensajero, la proteína c-Fos también es muy inestable. Se sabe que es degradada por el proteasoma sin necesidad de ubiquitinación previa, hecho inusual dado que la mayor parte de las proteínas requieren poliubiquitinación para ser degradadas por el proteasoma (56-59). La degradación de c-Fos dependería de dos dominios principales, uno ubicado en el extremo N-terminal y otro en el C-terminal (Figura I1) (56,59). El dominio C-terminal regularía la degradación de c-Fos tanto en células proliferando de manera asincrónica como en aquellas que están transitando el pasaje G0/G1, mientras que el dominio N-terminal sólo funcionaría en G0/G1 (60). La actividad del dominio C-terminal dependería de la fosforilación por parte de RSK1/2 y ERK1/2 de dos residuos: S362 y S374 respectivamente (ausentes en la versión estable viral v-Fos) (61).

1.4. Modificaciones post traduccionales de c-Fos

Una de las modificaciones post traduccionales más estudiadas, que afecta la actividad y vida media de c-Fos, es la fosforilación. Uno de los primeros reportes en los que se estudió la fosforilación de c-Fos, muestra que esta proteína es fosforilada *in vitro* por PKA, PKC y p34cdc2 (62) en regiones reportadas como inhibidoras de su actividad transcripcional.

La fosforilación de c-Fos en sitios ubicados entre los últimos 20 aminoácidos sería necesaria para que pueda actuar como trans-represor de su propia expresión (63). Se determinó posteriormente que existiría una cinética secuencial de fosforilaciones: primero se fosforilarían las serinas 362 y 374 (por RSK y ERK), permitiendo así la posterior fosforilación de las treoninas 331 y 325 por ERK2 modulando la transformación inducida por c-Fos, su localización subcelular y su degradación (61,64). Otros reportes han mostrado como las fosforilaciones en el extremo C-terminal de c-Fos por ERK2 en las treoninas 232, 325, 331 y en la serina 374 en respuesta a PDGF, aumentan tanto la actividad transcripcional de c-Fos como su capacidad transformante (65) (Figura I1).

Por otra parte, trabajos de nuestro laboratorio determinaron que p38 SAPK también regula la actividad de c-Fos. En principio, observamos que p38 γ SAPK interactúa con c-Fos en ensayos de doble híbrido. Luego, que todas las isoformas de p38 SAPK son capaces de fosforilar a c-Fos *in vitro*. Finalmente, estas quinasas son responsables de la localización nuclear de c-Fos y de la capacidad de c-Fos de unirse a sitios AP-1, luego del tratamiento con luz UV (66).

Finalmente, existen estudios que reportan una actividad de c-Fos no relacionada con su rol como factor de transcripción nuclear, sino con la modulación de la síntesis de fosfolípidos en el retículo endoplasmático. Esta función de c-Fos estaría regulada por fosforilaciones en tirosinas presentes en el extremo N-terminal, particularmente en las tirosinas 10 y 30 (Figura I1) (67).

2. MAPKs

Las cascadas de señalización que involucran a las MAPKs o quinasas activadas por mitógenos ("Mitogen-Activated Protein Kinases"), se encuentran conservadas en muchos organismos. Si bien una variedad muy amplia de estímulos pueden activar estas vías, la existencia de múltiples vías de MAPKs (en mamíferos se conocen 14 genes para MAPKs y 7 vías de señalización (68)), les permite a las células responder de manera específica según el estímulo del que se trate. El estímulo no sólo puede comprender a moléculas mitógenicas, como los factores de crecimiento EGF o PDGF, sino también otro tipo de agonistas como hormonas (Insulina u Hormona de Crecimiento), citoquinas inflamatorias (moléculas de la familia del TNF, "Tumor Necrosis Factor") y el estrés ambiental, como el estrés osmótico o la radiación ionizante.

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

Las MAPKs fosforilan serinas o treoninas seguidas de prolinas. Estos pares Ser - Pro o Tre - Pro pueden estar dentro de una secuencia consenso más compleja, aceptada como la secuencia de reconocimiento para sus sustratos [(Pro/residuo no polar)-Leu-(Ser/Thr)-Pro] (69).

Las MAPKs son activadas por fosforilación dual en treonina y tirosina, separadas por otro residuo, conformando el motivo TXY, donde la letra X puede representar varios aminoácidos distintos. Y dado que las MAPKKs son las responsables de estas fosforilaciones, son consideradas como quinasas de fosforilación dual. La identidad del aminoácido intermedio define a las distintas subfamilias de MAPKs. Actualmente se

pueden definir tres subgrupos o subfamilias (subfamilia ERK, subfamilia p38 y subfamilia JNK) (Figura I5).

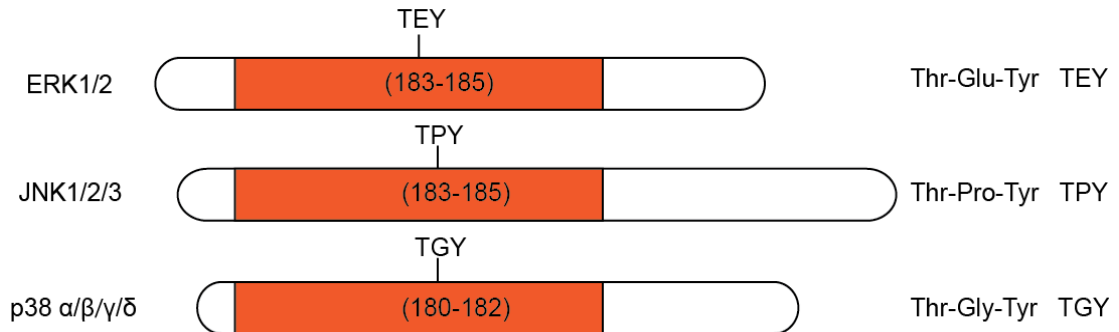


Figura I5. Sitios consenso de fosforilación por MAPKKs (quinasas de fosforilación dual) sobre MAPKs. Se indican las quinasas representativas de las tres cascadas más estudiadas de MAPKs, junto con los miembros más representativos de cada una. Las MAPKs son reguladas por la fosforilación dual de residuos treonina y tirosina en los aminoácidos que se muestran en blanco en los esquemas. La pertenencia a una dada familia de MAPKs es determinada por el residuo que se encuentra entre los sitios de fosforilación.

La localización de las MAPKs es predominantemente citoplasmática en células quiescentes. Sin embargo luego del tratamiento de las células con suero, se observa su translocación al núcleo (70), fenómeno que algunos autores muestran como índice inequívoco de activación. Esta característica es coherente con el hecho de que la mayoría de los sustratos de MAPKs son proteínas que se unen al ADN y son de localización nuclear (factores de transcripción).

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

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

otro activo como las proteínas G pequeñas (Ras, Rac, Rho, cdc42) que activan a las MAPKKKs (71).

Por otra parte, se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que constituyen una gran superfamilia de proteínas. En el exterior de la célula, estos receptores reciben un ligando, y en el interior celular activan proteínas G heterotriméricas. Los GPCRs presentan una estructura de siete pasos de membrana, con su extremo amino terminal orientado hacia el exterior y su extremo carboxilo terminal hacia el lado citoplásmico en donde se acopla una proteína G heterotrimérica. Estas, compuestas por las subunidades α , β y γ se encuentran acopladas al receptor cargadas con GDP mediante la subunidad α del complejo. Cuando el receptor se activa, la subunidad α intercambia el GDP por GTP y el complejo se disocia en la subunidad α y el dímero β - γ . Tanto la subunidad α como la β - γ pueden activar vías de señalización, y si bien el más estudiado es aquel que involucra la activación a través de la subunidad α , las MAPKs reciben su señalización a través de β - γ (72).

Un ejemplo de GPCR es el receptor que utilizamos en este trabajo, el receptor muscarínico M1. Este receptor se ha utilizado como modelo en el estudio de señales proliferativas activadas por receptores acoplados a proteínas G (73) ya que induce la transformación celular cuando es estimulado con el agonista Carbacol.

Ambos tipos de receptores controlan la actividad de las distintas MAPKs llevando a la activación de las MAPKKKs que a su vez activan a las MAPKKs y estas a las MAPKs (74,75).

En la Figura I6 se esquematizan las cascadas clásicas de MAPKs.

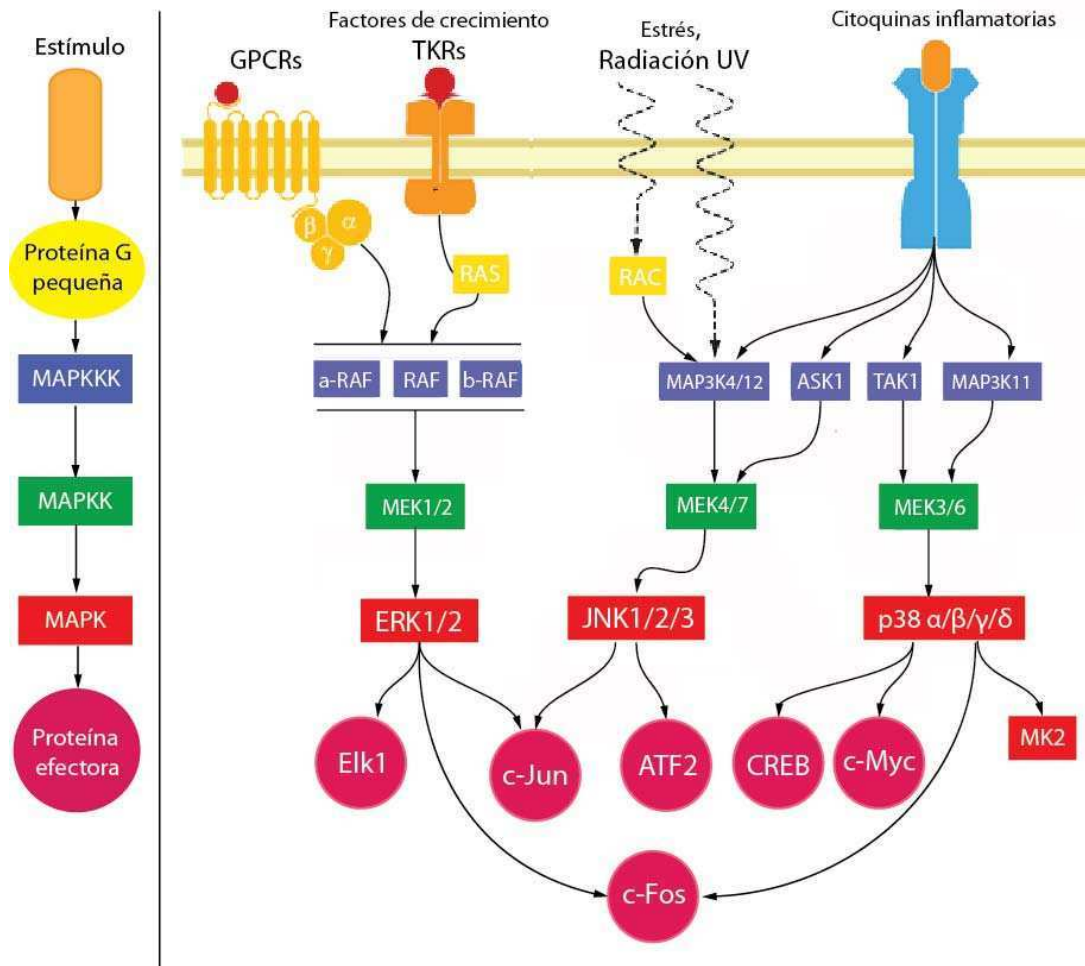


Figura I6. Esquema de las cascadas de señalización de MAPKs (Adaptado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Signaling-Pathways/Mitogen-Activated-Protein-Kinase-MAPK/Mitogen-Activated-Protein-Kinase-MAPK-Overview.html>). Diversos estímulos activan factores intercambiadores GEFs, que cargan GTP sobre proteínas G pequeñas. Estas, a su vez, activan una cascada de fosforilación, finalizando en la activación de MAPKs y sus sustratos, la mayor parte factores de transcripción.

El apagado de la señal se debe en gran parte a la acción de fosfatasa. Las fosfatasa de especificidad dual, DSP (“Dual Specificity Phosphatases”), que remueven los fosfatos en tirosinas y treoninas del sitio de activación de las MAPKs. Las fosfatasa duales que actúan sobre MAPKs se llaman MKPs, por “MAPK Phosphatases” (76).

2.1. ERK1/2

ERK1 (“Extracellular Regulated Kinase” 1) y ERK2 también conocidas como p44MAPK y p42MAPK respectivamente, son componentes centrales de los caminos de proliferación, se expresan en todos los tejidos estudiados y comparten cerca del 90% de identidad (77).

ERK1/2 son activadas por la fosforilación dual de los residuos Treonina 183 y la Tirosina 185 por la MAPKK MEK1 o MEK2 que a su vez se activa por la MAPKK Raf en respuesta a factores de crecimiento, suero, etc (71,77).

Uno de los ejemplos más estudiados que involucran la activación de ERK2 por receptores TKR es el del receptor de EGF, EGFR. Cuando el EGF se une a su receptor produce su auto-fosforilación que sirve como sitio de anclaje para proteínas adaptadoras que incluyen, entre otras, a Grb2la (78,79). Grb2 recluta a SOS (“Son of Sevenless”) que estimula el intercambio de GDP por GTP en la pequeña proteína Ras (una pequeña proteína G que une GTP) (80). Ras unido a GTP inicia la cascada de proteínas quinasas que incluyen, secuencialmente, a la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK) Raf, que fosforila y activa a la MAPK quinasa (MAPKK) MEK, que a su vez fosforila y activa a la MAPK, ERK1/2 (81-84).

La MAPK fosfatasa, MKP3 defosforila a ERK2 (85) tanto en la treonina como en la tirosina de su sitio de activación. También defosforilan a ERK1/2 las MKS-X y MKP-4 (76). Otro importante regulador de ERK1/2 es la fosfatasa PP2A, pero en este caso actúa de manera activadora, ya que defosforila sitios inhibitorios de la MAPKKK Raf, permitiendo de esta manera que se active la vía (86).

Algunos de los sustratos de ERK1/2 son los factores de transcripción c-Myc, c-Fos y p62/TCF (87), uno de los principales componentes de unión al elemento de respuesta a suero (SRE) en el promotor de *c-fos*.

La activación de ERK1/2 induce señales proliferativas que contribuyen tanto al crecimiento celular normal como al canceroso (88,89). Su actividad enzimática crece con la estimulación de mitógenos y el impedimento de su función previene la proliferación celular en respuesta a diversos factores de crecimiento (90). Este hecho es consistente con que moléculas que activan la vía de ERK1/2, como por ejemplo Ras, se encuentran generalmente mutadas en distintos tipos de cáncer (91) y que la activación constitutiva de moléculas que actúan río arriba de éstas es suficiente para producir tumorigénesis (79,89).

2.2. JNK

Las proteínas de la familia JNK (c-Jun NH₂-terminal “Kinase”) son proteínas quinasas activadas principalmente por estrés y citoquinas (92). Las JNKs son codificadas por tres genes *Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3* (93).

El factor de transcripción c-Jun es fosforilado por JNK en las Serinas 63 y 73 en respuesta al estímulo con ésteres de forbol (TPA) (94). Esta fosforilación se produce en la región amino terminal de c-Jun, que corresponde al dominio de trans-activación. La fosforilación de c-Jun en los sitios que son fosforilados por JNK causa un incremento en la actividad transcripcional (95). Además, se encontró que JNK es capaz de fosforilar a otras proteínas de la familia AP1, incluidas JunB, JunD y ATF2 (96). En cada caso la fosforilación corresponde a motivos Ser/Thr-Pro presentes en los dominios de activación de los factores de transcripción.

Las proteínas JNKs, son activadas por fosforilación dual en treonina y tirosina por MKK4 (también llamada SEK1) y MKK7 (SEK2) (97). La proteína quinasa MKK7 es principalmente activada por citoquinas (Ej.: TNF e IL-1) y MKK4 es principalmente activada por estrés ambiental. La comparación de las propiedades bioquímicas de MKK4 y MKK7 demuestra que mientras ambas pueden activar a JNK por fosforilación dual, hay diferencias en la especificidad del sustrato.

Diversas MAPKKs que activan a JNK han sido reportadas. Estas incluyen miembros del grupo de MEKK (MEKK1 a MEKK4), el grupo de proteínas quinasa mixed-lineage (MLK1, MLK2, MLK3, DLK y LZK) (98), el grupo ASK (ASK1 y ASK2), TAK1 y TPL2 (99).

Se reportaron distintas fosfatasas MKPs que pueden actuar sobre JNK, entre ellas, MKP-7 y VH5, que también regulan a p38 α y p38 β . Otras MKPs como MKP6, MKP2, MKP4 y MKP5 también podrían actuar sobre JNK (100).

Diversos estímulos activan JNK, por ejemplo, radicales libres de oxígenos (ROS), TNF, H₂O₂, sorbitol, etc (101). JNK está involucrada en producción de citoquinas, en la función del sistema inmune, en respuesta inflamatoria, en apoptosis inducida por estrés y durante el desarrollo, en la reorganización de actina y en la transformación celular (102).

JNK también ha sido involucrada en la formación de tumores. La transformación inducida por Ras requiere la activación del factor de transcripción c-Jun (103). Y la tumorigénesis que induce Ras es revertida por la mutagénesis de c-Jun en los sitios de fosforilación por JNK (104). Ha sido reportado que JNK está constitutivamente activa en

varias líneas tumorales y que las acciones transformantes de varios oncogenes han sido dependientes de la activación de JNK (96).

2.3. p38

La primera isoforma de p38 aislada corresponde a p38 α , o MAPK14. Fue encontrada como una proteína de 38 KDa que se fosforila rápidamente en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS) (105). Posteriormente se identificaron otras tres isoformas; p38 β (106), p38 γ (ERK6, SAPK3) (107) y p38 δ (SAPK4) (108). Las cuatro isoformas comparten entre sí un 60-70% de identidad. p38 α y p38 β son ubicuas, mientras que p38 γ y p38 δ se expresan solo en algunos tejidos (109).

Se ha reportado su activación en respuesta a una gran variedad de estímulos como radiación UV, cambios de temperatura, shock osmótico, citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (110-113). y en organismos diferentes. Fueron clonados homólogos de p38 en levaduras (Hog1 & Spc/Sty1) (114) gusano (pmk-2) (115), y mosca (105) entre otros organismos.

Las cuatro isoformas de las p38 MAPKs son activadas predominantemente por las MAPKKs MKK3 y MKK6. (116), mientras que MKK4 sólo activa a p38 α (117) y MMK7 activaría a p38 δ (118). La activación de estas MAPKKs lleva a la fosforilación de las treonina 180 y tirosina 182 en un dominio Treonina-Glicina-Tirosina (TGY) (119).

El hecho de que p38 pueda responder a una cantidad de estímulos tan amplia podría deberse en parte a la variedad de MAPKKs que participan en su activación, que incluyen TAK1 (120) ASK1/MAPKKK5 (121) DLK/MUK/ZPK (122,123) y MEKK4 (124). La sobreexpresión de cualquiera de estas quinasas lleva a la activación de las p38 MAPKs y generalmente también a la activación de JNK, lo que explicaría la coactivación de ambas vías.

También contribuyen a la activación de p38 pequeñas proteínas G de la familia de Rho, como Rac1 y Cdc 42 (125,126), activando a MAPKKs.

Por otra parte existen formas de activación de p38 que son independientes de las MAPKKs. Por ejemplo, p38 α puede activarse por autofosforilación cuando interacciona con la proteína TAB1 (TAB-“activated protein kinase 1-binding protein”) (127).

Nuevamente las encargadas de remover los fosfatos en treonina y tirosina e inactivar a las p38s son fosfatasas de la familia MKP (128). Varios miembros de las MKPs pueden desfosforilar p38 α y p38 β (129).

Además se conocen otros tipos de fosfatasa como la fosfatasa de serinas/treoninas PP2C (Protein Phosphatase 2C). Esta fosfatasa actúa sobre la MAPK HOG1 (homólogo de p38 en levaduras) y también sobre las MAPKKs humanas MKK6 y MKK4 tanto *in vitro* como *in vivo* (130-132).

El primer sustrato de p38 identificado fue MAPKAPK2 o MK2, ("MAP Kinase-Activated Protein Kinase" 2) (133). MK2 y otro miembro de esta familia de proteínas quinasa, MK3, activan varias proteínas incluyendo HSP27 (Small Heat Shock Protein 27) (134) y LSP1 ("Lymphocyte-Specific Protein"). MK2 también regula la actividad de proteínas de unión a elementos ARE o AUBPs como TTP y BRF1 regulando el mecanismo de decaimiento de mensajeros como explicaremos más adelante (135). Por otra parte, se ha observado que p38 β es capaz de regular la actividad de la AUBP KSRP por fosforilación directa (54).

Aproximadamente la mitad de los sustratos conocidos para p38 son factores de transcripción. Algunos ejemplos son ATF-1/2/6 ("Activating Transcription Factor" 1, 2 y 6), SAP-1, CHOP ("Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene" 153, or GADD153), p53, C/EBP β , MEF2C ("myocyte enhance factor" 2C), MEF2A, MITF1 ("Microphthalmia-associated Transcription Factor"), ELK1, NFAT ("Nuclear Factor of Activated T cells"), HBP1 ("High Mobility Group-box Protein" 1) (33,111,136-142). También se observó que fosforilan a CREB (136) y a SRF (143).

Además de MK2, p38 fosforila a otras quinasas, como por ejemplo a MNK1 ("MAPK-Interacting Protein Kinases") que está involucrada en la iniciación traduccional debido a que es una quinasa que fosforila al factor de iniciación eIF-4E ("Eukaryotic Initiation Factor"-4e) (144,145).

Por otra parte, p38 fosforila sustratos que no son ni quinasas ni factores de transcripción. Algunos ejemplos de este tipo de sustratos son: cPLA2 ("Phospholipase A2"), perteneciente a un grupo de enzimas intracelulares conocidas como fosfolipasas A que median la producción de productos lipídicos en respuesta a estímulos extracelulares; NHE-1 ("Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform"-1) una proteína integral de membrana involucrada en la regulación del pH intracelular; Tau (Microtubule-associated Protein Tau) cuya función principal está en el ensamblaje y estabilización de la red microtubular de las células y keratina 8 (Intermediate Filament Protein Keratin 8), una proteína de los filamentos intermedios, uno de los tres sistemas filamentosos del citoesqueleto (146-148).

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

y la enfermedad de Bowel están reguladas al menos en parte por la vía de p38 (149-151). La activación de las vías que involucran a esta quinasa llevan a la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF; a la inducción de enzimas como COX-2, que controla el remodelado de tejido conectivo durante condiciones patológicas a la expresión de enzimas intracelulares como iNOS, un regulador del estado de oxidación intracelular (152-154) a la inducción de VCAM-1 y otras proteínas de adherencia (112), etc.

Las p38 MAPKs están involucradas en la regulación del ciclo celular. La participación de p38 α ha sido observada tanto en levaduras como en mamíferos (155). Las p38s están involucradas en la regulación de las fases G1 y G2/M del ciclo. También se sabe que p38 α se activa en células arrestadas en fase M (156).

En algunos tipos celulares se ha descrito que p38 α y p38 β están involucradas en el proceso de diferenciación celular. Por ejemplo, en la diferenciación de la línea celular de preadipocitos 3T3-L1 en adipocitos, o en la de las células PC12 en neuronas (157,158). Por otra parte, se demostró que la MAPK p38 δ sería necesaria para la diferenciación de keratinocitos (159).

La MAPK p38 está también involucrada en senescencia y supresión tumoral, a través del acortamiento de telómeros, exposición a H₂O₂, activación permanente de la vía de RAS y activación de MKK3 o MKK6 (160-162).

Aún no está claro cual es el rol fisiológico de cada una de las p38 MAPKs. Algunos trabajos postulan que existe un importante antagonismo entre las isoformas p38 α , p38 β y p38 γ , p38 δ en donde las isoformas de p38 α y p38 β activarían la transcripción de genes con sitios de respuesta a AP-1 mientras que p38 γ y p38 δ la inhibirían (163,164). También se ha reportado un antagonismo ente las isoformas p38 α y p38 β en células HeLa y en cardiomiocitos en donde p38 α induce apoptosis y p38 β supervivencia celular (165,166).

La señalización por MAPKs puede inducir tanto la supervivencia y proliferación así como la muerte celular o la diferenciación. El balance entre cada cascada de MAPK es el que determina el destino celular, y este balance, a su vez, está determinado por el tipo de estímulo y el contexto en el que se encuentre la célula (167).

2.4. MK2 o MAPKAPK2

MK2 es una quinasa activada por MAPK perteneciente a la familia MAPKAPK (MAPK Activated Protein Kinase). Esta familia incluye a las quinasas RSKs (RSK 1-4), MNKs (MNK 1 y 2), MSKs (MSK 1 y 2) y MKs (MK 2, 3 y 5) (168).

Si bien en ensayos in vitro tanto ERK1, ERK2 como p38 α son capaces de fosforilar a MK2, el tratamiento con el inhibidor de la actividad de p38 α , SB203580, impide la activación de esta quinasa, sugiriendo que es p38 α su principal activadora (169).

Aunque los primeros sustratos identificados de MK2 fueron proteínas pequeñas del tipo "Heat shock" (134), ellos también incluyen enzimas, reguladores del ciclo celular, proteínas del citoesqueleto y proteínas de unión a ARN mensajeros (170), siendo estas últimas de particular importancia para este trabajo.

MK2 sería la quinasa efectora para la vía de p38 SAPK en el proceso de la estabilización de ciertos mensajeros, como por ejemplo el de TNF α o los de ciertas interleuquinas. A través de la fosforilación de proteínas AUBPs desestabilizantes como TTP o BRF1, MK2 y la vía de p38 producen el secuestro de estos factores por miembros de la familia de proteínas 14-3-3, impidiendo la degradación de mensajeros blanco. Esta estabilización sería temporal hasta el momento en el que se activan fosfatasa encargadas de remover los fosfatos de esas AUBPs y permitir su asociación a las regiones ARE, lo que implica la posterior degradación de los ARNm vía exosoma (171-175).

3. Regulación Post-transcripcional del ARN

Luego del nacimiento de un transcripto primario, producto de la transcripción de un determinado gen, suceden distintos eventos regulatorios hasta que se sintetiza la proteína resultante. Cada etapa de la vida de ese mensaje se encuentra regulada y representa un paso más en el proceso de expresión génica. Podemos nombrar los principales procesos por los que debe pasar un transcripto :

- | | | |
|--|---|-----------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - Edición o "splicing"; - Poliadenilación en 3´; - Presencia del CAP (7-metilguanosina) en el extremo 5´; | } | Transcripto 1 ^{ro} |
| <ul style="list-style-type: none"> - Transporte al citoplasma; - Localización del ARNm; - Estabilidad del ARNm; - Regulación de la traducción. | } | ARN mensajero
maduro |

Cualquier fenómeno que altere alguno de estos procesos da lugar a patologías, sobre todo en el caso de oncogenes o proto-oncogenes, citoquinas o reguladores del ciclo celular, puede resultar en tumorigénesis y en la progresión tumoral.

Una revisión de los mecanismos relacionados con la regulación post-transcripcional de los ARN mensajeros maduros que pueden ser afectados según si se relacionan con cada elemento estructural de los mismos puede observarse en la Figura 17. Básicamente, las alteraciones se relacionan con 3 fenómenos importantes (176):

A) Alteraciones en las secuencias presentes en los ARNms, ya sea por mutaciones puntuales o por deleciones;

B) Alteraciones en las proteínas de unión al ARN:

- Mutaciones que afecten la afinidad por el ARN;
- Problemas de titulación por sobreexpresión de secuencias blanco;
- Baja o alta expresión de estas proteínas;

C) Alteraciones en las cascadas de señalización

- Cambio en la afinidad de las proteínas de unión al ARN por modificaciones post-traduccionales;
- Cambio en las proteínas asociadas o cofactores de las proteínas de unión al ARN.

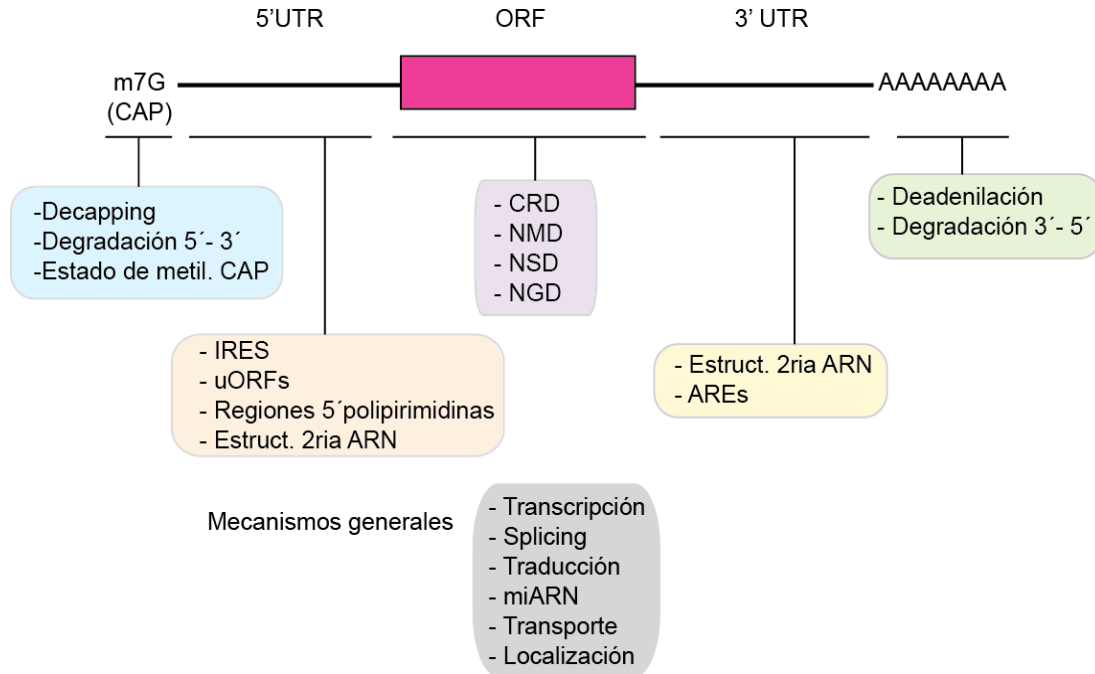


Figura I7. Procesos y eventos regulatorios post-transcripcionales que afectan a los ARN mensajeros. En el esquema observamos los elementos estructurales más importantes de un ARN mensajero: el CAP o 7-metilguanosa, una base modificada que se adiciona en el extremo 5' y que le confiere estabilidad al ARNm; la región 5'UTR o región 5' no traducible; la región codificante también denominada ORF por sus siglas "open reading frame" o marco de lectura abierto; la región 3'UTR; y la cola de poli-adeninas o poli(A), que confiere estabilidad y traducibilidad según su longitud de manera directamente proporcional. Dentro de cada una de las regiones pueden encontrarse secuencias específicas de ARN que determinan la unión o una conformación espacial determinada que puede alterar el destino del ARNm. Por otra parte también se enumeran los mecanismos que actúan sobre cada uno de estos elementos estructurales y otros mecanismos generales.

A continuación presentamos una descripción de algunos de los mecanismos de regulación post-transcripcional relacionados con la estabilidad y degradación más relevantes, según afecten a cada una de las regiones que conforman un mensajero maduro.

3.1. Región 5' no traducible o 5'UTR

IRES (Internal Ribosome Entry Site)

La presencia de un sitio de entrada interno de ribosomas puede significar, para un transcripto, la posibilidad de ser traducido de manera independiente del CAP (177). En el caso de genes particulares que necesiten ser traducidos en circunstancias en donde la traducción dependiente del CAP se encuentre inhibida, como es el caso de la

transición G2/M durante el ciclo celular, la presencia del IRES les permite saltar esta inhibición. El oncogén c-myc está regulado por 4 promotores, de los cuales 2 producen un transcripto con un 5'UTR más largo que contiene una secuencia IRES (178). Tanto c-myc como otros genes que presentan IRES son traducidos de manera específica durante la transición G2/M y la disrupción de esta secuencia puede resultar en una desregulación del ciclo celular.

Marcos abiertos de lectura (ORFs) localizados río arriba del ATG principal (uORFs)

El gen que codifica para la ubiquitin ligasa E3 o Mdm2 presenta este tipo de regulación. Mdm2 activa la degradación del factor de transcripción p53 (179). Gracias al uso diferencial de promotores se generan 2 tipos de mensajeros, uno de ellos presenta un 5'UTR más extenso que el otro y dentro de él 2 uORFs. Estos sitios AUG prematuros disminuyen la eficiencia de traducción de este ARNm (180). Por ejemplo, se ha reportado en ciertas líneas tumorales la presencia predominante de la forma corta, que favorece la sobre-producción de Mdm2, la consecuente represión de p53 y el favorecimiento de la progresión tumoral (181).

Estructura secundaria y proteínas de unión al ARN

En la región 5'UTR también se pueden localizar secuencias que poseen una estructura secundaria a la cual se asociarían factores clave para la regulación de determinados ARNs. Ese es el caso del mensajero de la ferritina, proteína encargada de secuestrar el hierro en exceso, protegiendo a la célula del estrés oxidativo producido por el mismo. La ferritina posee una secuencia IRE ("Iron Regulatory Element") en su región 5'UTR a la cual se asocian proteínas específicas que regulan su traducción o IRPs (182). Mutaciones que afecten la estructura del IRE (que posee una estructura espacial tipo "stem-loop"), pueden llevar a patologías severas como la hiperferritinemia hereditaria, en donde la imposibilidad de unión de las IRPs produce una sobreexpresión de la ferritina y una depleción del hierro celular (183).

Decapping y degradación 5'-3'

Dentro de las células de eucariotas superiores, la mayor parte de los mensajeros presentan tanto una monometil-guanosina en su extremo 5' como una cola de poliadeninas en su extremo 3' cuya longitud puede variar de 150 a 300 nucleótidos (36,184). Estos 2 elementos básicos son necesarios para la correcta traducción y estabilidad de los ARNms. La degradación de un determinado conjunto de ARNs comienza, en general a partir de la deadenilación o el acortamiento de la cola de poli(A) para luego ser degradados o bien en sentido 3'-5' o bien en sentido 5'-3'. Sin embargo existen mecanismos por los cuales a los transcriptos se les puede remover el CAP sin

necesidad de ser deadenilados (185). Los elementos en *cis* que afectan o promueven el decapping y la degradación, han sido descritos como localizados en la región 3'UTR y son las regiones ricas en adeninas y uracilos o AREs. La enzima encargada de remover el CAP mejor caracterizada se denomina Dcp2, pero también intervienen Dcp1, así como otras proteínas “enhancers” del decapping como Edc3 (186). Luego de la remoción del CAP, otras enzimas, entre ellas, la exonucleasa 5'-3' Xrn1 es la encargada de degradar los mensajeros. Por otra parte la falta de metilación en el CAP también es reconocida como una falla en ese ARNm y es eliminado (187).

3.2. Región codificante u ORF

CRD

Como mencionamos anteriormente, uno de los pocos ejemplos de secuencias desestabilizantes presentes en zonas codificantes se encuentra dentro del marco de lectura abierta de *c-fos*. Esta secuencia debe tener una longitud mínima de 87 nucleótidos y se caracteriza por ser rica en purinas (Adeninas y guaninas) (35). Se purificaron ciertos factores asociados a esta región (AUF1, PABP, PAIP1, SYNCRIP/hnRNP Q/NSAP1 y UNR/CSDE1) que se postula generan un puente entre la cola de poli(A), el CRD y los factores de iniciación de la traducción eIF4A, E y G. Esta conformación estabiliza al mensajero, pero solamente hasta que comienza la traducción, momento en el cual se desensambla el complejo y aquellas proteínas que se asocian al CRD quedan expuestas, lo que produce la deadenilación y rápida degradación (dado que ellas reclutan componentes del exosoma) (37,188). Otro oncogén, *c-myc*, también posee una secuencia de pegado de proteínas degradatorias dentro de su ORF. Uno de estos factores se denominó CRD-BP/IGF2BP1 y se reportó que producía el reclutamiento de enzimas endonucleolíticas que promovían el corte y posterior degradación del mensajero de *c-myc* (176).

NMD

Este mecanismo denominado “Non-sense Mediated Decay” detecta y degrada transcritos que contienen codones de terminación de la traducción prematuros o PTCs. Estos PTCs pueden surgir a causa de mutaciones, cambios de marco de lectura, mal procesamiento del ARN o iniciación errónea de la traducción. El complejo encargado de detectar los PTC se encuentra conservado y esta conformado por las proteínas UPF1, 2 y 3. En las uniones de los exones quedan proteínas que funcionan como marcas de splicing y la relación entre estas, el complejo de NMD y la distancia de este último a la cola de poli(A) determina si ese mensajero seguirá un camino degradativo o no (186).

Sin embargo el NMD no funciona solamente en casos de mensajeros aberrantes, sino que se ha visto que regula la estabilidad de diferentes transcritos normales (189).

NSD

El “Non-stop Decay” sucede cuando el codón stop se encuentra ausente, a causa de mutaciones, cambio de marco de lectura o poliadenilación prematura y se caracteriza por el pasaje de los ribosomas por sobre la cola de poli(A). 2 mecanismos aseguran la degradación de este tipo de mensajeros: 1) los ribosomas estancados en el extremo 3’ son detectados y un complejo exosomal es reclutado lo que produce la degradación en sentido 3’- 5’; 2) por otra parte, la remoción de la proteína de unión a poli(A), PABP por los ribosomas que se pasan induce el decapping y la degradación 5’- 3’ (186).

NGD

Uno de los mecanismos de degradación de mensajeros más recientemente descubiertos se denomina “No-go Decay”, primero detectado en levaduras. Si bien todavía no se encuentra completamente descrito, este mecanismo permite detectar ribosomas estancados en los mensajeros, produciendo el corte endonucleolítico en ese sitio. Los ribosomas son liberados y el ARNm es degradado por el exosoma y la exonucleasa Xrn1 (190).

3.3. Región 3’ no traducible o 3’UTR

Regiones ricas en AU o AREs.

La presencia de regiones ricas en adeninas y uracilos fue primero detectada en la secuencia de mensajeros de citoquinas (191). Posteriormente estas secuencias fueron introducidas en mensajeros estables, como el de la beta-globina, comprobándose su efecto como mediadores de una rápida degradación de los mensajeros que las portaban (1,192). Como se ha mencionado anteriormente, la remoción, de lo que posteriormente se conoció como secuencia ARE, del 3’UTR de *c-fos* y su conversión de proto-oncogén a oncogén, transformando las células por la expresión continua de este factor de transcripción (34), fue uno de los primeros indicios de la importancia de la regulación post-transcripcional mediada por estos elementos.

Las regiones AU-rich o ARE se extienden de 50 a 150 pb dentro de los 3’UTR de los mensajeros y, si bien, en la mayor parte de los casos, se asocian con la degradación de los mensajeros mediada por el acortamiento de la cola de poli(A), en algunas ocasiones, pueden llevar a su estabilización (193,194). Se han catalogado en 3 clases según la

presencia y disposición de las secuencias consenso AUUUA. Los ARE de clase I presentan de 1 a 5 copias del pentámero de manera dispersa (*c-myc*, *c-fos*, *CycA*, *CyCB1*, *CycD1*, etc). Los ARE de clase II poseen al menos 2 nonámeros UUAUUUA(U/A)(U/A) en tándem (*GM-CSF*, *TNFalfa*) o bien distintas disposiciones del pentámero AUUUA (se pueden encontrar 5 grupos distintos en esta clase). Finalmente los ARE de clase III no están tan bien definidos dado que no presentan la secuencia AUUUA, pero sí regiones ricas en uracilos (*c-jun*, *p53*, *miogenina*, etc) (194,195).

A partir de estudios con distintos tipos de reporteros se ha encontrado que el acortamiento de la cola de poli-adeninas en los ARNm que poseen secuencias ARE es un paso clave en el proceso de desestabilización. Ya sea un acortamiento sincronizado en donde todas las moléculas llegan hasta una cierta longitud y luego son degradadas (como es el caso de *c-fos*, que presenta una cinética de degradación bifásica) o que el acortamiento sea desincronizado (como sería el caso del mensajero de la citoquina *GM-CSF* o “Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor”), la deadenilación siempre precede a la degradación en el caso de mediar las secuencias ARE. (193).

A los ARE se asocian una serie de proteínas que presentan dominios de unión al ARN denominadas AUBPs o “AU-rich binding proteins”. De las más estudiadas hablaremos más adelante, ellas son HuR, TTP, BRF1, AUF1 y KSRP. Algunas como HuR se relacionan con la estabilización de los mensajeros, dado que al sobreexpresarla se prolonga el tiempo de vida media de los mensajeros a los que se asocia (194,195). Otras como TTP o KSRP se encuentran asociadas a la degradación, reclutando componentes del exosoma y siendo finamente reguladas mediante fosforilaciones (41,54,196,197).

Deadenilación

La deadenilación o acortamiento en la longitud de la cola de poliadeninas de los mensajeros se considera como el primer paso para su degradación masiva. Existen varias enzimas con actividad de deadenilasa, cada una con propiedades únicas, algunas de ellas son CCR4-NOT, PAN2-PAN3 y PARN. En mamíferos, PAN2-PAN3 acortan las colas de poli(A) hasta una cierta longitud (aproximadamente 80 nucleótidos) y luego continúa con la degradación CCR4-NOT. Este última enzima constituye la mayor deadenilasa en mamíferos y está constituida por 9 subunidades (198). PARN es dependiente de la presencia del CAP en los ARN mensajeros y su actividad es inhibida por la existencia de proteínas de unión al CAP (186).

Luego de la deadenilación, la degradación continua o bien en dirección 5´-3´o bien 3´-5´ (198).

Degradación 3'-5'

La degradación de los ARN mensajeros en dirección 3' - 5' es llevada a cabo por el exosoma, un complejo de 10 a 12 subunidades que contiene diversas enzimas ARnasas y ARN helicasas (198). Una vez que el mensajero se ha degradado casi por completo y quedan algunos nucleótidos en el extremo 5', se remueve el CAP, proceso en el cual participan las enzimas de decapping Dcp1 y Dcp2 y otras proteínas como las Lsm1-7 (186,198) como hemos mencionado anteriormente.

3.4. Mecanismos generales

Localización del ARNm

En las células somáticas, los transcritos que se sintetizan en el núcleo son transportados en gránulos hacia lugares específicos del citoplasma. En este viaje se previenen tanto el decaimiento como la traducción hasta llegar al lugar de destino (199). Luego de finalizada la traducción, y al desensamblarse los polisomas, se puede disparar la formación de dos tipos de estructuras granulares citoplasmáticas: los P-bodies o "Processing Bodies" (PBs) o los gránulos de estrés o SGs (200,201). La composición de proteínas de unión al ARN de estos gránulos determina si serán PBs o SGs. Por ejemplo en el caso de las proteínas TIA o TIAR, su sobreexpresión es suficiente para el ensamblaje de los SGs en ausencia de inhibición de la traducción disparada por estrés (202). Otro ejemplo es la proteína G3BP ("GTPase-activating Protein SH3 Domain-Binding Protein"), cuya sobreexpresión también produce la formación de SGs (203). Finalmente la AUBP TTP es capaz de nuclear tanto los SGs como los PBs y de permitir interacciones entre estas dos estructuras (204).

Los P-bodies agrupan la mayor parte de las proteínas relacionadas con la degradación de los ARNm. Estas proteínas incluyen a la exoribonucleasa Xrn1 (205), las enzimas de decapping Dcp1 y Dcp2 (206), así como el complejo Lsm1-7 (207).

En células somáticas tanto los PBs como los SGs contienen micro ARNs y proteínas de la familia Argonauta, componentes del complejo RISC que pueden regular la traducción y decaimiento de muchos mensajeros (208).

En cuanto a su función, aunque todavía no del todo dilucidada, los SGs parecen ser estructuras encargadas de almacenar ARNm importantes para las células mientras estas están siendo sometidas a condiciones de estrés ambiental. De estos gránulos son excluidos los mensajeros, por ejemplo, de las proteínas de respuesta a "heat-shock" (209). Por otra parte, los PBs serían estructuras destinadas a la degradación de los mensajeros. Sin embargo tanto PBs como SGs comparten muchos componentes y se

creo que algunas de esas proteínas, tales como TTP o BRF1 (AUBPs desestabilizantes) serían las encargadas de marcar los ARN mensajeros para ser transportados desde los SGs hasta los PBs y permitir así su degradación (209).

ARNncs o ARNs no codificantes

La clase de ARNs no codificantes más estudiada es la de los micro ARNs o miARNs, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que, en animales, median el silenciamiento génico a través de la regulación de la traducción (210). Se estima que los miARNs controlan la expresión de alrededor de un 60% de los genes codificantes para proteínas. Mientras algunos miARNs son específicos para ciertos mensajeros blanco otros parecen regular un set de genes (210). La síntesis de estos ARNs pequeños involucra a múltiples enzimas, desde proteínas con actividad ARNasa III como Dicer o Drosha, hasta miembros de la familia Argonauta que conforman el complejo RISC ("RNA Induced Silencing Complex"). Una vez que el miARN está cargado en RISC es capaz de dirigir al complejo con actividad endonucleasa hacia los mensajeros blanco específicos, generalmente a través del reconocimiento de secuencias parcialmente complementarias al miARN localizadas en las regiones 3'UTR (210).

3.5. Proteínas de unión a los AREs y vías de transducción de señales involucradas en su regulación

HuR

HuR pertenece a la familia de genes denominados Elav-like, homólogos humanos de los genes Elav de *Drosophila*, que codifican para proteínas esenciales para el desarrollo neuronal. Su sigla significa Embrionic lethal-Abnormal vision (dado que se encontró que era esencial para la formación del sistema nervioso central en embriones y esencial para el desarrollo del lóbulo óptico en neuronas adultas (211)) y los primeros 3 integrantes de esta familia - HuD, HuC/ple21 y HuB/Hel-N1 - fueron descritos como genes expresados exclusivamente en el sistema nervioso (212). Más tarde se caracterizó a HuR como una proteína que se encuentra presente en la mayor parte de los tejidos, con posibles diferencias en su nivel de expresión. HuR presenta 3 dominios de unión al ARN y se asocia a los elementos ricos en adeninas y uracilos presentes en mensajeros de oncogenes y citoquinas. Si bien se asocia a regiones que poseen la secuencia consenso AUUUA también lo hace, y con gran afinidad, a secuencias AUUUUA o AUUUUUUA, sugiriendo que la conformación espacial y no la secuencia en sí de estas regiones ricas en uracilos es la verdaderamente importante para el correcto pegado de esta proteína (213).

HuR es una proteína que, si bien se localiza en el núcleo en la mayor del ciclo celular, es capaz de migrar al citoplasma en determinadas circunstancias (214).

En todos los casos estudiados se ha visto que HuR se asocia a los ARNm que poseen elementos ARE y los estabiliza, sobre todo a aquellos de clases I y II, que son los que presentan las secuencias AUUUA, como los ARN mensajeros de *c-fos*, de la citoquina GM-CSF, de las ciclinas A, B1 y D1, de la ciclooxigenasa 2 o COX-2, del factor de crecimiento vascular VEGF, de la sintasa inducible de óxido nítrico o iNOS, entre otros (44,55,214-217).

Realizamos una revisión de los trabajos publicados acerca de HuR, de su fosforilación y del efecto que esta tenía sobre el destino de los ARN mensajeros target. En la tabla I7 mostramos un resumen de algunas características importantes descritas en estos trabajos.

El estudio de las vías de señalización y de los residuos fosforilados de HuR es relativamente reciente, publicándose el primer trabajo en el año 2007 (46). En este trabajo se describe como HuR estabiliza al gen de respuesta al estrés SIRT1. Luego de un tratamiento con agentes oxidantes, estos complejos HuR-SIRT1 se disocian y esta disociación está mediada por la quinasa Chk2 (Checkpoint Kinase 2). Se ha reportado también como HuR es blanco de fosforilación de una quinasa dependiente de ciclina, la quinasa Cdk1. En este caso la fosforilación produce una acumulación de HuR dentro del núcleo (vía asociación con proteínas de la familia 14-3-3), y la consecuente inhibición del transporte al citoplasma (48). Tanto Chk2 como Cdk1 se encuentran río debajo de la cascada ATM/ATR activada luego de producirse ruptura de una cadena de ADN (activación de ATM) o luego de algún tipo estrés celular como puede ser el tratamiento con agentes oxidativos, con radiación con UV o con inhibidores de la replicación del ADN (activación de ATR). Pero mientras Chk2 es activada por la vía ATM/ATR, Cdk1 es inhibida por esta vía.

De esta manera HuR sería un importante regulador de la respuesta a estrés celular (218). En este contexto la regulación mediada por la vía de p38 SAPK, una quinasa activada por estrés se presenta como una posibilidad coherente. Se publicó en 2009 la fosforilación de HuR por p38 SAPK (53), luego de un tratamiento con radiación gamma.

Además de las quinasas Chk2, Cdk1 y p38 SAPK, también se ha reportado como una isoforma de la quinasa PKC, PKC δ es capaz de fosforilar a HuR. Luego del tratamiento con angiotensina 2, se produce un rápido traslado de PKC δ desde el citoplasma al núcleo, esta quinasa interactuaría con HuR, lo fosforilaría y permitiría el

tráfico inverso de esta proteína desde el núcleo al citoplasma donde estabilizaría sus mensajeros blanco (49-52,219).

Enzima	Residuo	Efecto de la fosforilación	Estímulo	Especie	ARNm target	Referencia	Año
Chk2	S88		Senescencia	Humano	SIRT1	(46)	2007
	S100	Disminuye unión a ARNm					
	T118						
Cdk1	S202 + varios trabajos HTP	Aumenta la localización nuclear, Disminuye unión a ARNm	UVC - Estrés	Humano	N / S	(48)	2008
p38 α SAPK	T118	Aumentaría la unión y translocación al citoplasma	Rad. y - Estrés	Humano	p21	(53)	2009
PKC δ	S221	Aumenta la translocación al citoplasma	Angiotensina II	Humano	COX2	(50)	2008
	S318	Aumentaría la unión al ARNm					
						(51), (52)	2010-11
Posiblemente Cdk1	S242	Produce acumulación en el núcleo	UVC	Humano	Cyc A2 / B1	(220)	2008
?	Y26, Y109	Experimentos High Throughput (HTP)				(221)	2007
?	Y200	Experimentos HTP				(222)	2008

Tabla I8. Resumen del conocimiento actual sobre la fosforilación de HuR. Se describen en la tabla características de las quinasas, residuos fosforilados, ARN mensajeros blanco y efecto de la fosforilación de distintos trabajos publicados hasta la fecha sobre la proteína HuR.

Finalmente existen algunos reportes de otros residuos fosforilados de HuR, particularmente tirosinas de los cuales no existe una caracterización. Estos trabajos constituyen estudios de amplio espectro o de alto rendimiento también denominados

“High-throughput”, que estudian todos los fosfopéptidos celulares en determinadas circunstancias experimentales. Ninguno de los trabajos indicados en la Tabla 17, que describen tirosinas fosforiladas, se dedica al estudio particular de alguna proteína, sino de todas las proteínas fosforiladas por tirosin-quinasa. La presencia de tirosinas fosforiladas no descritas dentro de la secuencia de HuR parece un campo interesante para estudiar su influencia en la regulación de su actividad.

AUF1

AUF1 o hnRNP D fue una de las primeras AUBP encontradas para la cual se haya probado su rol en la estabilidad de los mensajeros (223). El mensajero que codifica para AUF1 sufre de splicing alternativo dando 4 isoformas de distinto peso molecular (p37: no presenta los exones 2 ni 7; p40: posee el exón 2 pero no el 7; p42: presenta el exón 7 pero no el 2; p45: posee ambos exones 2 y 7) (224). Las 4 isoformas de AUF1 presentan una localización nuclear predominante, aunque puede migrar hacia el citoplasma (225). Cada miembro de la familia parece tener distintas funciones que incluyen la activación transcripcional, la unión a ADN telomérico y la traducción, sin embargo todas parecen tener una función común en el mecanismo de transporte de mensajeros y el splicing (225). AUF1 parece asociarse en mayor medida a los AREs de clase I y II, y tener un rol como proteína desestabilizante. Sin embargo, se han reportado tanto casos de desestabilización (c-myc, c-fos, p21, ciclina D1, GM-CSF, IL-3) como de estabilización debidas a AUF1 (c-myc, c-fos, GM-CSF, TNF- α) (194). Otro hallazgo sobre esta proteína indicaría que el efecto de cada isoforma sobre la estabilización sería dependiente del tipo celular con el que se trabaje (226).

En cuanto a las modificaciones post-traduccionales, se ha encontrado que AUF1 p40 está fosforilada en las serinas 83 y 87 y asociada a polisomas en células quiescentes, pero pierde estas fosforilaciones luego del estímulo con TPA (227). La afinidad de AUF1 p40 por el ARN es ligeramente mayor estando fosforilada en estos dos residuos y tendería a estabilizar a los mensajeros (228). Ensayos de fosforilación in vitro indican que la fosforilación en la Ser83 podría ser realizada por PKA y consecuentemente se daría la fosforilación en la Ser87 por la quinasa GSK3 β (228).

Por otra parte se encontró que AUF1 era fosforilada in vitro por la quinasa ALK (“Anaplastic Lymphoma Kinase”) e hiperfosforilada en extractos de células que expresan la quimera NPM-ALK (“Nucleophosmin-Anaplastic Lymphoma Kinase”, expresada en células linfáticas neoplásicas, fruto de una translocación cromosomal) (229). ALK pertenece a la familia de receptores de tipo tirosin quinasa y la formación de quimeras con la proteína NPM u otras, permite su dimerización y activación sin necesidad de estímulo provocando la transformación celular. De esta manera se activan las vías downstream

como las vías de la PLC γ (Fosfolipasa C γ), PI3K (Fosfoinositol 3 Quinasa), STAT3, STAT5 y de las quinasas Src. (229). El resultado final de la hiperfosforilación de AUF1 es la estabilización general de sus ARNm blanco. En cuanto al cambio en la afinidad, esta dependería de su acción sobre los mensajeros a los que se asocia: si AUF1 es desestabilizante, entonces la fosforilación impide su pegado; pero si AUF1 estabiliza, entonces la fosforilación permite su asociación de forma mas estable (229).

TTP

TTP o tristetraprolina (también denominado ZFP36), fue una de las primeras proteínas identificadas de una familia que presenta dominios tipo CCCH “Zinc finger” o dedo de zinc (dominios en los cuales se presentan 3 cisteínas y 1 histidina en tándem, distinto de los dominios clásicos de 2 cisteínas y 2 histidinas). En un principio se creyó que eran factores de transcripción pero luego se descubrió su rol como proteínas de unión al ARN (195). En los primeros trabajos se observó como ratones KO (knock-out) para TTP, presentaban fenotipos de inflamación generalizada: desarrollando artritis inflamatoria, dermatitis, autoinmunidad e hiperdisplasia mieloide. Se encontró entonces que la falta de TTP impedía la correcta regulación de la expresión del factor de necrosis tumoral α o *TNF α* (230). *TNF α* presenta una región de tipo ARE en su ARN mensajero, en donde se asocia TTP llevándolo a degradación. La falta de esta AUBP produce una sobreexpresión del mensajero de *TNF α* que conlleva a los efectos inflamatorios observados. La lista de mensajeros blanco de TTP se fue ampliando con el tiempo: *GM-CSF*, *COX-2* (Ciclooxigenasa 2), *PAI-2* (Inhibidor del Activador de Plasminógeno 2), *IL-3* (Interleuquina 3), *IL-10*, *iNOS* (Sintasa de Óxido Nítrico Inducible) (194).

La expresión de TTP es inducida luego del tratamiento con suero, esteroides de forbol, insulina y LPS (Lipopolisacáridos) entre otros estímulos, en varios tipos celulares (231). El modelo indicaría que, mientras las células se encuentran en estado quiescente, la cantidad basal de TTP y otras AUBPs presentes, controlan la expresión, también basal, de los mensajeros blanco. En un estado estimulado, la gran cantidad de ARNm sintetizados requiere una mayor cantidad de proteína desestabilizante para ser controlada y se induciría también la expresión de TTP y de otras proteínas de la familia (195).

TTP presenta una distribución principalmente citoplasmática al ser inducido, en contraste con HuR y AUF1 (230,232) y parece tener preferencia únicamente por los ARE de clase II (194).

En cuanto a las modificaciones post-traduccionales, TTP presenta una variedad de formas fosforiladas que son dependientes de la vía de p38 SAPK. En un principio se

observó que la quinasa activada por p38, MAPKAPK2 o MK2 fosforila in vitro a TTP produciendo el mismo patrón que se observa en western blots de TTP endógeno, sugiriendo un posible rol en su regulación (233). Se observó que las formas fosforiladas de TTP poseen menor afinidad que las no fosforiladas por el ARN (232).

TTP estaría formando parte de los denominados “gránulos de estrés” o SGs, uno de los posibles lugares en donde se llevaría a cabo la degradación de los mensajeros, de hecho la sobreexpresión de esta proteína sería suficiente para la formación de los SGs en ausencia de estímulo. Luego de su fosforilación por MK2 o por p38 SAPK, TTP se vería excluido de los SGs, y se asociaría a proteínas de la familia 14-3-3 hecho que impediría el decaimiento de los mensajeros blanco (171). Por otra parte TTP se asocia con proteínas involucradas en la degradación de mensajeros, tanto aquellas que forman las estructuras denominadas “P-bodies” (Bodies) como con otras que no (197).

También se encontró que el mensajero mismo de TTP posee un ARE, que TTP es capaz de unirse a su propio mensajero limitando su expresión y que la vía de p38 SAPK estabiliza su mensajero de la misma forma que sucede en otros casos de unión de TTP (172).

Por otra parte la fosfatasa PP2A compete con la proteína 14-3-3 por el binding a TTP y la defosforila activando el decaimiento de los mensajeros (174). La Caseína-quinasa 2 también regula la actividad de TTP pero de manera indirecta, activa a la fosfatasa MKP1 que defosforila a p38 SAPK e impide la inhibición de TTP (234).

Por lo tanto el modelo de regulación de TTP hasta el momento indicaría que luego del estímulo se induce su transcripción así como la de sus mensajeros blanco. El estímulo también activa la vía de p38 SAPK, siendo MK2 la quinasa principal que fosforila a TTP. TTP fosforilada se asocia a proteínas 14-3-3 que la secuestran e impiden que forme parte de los SGs o de los P-bodies, impidiendo la degradación de los ARNs. Posteriormente la activación de la fosfatasa PP2A, remueve las fosforilaciones de TTP activando su función desestabilizadora y localizándolo en las estructuras de degradación de mensajeros (los SGs y los P-bodies).

BRF1

BRF1 (Butyrate Response Factor 1) es otro miembro de la familia CCCH zinc finger, denominado también ZFP36L1. Clonado y caracterizado posteriormente a TTP (235), se ha encontrado que como esta última, BRF1 es capaz de estimular la deadenilación de mensajeros (236). BRF1 también posee funciones como factor de transcripción en promotores de la ARN polimerasa 3, que codifican para ARN de transferencia, es llamado TFIIB90 (237).

Al igual que TTP, BRF1 es capaz de unirse a los ARE en los ARNms y redirigirlos hacia los P-bodies en donde serían degradados (238).

Se ha encontrado que la actividad de BRF1 está regulada por AKT, que fosforilaría a BRF1 en sitios luego reconocidos por proteínas de la familia 14-3-3, lo que podría implicar un mecanismo de regulación similar al descrito para TTP (239). MK2 también sería capaz de fosforilar a BRF1 inhibiendo su capacidad de estimular el decaimiento de los mensajeros (175). La inhibición de la vía de PI3K-AKT, conduce a la estabilización de mensajeros blanco de tanto de BRF1 como de KSRP, confirmando que esta vía podría estar regulando la actividad de estas proteínas desestabilizadoras (240).

KSRP

KSRP fue identificada como perteneciente a la familia de proteínas FBP. FBP significa “proteína de unión a elementos FUSE (“Far Upstream Element”)”, rico en adeninas y timinas, presente río arriba del promotor del oncogén c-myc. Los miembros de esta familia son 3: FBP1, 2 y 3. KSRP o FBP2 tiene un tamaño de aproximadamente 75 kDa, presenta 4 dominios de unión al ARN del tipo KH (por su homología con dominios presentes en la ribonucleoproteína heterogénea nuclear hnRNP K) y se encontró involucrada en múltiples procesos celulares, como el splicing, la traducción, la degradación de mensajeros o la maduración de microARNs (241). Se ha reportado que KSRP se une a elementos ARE y se encarga de reclutar a deadenilasas y proteínas del exosoma produciendo la rápida degradación de los mensajeros blanco (41-43). Se ha encontrado que KSRP forma un complejo junto con la deadenilasas, el componente del exosoma RRP44 y a enzimas de “decapping” o que se encargan de remover el CAP de los mensajeros.

En lo que respecta a regulación a través de vías de transducción de señales, se ha visto que p38 β SAPK fosforila a KSRP en la treonina 692 e impide que se una al mensajero de p21 en un modelos de diferenciación de mioblastos (54). Por otra parte, Akt fosforila a KSRP en la serina 193 y esa fosforilación permite la asociación con la proteína 14-3-3zeta, su acumulación en el núcleo y el impedimento de migrar al citoplasma y desestabilizar el mensajero de beta-catenina (242,243).

KSRP también posee un rol en el procesamiento tanto de los pri-miARN (microARNs primarios) a pre-miARNs (precursores de miARNs) como de pre-miARNs a miARNs. KSRP se uniría a estos precursores y se asociaría a Dicer y Drosha (2 enzimas encargadas de procesar estos ARNs pequeños) promoviendo la maduración de ciertos pri-miARNs (244).

En modelos in vitro se ha visto que tanto KSRP como TTP son esenciales para la degradación del ARE de *c-fos* (42).

La Figura 18 resume todas las vías de señalización encontradas hasta el momento que regulan el decaimiento del ARN mediado por los elementos ARE. La Figura muestra como estas vías afectan la actividad de las proteínas de unión a los ARE en cuanto a su función estabilizadora o desestabilizadora.

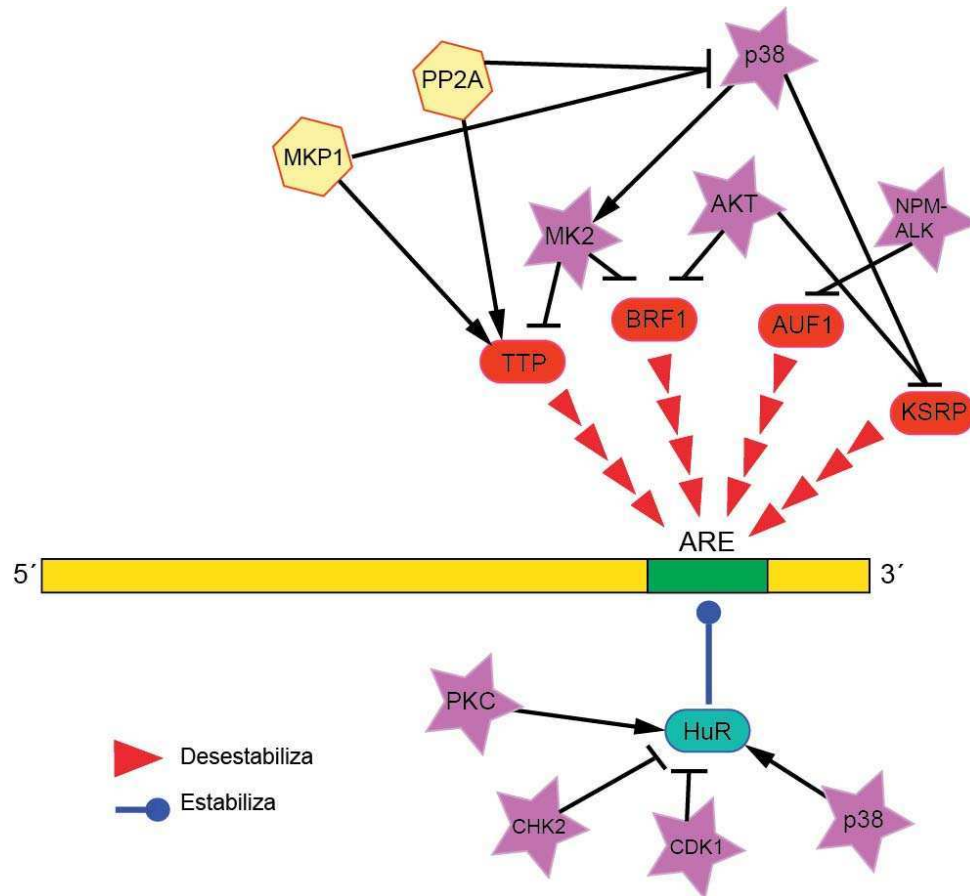


Figura 18. Esquema de las vías de señalización que influyen directamente sobre el decaimiento del ARN. Tomado de (245). En el esquema se puede observar un resumen de todas las vías de señalización que actúan sobre las proteínas de unión a los ARE y su efecto sobre el decaimiento de los mensajeros. Los hexágonos indican fosfatasas, las estrellas proteínas quinasas y las cápsulas proteínas AUBPs. Las flechas con punta indican activación mientras que las flechas cortadas indican inhibición de su actividad.

OBJETIVOS

La llegada de señales proliferativas a células en cultivo induce la rápida expresión de una serie de genes llamados colectivamente "Immediate-Early Responsive Genes" o IEGs, entre los cuales se encuentran una variedad de factores de transcripción incluyendo los de las proteínas de la familia AP-1 como c-Jun y c-Fos. Nuestro interés se concentra en el estudio de los caminos de transducción de señales que afectan a la expresión del proto-oncogén *c-fos* en particular y en los múltiples niveles afectados por los mismos, desde que el promotor de *c-fos* es inducido hasta que su señal desaparece de la célula. Sin embargo, el estudio de los mecanismos de encendido de las respuestas celulares al medio externo ha recibido significativamente mucha más atención que el estudio de los mecanismos de apagado, aunque siempre se mencione la posibilidad de que también estén sujetos a una fina regulación. Este argumento resulta absolutamente lógico si pensamos que la importancia de su momento de participación funcional en la vida de la célula implica el estar ausente o apagado previamente.

Las cascadas de señalización participan del control de la expresión génica mediante la unión de proteínas regulables por fosforilación a los ácidos nucleicos. Más allá de regular la actividad de los promotores de genes, también regulan la actividad de proteínas que se unen a moléculas de ARN precursoras de los ARN mensajeros, regulando su procesamiento y resultando en la producción de formas alternativas de los mismos. Además regulan la expresión y actividad de proteínas que se unen a regiones ricas en Adeninas y Uracilos (o AUBPs), en general localizadas en las regiones 3' no codificantes de ARN mensajeros, estabilizándolos o promoviendo su degradación. El descubrimiento de estas proteínas y su potencial regulatorio es relativamente reciente. Hasta el momento, la regulación de *c-fos* a nivel de la estabilidad de su ARN mensajero, se ha enfocado en mayor medida en el estudio estructural de su secuencia pero no así en los caminos de señalización que regulan su degradación.

Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis es estudiar la respuesta molecular a las señales extracelulares que determinan el compromiso con eventos clave en la vida de una célula viva como lo es el control de la proliferación celular. Intentamos describir los caminos de transducción de señales que regulan el apagado de la expresión de genes de respuesta temprana como *c-fos*, estudiando específicamente los mecanismos que regulan la estabilidad de su ARNm.

Los objetivos específicos son:

- Obtener y poner a punto un sistema para el estudio de la regulación post-transcripcional de *c-fos*.
- Estudiar las vías de señalización involucradas en la regulación post-transcripcional del ARN de *c-fos*.
- Estudiar los factores asociados al ARN mensajero de *c-fos* que sean importantes en su procesamiento.
- Estudiar la relación entre estos factores y quinasas encontradas.

RESULTADOS

Las figuras presentadas en la presente sección son representativas de, al menos, 3 ensayos independientes

1. Observaciones preliminares

Nuestro grupo de trabajo se ha abocado al estudio de la regulación de la expresión génica por caminos de transducción de señales desencadenados por estímulos extracelulares. En los últimos años hemos elegido el modelo del proto-oncogén *c-fos* y hemos estudiado cómo se regula su expresión a través del estudio de cascadas de señalización que inducen su promotor y también de aquellas que modifican su actividad como factor de transcripción. Nuestro laboratorio y muchos otros han encontrado que son las MAPKs las responsables de la mayor parte de esta regulación (ver Introducción, Sección 1). Fue el estudio de esta actividad promotora de *c-fos* la que dio lugar a la hipótesis del presente trabajo: encontrar aquellas quinasas responsables del apagado de la señal de este gen y las proteínas componentes de los mecanismos asociados.

El primer indicio de posibles reguladores a nivel post-transcripcional del ARNm de *c-fos* lo observamos al utilizar inhibidores farmacológicos de MAPKs y medir la cantidad de ARNm. En la Figura R1 testeamos cómo 3 inhibidores de vías de MAPKs (el PD98059, el SP600025 y el SB203580) afectan los niveles del mensajero de *c-fos* a un determinado tiempo mediante las técnicas de Northern Blot y de PCR cuantitativa o qPCR. En principio confirmamos la participación de la vía de ERK2 en la activación transcripcional de *c-fos*: al inhibir la actividad de ERK2 utilizando el inhibidor de MEK1 PD98059 en células NIH3T3 m1.2 estimuladas con carbacol (Ch), observamos menor cantidad de mensajero comparando con el control sin inhibidor (Figura R1 A y B). Resultado coherente con todos los reportes que describen cómo ERK2 es la encargada de fosforilar a factores de transcripción que se asocian al promotor de *c-fos* e inducen su actividad transcripcional. Por otra parte, la inhibición de la actividad de JNK utilizando el SP600025 no parece alterar significativamente la expresión del reportero encontrado en la célula (Figura R1 A y B). Resultado que también responde a la ausencia de reportes acerca de la influencia de la vía de JNK sobre la activación del promotor de *c-fos*. Sin embargo, al inhibir la actividad de la SAPK p38 con el inhibidor farmacológico SB203580, observamos esta vez, una mayor cantidad de mensajero en ambas mediciones (Figura R1 A y B).

Si bien encontramos a este resultado muy interesante, la diferencia en la cantidad de ARNm podría deberse a un efecto particular del tipo de agonista que estábamos utilizando, el Ch, que se une a un receptor del tipo GPCR (el Receptor Muscarínico M1).

Con el objetivo de comparar los resultados observados con aquellos que se obtendrían con otro tipo de receptor, como puede ser uno del tipo TKR (Receptor Tirocin-Quinasa), repetimos el experimento en células que no expresaban el receptor M1 y utilizamos como agonista al PDGF (“Platelet-derived Growth Factor”), para el cual las células NIH3T3 poseen receptores endógenos. En la Figura R2 podemos observar como se reproduce el efecto de la inhibición de p38.

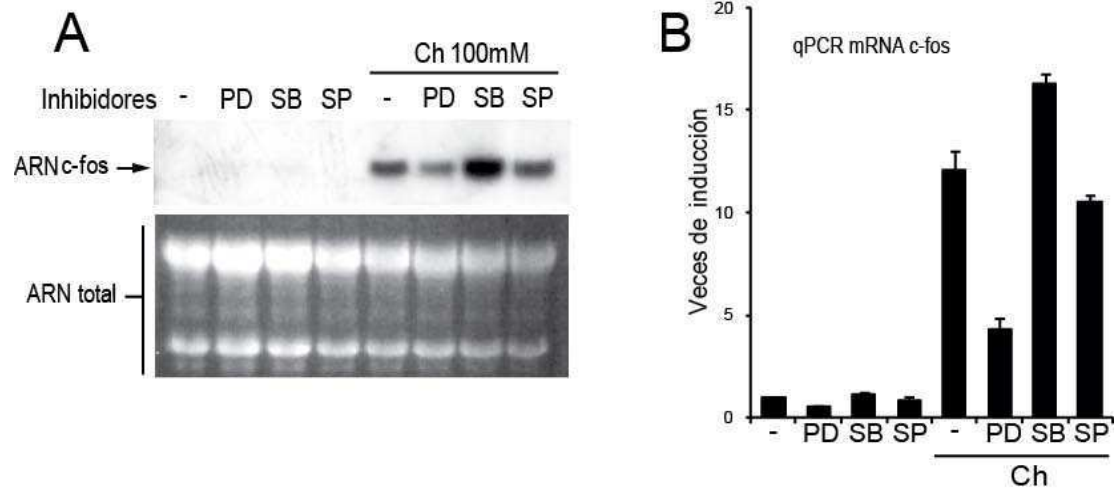


Figura R1. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de c-fos. Células NIH3T3 que expresan establemente el receptor muscarínico M1 (m1.2) fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas y pre-incubadas durante 1 hora con los inhibidores de MAPKs, PD: PD98059 (inhibidor de la actividad de MEK), SB: SB203580 (inhibidor de la actividad de p38) y SP: SP60025 (inhibidor de la actividad de JNK) y luego estimuladas durante 40 minutos con carbacol (Ch) a una concentración final de 100 mM. En la parte A, el ARN de estas células fue extraído y se analizó la presencia del mensajero de c-fos mediante un Northern Blot, mientras que en la parte B, el ARN fue extraído, sometido a transcripción reversa y el ADNc de c-fos fue cuantificado utilizando qPCR.

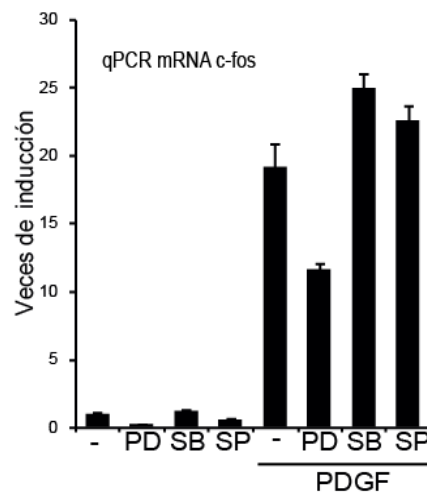


Figura R2. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de *c-fos*. Células NIH3T3 fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas y pre-incubadas durante 1 hora con los inhibidores de MAPKs, PD, SB y SP y luego estimuladas durante 40 minutos con PDGF a una concentración final de 100 ng/mL. Se extrajo el ARN y se analizó la presencia del mensajero de *c-fos* utilizando qPCR.

Por otra parte este efecto de p38 podría deberse a su posible influencia sobre el promotor de *c-fos*. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos podido determinar que p38 SAPK no se encuentra involucrada en la actividad promotora de *c-fos*. Midiendo la actividad reportera de luciferasa utilizando un vector pc-fos-luc (en donde el gen de la luciferasa se encuentra río abajo del promotor endógeno de *c-fos*), en distintas condiciones de activación de cada MAPK, hemos comprobado como p38 no afecta la expresión del gen reportero. La Figura R3 es un ejemplo de uno de esos ensayos en los que co-transfectamos el reportero con algunas de las MAPKs más relevantes, incluidas las 4 isoformas de p38. Sólo aquellas células que sobre-expresan ERK2 sufren una activación mayor que las células control. Ninguna de las p38s producen un efecto sobre el promotor, positivo o negativo (246).

De esta manera comenzamos a evaluar la posibilidad de que la vía de señalización de p38 SAPK pudiera estar involucrada en algún evento de regulación post-transcripcional sobre el ARNm de *c-fos*, más precisamente relacionado con la disminución de la cantidad de ARNm presente en la célula.

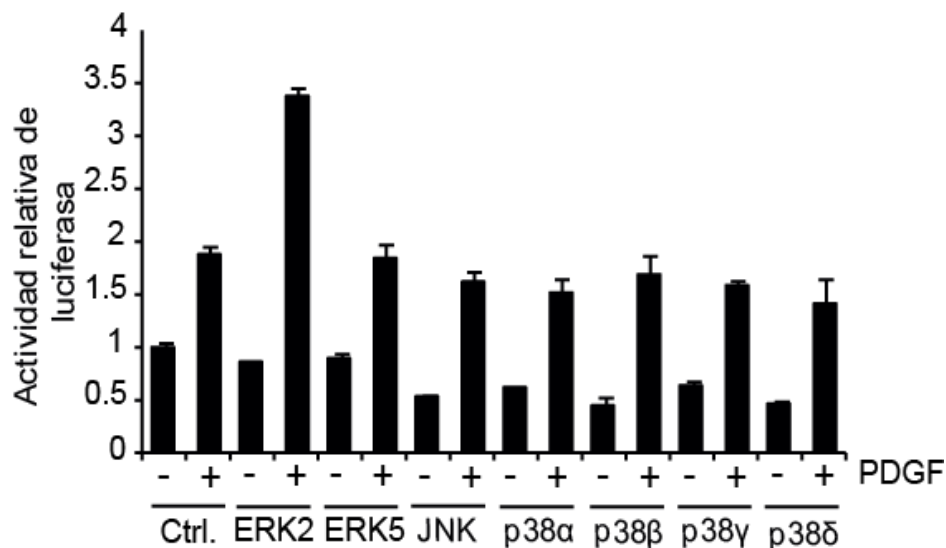


Figura R3. Influencia de las MAPKs sobre la actividad promotora de *c-fos*. Células NIH3T3 fueron co-transfectadas con un plásmido reportero que expresa el gen de la luciferasa río abajo del promotor de *c-fos* (pc-fosLuc) y con vectores de expresión de las distintas MAPKs (ERK2, ERK5, JNK1, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ). 24 horas post-transfección las células fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas (ERKs) o 2 horas (SAPKs) y luego estimuladas durante 6 horas

con PDGF a una concentración final de 100 ng/mL. Las células fueron lisadas y se midió actividad de luciferasa que fue normalizada midiendo actividad de β -galactosidasa.

1.1. Determinación de tiempos de activación óptimos de MAPKs

Con el objetivo de determinar si la activación de estas quinasas coincide temporalmente con distintos procesos que estudiamos en el pasado y otros que desarrollaremos en las secciones siguientes, investigamos los tiempos óptimos de activación de las MAPKs ERK2 y 5, JNK1, y las 4 isoformas de p38. En la Figura R4 se exponen las actividades de las MAPKs a distintos tiempos de estímulo con carbacol y con PDGF. Observamos como las MAPKs de la subfamilia de ERK tienen tiempos de activación tempranos, coherentes con sus efectos sobre distintos promotores, mientras que las SAPKs (JNK y p38s) presentan tiempos de activación más tardíos. Este desfase es muy interesante y es consistente con un rol en la regulación del apagado de la señal.

Este modelo de cinéticas de activación es compatible con una regulación cíclica de los procesos celulares. Luego de activarse los caminos de señalización por procesos de fosforilación, estos son rápidamente apagados mediante la remoción de aquellos fosfatos por parte de proteínas especializadas, las fosfatasas, que no presentan una especificidad de sustrato tan definida como sus contrapartes, las proteínas quinasas. Por ejemplo, se ha reportado que la señalización mediada por p38 SAPK, estimula la asociación física entre la fosfatasa PP2A y el complejo MEK1/2-ERK1/2 llevando a la defosforilación de MEK1/2 y consiguiente apagado de esta vía (247).

Kinase \ Min.		Ch					
		Ctrl	5	10	20	30	60
ERK2	+	++++	+++	+	+	+	
ERK5	+	+++	+++	++	++	+	
JNK	+	+	++	++++	++++	+	
p38 α	+	+	++	++++	++++	+	
p38 β	+	+	++	++++	++++	+	
p38 γ	+	+	++	+++	++++	+	
p38 δ	+	++	++	+++	+++	++	

Kinase \ Min.		PDGF					
		Ctrl	5	10	20	30	60
ERK2	+	++++	+++	+	+	+	
ERK5	+	+++	++++	++	++	+	
JNK	+	+	+++	++++	+++	+	
p38 α	+	+	+++	++++	+++	+	
p38 β	+	+	++	+++	++	+	
p38 γ	+	+	+++	+++	++++	+	
p38 δ	+	++	+	++	+++	++++	

Figura R4. Tiempos óptimos de activación de las MAPKs. A, Células NIH3T3 m1.2 incubadas en medio sin suero durante 16 horas (ERKs) o durante 2 horas (SAPKs), previamente transfectadas con isoformas taggeadas de cada quinasas, fueron estimuladas con carbacol

durante los tiempos indicados. Las células lisadas fueron incubadas con anticuerpos específicos y cada quinasa fue inmunoprecipitada e incubada en presencia de un sustrato y ATP ^{32}P -gamma (Ensayo de quinasa *in vitro*). B, Ídem A pero utilizando células NIH3T3 y estimulando con PDGF

2. Obtención y puesta a punto de un sistema para el estudio de la regulación pos-transcripcional del mensajero de c-fos

2.1. Clonado del 3'UTR de c-fos

Como se ha mencionado en la Introducción, el mensajero de *c-fos* consta de elementos estructurales que le otorgan una labilidad característica. Este mensajero posee una vida media extremadamente corta comparada con la mayoría de los genes (1). La secuencia rica en purinas en su región codificante o CRD y el elemento rico en adeninas y uracilos o ARE presente en su 3'UTR, son determinantes de su vida media y, al colocarse en sistemas heterólogos producen un efecto similar al que producen en el contexto de *c-fos* (1,35,36,248). Dado que existen mas reportes acerca de la regulación de los mensajeros a través de regiones 3'UTR (tanto en el caso general y en el caso particular de *c-fos*), decidimos comenzar nuestro estudio clonando la secuencia completa del 3'UTR del ARN mensajero de *c-fos* murino a partir de ADNc de células NIH3T3.

Para realizar nuestros estudios elegimos un sistema de control de la transcripción regulable por tetraciclina. El Dr. Jonathan LaMarre (Universidad de Guelph, Canadá) nos proporcionó los reactivos iniciales necesarios: vectores comerciales reporteros (Clontech) en los cuales el gen de la luciferasa se encuentra río abajo de un promotor regulable por tetraciclina. Asimismo, río debajo de este gen se localiza el sitio múltiple de clonado o MCS. En la Figura R5 podemos observar un esquema del vector pTRE2hygluc en su versión sin inserto. Su nombre se debe a sus características: **TRE** significa "Tetracycline Responsive Element", dado que posee secuencias de pegado del represor de tetraciclina TetR río arriba de un promotor mínimo (CMV, promotor mínimo del citomegalovirus); **hyg** por la presencia de un gen de resistencia a higromicina; y **luc** por la presencia del gen de luciferasa como gen reportero. La característica de esta secuencia de luciferasa es que no posee regiones propias de su 3'UTR, sino que sólo se extiende hasta su codón stop, permitiendo el clonado y la regulación por las secuencias insertadas.

Además del vector también necesitamos líneas celulares estables para los factores regulables por tetraciclina que deben asociarse al promotor del pTRE2. Estas también fueron cedidas por el Dr. LaMarre y consistieron en 2 líneas que expresan el represor TetR fusionado al dominio mínimo de transactivación del factor de transcripción

del Herpes virus VP16. Esta proteína de fusión se denomina tTA. Una de las líneas proviene de células NIH3T3 transfectadas con una versión antigua de esta quimera en la cual el usaje de codones corresponde al de bacterias (la secuencia del TetR fue extraída del sistema bacteriano), y solo posee una fusión con el dominio VP16 (NIH TetOff). Sin embargo la otra línea celular proviene de HeLa transfectadas con una versión del tTA modernizada, en la cual el usaje de codones es el de mamíferos y posee 3 dominios mínimos VP16, esta versión se denominó tTAS2 (HeLa TetOff) (249).

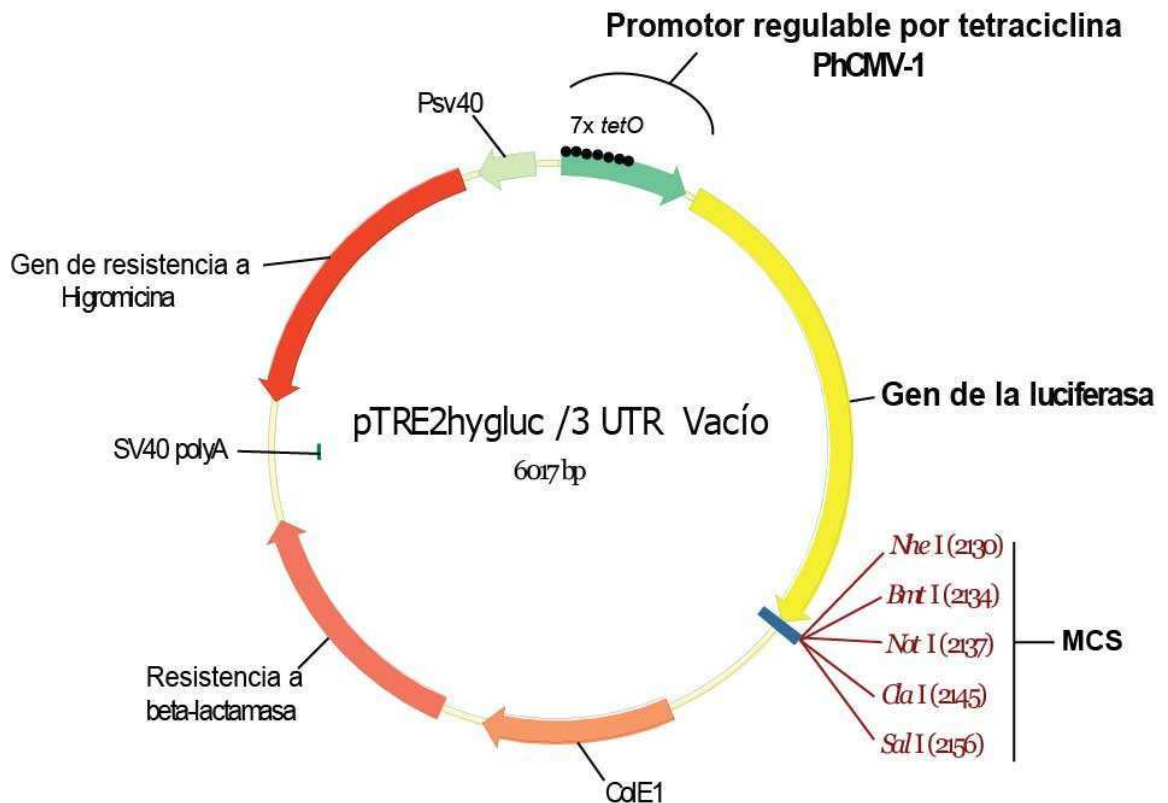


Figura R5. Esquema del vector de clonado de la secuencia 3'UTR de *c-fos* y de todas las regiones evaluadas. Su promotor posee un enhancer de 7 secuencias *tetO* de 19 pares de bases en donde se asocia el tTA. Río abajo de la luciferasa se insertan las secuencias de interés en alguna combinación de los sitios únicos *Nhe* I, *Bmt* I, *Not* I, *Cla* I y *Sal* I.

Al utilizar este tipo de líneas celulares, que expresan la fusión con el transactivador VP16, el tTA, lo que se logra es trabajar en un sistema "TetOff". Esto significa que, en ausencia del antibiótico, el tTA activa la transcripción de manera constante, mientras que al agregar la tetraciclina, el tTA pierde afinidad por el ADN, se separa de la secuencia del promotor y no existe transcripción, como se esquematiza en la Figura R6. Este sistema nos permite poder estudiar la regulación del mensajero de *c-*

fos, deteniendo la transcripción específica del reportero, sin afectar la expresión de otros genes

Una de las razones por las cuales elegimos este sistema de expresión controlada, que regula la expresión del reportero de modo específico, es el efecto que los inhibidores generales de la transcripción producen en las células. Se ha estudiado cómo estos inhibidores, entre los que se encuentran la actinomicina D o la α -amanitina, activan vías de estrés (que incluyen la activación de SAPKs como es el caso de p38 SAPK) y pueden causar, por ejemplo, una acumulación de p53 dentro de la célula, lo que puede llevar a una apoptosis celular (250,251). Y dado que nuestro interés se focaliza, en un principio, en el estudio de estas vías de SAPKs como posibles reguladoras de la estabilidad del ARNm de *c-fos*, no encontramos adecuado el uso de estos inhibidores de acción general.

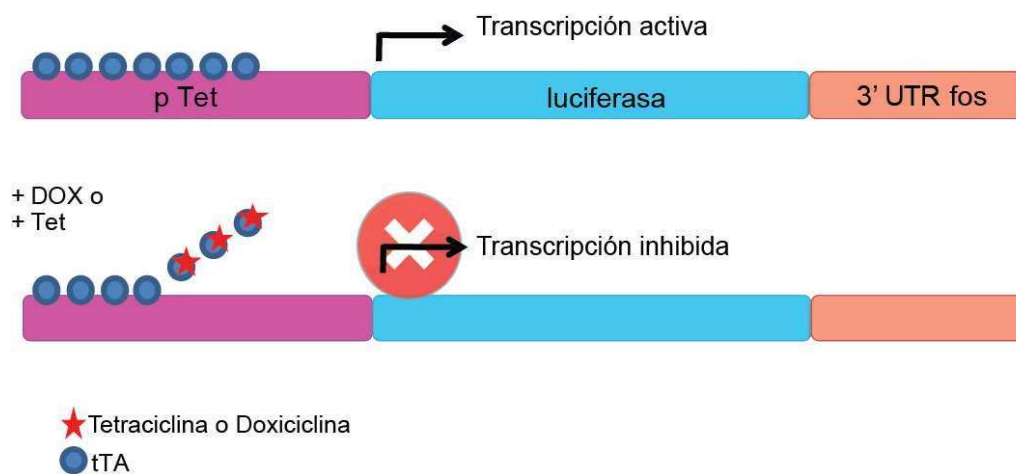


Figura R6. Esquema del sistema TetOff. Tanto en las células NIH3T3 como en las células HeLa que expresen el transactivador rTA, el gen de la luciferasa presente en el vector es transcrito en ausencia de antibiótico. Al agregar tetraciclina o su análogo doxyciclina al medio de cultivo celular, el tTA pierde afinidad por el promotor, se separa y se detiene la transcripción.

Con primers específicos para amplificar la región 3'UTR completa de *c-fos* (808 pb) clonamos esta región en el pTRE2hygluc utilizando adaptadores con los sitios de clonado para las enzimas NheI y ClaI. Al vector resultante lo denominamos pLucFosWT. El vector control con el cual realizamos la comparación consta de la misma estructura basal pero se lleva clonado en él la región 3'UTR del gen de la β -globina. Este gen se ha reportado como un gen que produce transcriptos estables (se puede detectar de 8 a 24 horas post-transcripción dentro de la célula (1)). A este vector lo denominamos pLuc β Globin.

Construimos otro reportero en el cual, a la secuencia original del 3'UTR del ARNm de *c-fos*, se le ha deletado la región completa del ARE. Este reportero lo construimos amplificando por PCR 2 fragmentos con primers específicos a partir del pLucFosWT como se muestra en la Figura R7. La región ARE fue reemplazada por un sitio de restricción Age I que permite ligarlos, ausente en toda la secuencia del pLucFosWT, a este reportero lo denominamos pLuc Δ ARE. Esta secuencia de 6 pares de bases (ACCGGT) permite distinguir el mutante del salvaje y no está relacionada con el tipo de secuencias que caracteriza a los AREs (ricos en adeninas y uracilos), razón por la cual esperamos que no exista ningún tipo de influencia de esta secuencia sobre el mensajero resultante.

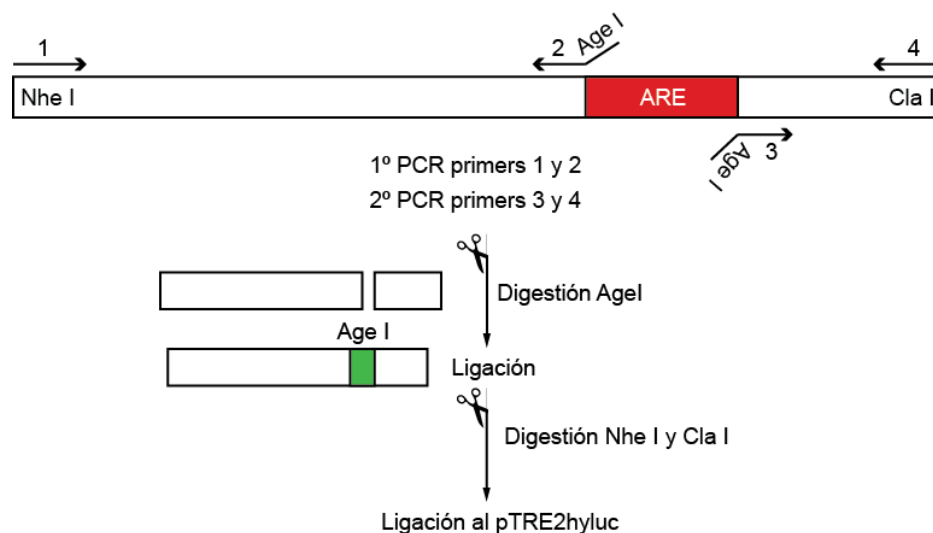


Figura R7. Esquema del protocolo utilizado para obtener la delección de la región ARE. Luego de realizar las reacciones de PCR que amplifican las regiones flanqueantes al ARE con primers específicos con adaptadores para Age I, se purificaron los fragmentos que correspondían al tamaño esperado. Estos fragmentos, luego digeridos con Age I, fueron ligados para reconstruir el 3'UTR de *c-fos*. Finalmente el fragmento reconstruido pero sin el ARE fue ligado al pTRE2hyLuc vacío para formar el pLuc Δ ARE.

Comenzamos evaluando ambas líneas celulares, tanto NIH TetOff como HeLa TetOff, en cuanto a su nivel de regulación del promotor (Figura R8). Luego de transfectar ambas líneas con los reporteros pLucFosWT y pLuc β Globin, las células fueron mantenidas en medio de cultivo complementado con distintas cantidades de tetraciclina (Sin antibiótico, 100, 1000 y 2000 ng/mL) y se midió actividad de luciferasa en los lisados 24 horas post-transfección.

Como se puede observar en la Figura R8, ambas líneas parecen regular correctamente la expresión de los reporteros: sin tetraciclina, se observa actividad de

luciferasa, pero al agregar el antibiótico esta actividad disminuye hasta niveles basales (comparable con niveles de células sin transfectar). Sin embargo algo que cabe señalar es que las células HeLa TetOff parecen tener mejor capacidad de regulación del sistema (Figura R8B). Si comparamos las columnas correspondientes a la cantidad de 1000 y 2000 ng/mL de tetraciclina entre los paneles A y B de la Figura R8, observamos menor actividad de luciferasa en el caso de las células HeLa. Por lo tanto decidimos realizar la mayor parte de los experimentos con esta línea celular. Por otra parte, dado que con cantidades menores de antibiótico observábamos aun transcripción detectable, determinamos la cantidad a usar de tetraciclina en los próximos experimentos en 1000 ng/mL o 1 ug/uL.

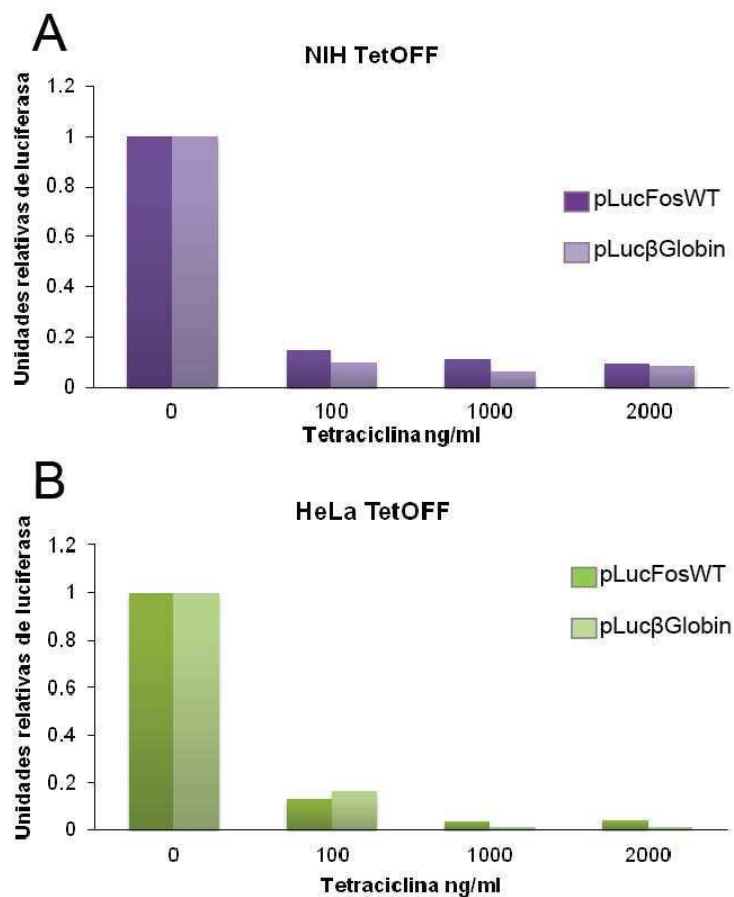


Figura R8. Puesta a punto de la cantidad de tetraciclina a utilizar en experimentos TetOff. A, NIH3T3 TetOff fueron transfectadas con los reporteros pLucFosWT y pLucβGlobin. Inmediatamente terminada la transfección el medio se cambió y se agregó al medio la tetraciclina en las concentraciones finales que se indican en el gráfico. 24 horas post-transfección se midió actividad de luciferasa y las cantidades fueron relativizadas al punto 0. B, ídem A pero transfectando células HeLa TetOff. La actividad fue relativizada utilizando un reportero para β-galactosidasa y midiendo su actividad.

Además de la tetraciclina también se pueden utilizar homólogos, como la doxiciclina. La diferencia reside en la afinidad por el tTA: la doxiciclina posee mayor afinidad por el tTA que la tetraciclina (252). Esta característica podría ser un problema en el caso que quisiéramos realizar experimentos con pulsos de transcripción, dado que nos sería más difícil eliminar la doxiciclina del medio de cultivo. Sin embargo no elegimos realizar experimentos del tipo de pulso de expresión por lo que en algunos casos hemos utilizado este análogo en una concentración de 10 ug/ul.

Quisimos también comparar los 3 reporteros obtenidos en cuanto a su nivel de expresión. Transfectamos entonces células HeLa TetOff con los reporteros obtenidos pLucFosWT, pLuc Δ ARE y pLuc β Globin y los mantuvimos con o sin tetraciclina durante 24 horas. Luego medimos la actividad luciferasa. En la Figura R9 se puede observar las distintas cantidades de luciferasa que se obtienen al transfectar la misma cantidad de ADN en cada caso. Por ejemplo, el reportero que menor cantidad posee es el que expresa la luciferasa con el 3'UTR de *c-fos* en su versión WT, es decir que posee el elemento ARE. Cuando eliminamos el ARE, como sucede en el caso del pLuc Δ ARE, podemos observar un aumento en la expresión, lo que comprueba que este elemento provoca la inestabilidad del mensajero. Por otra parte, el reportero que muestra mayor expresión es el que posee la luciferasa con el 3'UTR de β -globina y esto se podría dar por la falta de degradación o por la acumulación de este mensajero, a este reportero lo utilizamos como control negativo de decaimiento.

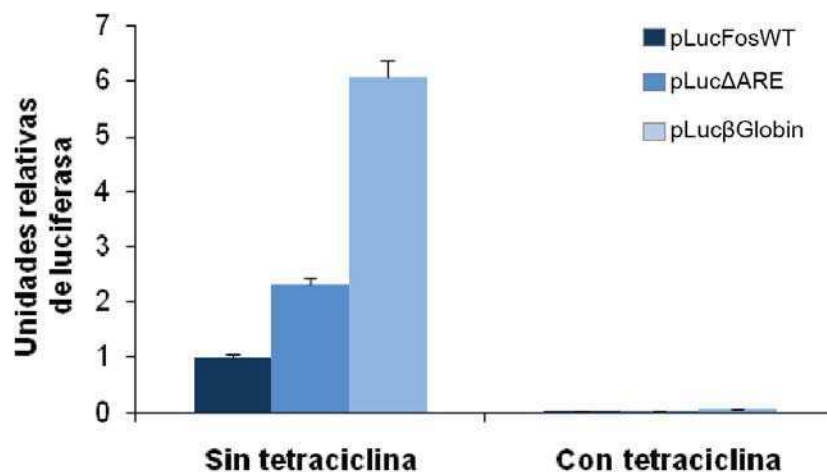


Figura R9. Comparación de los niveles de expresión de los reporteros pLuc. HeLa TetOff fueron transfectadas con la misma cantidad de cada reportero y 24 horas post-transfección se midió actividad de luciferasa. La actividad fue relativizada utilizando un reportero para β -galactosidasa.

Como mencionamos anteriormente, la idea de utilizar este sistema es poder medir el decaimiento de un mensajero. En nuestro caso, de todas las técnicas posibles, elegimos la de qPCR (PCR en tiempo real) para cuantificar el ARNm. Por lo tanto, continuamos con la puesta a punto del sistema según trabajos previos que lo utilizaron (253), en los cuales se describían protocolos para el estudio del decaimiento de ARNm utilizando sistemas del tipo TetOff. En estos trabajos recomiendan tener en cuenta la cantidad de reportero transfectado para observar el efecto de degradación de manera adecuada. Proseguimos entonces con estos experimentos en los cuales transfectamos en ambas líneas celulares 5, 10, 25, 50 y 100% del DNA reportero (pLucFosWT) con respecto al ADN total, completando con ADN de un plásmido no relacionado que denominamos “carrier”. En la Figura R10 se muestra la puesta a punto de las qPCRs, que se llevaron a cabo manteniendo a las células en medio sin antibiótico durante 24 horas post-transfección y luego tratándolas 0, 3 y 5 horas con tetraciclina. Luego del tratamiento las células fueron lisadas, se extrajo el ARN total y se realizó la transcripción reversa y la PCR en tiempo real. En esta PCR se midió la cantidad de ADNc de ARNm de luciferasa con primers específicos ubicados en una región cercana al 3'UTR, y se normalizaron los datos amplificando con primers específicos para el gen de resistencia a higromicina ubicado en el mismo plásmido (esta normalización corresponde a una corrección por posibles diferencias en la cantidad de ADN reportero transfectado y/o por diferencias en la cantidad de ARN total utilizado en la reacción de retrotranscripción).

Por trabajos reportados y por algunos experimentos previos, esperábamos que el reportero pLucFosWT mostrara un comportamiento de mensajero inestable, desapareciendo luego de detener la transcripción por un tiempo prolongado (1-5 horas). Sin embargo, una primera observación es que no todas las cantidades de ADN transfectado producen este patrón continuo de degradación, sino que la mayor parte muestra un comportamiento errático en los que observamos mayor cantidad de mensajero luego de 5 horas de tratamiento de tetraciclina (Figura R10).

Las dos condiciones que esperamos observar son:

- Buena expresión del gen reportero (comparado con los niveles que se detectan en las mismas condiciones de otros genes estudiados en el laboratorio)
- Buenos márgenes entre la expresión total y la expresión del ARN decaído a un número compatible con el tiempo de trabajo.

Buscamos estos parámetros para poder estudiar instancias regulatorias del decaimiento del ARNm de *c-fos*. En la Figura R10 A y B observamos que la concentración del 25% (señalado con flechas en Figura R10) del ADN reportero

transfectado con respecto del total es la que mejor cumple con las condiciones mencionadas. Fue esta cantidad la elegida para realizar los próximos experimentos.

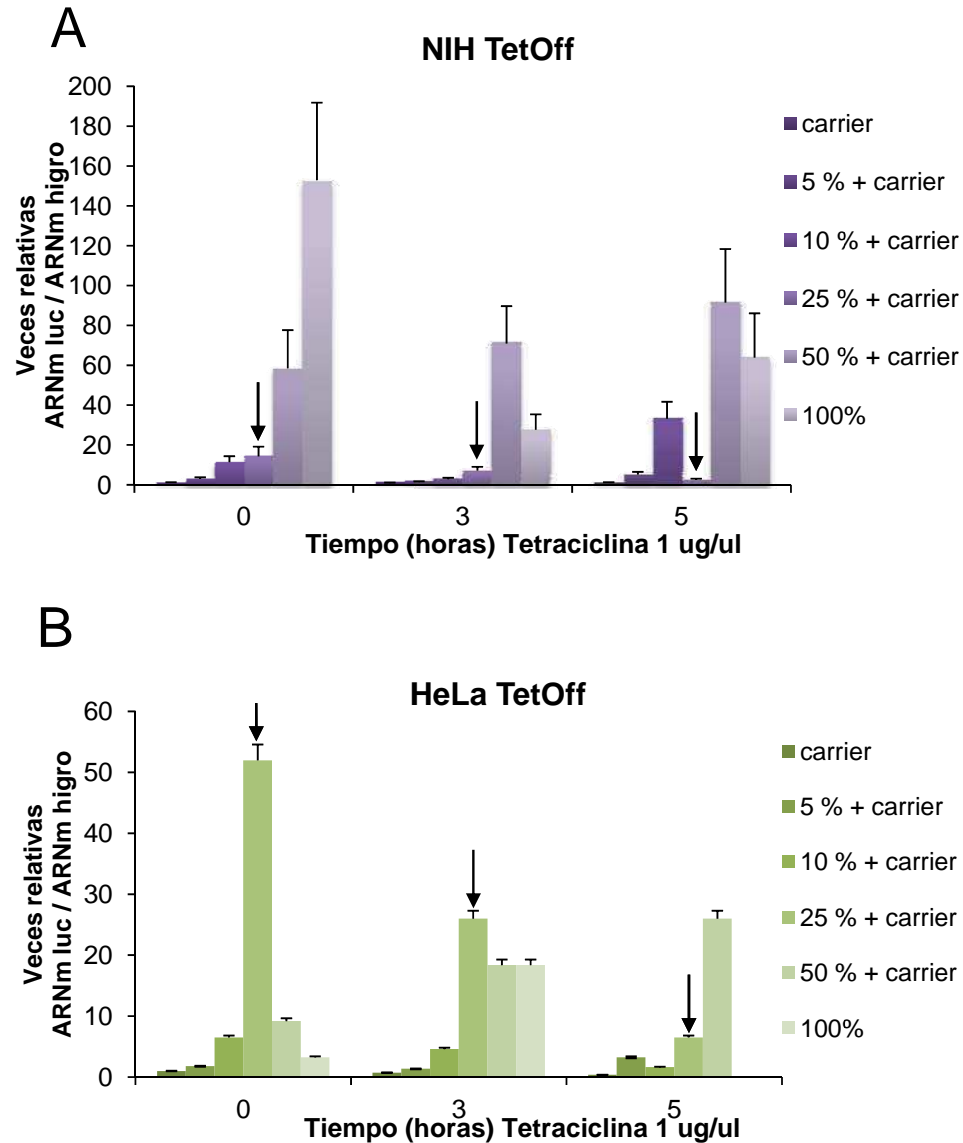


Figura R10. Puesta a punto de la cantidad de ADN a transfectar en los ensayos TetOff. qPCR de luciferasa a partir del reportero pLucFosWT. A, Células NIH3T3 TetOff transfectadas con distintas cantidades del ADN reportero, 5, 10, 25, 50 y 100 % sobre el total de ADN transfectado. Las células fueron mantenidas en medio sin antibiótico durante 24 horas post-transfección (eso significa que el gen se transcribe constantemente) y luego se realizó el tratamiento con tetraciclina a una concentración final de 1 ug/ul, durante 3 y 5 horas. Las flechas indican la concentración que muestra el comportamiento esperado de decaimiento que corresponde a la cantidad de 25% del ADN reportero transfectado. B, ídem A, pero transfectando células HeLa TetOff. En este caso también la concentración elegida fue de 25 %.

Comenzamos entonces los experimentos para testear a los 3 reporteros pLucFosWT, pLuc Δ ARE y pLuc β Globin en distintas condiciones. En la Figura R11 evaluamos la cantidad de ARNm de luciferasa en células HeLa TetOff proliferando tratadas con tetraciclina a 0, 2 y 5 horas. Observamos que el reportero que expresa la luciferasa río arriba del 3'UTR de *c-fos* WT es muy inestable llegando a aproximadamente un 20% del ARNm luego de 5 horas de detenida la transcripción. Sin embargo al eliminar la región del ARE, ese comportamiento inestable se pierde, el pLuc Δ ARE muestra un 85% del ARNm luego de 5 horas de tratamiento con tetraciclina, resultado muy similar al del control, pLuc β Globin. Para verlo más gráficamente, en la parte B mostramos las cantidades relativas de cada reportero luego de 5 horas de tetraciclina.

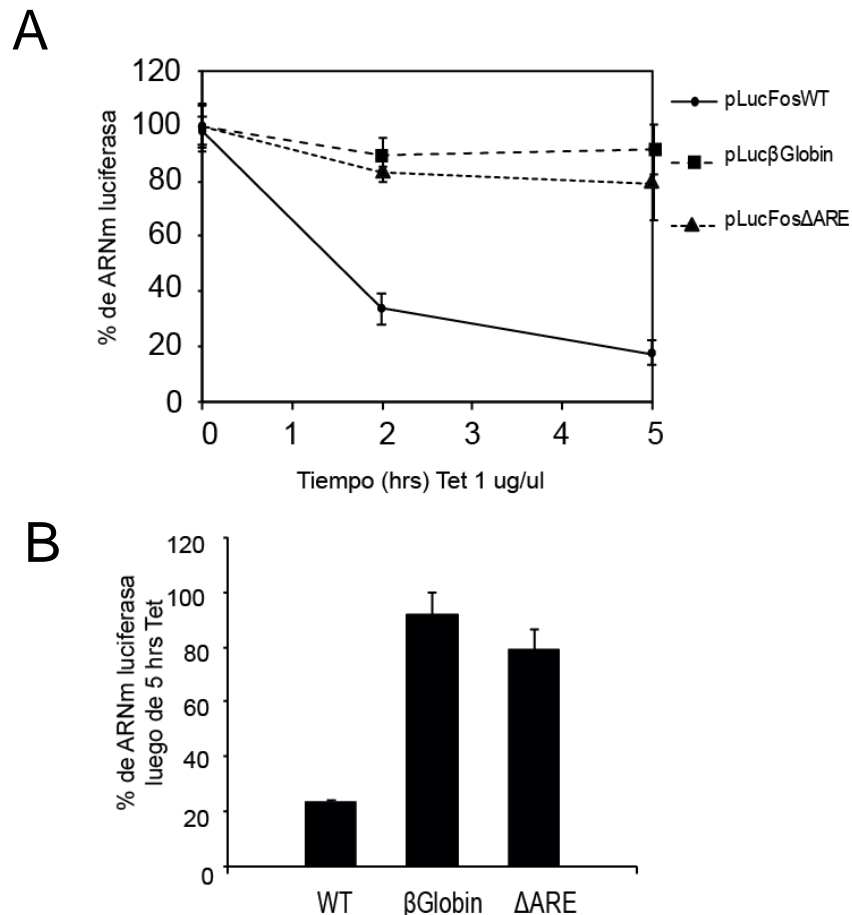


Figura R11. Patrón de decaimiento de los reporteros pLuc. *A*, Células HeLa TetOff fueron transfectadas con los reporteros pLucFosWT, pLuc Δ ARE y pLuc β Globin. Luego de 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con tetraciclina 1 ug/ul durante 2 ó 5 horas. El ARN total fue extraído y se midieron los niveles de ADNc de luciferasa por qPCR, que fueron normalizados midiendo cantidad de ADNc de higromicina. *B*, Valores correspondientes al punto de 5 horas del gráfico presentado en *A*.

El experimento de la Figura R11 fue repetido al menos 3 veces para los reporteros control y más de 3 veces para el caso del pLucFosWT. La curva de decaimiento de este último reportero es el resultado del promedio de todos esos experimentos y la curva es la misma en todos los experimentos en los que mostramos un control sin co-transfección o pre-tratamientos.

3. Estudio de las vías de señalización involucradas en la regulación post-transcripcional del ARN de *c-fos*. Influencia de la vía de p38 SAPK en el decaimiento del ARNm de *c-fos*.

Como se ha mencionado anteriormente, tratando de determinar las MAPKs involucradas en la regulación de la actividad promotora de *c-fos*, nos encontramos con un resultado interesante: el inhibidor farmacológico de p38 SAPK, SB203580 produce un aumento visible en la cantidad de ARN mensajero de *c-fos* (Figuras R1 y R2) y esta actividad no estaría involucrada en la regulación del promotor de *c-fos* (Figura R3, (246)). Siguiendo esta línea de investigación, evaluamos la cantidad de ARNm de *c-fos* en presencia del inhibidor SB203580 a distintos tiempos. En la Figura R12, medimos la cantidad de ARNm de *c-fos* en células NIH3T3 m1.2 estimuladas con Carbacol y realizamos el cociente de la cantidad a los 60 minutos, en el que esperamos ver menor cantidad de ARNm (ver Introducción, Figura I3), sobre la cantidad a 30 minutos, en el que se observa un pico de expresión. En presencia del inhibidor de p38, lo que podemos observar es un cociente mayor a 1, indicando que la cantidad a 60 minutos de estímulo es mayor que a los 30. Este comportamiento es coherente con una influencia positiva de p38 sobre la degradación del ARNm de *c-fos*.

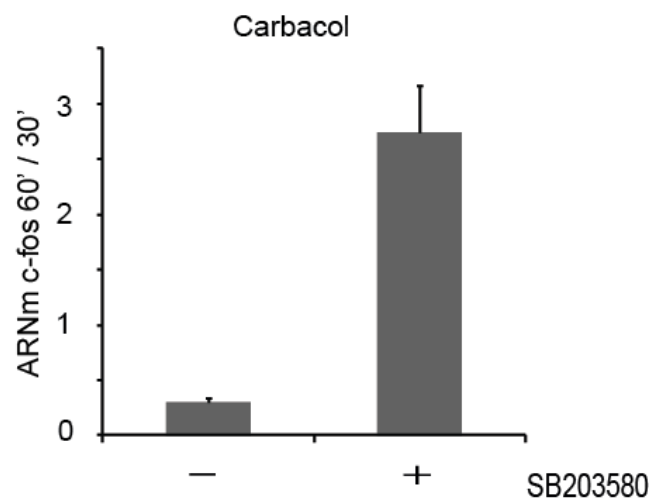


Figura R12. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de *c-fos*. Células NIH3T3 m1.2 fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas y estimuladas a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos) con o sin pre-incubación de 1 hora con el inhibidor de p38 SB203580. Al finalizar el estímulo se extrajo el ARN total, se realizó la transcripción reversa y se midió el ARNm de *c-fos* por qPCR. Los niveles de ARNm de *c-fos* fueron normalizados midiendo ARNm de actina. Por cuestiones prácticas, aquí mostramos solamente el cociente entre los tiempos 60 y 30 minutos de la curva control y tratada con el inhibidor de p38 SB203580.

Evaluamos si lo visto en las células NIH3T3 m1.2 también se reproducía en células NIH3T3, pero además quisimos testear una nueva variable: ¿es p38 SAPK la que está regulando de manera directa el procesamiento del ARNm de *c-fos* o lo hace a través de alguna quinasa río abajo? MK2 o MAPKAPK2 es una quinasa activada por p38 SAPK que se ha reportado como reguladora de la actividad de diversas proteínas de unión al ARN y más precisamente de unión a los AREs (ver Introducción, Secciones 2.4 y 3.5 (168,169,171,254)). Para testear si MK2 tenía alguna influencia sobre la regulación de la estabilidad del ARNm de *c-fos*, evaluamos el efecto de su inhibidor farmacológico, MK2ai (inhibidor de la isoforma α de MK2) (Calbiochem). El resultado se observa en la Figura R13: se puede reproducir el efecto del SB de la Figura R12 y de experimentos anteriores, pero además se agrega un nuevo ítem que es el efecto de MK2. Esta quinasa parece tener el mismo efecto que p38 en la cantidad de mensajero de *c-fos* que se encuentra en la célula y podría indicar que p38 está regulando el procesamiento del ARNm de *c-fos* a través de su activación.

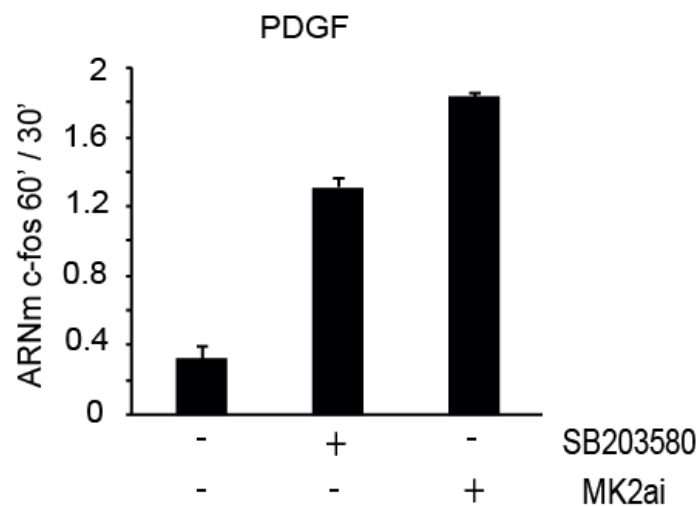


Figura R13. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de *c-fos*. Células NIH3T3 fueron incubadas durante 16 horas en medio sin suero y luego estimuladas distintos tiempos con PDGF y pre-incubadas o no durante una hora con los inhibidores SB203580 o MK2a. Luego se extrajo el ARN, se realizó la transcripción reversa y se cuantificó el ADNc de *c-fos* mediante qPCR, normalizada midiendo actina. Se muestra en el gráfico el cociente entre los tiempos 60 y 30 minutos de estímulo con PDGF en situaciones control y con ambos inhibidores.

Volvimos entonces al sistema TetOff para evaluar la influencia de p38 en el decaimiento de los reporteros. En la Figura R14 testamos los reporteros pLucFosWT y el pLucβGlobin en células NIH3T3 TetOff co-transfectados con isoformas de la MAPKK MEK3 activadora de las p38 SAPKs: MEK3AA (su versión mutante dominante negativa), y MEK3EE (su versión mutante constitutivamente activa). En el panel A de la Figura R14 observamos el comportamiento del reportero pLucFosWT, en donde la co-transfección de la dominante negativa de MEK3, MEK3AA, impide la degradación esperada. Por otra parte las mutantes de MEK3 no parecen tener un efecto sobre el reportero control pLucβGlobin. Este resultado agrega una evidencia más acerca de la participación de la vía de p38 SAPK en la regulación del procesamiento post-transcripcional de *c-fos*.

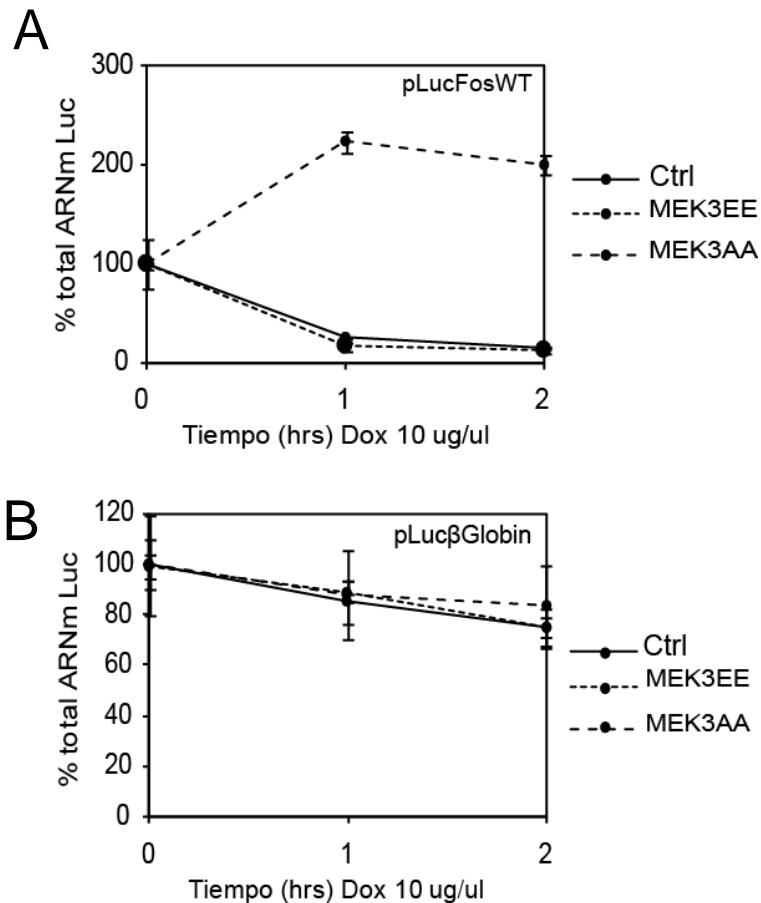


Figura R14. Influencia de la vía de p38 SAPK sobre el decaimiento del ARNm de *c-fos*. A, Células NIH3T3 TetOff fueron co-transfectadas con los reporteros pLucFosWT y con plásmidos de expresión de las isoformas mutantes de MEK3, MEK3AA o MEK3EE. 24 horas post-transfección las células proliferando fueron tratadas con el análogo de la tetraciclina, doxiciclina (Dox) a una concentración final de 10 ug/ul, durante 1 y 2 horas. El ARN de las células fue extraído, se sintetizó ADNc y se midió la cantidad de ADNc de luciferasa utilizando qPCR. La cantidad de luciferasa se normalizó cuantificando ADNc de higromicina. B, ídem A pero transfectando pLucβGlobin.

A continuación testamos el comportamiento de las células HeLa TetOff cuando son expuestas a los inhibidores SB203580 y MK2ai luego de ser transfectadas con los reporteros. En la Figura R15 A observamos como el tratamiento con ambos inhibidores previene la degradación del reportero pLucFosWT, evento que sí se observa en condiciones control. En la Figura R15, podemos observar la influencia que tiene la vía de p38 SAPK sobre el decaimiento del reportero coincidente con los resultados de la Figura R13. Si observamos el panel B, que corresponde al reportero que no posee la región ARE, este reportero no responde al tratamiento con los inhibidores, así como no decae de la manera en sí lo hace el WT. Finalmente el control pLucβGlobin no se altera con el tratamiento con los inhibidores.

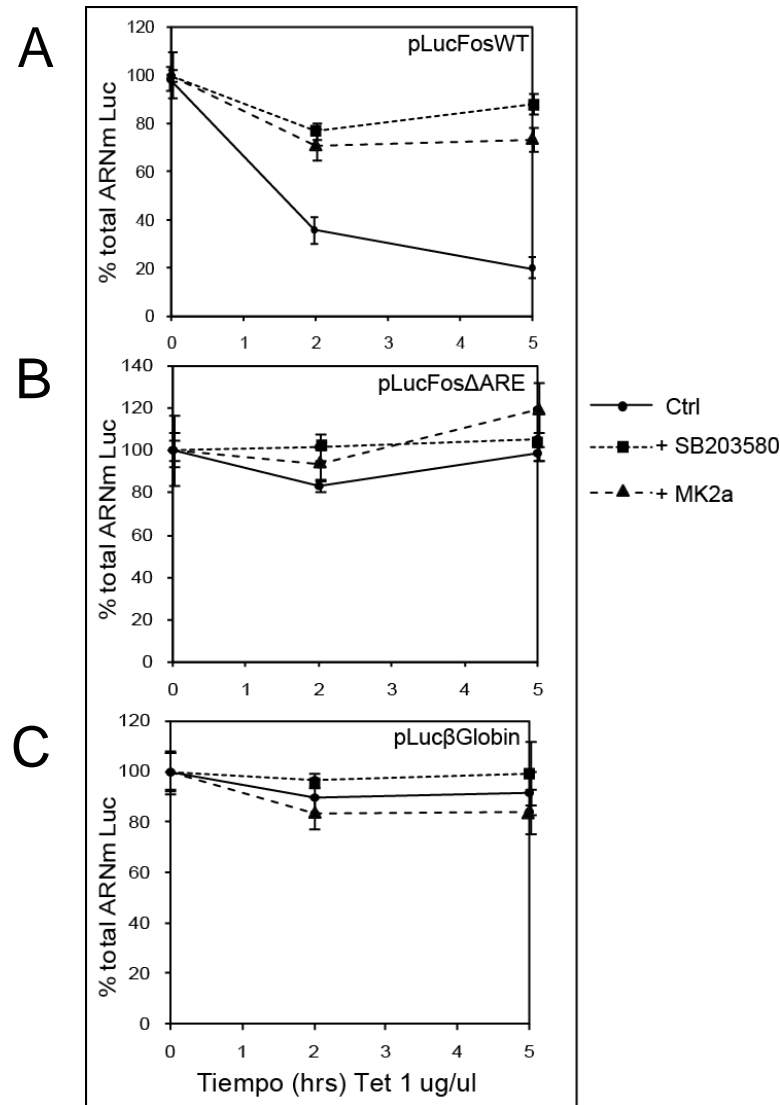


Figura R15. Influencia de p38 SAPK sobre el decaimiento del ARNm de *c-fos*. A, Células HeLa TetOff fueron transfectadas con el reportero pLucFosWT. Luego de 24 horas post-transfección las células fueron pre-incubadas con los inhibidores SB203580 y MK2a durante 1 hora y luego tratadas con tetraciclina 1 ug/ul durante 2 ó 5 horas. El ARN total fue extraído y se midieron los niveles de ADNc de luciferasa por qPCR, que fueron normalizados midiendo cantidad de ADNc de higromicina. B, ídem A pero transfectando el reportero pLuc Δ ARE. C, ídem A pero transfectando el reportero pLuc β Globin.

4. Estudio de los posibles factores esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de *c-fos*

4.1 Búsqueda de factores asociados a la región ARE de *c-fos*

Así como se ha estudiado ampliamente cómo los factores de transcripción son objeto de regulación por vías de transducción de señales (en la mayor parte de los casos siendo transactivados por eventos de fosforilación), en los últimos años se ha estudiado como proteínas que se asocian al ARN son blancos de una regulación análoga. Estos factores pueden estar involucrados tanto en eventos de edición del ARNm maduro por eventos de “splicing”, como en eventos de NMD (non-sense mediated decay o degradación de mensajeros truncados) o también en el procesamiento de los mensajeros inestables, como es el caso del ARNm de *c-fos*, entre otros procesos post-transcripcionales. En el caso de los mensajeros regulados a través de los elementos ARE, aquellas proteínas de unión que regulan el destino de esos mensajeros se denominan AUBPs, y muchas de estas AUBPs parecen estar reguladas de forma directa por cascadas de transducción de señales (54,55,255).

Si bien se han reportado AUBPs que se asocian al ARE de *c-fos* en distintos sistemas y de su influencia sobre el decaimiento de este mensajero (39,42,44,256), quisimos determinar cuáles eran las proteínas que se asociaban a esta región en el marco de nuestros experimentos y de nuestro modelo. Para ello adquirimos 2 tipos de sondas de ARN, sintetizadas comercialmente (Thermo), que poseen un grupo biotina covalentemente unido en el ribonucleótido 5'. La sonda abarca al núcleo del ARE, comprendiendo 40 de las, aproximadamente, 70 bases consideradas como el ARE de *c-fos*. Estas 40 bases incluyen a las secuencias consenso descritas como esenciales para la unión de las AUBPs (AUUUA). Una de las sondas sintetizadas corresponde a la secuencia WT, mientras que la segunda sonda tiene las 3 secuencias consenso AUUUA reemplazadas por AGGGA como se muestra en la Figura R16 (sonda MUT). Estas sondas fueron incubadas en presencia de lisados celulares de la línea HEK293, previamente estimulada durante 60 minutos con EGF. Gracias al grupo biotina presente en la sonda, los complejos formados proteínas-ARN pueden ser purificados utilizando una resina de streptavidina unida covalentemente a agarosa (“pull-down”). La Figura R16 muestra el esquema del diseño experimental de esta purificación.

Luego del pull-down, las proteínas obtenidas fueron corridas en un gel de poliacrilamida que, posteriormente, fue teñido ya sea con la técnica de coomassie coloidal o con una tinción con nitrato de plata. En total, las calles del gel preparativo

fueron 3: 1) sin colocar sonda de ARN, pero sí proteínas del lisado y resina streptavidina-agarosa; 2) con la sonda mutante, proteínas del lisado y la resina; 3) con la sonda WT, proteínas del lisado y la resina. Las calles fueron escindidas del gel y cortadas en 8 partes. Todos estos fragmentos fueron enviados a la ciudad de Lausanne, en Suiza, a la facilidad de proteómica del EPFL (École Polytechnique Fédérale de Lausanne). Allí se analizaron 5 réplicas del mismo experimento en un secuenciador de proteínas LC-MS tipo Orbitrap. Es decir que los pequeños péptidos resultantes de la digestión con tripsina, fueron primero separados por cromatografía líquida y luego enviados a un secuenciador de masa de alto rendimiento. Los datos que arrojó el secuenciador fueron sometidos a las bases de datos en proteómica Proteome Discoverer 1.1 y Mascot 2.3. Finalmente se analizó la lista resultante con el programa Scaffold viewer 3 (Colaboración con Diego Chiappe).

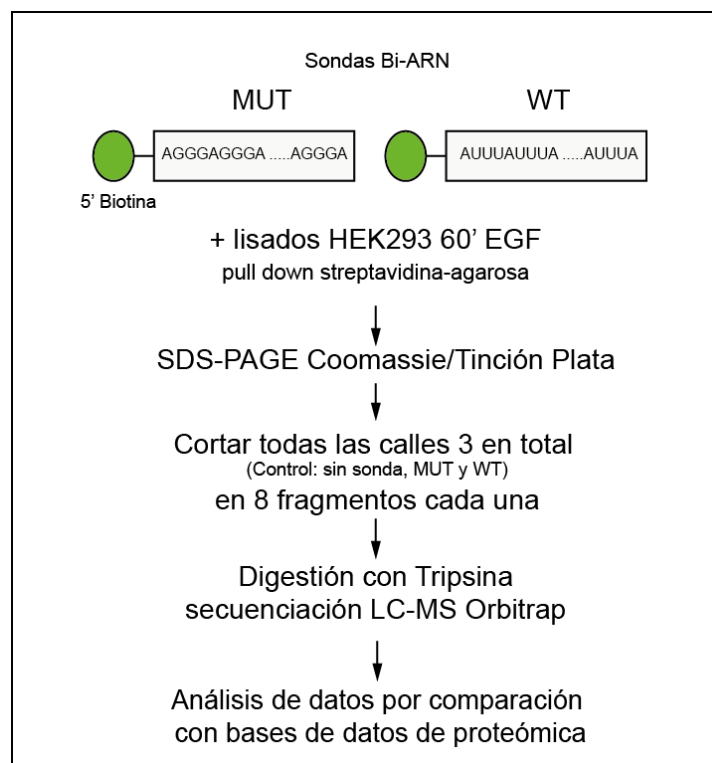


Figura R16. Diagrama del diseño experimental de la purificación de complejos proteína - sonda de ARN biotinilada. Lisados de células HEK293 incubadas durante 16 horas en medio sin suero y estimuladas durante 60 minutos con EGF (epidermal growth factor) fueron incubados con sondas wild-type, mutante y sin sonda. Estos complejos fueron purificados con una resina de streptavidina-agarosa y separados en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. Luego de teñir el gel con coomassie coloidal o con tinción de plata, cada calle fue escindida y partida en 8 fragmentos. Las proteínas en cada fragmento fueron purificadas de la poliacrilamida y tratadas con tripsina ON (overnight). Luego esos fragmentos fueron separados por cromatografía líquida (LC) y secuenciados en un secuenciador de masa tipo Orbitrap. Los datos arrojados se compararon con bases de datos de proteómica.

Las listas de proteínas resultantes de cada experimento fueron comparadas entre sí. Eliminamos todas las proteínas que aparecieron en la calle control y sólo nos quedamos con aquellas que se asociaron a la sonda WT (aunque también pudiesen asociarse a la MUT), en por lo menos, 3 experimentos independientes. Además filtramos aquellas proteínas de las que se encontraron menos de 2 péptidos únicos. Esa selección se muestra en la Tabla R17. Las filas sombreadas y resaltadas corresponden a AUBPs. En la Figura R18 se pueden observar un cuantificación de la cantidad de péptidos únicos encontrados en 3 réplicas del experimento. La cantidad de péptidos únicos es un reflejo indirecto de la cantidad de proteína encontrada. De todas las proteínas identificadas, las que pertenecen a la categoría de AUBP fueron las únicas de la lista en asociarse en mayor medida a la sonda WT que a la MUT, y hasta en algunos casos, se asociaron de manera exclusiva a la misma. En la Figura R18 incluimos una proteína, no AUBP (DIS3) en la que claramente se ve como se asocia en mayor medida a la sonda mutante. Esta asociación selectiva de las AUBPs a la sonda que posee la secuencia WT, indicaría la importancia de esta secuencia ARE para su asociación y su especificidad.

Nombre de la Proteína	Nbre. del Gen	Sinónimo	Nro. ID Uniprot	Peso Molec.
ELAV-like protein 1	ELAVL1	HuR	Q15717	36 kDa
ELAV-like protein 2	ELAVL2	HuB	Q12926	40 kDa
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	KSRP	Q92945	73 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	AUF1	Q14103	38 kDa
Exosome complex exonuclease RRP44	DIS3	RRP44	Q9Y2L1	109 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	HNRPA0	Q13151	31 kDa
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	HNRPC	P07910	34 kDa
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	IGF2BP2	VICKZ2	Q9Y6M1	66 kDa
Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	PABP1	P11940	61 kDa
Isoform JKTBP2 of hnRNP D-like	HNRPDL	JKTBP	O14979	34 kDa
Lupus La protein	SSB	SSB	P05455	47 kDa
Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	PTB	P26599	57 kDa
Ras GTPase-activating protein-binding prot. 1	G3BP1	G3BP	Q13283	52 kDa
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	RTCD1	RTC1	O00442	39 kDa
Serine-threonine kinase receptor-assoc.protein	STRAP	UNRIP	Q9Y3F4	38 kDa
Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	SAP155	O75533	146 kDa
Cold shock domain-containing protein E1	CSDE1	UNR	O75534	89 kDa

Tabla R17. Lista de proteínas asociadas al ARE de *c-fos*. En esta tabla se encuentra una selección de proteínas identificadas como parte de complejos con el ARE de *c-fos* biotinilado. Encontramos 4 AUBPs, marcadas en gris. Son estas proteínas las únicas que se asocian en mayor medida a la sonda WT que a la mutante, todas las demás no muestran este patrón. Entre todas las funciones asociadas a cada proteína, encontramos funciones de degradación, como parte del exosoma, splicing, signaling y distintas etapas del metabolismo del ARN.

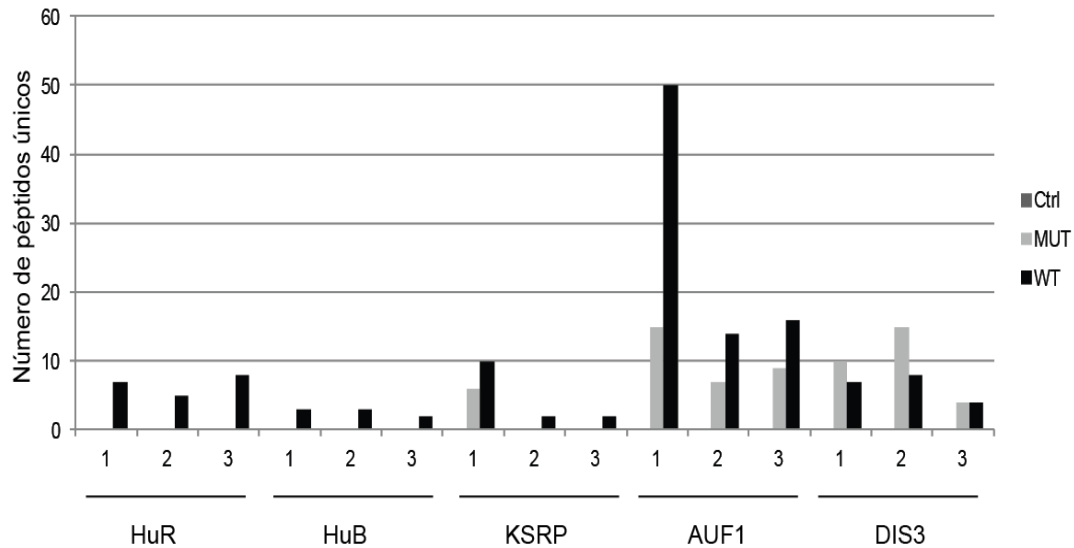


Figura R18. AUBPs asociadas al ARE de c-fos. Número de péptidos únicos identificados para las AUBPs asociadas a la sonda biotina-ARE. Los números del eje de abscisas se refieren a replicados del mismo experimento. Las barras grafican la cantidad de péptidos de cada proteína en 3 casos: control, sin sonda agregada; MUT, proteínas incubadas con la sonda mutante; WT, proteínas incubadas con la sonda en su versión salvaje.

Una vez que las proteínas fueron identificadas por secuenciación de espectrometría, continuamos con el proceso de validación de su asociación al ARE por otros métodos. Resolvimos lisados de células HEK293 estimuladas con EGF, en un gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE y lo teñimos con nitrato de plata. La tinción reveló las bandas correspondientes a todas las proteínas purificadas (Figura R19). En el gel incluimos un control con una sonda no relacionada, es decir que no posee secuencias del tipo ARE (este control se realizó incubando los lisados en presencia de una sonda biotinilada de 47 pares de bases que corresponde a una secuencia presente en el exón EDI del gen de la fibronectina (257)) y un control sin sonda, aparte de las calles correspondientes a las incubaciones con la sonda WT y MUT.

El gel teñido con nitrato de plata reveló que, en principio, no existen proteínas inespecíficas asociadas a la resina (calle sin sonda). Por otra parte, comparando las calles de las sondas WT y MUT, encontramos 2 bandas correspondientes a proteínas preferentemente unidas a la sonda WT (señaladas con flechas en el panel superior de la Figura R19). Para identificar mediante anticuerpos específicos a estas proteínas, el mismo experimento fue corrido en un gel de poliacrilamida y transferido a una membrana de PVDF. Las bandas coincidieron con 2 de las AUBPs identificadas en la Tabla R17: KSRP como HuR. Estas dos proteínas no son detectadas en las calles control, 1 y 2.

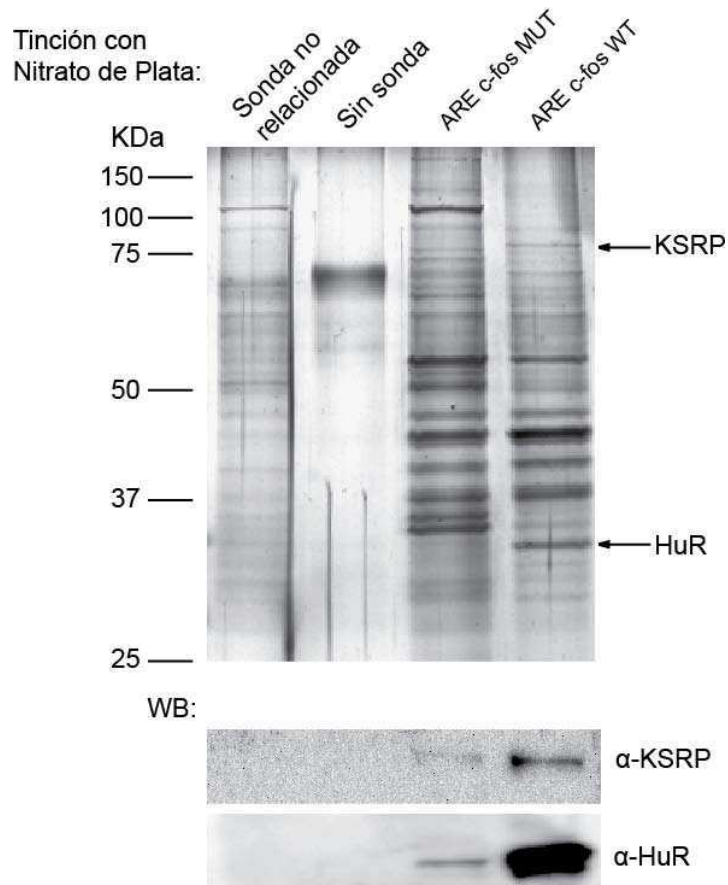


Figura R19. Proteínas asociadas al ARE de *c-fos*. Células HEK293 estimuladas durante 60 minutos con EGF fueron lisadas. Luego de cuantificar la cantidad de proteína presente en el lisado se incubaron las sondas de ARN biotiniladas. En el panel que muestra un gel de poliacrilamida en donde se corrieron los complejos ARN-proteína las calles corresponden a : 1) proteínas del lisado incubadas con una sonda biotinilada del gen de fibronectina, no relacionada con la secuencia ARE; 2) Resina de streptavidina incubada solo en presencia de lisado celular; 3) Sonda del ARE de *c-fos* mutado (MUT); 4) Sonda del ARE de *c-fos* salvaje o WT. Los pesos moleculares son los que se indican en la parte izquierda del gel y en la parte opuesta están marcadas dos AUBPs que parecen estar más fuertemente asociadas a la variante WT de la sonda, KSRP (de peso molecular entre 72 y 80 kDa) y HuR (de peso molecular entre 34 y 36 kDa). Al transferir estas proteínas a una membrana de PVDF y realizar un western Blot (WB), esas proteínas son reveladas, confirmando su asociación preferencial a la sonda WT.

De esta manera logramos identificar varias proteínas que se podrían estar uniendo al ARE de *c-fos* dentro de la célula regulando su procesamiento. De todas ellas, HuR y KSRP fueron validadas por WB, convirtiéndolas en candidatos a evaluar prosiguiendo con los estudios sobre los procesos regulatorios que afectan al ARNm de *c-fos*

4.2. Estudio de la influencia de los factores de unión a la región ARE en el proceso de decaimiento del ARNm de *c-fos*

4.2.1. Influencia de la AUBP HuR

Comenzamos el análisis de la participación de HuR en la regulación del ARNm de *c-fos*, observando su localización subcelular. En células NIH3T3 pudimos observar la translocación de HuR del núcleo al citoplasma, luego de estimular a las células con PDGF durante una hora (Figura R20). Esta migración es consistente con una translocación conjunta de HuR y los ARNm a los cuales se asocia, sobre todo en el caso de ser mensajeros que solo son transcritos luego de iniciada una cascada de señalización como es el caso del ARNm de *c-fos*.

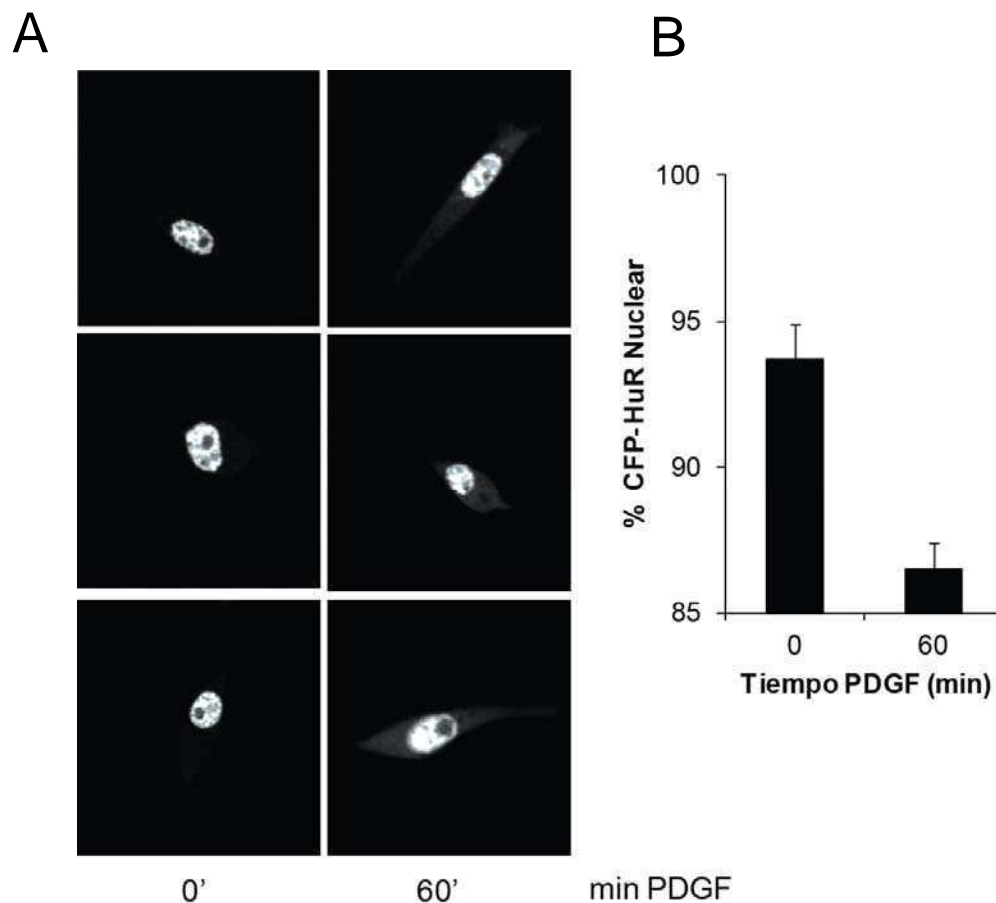


Figura R20. Estudio de la localización subcelular de CFP-HuR. A, Células NIH3T3 fueron transfectadas con la construcción pBAXEN-CFP-mHuR, que expresa a la proteína HuR murina fusionada a la proteína fluorescente cian, CFP. 24 horas post-transfección las células fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas para luego ser estimuladas con PDGF durante 1 hora y fijadas con paraformaldehído 4%. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Olympus FV-1000. Se muestran fotos de 6 células representativas. B, Representación gráfica de la cuantificación de fluorescencia presente como porcentaje de CFP dentro del núcleo utilizando el software ImageJ.

Para comenzar con la evaluación de la influencia de HuR sobre la expresión de *c-fos*, realizamos un experimento de depleción con técnicas de ARN de interferencia o siRNA. Adquiriendo oligonucleótidos comerciales de ARN preparados para este fin (Qiagen) evaluamos aquel que presentaba un mejor efecto sobre la disminución de la expresión de HuR. En la Figura R21B observamos como 48 horas luego de la transfección, la cantidad de HuR presente en las células ha disminuido notablemente. Utilizando entonces este siRNA testearmos el efecto sobre la expresión de *c-Fos*. Pudimos concluir que la disminución de HuR dentro de la célula tiene un efecto drástico sobre la correcta regulación de *c-Fos*. En el Western Blot de la Figura R21A, observamos como, al disminuir la cantidad de HuR presente, la cantidad de *c-Fos* también disminuye.

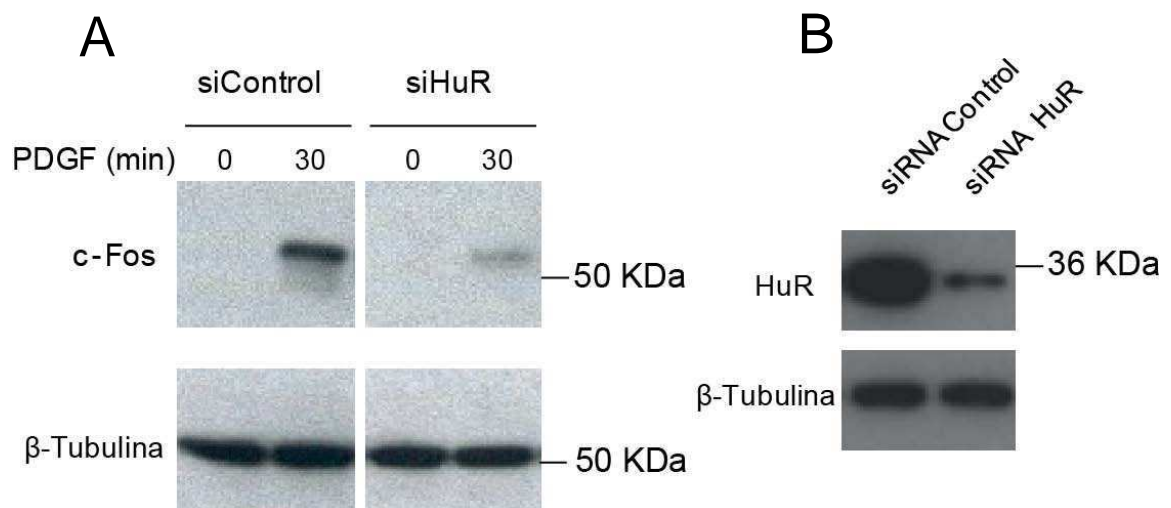


Figura R21. Efectos de la depleción de HuR. A, Células NIH3T3 fueron depletadas de la proteína HuR mediante la transfección de un siRNA contra la secuencia del ARNm de esta proteína. 48 hs post-transfección se detectó la presencia de la proteína *c-Fos* en estas células al estimular durante 30 minutos con PDGF. El control se realizó transfectando con siRNA "scramble", que constaba de distintos oligonucleótidos de ARN que tenían como blanco secuencias aleatorias, es decir, ningún gen en particular. Se observa el efecto de la ausencia de HuR sobre la expresión de *c-Fos*. B, ídem A pero observando la expresión de HuR.

Continuamos con el estudio de la influencia de HuR sobre la expresión de *c-fos* utilizando el sistema inducible por tetraciclina. Cotransfectamos entonces, los 3 reporteros descritos en la Sección 2.1 con un vector que codificaba para HuR murino y medimos su efecto mediante qPCR para luciferasa. La sobreexpresión de HuR no parece tener efecto en los vectores control pLuc β Globin y pLuc Δ ARE (Figura R22B y C), pero sí estabiliza a pLucFosWT (Figura R22A). En el panel D de la Figura R22 validamos la expresión de la proteína transfectada HA-mHuR en un Western Blot en células HeLa. Por lo tanto estos experimentos nos confirman la función estabilizante de HuR sobre el mensajero de *c-fos*.

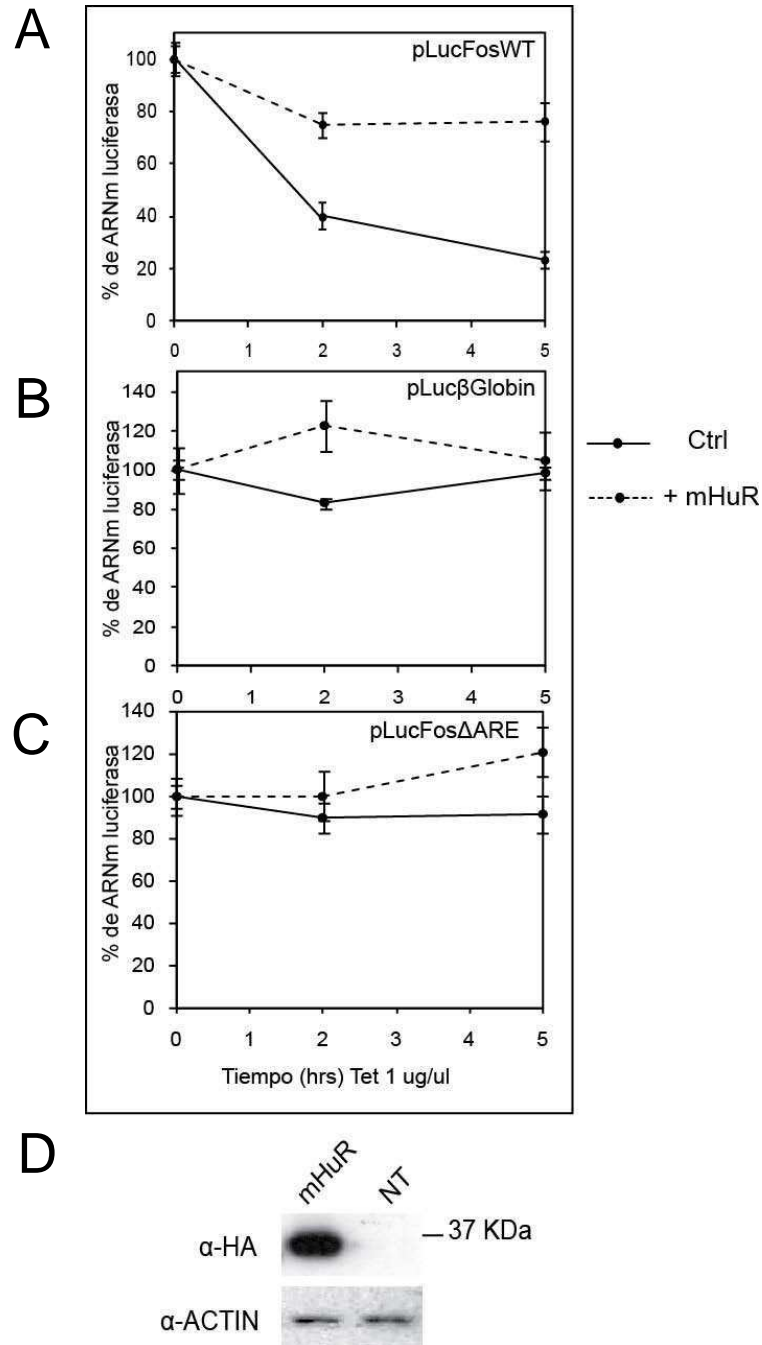


Figura R22. Influencia de HuR sobre el decaimiento del ARNm de *c-fos*. *A*, Células HeLa TetOff fueron co-transfectadas con el reportero pLucFosWT y con el plásmido de expresión pCEFL-HA-mHuR. Luego de 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con tetraciclina 1 ug/ul durante 2 ó 5 horas. El ARN total fue extraído y se midieron los niveles de ADNc de luciferasa por qPCR, que fueron normalizados midiendo cantidad de ADNc de higromicina. *B*, ídem *A* pero transfectando el reportero pLucβGlobin. *C*, ídem *A* pero transfectando el reportero pLucΔARE. *D*, Western Blot contra el epítipo HA en células HeLa TetOff transfectadas con el plásmido pCEFL-HA-mHuR o sin transfectar (NT). El control de carga se realizó revelando los mismos lisados celulares contra actina.

4.2.1.1. Análisis de los caminos de transducción de señales que afectan la fosforilación de HuR

Si bien logramos determinar que la función de HuR es estabilizar el ARNm de *c-fos*, a continuación quisimos determinar si existía una relación entre este efecto y la vía de señalización de p38 SAPK o con alguna otra vía de señalización celular.

Como primera aproximación al estudio de las fosforilaciones y quinasas que regulan la actividad de HuR realizamos un ensayo de fosforilación *in vitro* en fase sólida o “solid-phase kinase assay”. En este ensayo producimos HuR fusionado a GST (glutación S-transferasa) de manera recombinante en bacterias y lo purificamos utilizando una resina de sefarosa covalentemente unido a la molécula glutación. La diferencia con otro protocolo de purificación de proteínas recombinantes es que, en este caso, no eluimos la proteína de la resina sino que la dejamos unida. Esta herramienta (resina-proteína recombinante) que actúa como anzuelo para potenciales proteínas asociadas a HuR, es incubada con lisados celulares sometidos a distintos tratamientos. Finalmente, la resina es precipitada e incubada con ATP [γ - 32 P]. La idea detrás de este experimento es precipitar los complejos de HuR y sus quinasas asociadas que al ser incubadas en presencia de ATP radiactivo son capaces de fosforilar a la AUBP. El resultado nos indica cual es el estado de actividad de las quinasas que regulan la actividad de HuR. En la Figura R23 A utilizamos lisados de células NIH3T3 tratados con PDGF durante distintos tiempos y los comparamos con lisados preincubados con el inhibidor de p38 SAPK SB203580. El tratamiento con el inhibidor produce un incremento en el nivel de HuR fosforilado.

El hecho de que la fosforilación de HuR disminuya de manera p38 dependiente podría indicar que están sucediendo 2 eventos: a) que p38 SAPK regule negativamente a las quinasas que fosforilan a HuR; b) que p38 SAPK active fosfatasas de HuR.

De esta manera, HuR sería un importante regulador de la respuesta a estrés celular (218). En este contexto la regulación de HuR mediada por la vía de p38 SAPK, una quinasa activada por estrés se presenta como una posibilidad coherente. Se publicó en 2009 un estudio que muestra la fosforilación de HuR por p38 SAPK (53), luego de un tratamiento con radiación gamma. Este resultado nos pareció sumamente interesante pero al profundizar en el análisis, notamos que el estudio reporta fosforilación en la treonina 118, dentro de la secuencia de HuR, que en principio no está seguida de una prolina, y un requisito para que una secuencia sea blanco de fosforilación de una MAPK es presentar una serina o treonina seguida de prolina. Por este motivo decidimos estudiar la fosforilación de HuR con detenimiento comenzando con la búsqueda de

evidencias básicas propias, sin olvidar este antecedente pero considerando la posibilidad de encontrar eventos diferentes de fosforilación.

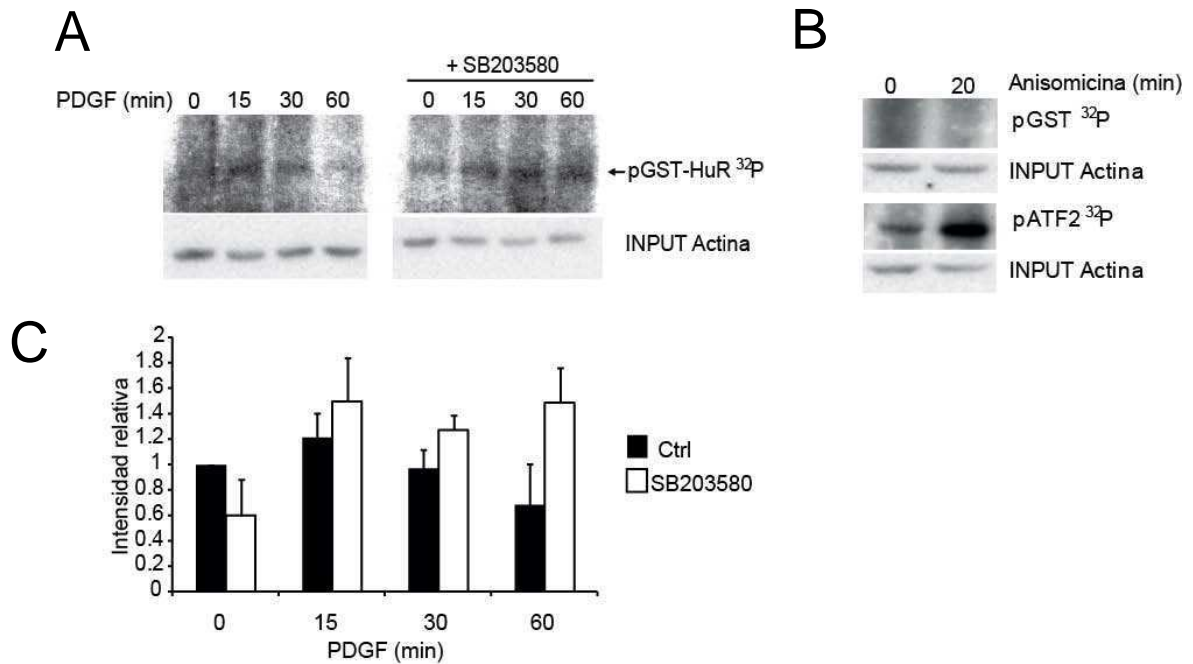


Figura R23. Influencia de p38 SAPK sobre el estado de fosforilación de HuR. A, Células NIH3T3 fueron incubadas durante los tiempos indicados con PDGF con o sin el inhibidor de p38 SAPK, SB203580 y lisadas posteriormente. GST-HuR unida a glutatión-sefarosa fue incubada con estos lisados durante 16 horas. Luego de la purificación de la resina y de todas las proteínas asociadas, la misma fue incubada con ATP [γ -³²P] y se corrió un SDS-PAGE que fue revelado por autorradiografía. B, Ídem A pero tratando a las células con anisomicina, un agente inductor de estrés. Estos lisados fueron incubados con GST como control negativo y con GST-ATF2 como control positivo del experimento. C, Cuantificación promedio de los valores de intensidad observados en 3 experimentos (como el realizado en A) independientes.

Evaluamos el nivel de fosforilación de distintos residuos sensibles de ser fosforilados como serinas, treoninas o tirosinas. Sobreexpresando HuR en células HEK293 y purificándola pudimos realizar Western Blots que revelaran los fosfo-residuos. Transfectamos células con una versión de HuR fusionada a un epítipo que deriva de la interacción biotina-estreptavidina, pero que presenta mayor afinidad. Este epítipo se denomina Strep-tag (nosotros utilizamos la versión Strep2) y codifica para un pequeño péptido de 8 aminoácidos (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Originalmente creado para purificar proteínas recombinantes, fue clonado en vector de expresión para células de mamífero (vector donado por el Dr. J. LaMarre). Este epítipo es purificado de manera muy específica utilizando una resina llamada StrepTactin (IBA BioTAGnology). El epítipo Strep puede ser revelado utilizando un anticuerpo monoclonal comercial.

Al evaluar el nivel de fosforilación de HuR en los distintos residuos blanco, nos encontramos con diferencias importantes entre células control y aquellas en las que la actividad de p38 SAPK fue inhibida utilizando SB203580. En el caso de fosfo-serinas inhibir la actividad de p38 SAPK incrementa el nivel de fosforilación, aún en tiempos basales (Figura R24 A). En contraposición, la fosforilación en tirosina se ve disminuida al utilizar el SB203580 y si bien todavía no se conoce la influencia de fosforilaciones en tirosina sobre la actividad de HuR, es un resultado sumamente interesante (Figura R24 B). En contraste, analizando fosfo-treoninas no obtuvimos un resultado concluyente.

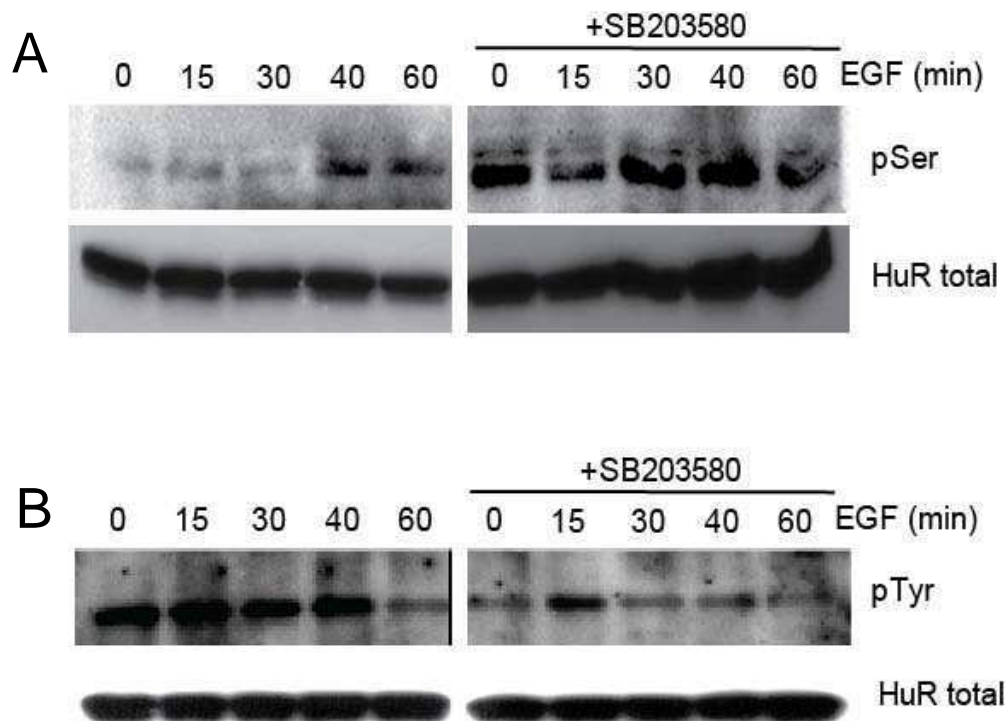


Figura R24. Influencia de la vía de p38 SAPK sobre la fosforilación de HuR. A, Células HEK293 fueron transfectadas con el pcDNA3-Strep3-HuR. 24 horas post-transfección las células fueron incubadas en medio sin suero durante 16 horas y tratadas con EGF durante los tiempos indicados, algunas fueron pretratadas con el inhibidor SB203580. Se precipitó a la proteína Strep-HuR utilizando la resina comercial Streptactin y el precipitado se corrió en un gel SDS-PAGE. Se realizaron Western Blots utilizando un anticuerpo que reconoce serinas fosforiladas. El nivel de HuR total se reveló utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce al epítipo Strep (esta banda fue validada con anticuerpos que reconocen a HuR). B, Idem A pero revelando con un anticuerpo que reconoce tirosinas fosforiladas.

Por lo tanto una conclusión de esta primera aproximación a la regulación por fosforilación de la actividad de HuR, es que la vía de p38 SAPK regula de manera

negativa la fosforilación de esta proteína, por lo menos en cuanto a su nivel global de residuos fosforilados y en cuanto a la fosforilación en serinas.

Por otra parte conseguimos una variante mutante de HuR para poder evaluar la relación que existe entre algunos de los sitios blancos de fosforilación mejor descritos y la actividad de HuR como proteína estabilizadora. Gracias a vectores de expresión para las formas humanas de HuR pudimos evaluar la influencia de un triple mutante (pCEFL-HA-hHuR WT y pCEFL-HA-hHuR 3xM). Este mutante presenta las siguientes mutaciones: 1) Treonina 118 mutada a alanina (T118A); 2) Serina 202 mutada a alanina (S202A); 3) Serina 221 mutada a alanina (S221A). Las construcciones fueron cotransfectadas junto con el vector reportero para *c-fos* WT y evaluamos su efecto sobre el patrón de decaimiento. El resultado se muestra en la Figura R25. La sobreexpresión de la forma WT de HuR estabiliza al reportero de *c-fos*, así como lo hiciese en el caso de la proteína HuR murina, pero lo notable es que el triple mutante pierde la capacidad de estabilizar al ARNm de luciferasa (Figura R25 A).

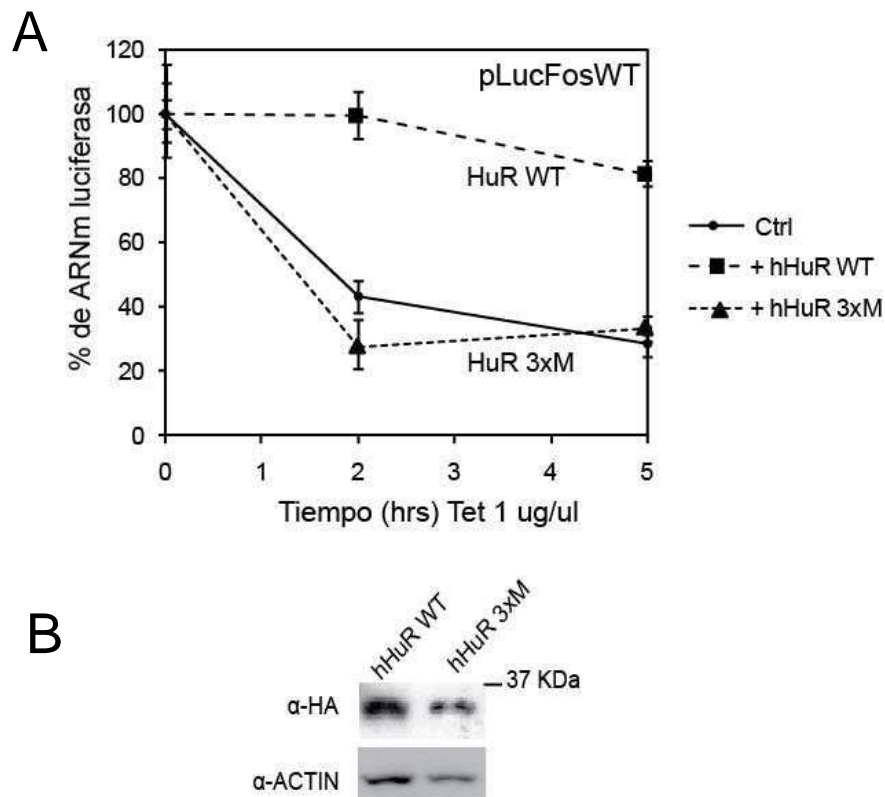


Figura R25. Influencia de los sitios de fosforilación de HuR sobre el decaimiento del ARNm de luciferasa. A, Células HeLa TetOff fueron co-transfectadas con el vector pLucFos WT y con pCEFL-HA-hHuR WT o pCEFL-HA-hHuR 3xM. Se realizaron los ensayos de decaimiento y el ADNc de luciferasa se midió por qPCR. B, Western Blot contra HA en células HeLa TetOff transfectadas con el pCEFL-HA-hHuR WT o pCEFL-HA-hHuR 3xM. El control de carga se realizó revelando los mismos lisados celulares contra actina.

Continuando con este análisis tratamos de identificar las quinasas específicas que podrían estar actuando directamente sobre HuR y su potencial relación con los datos obtenidos respecto de la participación de la vía de p38 SAPK en la regulación de la estabilidad del ARNm de *c-fos*. Realizamos un ensayo de fosforilación en gel o “in-gel kinase assay”, en el cual copolimerizamos junto con la estructura de un gel de acrilamida, una cierta cantidad de proteína recombinante GST-HuR (o GST para realizar el control negativo). Luego en este gel corremos lisados celulares, se renaturalizan las proteínas (el gel es desnaturizante), se incuba el gel en presencia de ATP [γ - 32 P] y se lo revela por autorradiografía. Este ensayo nos permite tener una idea del peso molecular de todas las quinasas que son capaces de fosforilar a HuR.

Evaluamos lisados de células NIH3T3 m1.2 proliferando o tratadas con carbacol. El panel A de la Figura R26 muestra el gel que posee a HuR dentro de su estructura polimérica y las bandas que se observan corresponden a quinasas que se autofosforilan, que fosforilan a otra proteína del mismo peso molecular o que fosforilan a HuR, observando las bandas que aparecen en el panel B de la Figura R26 podemos descartar los 2 primeros casos y quedarnos sólo con las quinasas específicas que se encuentran actuando sobre HuR. La primera observación es que en la calle correspondiente a células proliferando observamos un patrón distinto que no se vuelve a repetir en diferentes condiciones, una quinasa de aproximadamente 32 kDa de peso parece estar fosforilando a HuR. Al incubar a las células con medio sin suero durante 12-16 horas y luego tratarlas con carbacol, desaparece esta banda de 32 kDa y aparecen con más fuerza otras dos, una correspondiente a una proteína de aproximadamente 34 kDa y otra de 72 kDa. La banda más pequeña parece tener un pico de activación a los 30 minutos post-estímulo, indicado con una flecha vertical en la parte inferior. La banda de 72 kDa parece aumentar en activación a medida que pasa el tiempo. Al tratar las células con SB203580, ambas bandas se presentan más intensas, lo cual indicaría que estas quinasas se encuentran más activas en estas circunstancias. Este resultado concordaría con los todos los resultados anteriores que relacionan a la vía de p38 SAPK con los potenciales niveles de fosforilación sobre HuR.

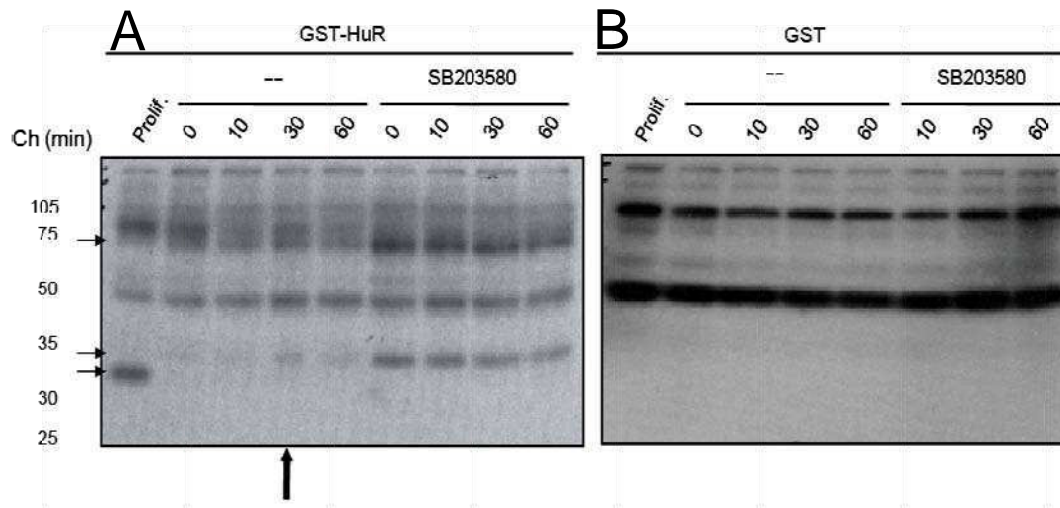


Figura R26. Ensayo de fosforilación en gel. A, Ensayo de fosforilación *in vitro* en gel o “In-gel kinase assay”. Se sintetizó un gel desnaturante de poliacrilamida junto con GST-HuR producida de manera recombinante. Luego se corrieron en ese gel lisados celulares de células NIH3T3 m1.2. Los lisados fueron extraídos de células proliferando y de células incubadas en medio sin suero durante 16 horas y tratadas con carbacol durante los tiempos indicados. Se utilizaron también lisados de células preincubadas con SB203580. Luego de realizar la corrida, las proteínas se incubaron en distintas soluciones de urea (de mayor a menor concentración) con el fin de renaturalizar las proteínas y devolverles su estructura nativa. Finalmente el gel se sumergió en una solución con ATP [γ - 32 P]. El gel se secó y se reveló por autorradiografía. B, Idem A pero colocándolo en la estructura del gel GST como control negativo. Las bandas reveladas fueron descartadas del análisis del gel en A.

Continuamos con los experimentos de fosforilación *in vitro* tratando de determinar la fosforilación de HuR por MAPKs. Evaluamos entonces la capacidad de cada una de las MAPKs disponibles en el laboratorio (y de MK2) para fosforilar a HuR. Las quinasas activadas y purificadas a partir de lisados de células transfectadas con cada isoforma de las MAPKs fueron incubadas en presencia de GST-HuR o de su sustrato específico control y de ATP [γ - 32 P]. La Figura R27 muestra como ni las MAPKs ni MK2 son capaces de fosforilar directamente a HuR.

4.2.1.2. Estudio de la actividad de HuR como proteína de unión al ARE de *c-fos*.

Los resultados hasta aquí presentados indican que la estabilidad del ARN mensajero de *c-fos* está regulada por elementos en *cis* (la secuencia ARE dentro de su 3'UTR), elementos en *trans* (AUBPs y otras proteínas asociadas a la secuencia ARE) y caminos de transducción de señales (la vía de p38). En pos de establecer un posible mecanismo de acción de todos estos elementos quisimos caracterizar la asociación de las proteínas a la región ARE y su dependencia de las condiciones de señalización celular.

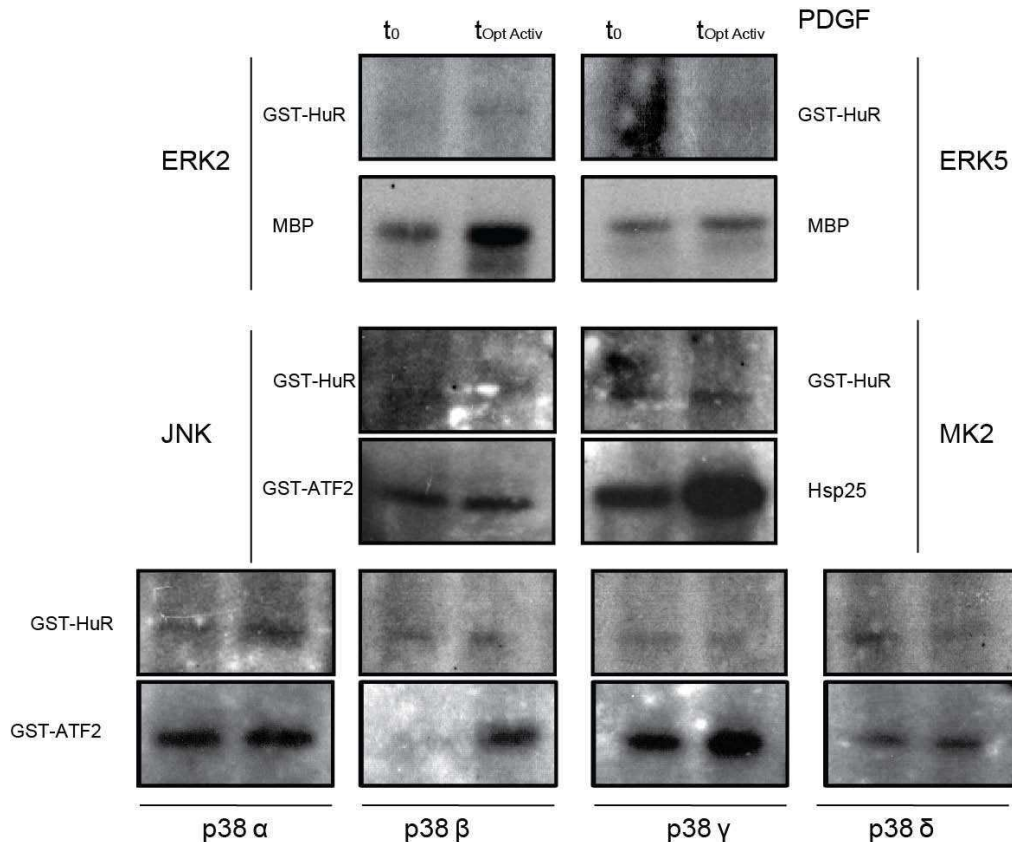


Figura R27. Ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando HuR como sustrato. Células NIH3T3 fueron transfectadas con las isoformas de cada MAPK fusionadas a un epítipo (HA-ERK2, HA-ERK5, HA-JNK1, myc-MK2, HA-p38 α , β , γ , δ). 24 horas post-transfección las células fueron incubadas en medio sin suero durante 2 (para SAPKs, JNK y p38s) o 16 horas (ERKs) y tratadas con PDGF durante los tiempos óptimos de activación (indicado como $t_{Opt\ Activ}$) indicados en la Figura R4. Los lisados fueron incubados con GST-HuR recombinante o con su sustrato específico como control positivo de fosforilación (ERKs: MBP o proteína básica de la mielina; JNK y p38s: ATF2; MK2: Hsp25).

Mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética de ARN, pudimos determinar los complejos ARN-proteína formados. Toda la región ARE fue clonada en un vector río abajo de un promotor T7 (pBluescriptFos) y transcripta *in vitro* en presencia de UTP [α - ^{32}P]. La sonda purificada se enfrentó a lisados celulares extraídos luego de distintos tratamientos. Estos complejos ARN-proteínas fueron digeridos con RNasa T1 con el fin de tener complejos discretos que pudiesen correr en un gel y ser reconocidos como individuales. Los complejos fueron corridos en un gel de poliacrilamida nativo y los visualizamos por autorradiografía.

Parte de la puesta a punto de esta técnica, basada en trabajos previos (258), fue observar la cantidad, la especificidad y la calidad de los complejos resultantes. En la segunda calle de la Figura R28 observamos 4 complejos formados luego de la

incubación de los lisados celulares con la sonda correspondiente a la región ARE. A medida que fuimos realizando más experimentos pudimos comprobar que estos complejos iniciales que observamos se repetían y decidimos concentrarnos en dos de ellos, señalados como complejo 1 ó C1 y complejo 2 ó C2, en la Figura R28. Estos complejos son específicos ya que desaparecen al incorporar en la reacción una cantidad 10 y 20 veces mayor de la sonda ARE, y no lo hacen al competir con una sonda de secuencia distinta como lo es la sonda correspondiente a una región del 3'UTR de la β -globina. Estos complejos están formados por proteínas unidas al ARN, dado que al tratar con proteinasa K o PK, los mismos desaparecen. El tratamiento con PK se realizó posteriormente a la incubación de los lisados con la sonda.

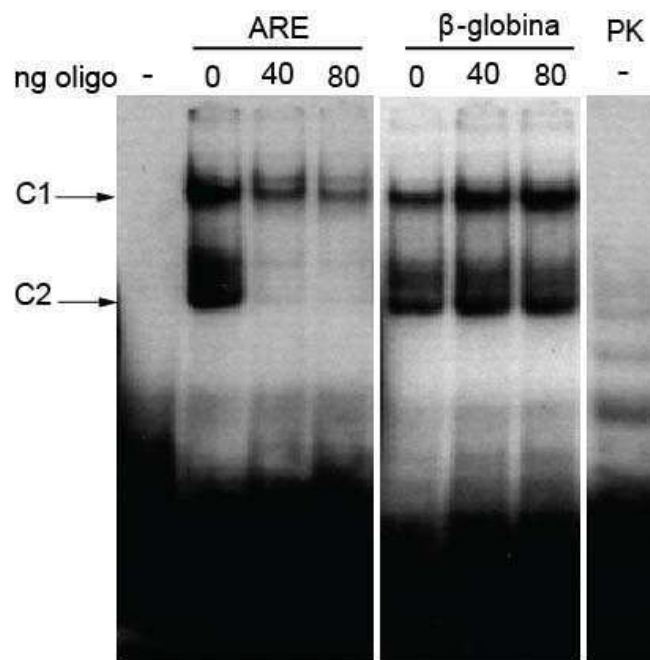


Figura R28. Complejos ARN ARE *c-fos* y proteínas de unión. Se sintetizaron *in vitro* 2 sondas de ARN marcadas radiactivamente: sonda ARE y β -globina. La sonda ARE fue incubada con un lisado celular de NIH3T3. Se agregaron distintas cantidades de sonda específica (ARE, calles 3 y 4) o inespecífica (β -globina, calles 6 y 7) como competencia en la incubación en las cantidades indicadas 10:1 (40 ng) o 20:1 (80 ng). Se agregó proteinasa K luego de la formación de los complejos (PK, calle 8). Los complejos formados fueron corridos en un gel de poliacrilamida nativo y revelado por autorradiografía.

Con el objetivo de identificar la identidad de las proteínas que estarían formando estos complejos con la sonda del ARE de *c-fos*, agregamos anticuerpos específicos que reconocen AUBPs reportadas que se asocian a esta región (anti-HuR y anti-AUF1) y AUBPs que no se asociarían directamente a esta región (anti-TTP). Solamente la incubación con el anticuerpo que reconoce a HuR logró retrasar uno de los complejos

previamente señalados (C2) a un nuevo complejo señalado con una flecha en la Figura R29.

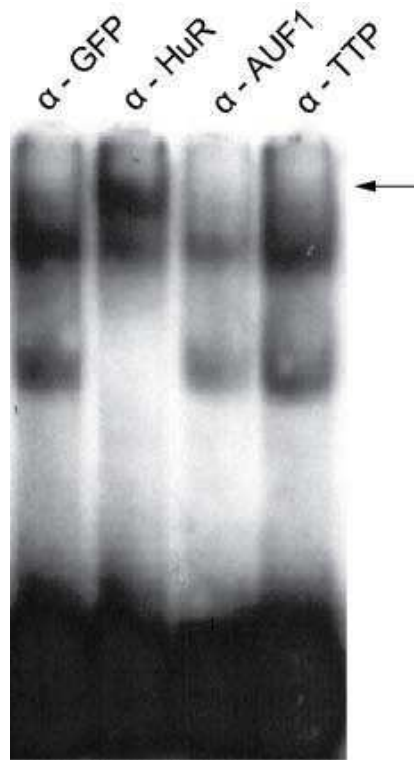


Figura R29. Identificación de los componentes de los complejos ARN ARE *c-fos*. La sonda ARE fue incubada en presencia de lisados celulares de NIH3T3 y 1 ug de anticuerpos específicos contra GFP (control negativo), HuR, AUF1 y TTP. El complejo retrasado en la calle correspondiente al anticuerpo que reconoce a HuR se encuentra marcado con una flecha en la parte derecha del gel.

Realizamos otro experimento pero introduciendo una variante: unimos covalentemente las proteínas al ARN utilizando radiación UV (256 nm) (“crosslinking”). Estos complejos fueron digeridos con RNasa T1 y RNasa A con el objetivo de disminuir al mínimo la cantidad de ARN unido a las proteínas y corridos en un gel de proteínas desnaturizante. Este gel se transfirió en una membrana de PVDF y fue revelado tanto por autorradiografía como por Western Blot con anticuerpos específicos.

La Figura R30 muestra los ensayos de crosslinking. A medida que repetíamos los experimentos nos dimos cuenta de que existían diferencias entre la cantidad de cada integrante de los complejos dependiendo de si el lisado utilizado estaba recién colectado (lisado fr) o de si había sido guardado durante algunos días a -20 °C y congelado y descongelado (lisado vi). Al utilizar los lisados fr, observamos distintos complejos con la presencia de una proteína principal y al revelar con un anticuerpo que reconoce a HuR, esta banda de mayor intensidad coincide con aquella revelada. Esta es una nueva

instancia de identificación de HuR como una de las AUBPs más importantes en cuanto a su asociación al ARE de *c-fos*. Sin embargo cuando utilizamos lisados vi, comienzan a aparecer otros complejos por autorradiografía, si bien HuR sigue estando asociado.

En el panel B de la Figura 30 se muestran como se ven los complejos formados por la sonda ARE incubada con los distintos lisados fr y vi. En el caso del lisado fr, se ve incrementada la presencia del complejo C2, en donde encontramos a HuR, pero en el caso de lisados vi, el complejo C1 es el que se aparece de forma más intensa.

Si bien no podemos concluir un resultado concreto a partir de estos ensayos, es interesante notar como las características de los lisados de proteínas determinan la calidad de los complejos formados. Se puede inferir que a medida que pasa el tiempo, o el lisado es sometido a mucha manipulación, puede llegar a cambiar el estado de fosforilación o de modificaciones post-traduccionales de las proteínas presentes en ese lisado. En este contexto el cambio de composición de los complejos proteínas-ARE puede responder a estos cambios en la fosforilación o de alguna otra modificación, sugiriendo algunos de los mecanismos subyacentes en la regulación a través de los elementos ARE: a medida que pasa el tiempo luego de un estímulo cambiarían las afinidades, las cantidades relativas o las modificaciones de las proteínas involucradas, determinando el destino del ARN mensajero (en cuanto a su traducción, estabilización o degradación).

Una vez confirmada la identidad de, al menos, uno de los componentes del complejo C2, HuR, quisimos explorar como variaba su asociación a medida que pasaba el tiempo de estímulo. Realizamos ensayos de retardo de la movilidad electroforética de ARN utilizando la sonda ARE y lisados de células estimuladas con PDGF a lo largo de una curva de tiempo (0', 10', 15', 30', 40', 60', 90' y 120'). Medimos la intensidad de los complejos formados en el tiempo en 3 experimentos independientes y los graficamos en la Figura R31. Pudimos observar que el complejo C2 formado por HuR aumenta hasta llegar a un pico de asociación a los 30 minutos para luego decrecer. Sin embargo el complejo C1 sigue un patrón inverso al que muestra C2.

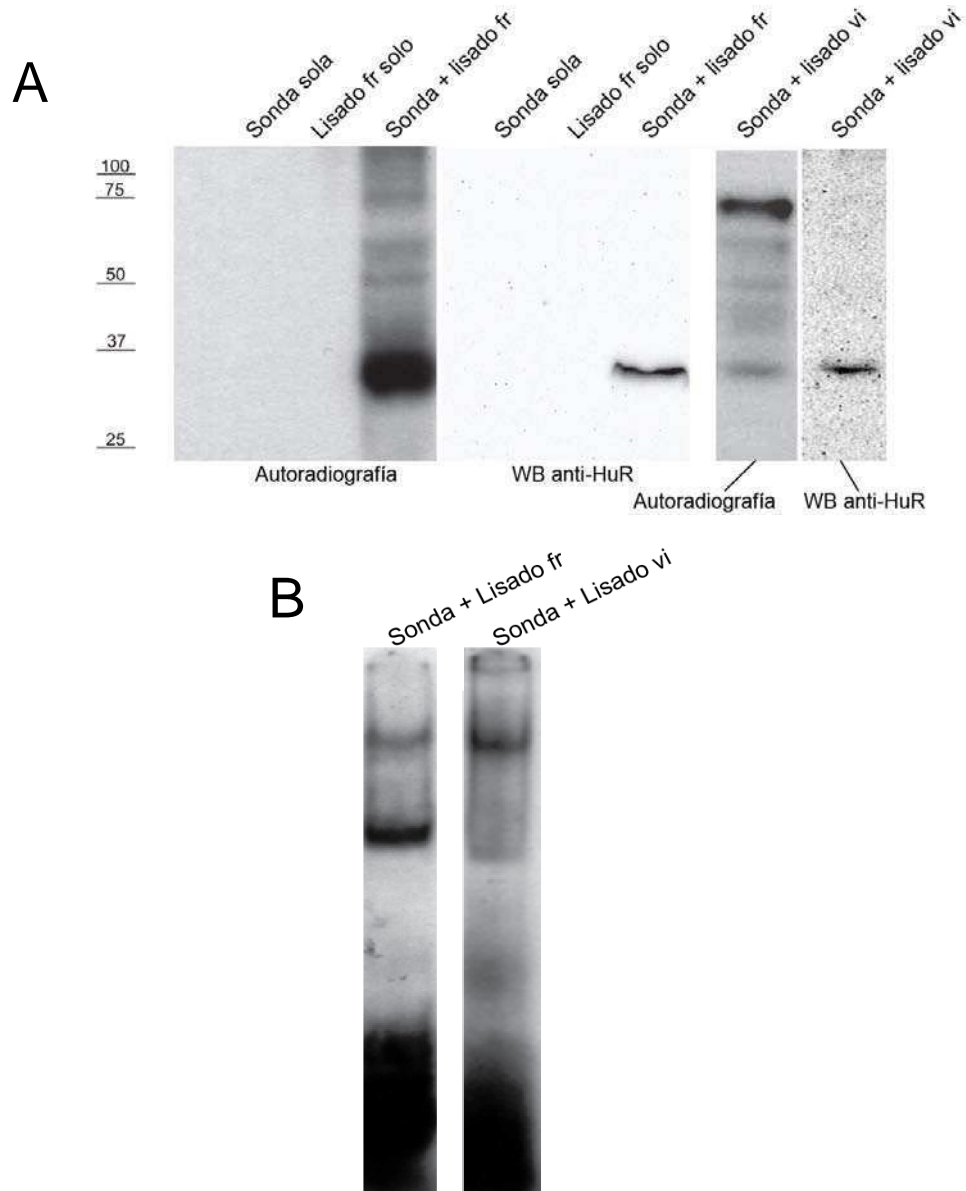


Figura R30. Distintos complejos ARE-proteínas según las características de los lisados utilizados. *A*, 2 tipos de lisados fueron evaluados: lisados colectados y utilizados de manera inmediata, o fr, fueron comparados con lisados manipulados varias veces o vi. Se incubó la sonda sola sin lisado, el lisado solo sin sonda y el lisado en presencia de la sonda de ARN ARE. Luego de la incubación los complejos fueron irradiados utilizando luz UV de 256 nm. Luego fueron separados en un gel de proteínas desnaturante o SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF, posteriormente revelada por autorradiografía o realizado un Western Blot utilizando un anticuerpo anti-HuR. *B*, Ensayo de retardo de la movilidad electroforética de ARN evaluando los distintos lisados fr y vi.

Esta cinética podría corresponder a un aumento de la asociación de HuR a medida que aumenta la cantidad de ARNm de *c-fos* (que posee un máximo de expresión a los 30 minutos post-estímulo, ver Introducción Figura I3) que podría resultar en una estabilización momentánea y que podría facilitar su traducción. Más allá de los 30

minutos, el mensajero de *c-fos* comienza a disminuir, evento que también coincidiría con la disociación de HuR de la región ARE, permitiendo que otros factores se asocien a esta región. Estos factores quizás tengan, por ejemplo, la función de reclutar componentes del exosoma, evento que finalmente desencadenaría la rápida degradación del mensajero.

Realizamos ensayos como los de la Figura R31 pero comparando los valores encontrados en la variación del complejo C2-HuR en experimentos en donde los lisados fueron pretratados con el inhibidor SB203580. En este caso también analizamos 3 experimentos independientes y comparamos la intensidad del complejo C2-HuR en lisados sin tratar y en los que se ha inhibido la actividad de p38 SAPK. La Figura R32 muestra como el tratamiento con el inhibidor logra incrementar la cantidad de complejo C2-HuR asociado al ARE, con respecto al control. Este resultado sigue la línea de hipótesis que indicaría cómo la vía de p38 SAPK modifica la actividad de HuR de manera tal que disminuya su fosforilación y al mismo tiempo su asociación a la región ARE en el 3'UTR de *c-fos*.

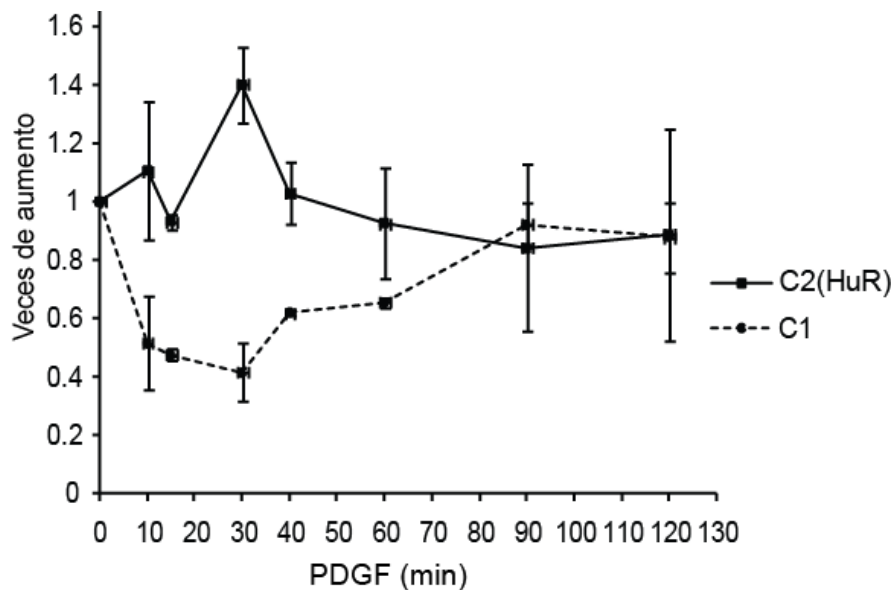


Figura R31. Variación de la asociación de los complejos C1 y C2 a la región ARE. Se realizaron 3 ensayos independientes de retardo de la movilidad electroforética en gel del ARN como el descrito en la Figura R28, utilizando lisados de células NIH3T3 estimulados con PDGF durante los tiempos indicados (0', 10', 15', 30', 40', 60', 90' y 120'). La intensidad de los complejos fue medida utilizando el software ImageJ. Se grafican los promedios y errores estándar de las intensidades de las bandas de cada complejo correspondientes a 3 experimentos independientes.

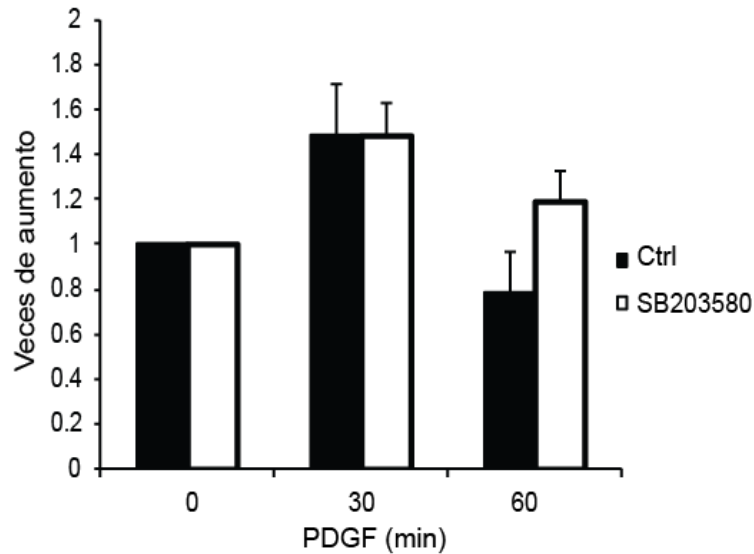


Figura R32. Asociación de HuR al ARE de *c-fos* luego de inhibir la vía de p38 SAPK. Ensayo de comparación de la intensidad del complejo C2-HuR como el descrito en la Figura R31, con la diferencia que se comparan lisados de células NIH3T3 estimuladas con PDGF con otros provenientes de células pretratadas con SB203580 y luego estimuladas con PDGF.

Quisimos descartar la posibilidad de que los complejos estuvieran formados en su totalidad por HuR. Para ello incubamos la sonda ARE radiactiva con cantidades crecientes de GST-HuR recombinante (las concentraciones variaban de 0 a 1 μ M). Comprobamos, en primera instancia, que la proteína recombinante GST-HuR es capaz de unirse al ARE, confirmando los datos obtenidos hasta aquí (en cuanto a la capacidad de esta proteína de estar asociada a esta región). Por otra parte, también observamos que HuR no necesariamente requiere un estado de fosforilación previa para su asociación. Finalmente, si bien se observa que a medida que aumenta la concentración de proteína los complejos se forman con intensidad también creciente, no pudimos detectar el patrón de bandas que sí observamos en el caso de la incubación con los lisados totales de células en cultivo (Figura R33).

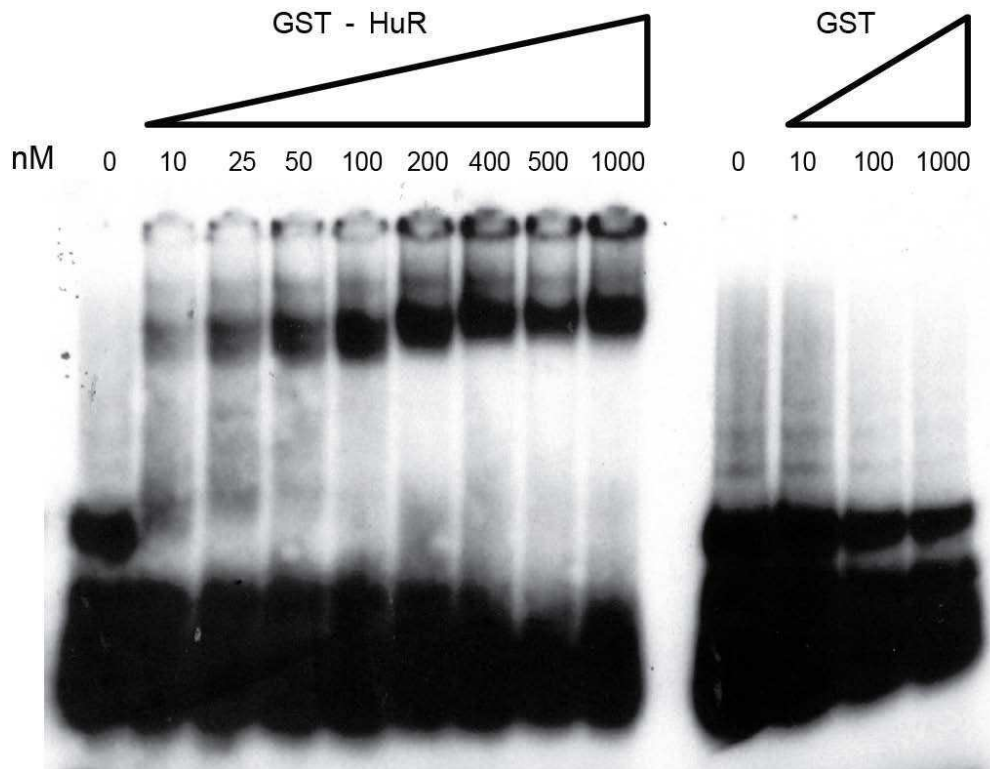


Figura R33. Complejo ARN ARE de *c-fos* y GST-HuR. La sonda ARE fue incubada en presencia de una cantidad creciente de GST-HuR (0 - 1 μ M). Como control negativo se incubó la sonda con cantidades crecientes de GST. Los complejos fueron separados en un gel nativo de poliacrilamida y revelado por autorradiografía

Para comprobar la posible presencia de de otras AUBPs asociadas al ARE de *c-fos*, realizamos ensayos de retardo de la movilidad electroforética testeando distintas proteínas recombinantes. Utilizamos tanto proteínas que correspondían a AUBPs reportadas como asociadas al ARE (HuR y KSRP) como aquellas no asociadas (TTP y BRF1) (Figura R34). Tal como destacamos en la Figura 33, aquí también observamos la unión de GST-HuR a la sonda (Figura R34A, calle 3 y Figura R34B, calle 2). Además, detectamos que KSRP (producida como proteína con un tag de 6 histidinas, His-KSRP), otra proteína reportada como asociada al ARE, era capaz de unirse a la sonda (Figura R34B, calle 3).

Cabe destacar que KSRP fue otra de las proteínas detectadas en el ensayo de pull-down con la sonda ARE biotinilada y validada luego por Western Blot, lo que nos estaría indicando la importancia de su participación en la regulación de la estabilidad del ARNm de *c-fos*.

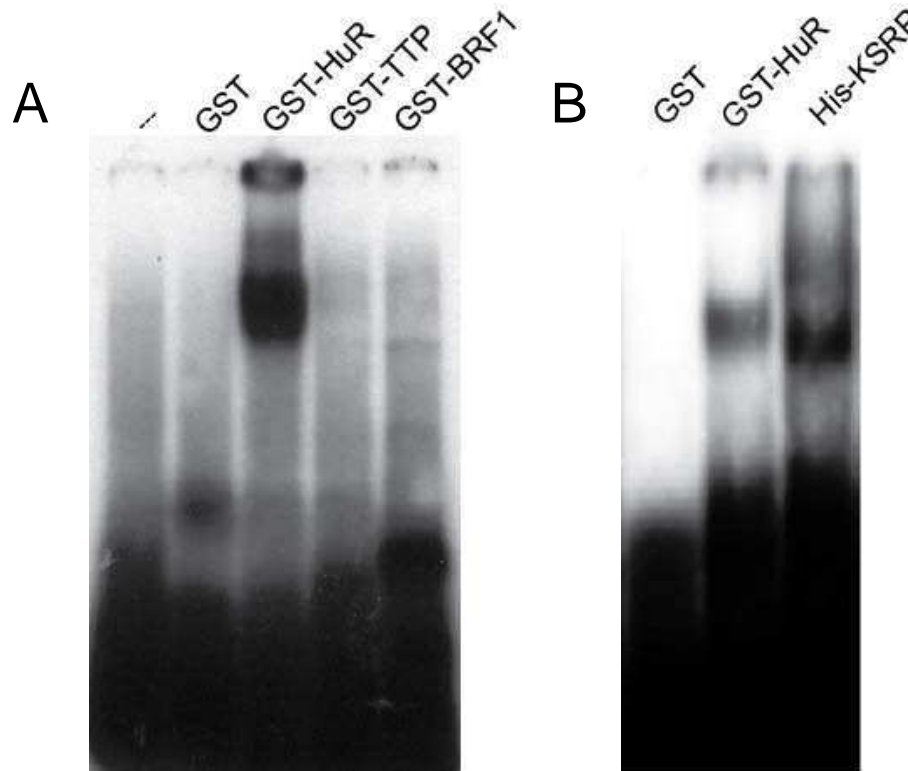


Figura R34. Complejos ARN ARE de *c-fos* y proteínas recombinantes. La sonda ARE fue incubada en presencia de 100 ng de las proteínas recombinantes indicadas. Los complejos fueron corridos en un gel nativo de poliacrilamida y revelado por autorradiografía.

4.2.1.3 *Correlación entre la presencia de HuR y de c-Fos en un microarreglo de tumores de pulmón*

Como parte de la caracterización del efecto de HuR sobre la expresión de *c-fos* tanto a nivel de su ARN mensajero como de la proteína traducida a partir del mismo, analizamos un microarreglo de tumores humanos extraídos de pulmón. Se obtuvieron 341 muestras de tejidos tumorales desde Enero de 1990 hasta Diciembre de 2004. Se tomaron todos los datos de los pacientes y los tumores, fijados en formaldehído, fueron embebidos en parafina y utilizados para construir un microarreglo de tumores o “tissue microarray” (TMA). Este TMA permite que un mismo portaobjetos podamos analizar la presencia, mediante técnicas de inmunohistoquímica, de distintos factores relevantes en el desarrollo tumoral.

c-Fos ha sido descrito como un oncogén desde hace 30 años y, más recientemente, un incremento en la presencia de HuR se ha encontrado correlacionada con la progresión tumoral (259). Y dado que no solamente son relevantes las mutaciones en las secuencias de oncogenes que puedan afectar su expresión, sino también aquellas

que afectan a los genes regulatorios de los mismos, decidimos buscar una correlación entre la expresión de HuR y de c-Fos. Realizando inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos tanto para c-Fos como para HuR sobre distintos cortes de los TMAs pudimos construir cuadros de correlación y encontrar distintos resultados.

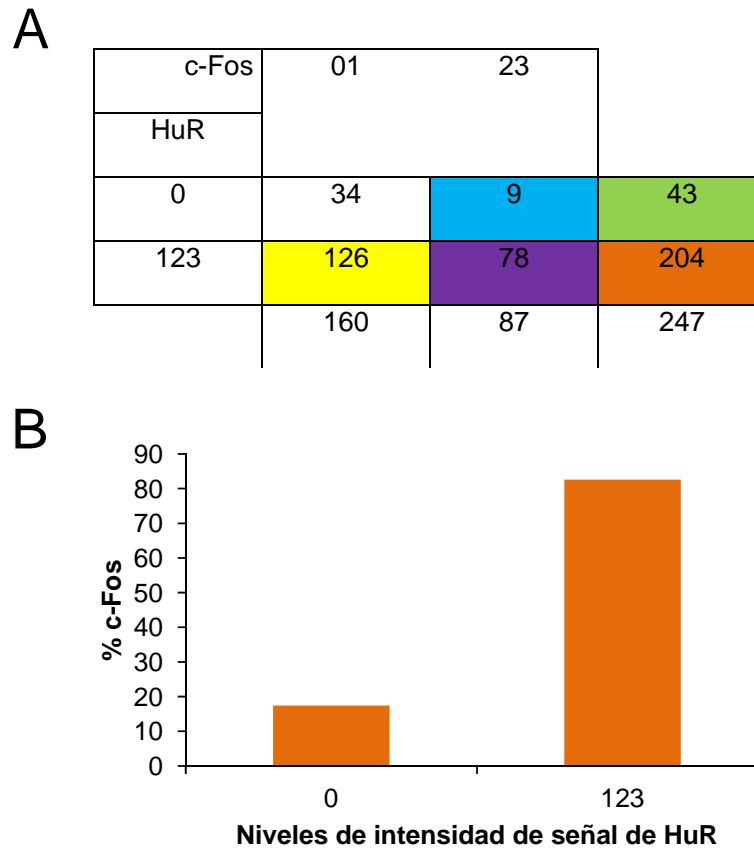


Figura R35. Correlación entre la expresión de c-Fos y HuR. A, Luego de la puesta a punto para obtener señales óptimas para cada anticuerpo se realizaron distintas inmunohistoquímicas para anticuerpos específicos de c-Fos y HuR sobre los TMAs. Luego del análisis de un patólogo especializado, se le asignaron valores arbitrarios para los niveles de expresión detectados en cada TMA, 0 indica nivel no detectable, 1 a 3 indican niveles positivos en incremento. Se agruparon distintos niveles para c-Fos (01, niveles nulos o bajos de intensidad de señal; 23, niveles moderados a altos) y para HuR (0, niveles nulos; 123, niveles detectables, moderados a altos). B, Se tomaron los valores presentados en A y se graficó el porcentaje de c-Fos en función de los niveles de intensidad en la señal detectada para HuR.

- 1) En primer lugar, sólo un 25 % de las muestras negativas para HuR expresan altos niveles de c-Fos (Figura R35 A, celda turquesa).
- 2) En tumores sin expresión de HuR, menos del 4 % mostraron moderados a altos niveles de c-Fos (Figura R35 A, celda verde y Figura R35 B). Este porcentaje se quintuplica en muestras con HuR detectable (Figura R35 A, celda naranja).

3) 90 % de los tejidos que muestran niveles moderados a altos de expresión de c-Fos fueron positivos para HuR (Figura R35 A, celda violeta).

4) El 50 % de los tumores sin expresión de c-Fos, fueron positivos para la presencia de HuR citoplasmática (Tabla R36, celda turquesa) mientras que en las muestras que presentan niveles detectables de c-Fos, el porcentaje de muestras con HuR citoplasmática aumenta significativamente (Tabla R36, celda verde).

c-Fos	0	123	
HuR			
Cit. (-)	24	69	93
Cit. (+)	22	132	154
	46	201	247

Tabla R36. Correlación entre la expresión de c-Fos y la localización subcelular de HuR. Ídem Figura R35, pero se analizó la intensidad de HuR como positiva o negativa en cuanto a su presencia en el citoplasma.

4.2.2. Influencia de la AUBP KSRP

Comenzamos la exploración de la influencia de KSRP sobre la regulación post-transcripcional de *c-fos* realizando ensayos de decaimiento utilizando el sistema reportero de luciferasa. Si bien no encontramos diferencias sobreexpresando KSRP junto con el reportero pLucFosWT (datos no mostrados), sí pudimos revertir situaciones de estabilización previamente encontradas. KSRP puede restituir a una situación control el tratamiento con el inhibidor de la actividad de p38 SAPK, el SB203580 (Figura R37 A). Por otra parte, también es capaz de revertir el efecto estabilizante de HuR al cotransfectar estas dos proteínas (Figura R37 B).

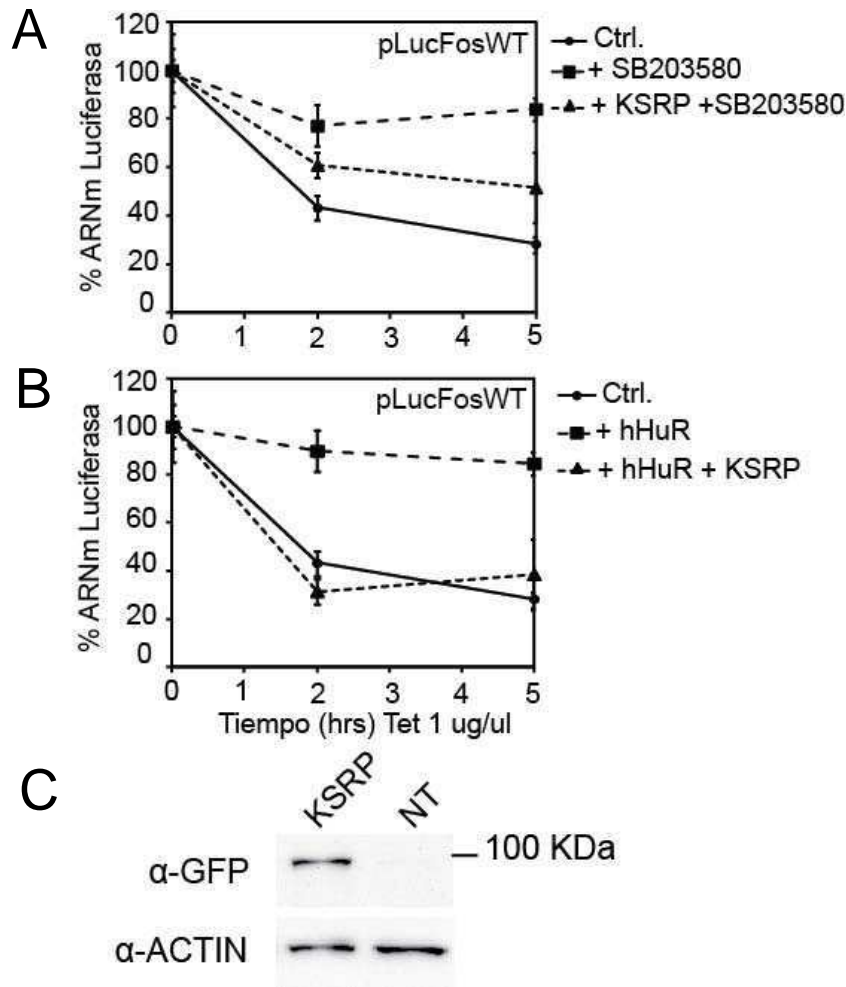


Figura R37. Influencia de KSRP sobre la estabilidad de c-fos. A, Células HeLa TetOff fueron co-transfectadas con el reportero pLucFos WT y con el plásmido de expresión pcDNA3-4TO-EGFP-KSRP WT. 24 horas post-transfección las células fueron pre-tratadas con el inhibidor SB203580 durante 1 hora y luego tratadas con tetraciclina 1 ug/ul durante 2 ó 5 horas. El ARN total fue extraído y se midieron los niveles de ADNc de luciferasa por qPCR. B, Idem A pero cotransfectando el plásmido pCEFL-HA-hHuR WT. Las células no fueron tratadas con inhibidor. C, Western Blot de células HeLa TetOff transfectadas con el vector pcDNA3-4TO-EGFP-KSRP WT o sin transfectar (NT). El control de carga se realizó revelando los mismos lisados celulares contra actina.

Quisimos saber si KSRP y HuR están compitiendo por los mismos sitios dentro del ARE de *c-fos*. Realizamos entonces ensayos de competencia, agregando una cantidad constante de HuR y variando las cantidades de KSRP y viceversa. En la Figura R38 podemos observar como se forman los complejos con cada una de las proteínas cuando se incuban en ausencia de la otra. Sin embargo en el panel que corresponde a una cantidad constante de KSRP podemos ver claramente como aun pequeñas cantidades relativas de HuR desplazan los complejos formados por KSRP. Este

resultado indicaría que ambas AUBPs estarían compitiendo por los mismos sitios de unión dentro de la región ARE en el 3'UTR de c-fos.

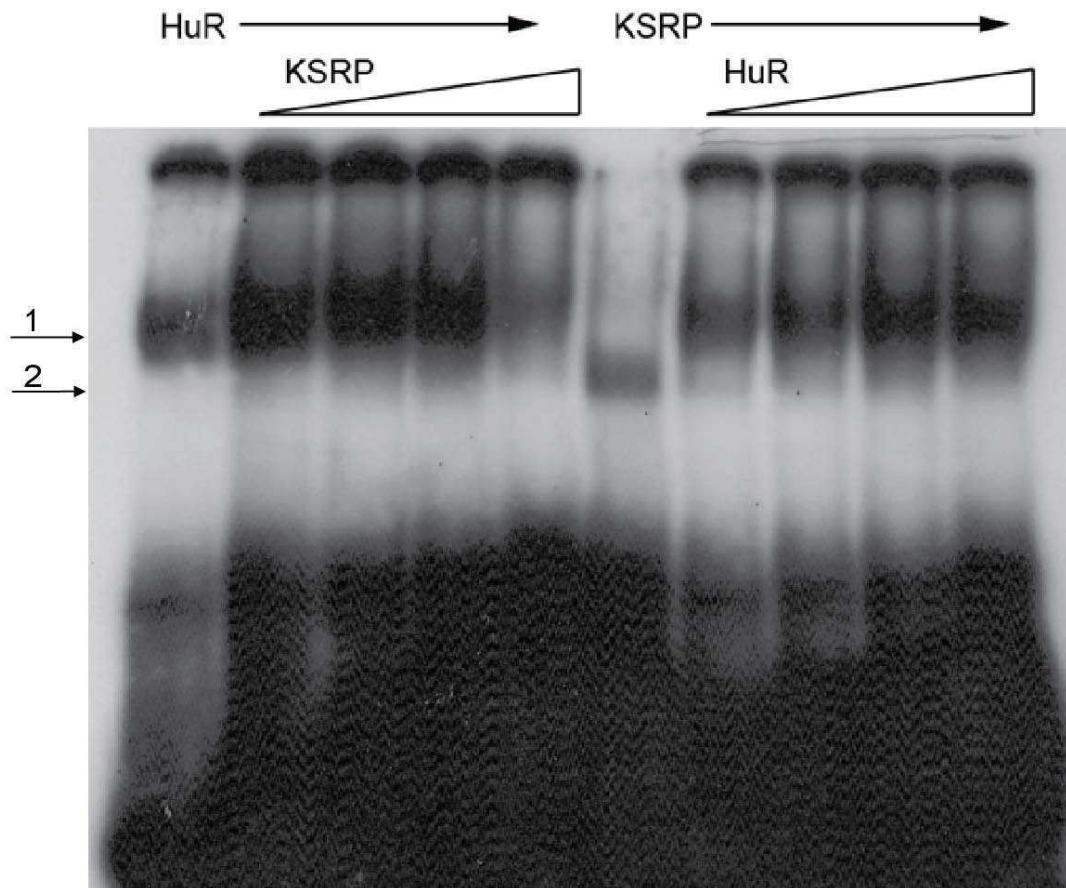


Figura R38. Competencia entre HuR y KSRP por el ARE de c-fos. La sonda ARE fue incubada en presencia de una cantidad constante de GST – HuR (1 ug) y cantidades variables de His - KSRP (0 – 2 ug). Por otra parte la sonda fue incubada con una cantidad constante de KSRP (1 ug) y cantidades variables de HuR (0 – 2 ug). Luego de ser digeridos con RNasas T1 los complejos fueron corridos en un gel nativo de poliacrilamida y revelado por autorradiografía. Los complejos formados por HuR (1) y KSRP (2) están indicadas con flechas en la parte izquierda de la imagen.

Realizamos también ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando a KSRP como sustrato de fosforilación (figura no mostrada), en un experimento idéntico al de la Figura R27, sin embargo no dieron resultados positivos para ninguna de las MAPKs ni para MK2.

Como comentario final cabe destacar que KSRP forma un complejo junto con deadenilasas, el componente del exosoma RRP44 (que hemos detectado en el ensayo de identificación de proteínas de unión a la sonda ARE biotinilada, ver Tabla R17) y

enzimas de “decapping” o encargadas de remover el CAP de los mensajeros (41,43,241), todos resultados que la implican como una de las principales AUBPs relacionadas con la degradación de mensajeros.

5. Búsqueda informática de nuevos factores e interacciones esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de c-fos

Con el objetivo de encontrar relaciones funcionales entre las vías de transducción de señales y los procesos de decaimiento que afectan al ARN de *c-fos*, quisimos integrar los conocimientos que pudimos coleccionar hasta el momento con todo lo reportado acerca de interacciones proteicas. El “Data Mining”, o Manejo de Datos, utiliza herramientas computacionales para extraer información útil a partir de una gran cantidad de datos crudos, como se da en el caso de experimentos denominados de “High Throughput” o de Alto Rendimiento. En este tipo de experimentos no tenemos un número sencillo de datos a analizar sino una cantidad considerable de ellos. Muchos de esos resultados son luego publicados por los laboratorios permitiendo su acceso libre y la utilización de los mismos. Particularmente lo que decidimos realizar fue una búsqueda de los interactores (aquellas proteínas que se encontraron asociadas físicamente) de las proteínas relevantes para este proyecto. Buscamos entonces los interactores de las 4 isoformas de p38 SAPK (alfa, beta, gama y delta), de una quinasa activada por p38, MK2 y de 5 AUBPs, HuR, TTP, BRF1, AUF1 y KSRP.

Gracias a bases de datos de acceso público que coleccionan información sobre las interacciones físicas proteína-proteína (PPIs), se pueden conformar interactomas o mapas de interacciones en la mayor parte de los organismos modelo (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, ratón –señalados como Sc, Sp, Ce, Dm, At y Mm respectivamente en la Figura R39- y humano). Sin embargo se debe tener en cuenta que cada base de datos obtiene su información de manera distinta, por lo que a veces es difícil encontrar la misma interacción en todos los casos, es por esta razón que deben utilizarse varias para realizar el análisis (260). Algunas de las bases de datos públicas más importantes son las siguientes: BioGrid (<http://thebiogrid.org/>), IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), HPRD (www.hprd.org/), DIP (<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi>), MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do>) y BIND (bind.ca/). Estas bases de datos incluyen listas de PPIs obtenidas o bien a partir de la literatura y subidas a la red manualmente por un curador o bien subidas por los usuarios.

Como mencionamos anteriormente los datos publicados en estos sitios son de libre acceso y pueden ser utilizados por cualquier usuario.

El análisis de las redes de PPIs comenzó descartando todas las interacciones puramente genéticas y conservando las interacciones físicas. Luego se separaron las interacciones según el organismo en el que se hayan encontrado y se les colocó a cada proteína el nombre oficial que se les asigna según Uniprot o ID (este paso se realiza de esta manera dado que los nombres suelen no coincidir, aunque están escritos igual pero uno en minúscula y otro en mayúscula deben ser homologados) (260) (el proceso hasta aquí fue llevado a cabo por el Dr. Pablo Echeverría con el que establecimos una colaboración). En esta instancia, entonces se obtiene el interactoma completo de todas las interacciones PPI reportadas hasta el momento, para humano y para cada organismo por separado.

Estos interactomas pueden ser fusionados gracias a la vinculación semántica por homología, siempre conservando la interacción original. Esta unión o fusión de los interactomas de cada organismo es posible gracias a la existencia de herramientas como el Homologene del NCBI (National Center for Biotechnology Information), sitio en el cual se puede acceder a la información de todos los genes conocidos y sus homólogos en otros organismos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>).

El proceso de edición incluye la eliminación de interacciones repetidas siempre conservando la información de aquellas más relevantes (es decir las que se encuentren en humano), por ejemplo si existen 2 interacciones, una en *S. cerevisiae* y la otra en humano, se conserva la del humano. Los interactomas son manipulados gracias al software Cytoscape y se les extrae la información de interés. En nuestro caso la pregunta es la siguiente: ¿Cuáles son los interactores de las proteínas que integran la vía de p38 SAPK y de las AUBPs más relevantes en el contexto de la regulación del ARNm de *c-fos*? Se conforma entonces un interactoma más pequeño que sólo incluye los interactores de las proteínas interrogantes o QP (Query Proteins) (p38 SAPK alfa, beta, gama y delta, MK2, HuR, TTP, BRF1, AUF1 y KSRP). Este interactoma fue actualizado incluyendo datos hasta el año 2011 utilizando las bases de datos más importantes (IntAct y BioGrid) y se realizó una cura de literatura con papers dedicados a la investigación en señalización celular y en regulación de mensajeros por elementos ARE (Figura R39).

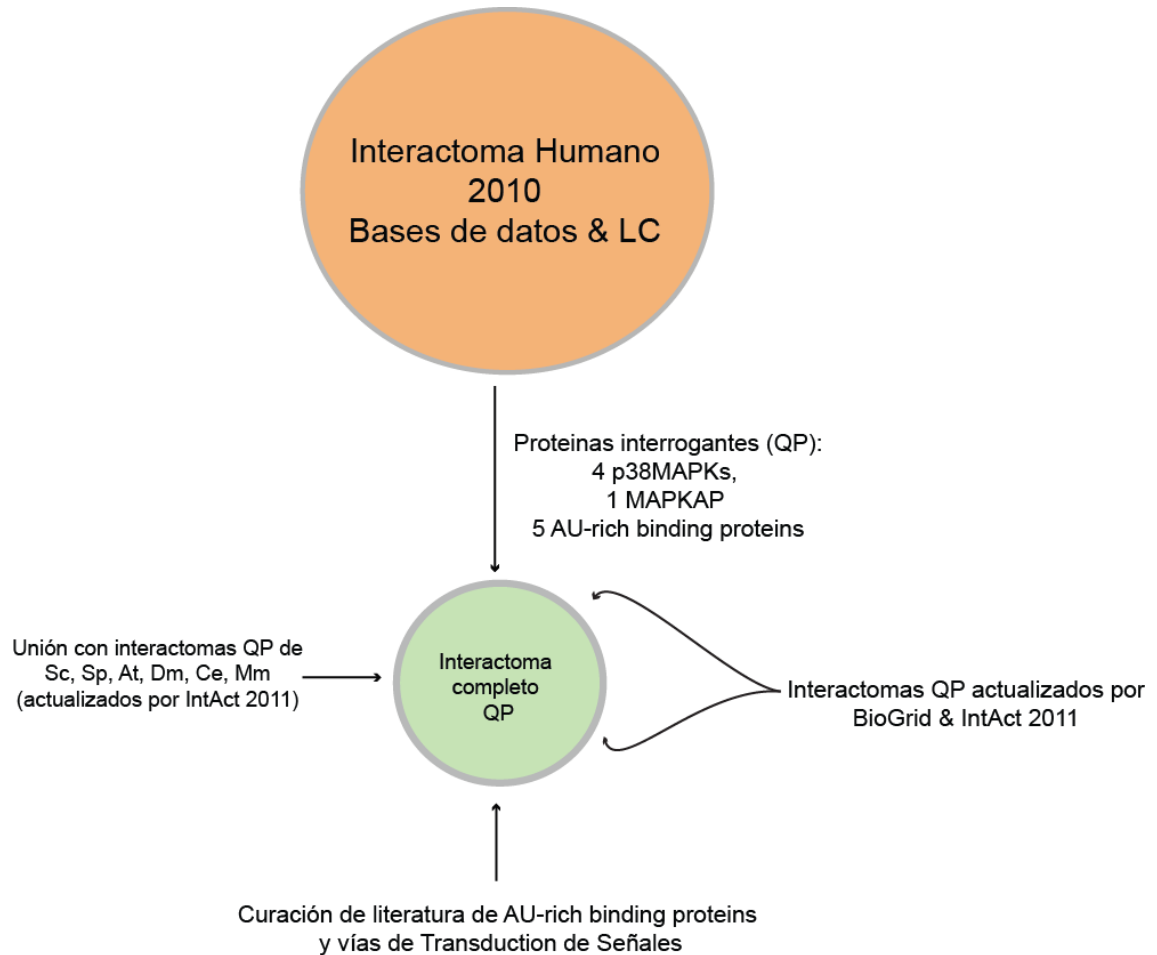


Figura R39. Diagrama de la construcción de interactomas para el análisis de PPIs.

El interactoma resultante a partir del esquema de la Figura R39 puede observarse en la Figura R40, se encuentran resaltadas todas las proteínas interrogantes o QP. El interactoma consta de 484 nodos o interactores (proteínas) unidas por 1922 interacciones físicas.

Este tipo de análisis nos permite tener toda la información de cada una de las proteínas y de las interacciones que las involucran, incluidos los números de identificación o ID de PubMed de los reportes en donde se las encontraron. También se pueden acceder a toda la información que existe acerca de la función biológica, localización subcelular y regulación de cada uno de los nodos del interactoma. Los análisis posibles para realizar con esta información son múltiples y se debe elegir el más adecuado para los fines de la investigación.

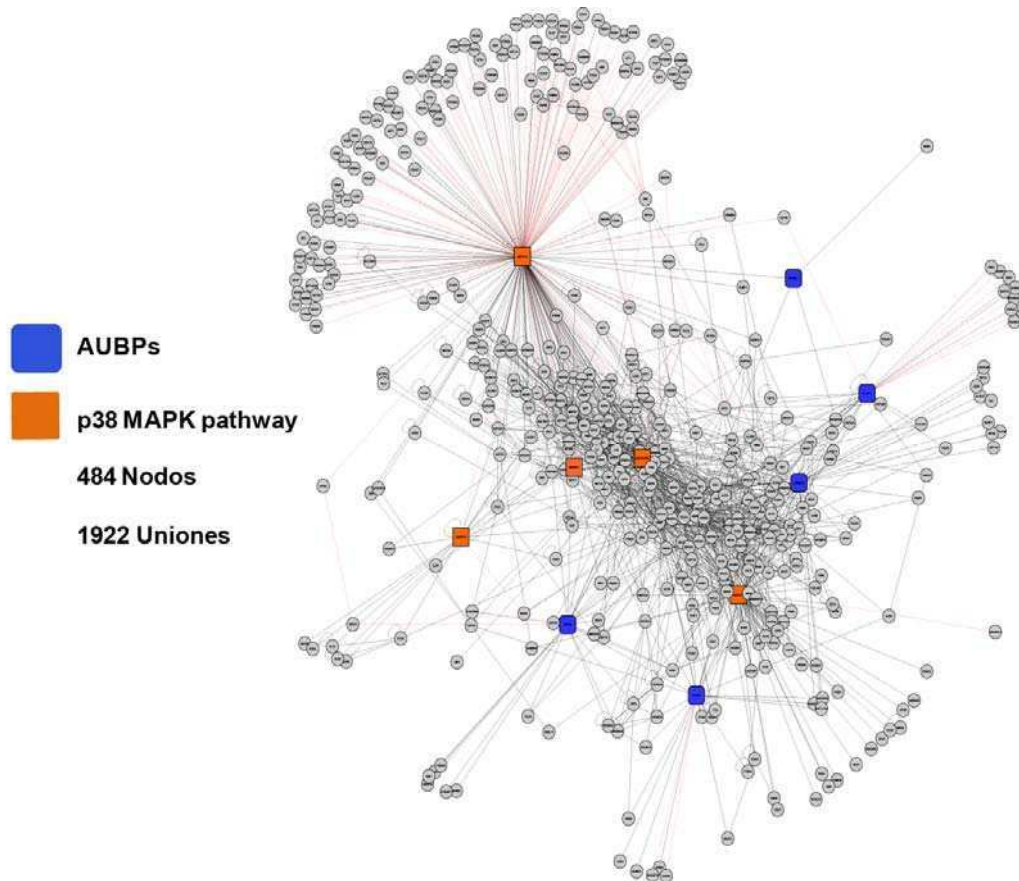


Figura R40. Esquema del interactoma de QP final. Luego de extraer información de todas las interacciones de nuestras proteínas de interés o QP se llega a este interactoma. En naranja se encuentran resaltadas todas las proteínas pertenecientes a la vía de p38 SAPK y en azul las AUBPs. El interactoma está formado por 484 proteínas (denominados nodos) que presentan 1922 interacciones (uniones).

Descartamos entonces, interacciones que no relacionaban a las p38 SAPKs con las AUBPs o que involucraban proteínas no relacionadas con los procesos de regulación post-transcripcional del ARN. Nos quedamos con un interactoma mucho más pequeño que el de la Figura R40. Agrupamos aquellas proteínas que compartían funciones similares o que pertenecían al mismo complejo funcional. TTP, KSRP y AUF1 interactúan con proteínas que pertenecen al complejo del exosoma, con proteínas con actividad deadenilasa o de decapping o con proteínas que regulan la degradación de mensajeros acoplada a la traducción. Sin embargo HuR se relaciona con proteínas que tienen alguna relación con actividad de fosfatasa de PP2A: PPP2R2B es una de las variantes de la subunidad regulatoria de PP2A (encargada del reconocimiento del sustrato) y pp32, SET α , SET β y APRIL son 4 proteínas de estructura similar, poseen largos dominios ácidos

en su extremo carboxilo terminal y las 3 primeras han sido caracterizadas como inhibidores de PP2A (261) (Figura R41).

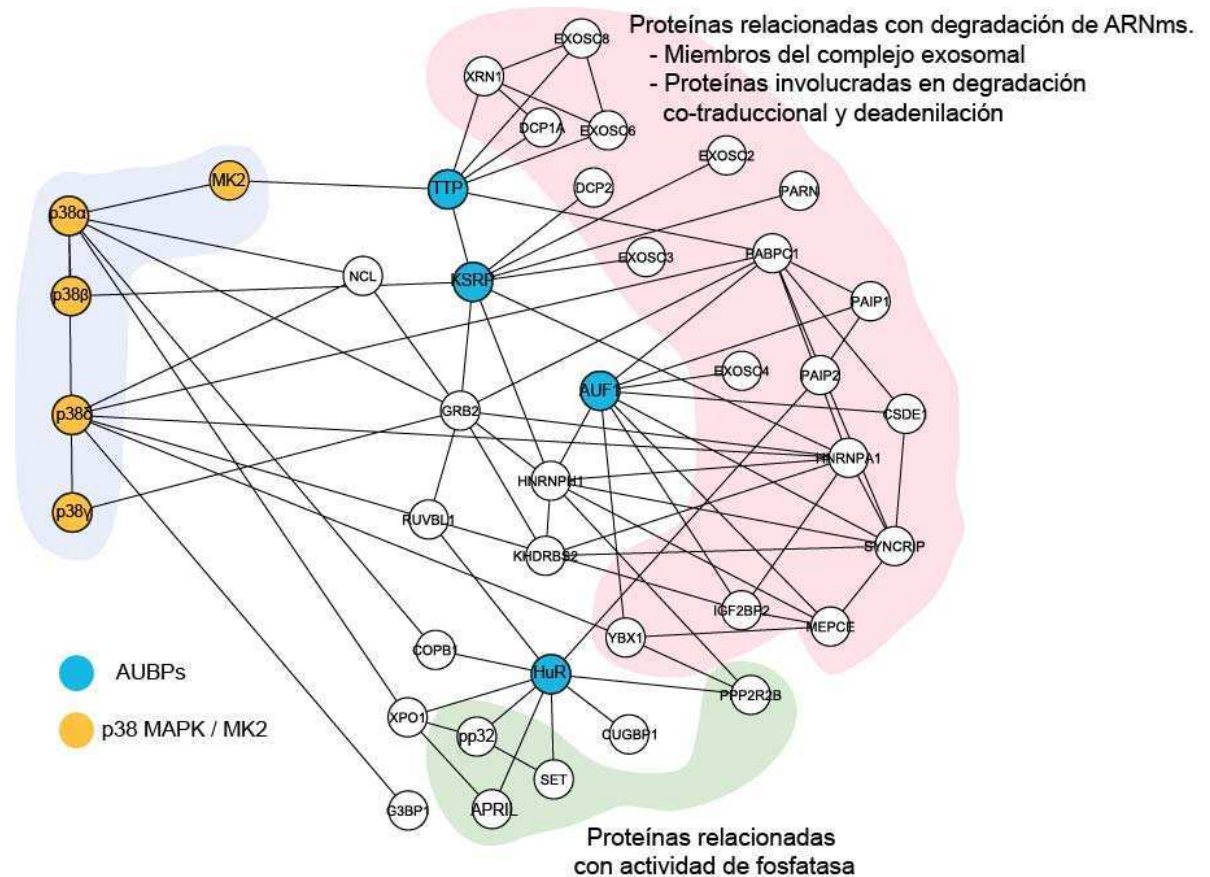


Figura R41. Características de los interactores de las AUBPs. Del interactoma presentado en la Figura R38 se tomaron los primeros interactores de las AUBPs (marcadas con color celeste) y de los integrantes de la vía de p38 SAPK (marcadas con color naranja). De este interactoma más reducido se estudiaron interacciones específicas según la funcionalidad de las proteínas involucradas.

Otra posibilidad para agregar información útil para el análisis de los datos es enriquecer la red con información acerca de alguna regulación a nivel génico. Si bien nuestro interés se enfoca en procesos rápidos que probablemente no involucren gran cantidad de genes expresados de novo, es interesante poder estudiarlos. Las bases de datos de experimentos realizados utilizando "Microarrays" o Microarreglos son públicas y pueden ser utilizadas en trabajos de la comunidad una vez que el autor original haya publicado sus datos. Existen múltiples reportes acerca de la influencia de p38 SAPK sobre la expresión génica y pensamos que sería interesante analizarla en el contexto de nuestros datos.

De todos los microarreglos génicos que pudimos encontrar, uno arroja más información que los demás, ya que se trata de un experimento de delección génica o “knock-out” (KO) de p38 α SAPK en células de ratón (262). En este trabajo se analiza como la delección de ambos alelos del gen de p38 α afecta a la expresión de diferentes genes cuando se somete a las células a 3 estímulos de estrés: a estrés osmótico, al tratamiento con la citoquina TNF α y al tratamiento con el inhibidor de la síntesis proteica, anisomicina. Luego del análisis concluyen que cada estímulo produce una respuesta transcripcional muy diferente. Los genes activados en los 3 tratamientos sólo alcanzan un 20%, lo que podría ser importante en la preparación de la célula para sobrellevar una situación particular de estrés. Otra conclusión importante del trabajo es que un 85% de los genes activados responden a p38 SAPK, lo que la convierte en una vía esencial para la supervivencia al estrés. De todos los grupos de datos posibles, tomamos los datos control y aquellos tratados anisomicina para nuestro análisis.

En la Figura 42 podemos observar como la información sobre la influencia de p38 SAPK se ve en el contexto del interactoma que decidimos analizar. En rojo aparecen aquellos genes regulados de manera positiva por p38 α SAPK, es decir, que al eliminar este gen por doble KO su expresión disminuye. En verde se muestran los genes, que de manera contraria, están regulados de forma negativa por el gen deletado, es decir que eliminando la presencia de p38 α SAPK incrementan sus niveles de expresión.

Finalmente agregamos más información a la red de interacciones, indicamos cuales de estas proteínas se estarían uniendo al ARE de *c-fos*, según los resultados de la Tabla R17. De esta manera, encontramos como 2 genes regulados positivamente por p38 α SAPK y relacionados con el proceso de degradación de mensajeros se estarían uniendo al ARE de *c-fos* (PABPC1 y IGF2BP2) (Figura R43).

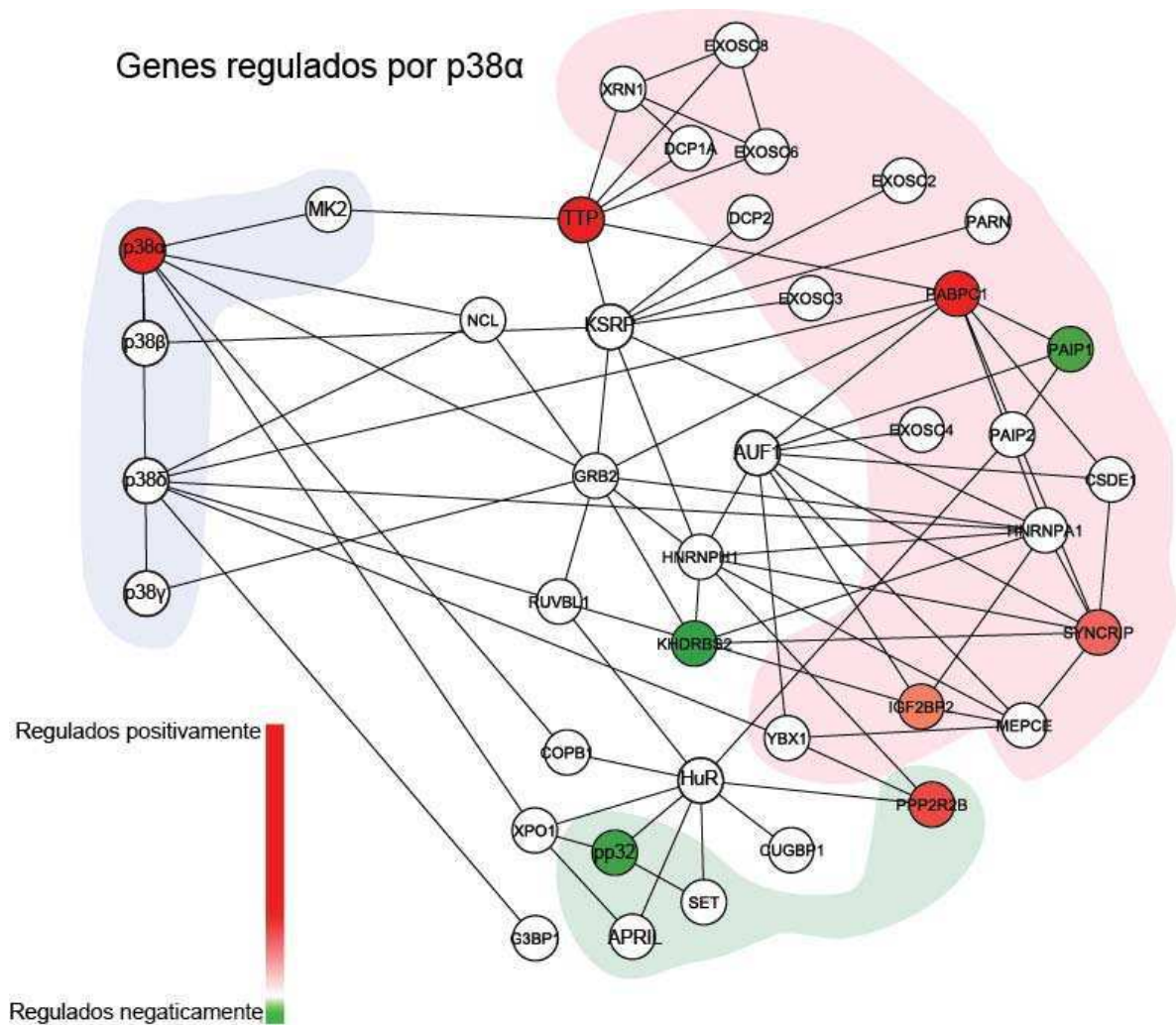


Figura R42. Genes regulados por p38 α SAPK. El interactoma es idéntico al de la Figura 39 pero se le ha agregado información proveniente de un microarreglo de expresión en un experimento de doble KO en células embrionarias de ratón (262). En distintas tonalidades de rojo se indican los genes regulados positivamente por p38 α SAPK y en verde los regulados negativamente.

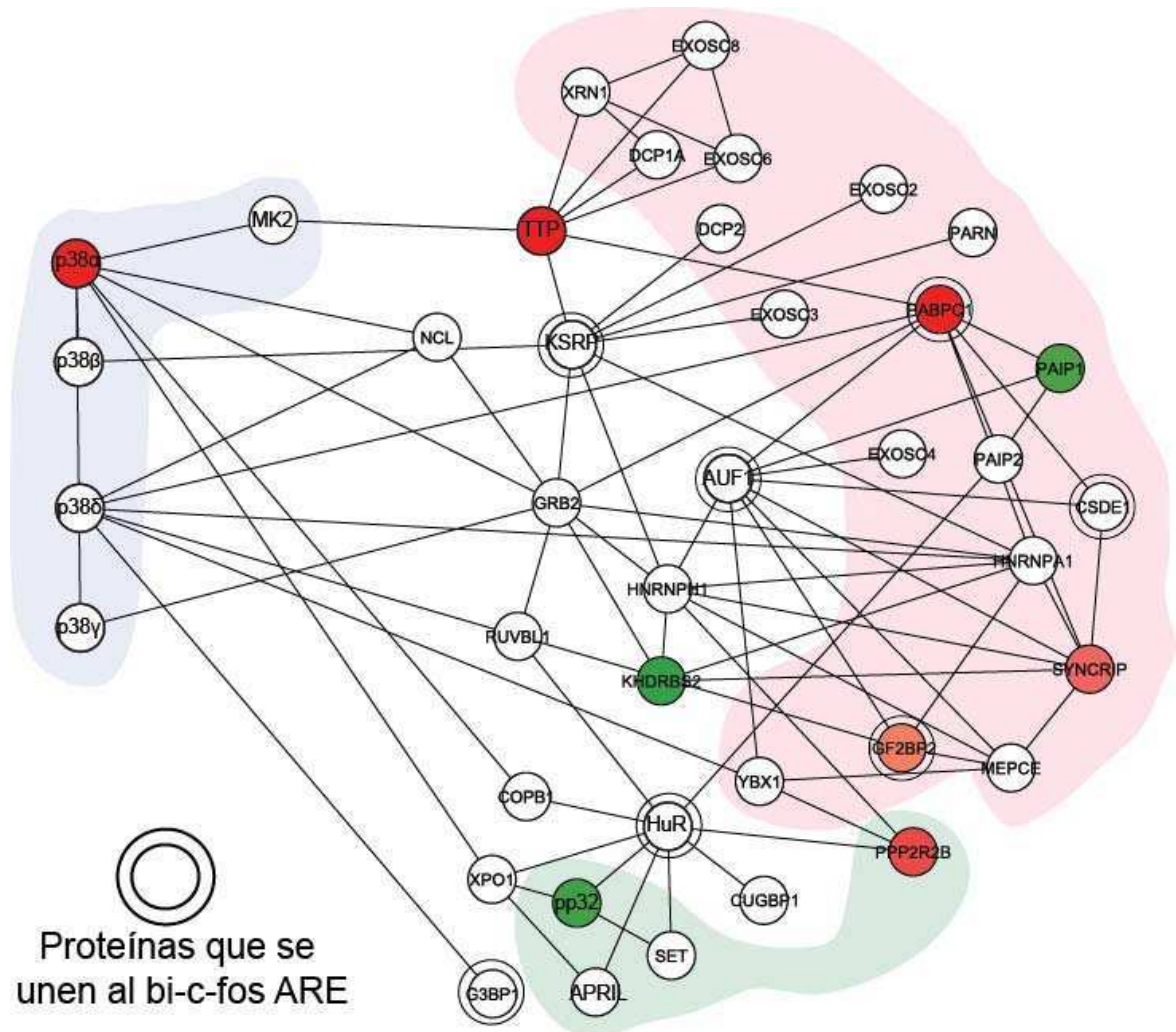


Figura R43. Interactoma final. El interactoma de la figura es idéntico al de la figura R42 pero se le ha agregado información acerca de cuáles son aquellas proteínas encontradas en el análisis de asociación con la región ARE de *c-fos* presentadas en la Tabla R17. Las proteínas asociadas están indicadas con una doble línea.

6. Estudio de la influencia sobre la regulación post-transcripcional de *c-fos* de factores encontrados en la búsqueda informática

Luego de realizar el análisis bioinformático y considerar varias proteínas como candidatos a analizar, comenzamos evaluando la influencia de 2 proteínas asociadas a HuR, reportadas como potentes inhibidores de la fosfatasa PP2A, y una de ellas también parece ser regulada por p38 α SAPK (pp32) según análisis de microarreglos (262).

pp32 y APRIL presentan una identidad de secuencia de aproximadamente el 70%, junto con la presencia en ambas proteínas, de extensa región ácida en su extremo carboxilo-terminal. Ambas son proteínas nucleares con la capacidad de migrar al citoplasma, al igual que HuR. Estas dos proteínas estarían interactuando con HuR, modulando una de las 2 posibles vías de translocación, mediando la interacción con la exportina XPO1, mientras que al mismo tiempo modulan su interacción con sus ARNm blancos como el de *c-fos*. La otra vía de migración es independiente de XPO1 y dependiente de la señal endógena de translocación presente en la secuencia de HuR (261,263). La hipótesis que se ha postulado es que tanto pp32 como APRIL modulan la interacción de HuR con la exportina 1 por separado y le permiten migrar al citoplasma una vez unido a los mensajeros (263).

Si sobreexpresamos tanto pp32 como APRIL por separado y medimos el decaimiento del reportero pLucFosWT podemos observar como ambas proteínas contribuyen a la estabilización del mismo (Figura R44 A).

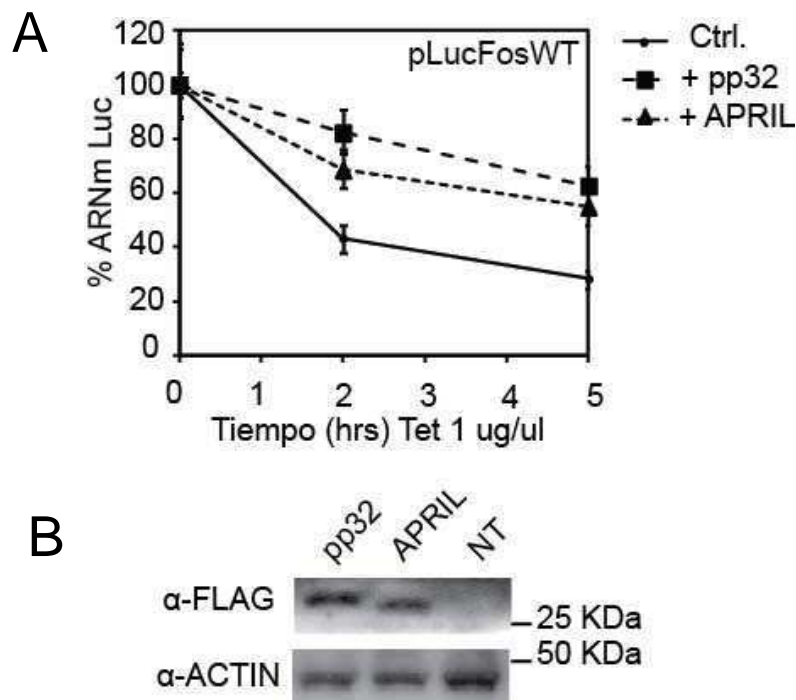


Figura R44. Influencia de las proteínas pp32 y APRIL sobre el decaimiento del ARNm de *c-fos*. A, Células HeLa TetOff fueron co-transfectadas con el reportero pLucFosWT y con los plásmidos de expresión pcDNA3-FLAG-pp32 y pcDNA3-FLAG-APRIL. 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con tetraciclina 1 ug/ul durante 2 ó 5 horas. El ARN total fue extraído y se midieron los niveles de ADNc de luciferasa por qPCR. B, Western Blot de células HeLa TetOff transfectadas con los vectores pcDNA3-FLAG-pp32 y pcDNA3-FLAG-APRIL o sin transfectar (NT). El control de carga se realizó revelando los mismos lisados celulares contra actina.

Por otra parte quisimos evaluar la influencia de la actividad de fosfatasa sobre la estabilización del mensajero de *c-fos*. Considerando que tanto el análisis bioinformático como todas las evidencias que vinculan a la vía de p38 SAPK con la actividad de HuR apuntan a una posible regulación de algún factor relacionado con la desfosforilación de esta proteína, consideramos relevante evaluar los efectos de la actividad fosfatasa sobre la estabilidad del ARNm de *c-fos*. El tratamiento con el inhibidor de las fosfatasa PP2A y PP1, Endotal a una concentración final de 50 μ M muestra la influencia de esta actividad sobre el mensajero reportero de luciferasa. La Figura R45 muestra como tanto el pretratamiento de 1 hora, previo al agregado de la tetraciclina y aun más el pretratamiento de 2 horas, logran que se alcancen niveles mayores de ARNm de luciferasa con respecto al control sin inhibidor. Este resultado indicaría que, de manera global, esta actividad fosfatasa sería necesaria para el correcto procesamiento del ARNm de *c-fos*, contribuyendo a su rápida degradación.

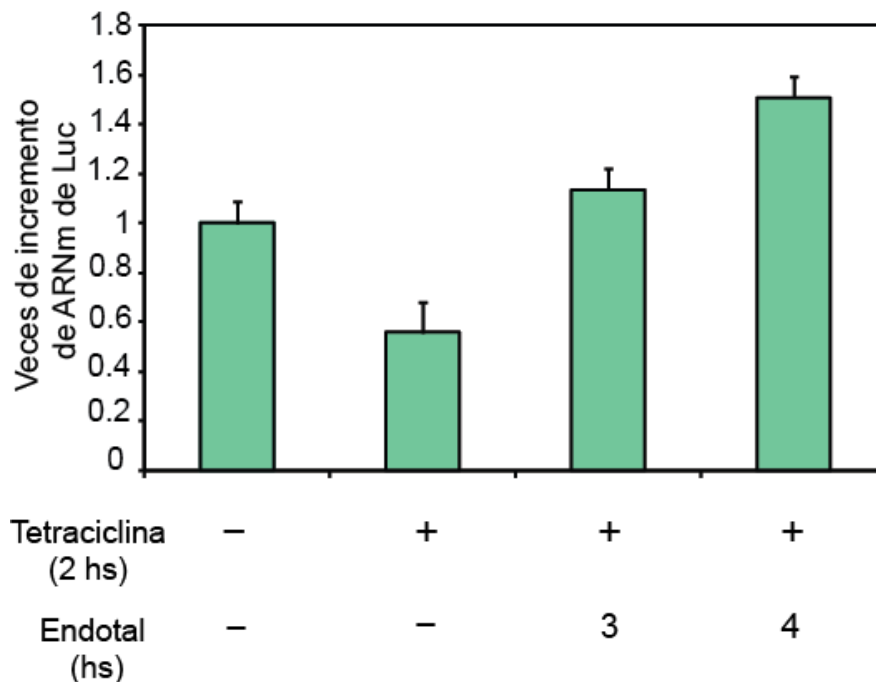


Figura R45. Influencia de la actividad fosfatasa de PP2A y PP1 sobre la estabilidad del ARNm de *c-fos*. Células HeLa TetOff fueron transfectadas con el reportero pLucFosWT. 24 horas post-transfección las células fueron tratadas con tetraciclina 1 μ g/ μ l durante 2 horas. Previamente al tratamiento con el antibiótico, algunas células fueron pretratadas durante 1 ó 2 horas con el inhibidor de PP2A y PP1, Endotal a una concentración final de 50 μ M. El ARN total fue extraído y se midieron los niveles de ADNc de luciferasa por qPCR.

DISCUSIÓN

Las células responden a la llegada de estímulos extracelulares a través de la activación de caminos transductores de señales, los cuales casi invariablemente están formados por una o más proteínas quinasas entre otros componentes. Estos caminos suelen concluir en efectores bioquímicos (enzimas metabólicas), efectores estructurales como los componentes del citoesqueleto o efectores que modifican la expresión de genes específicos para cada tipo de estímulo.

En particular, las señales que conducen a la proliferación de células en cultivo inducen la rápida expresión de un conjunto de genes denominados “Immediate-Early Responsive Genes” o IEGs, entre los cuales se encuentran los factores de transcripción c-Jun y c-Fos, pertenecientes a la familia AP-1 (264). En condiciones fisiológicas normales, o no patológicas, la activación de estos caminos es seguida posteriormente por su apagado, que incluye la reversión de la mayor parte de los procesos intermediarios desencadenados. Este argumento, válido para todo proceso transductor de señales adquiere un carácter de transitoriedad mas inmediata para los genes agrupados como IEGs y de allí su nombre.

El estudio de las fosfatasas ha ganado auge en los últimos años hasta tal punto que se ha fijado la atención en ellas como posibles blancos terapéuticos contra patologías como el cáncer, en las que se las podrían utilizar como “frenos” celulares ante la proliferación sin control, característica de dicha patología (265).

El prendido y el apagado de una señal se encuentran finamente regulados por caminos de señalización intracelular. Existe un número significativamente mayor de estudios que aportan al conocimiento del primer proceso que respecto del segundo. Este hecho es patente para cada paso de la señalización celular. Sabemos más sobre el encendido de un mecanismo transductor que sobre su consiguiente apagado, pese a que nos resulta lógico imaginar que para mantener la homeostasis celular se hace necesaria la fina regulación de ambos eventos.

Este trabajo surgió como parte del estudio de los caminos de transducción de señales que afectan tanto a la activación de proteínas quinasas y la inducción de la expresión génica como al apagado de estas mismas vías. Elegimos al proto-oncogén *c-fos* como modelo de estudio. Su regulación a múltiples niveles, desde la activación de su promotor hasta la desaparición casi total de su proteína y su ARN mensajero en la célula horas más tarde, lo convierten en un excelente candidato para el estudio de las vías de señalización que lo regulan.

Estudiando la regulación del apagado de la expresión génica de *c-fos* a nivel de su ARN mensajero encontramos que uno de los mecanismos de control más importantes

es aquel que involucra al elemento denominado ARE, secuencia rica en adeninas y uracilos presente en el extremo 3'UTR de algunos ARN mensajeros y que posee alrededor de 70 nucleótidos de extensión (1). Esta región es blanco de una serie de proteínas de unión al ARN, las AUBPs, que actúan como reguladoras de la estabilidad del mensajero permitiendo su expresión, transporte, localización y degradación (43,44,55,193-195,228,238). Las proteínas AUBPs son blanco, a su vez, de caminos de transducción de señales que regulan su actividad y determinan el destino final del ARN mensajero al que se unen (54,171,174,175,196,230,234,241,255,266-269).

Durante el trabajo sujeto de la presente tesis encontramos que existen 2 AUBPs, que podrían estar regulando el decaimiento del ARNm de *c-fos*: HuR y KSRP, presentando efectos contrapuestos en cuanto a la estabilización. Mientras que una estabiliza y prolonga la vida del ARN, la otra podría ser la encargada de reclutar elementos del exosoma llevándolo a degradación.

En cuanto los caminos de transducción de señales involucrados, encontramos que la vía de p38 SAPK es responsable de la desestabilización del mensajero de *c-fos*. Esta vía regularía el estado de fosforilación de HuR a través de la activación de fosfatasa. La inhibición tanto de la vía de p38 como de la acción de fosfatasa estabiliza al ARNm de *c-fos*.

1. Observaciones preliminares. Resultados que dieron lugar a la hipótesis de trabajo

Pudimos detectar como primer indicio la influencia de la vía de p38 MAPK en la regulación génica de *c-fos* en ensayos en los que medimos la cantidad total de ARNm de este último, como el que mostramos en las Figuras R1 y R2. Al utilizar un inhibidor farmacológico de la actividad de p38, SB203580, se produce un incremento en la cantidad de mensajero de *c-fos*, con respecto a la situación control.

Por otra parte, comprobamos por ensayos en los que el gen reportero luciferasa es regulado por el promotor de *c-fos*, que la actividad de p38 no tiene influencia sobre la actividad transcripcional de dicho promotor, como se observa en la Figura R3.

Por lo tanto, nos preguntamos cuál es el mecanismo afectado por p38 que da lugar a ese incremento del ARN mensajero de *c-fos* y seguimos el siguiente razonamiento: sabemos que la cantidad de un determinado ARN mensajero en un momento específico es el resultado de la cantidad de ARN producido por la transcripción

de ese gen menos la cantidad de ese ARN que es degradado; entonces, si la vía de p38 SAPK no afecta la regulación del promotor de *c-fos*, es decir que no está involucrada en la cantidad de ARN que es transcrito, ¿podría suceder que sí regule algún evento post-transcripcional y afecte el proceso de decaimiento del ARNm de *c-fos*?

La primera aproximación hacia la regulación del apagado de la señal de *c-fos* a nivel de su ARN mensajero indica que la vía de señalización de p38 está involucrada de manera positiva en el decaimiento de este mensaje. En otras palabras, p38 promueve la degradación del ARNm de *c-fos*. Esa es nuestra hipótesis inicial de trabajo y a lo largo de la presente tesis pretendimos identificar componentes moleculares y pasos del mecanismo subyacente a esta regulación.

1.2 Elementos regulatorios de *c-fos*

Para poder realizar el estudio de la regulación post-transcripcional del ARNm de *c-fos* debíamos caracterizar todos los elementos que pudiesen estar involucrados tanto en *cis*, (elementos de ARN regulatorios), como en *trans* (factores proteicos asociados a estos elementos de ARN). El gen *c-fos* ha sido un modelo en ensayos de desestabilización de mensajeros desde hace más de 20 años (1). Es uno de los genes que posee el transcripto de menor vida media dentro de la célula. Además, por sus características, es un gen de interés en estudios relacionados con cáncer ya que su desregulación puede provocar la transformación celular (264). La importancia de los elementos regulatorios de *c-fos*, tanto en la secuencia de su ARNm como en la secuencia de la proteína que codifica se ilustran en la Figura D1. La versión viral de Fos presente en el virus de Finkel-Biskis-Jinkis (FBJ) denominada v-Fos, carece de la mayor parte de los elementos regulatorios respecto de su homóloga celular. El gen v-Fos posee una delección en su región codificante hacia el extremo carboxi terminal, considerado como uno de los dominios importantes para la regulación de su estabilidad proteica en el citoplasma (11,14,58,59,61,270). En cuanto a la regulación del ARNm, v-Fos presenta otra delección, esta vez en su 3'UTR, que elimina la acción de la región ARE y del micro ARN miR-101. Asimismo, una mutación disrumpe el sitio de reconocimiento de otro micro ARN, el miR-155 (13).

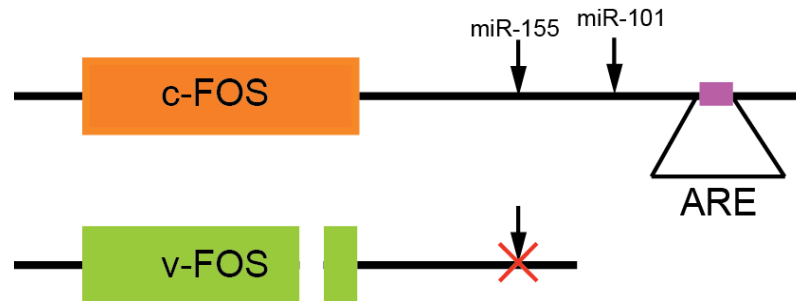


Figura D1. Diferencias estructurales entre la forma transformante de Fos, v-Fos y la forma celular, c-Fos. Esquema tomado de (13). c-Fos presenta múltiples secuencias regulatorias encargadas de preservar su correcta expresión. La mayor parte de las secuencias son blanco de mecanismos que desencadenan o bien la degradación del mensajero como el ARE y los micro ARNs, o bien la degradación de la proteína, como los aminoácidos faltantes en el dominio carboxi terminal.

De todos los elementos que afectan la regulación de la estabilidad del ARN mensajero de *c-fos*, la región ARE es aquella mejor estudiada y se presenta como la principal responsable de su degradación. Además, este tipo de regiones, aunque heterogéneas en su presentación, se han encontrado en diversos mensajeros y los mecanismos que los afectan parecen tener muchos puntos en común (194) es por eso que pensamos que los resultados alcanzados por este trabajo de tesis, si bien se aplican de modo directo a la biología de *c-fos*, pueden tener una implicancia en contribuir de modo general al estudio de la mecánica de regulación de otros ARN mensajeros que pudiesen estar afectados por los mismos factores y caminos transductores de señales.

Decidimos entonces, testear nuestra hipótesis estudiando la señalización que converge en el ARE de *c-fos*, es decir si p38 regula la estabilidad de *c-fos* a través de su influencia sobre mecanismos que afecten a este elemento.

2. Obtención y puesta a punto de un sistema para el estudio de la regulación post-transcripcional del mensajero de c-fos

Como mencionamos anteriormente, la hipótesis de trabajo con la que partimos involucra la regulación de la vía de p38 en el proceso de decaimiento del ARN mensajero de *c-fos*. Hasta el momento de comenzar con los experimentos de

decaimiento, se reportaban 2 sistemas para este tipo de estudios. Uno implica la utilización de inhibidores generales de la transcripción, como la actinomicina D, para medir mensajeros endógenos, el cual produce el bloqueo de la transcripción de todos los ARN mensajeros. El otro involucra el uso de sistemas de expresión regulados por tetraciclina, en los que elementos del mensajero se colocan en un ambiente heterólogo bajo el control de un promotor tetraciclina dependiente. Este último involucra manejo de ADN recombinante y expresión de un reportero heterólogo pero presenta la ventaja de que puede tener la actividad de su promotor controlada de modo independiente del resto de los genes endógenos.

Consideramos que para comenzar con los experimentos debíamos disponer de un sistema que no implicase la activación artefactual de p38 MAPK más allá del estímulo que agregásemos. El uso de actinomicina D, al bloquear la transcripción de modo general, dispara la activación de vías de estrés (251), entre las cuales se encuentra la que regula a p38 por lo que descartamos su uso y elegimos los sistemas de expresión regulados por tetraciclina.

Pusimos entonces a punto un sistema de expresión de un gen reportero cuyo promotor es controlado por tetraciclina para el estudio del decaimiento del ARNm. Este sistema comprende una serie de reactivos para la expresión de un gen de luciferasa reportero híbrido que contiene la región codificante de Luciferasa y como 3'UTR elementos presentes en el ARN mensajero del gen de interés (*c-fos* en nuestro caso) y que puede entonces ser regulado por los mismos mecanismos que regulan a *c-fos* endógeno.

Colocamos el 3'UTR completo de *c-fos* río abajo del reportero (dentro del contexto del vector pTRE2hgLuc, Figura R5) para estudiar como las zonas regulatorias presentes, y en particular el elemento ARE de *c-fos*, afectaba su expresión y lo denominamos pLucFosWT. Trabajamos con el 3'UTR en su secuencia completa y no solamente con las 70 pares de bases que comprenden al ARE por varios motivos. En principio, dado que el gen de la luciferasa no presenta sitios de corte y poliadenilación, consideramos que una región 3'UTR completa le permitiría una mejor expresión. Por otra parte, existen reportes que sugieren que tanto la localización del ARE como la distancia entre el codón stop y la cola de poli(A) son importantes en el proceso de decaimiento (271,272).

También construimos 2 vectores control. Uno de ellos casi idéntico a la construcción pLucFosWT con la diferencia de que la secuencia ARE fue reemplazada por el sitio de restricción de la enzima AgeI, como se observa en la Figura R7. La

secuencia de reconocimiento de esta enzima es ACCGGT y no está relacionada con secuencias ARE ricas en adeninas y uracilos de ningún tipo, ni con el consenso AUUUA, por eso consideramos que su introducción elimina por completo la regulación dada por el ARE. Otro de los controles presenta la secuencia codificante de la luciferasa regulado por el 3'UTR del mensajero de la β -globina, el cual carece de AREs. A partir de trabajos pioneros en el estudio de la estabilidad de *c-fos* y de mensajeros en general, la secuencia de la β -globina ha sido utilizada como un ejemplo de un ARNm estable que puede mantenerse en la célula durante muchas horas, aún luego de haber detenido la transcripción (1).

Luego de obtener los vectores de trabajo para los ensayos de decaimiento, testeamos las dos líneas celulares, (NIH3T3 y HeLa) TetOff. Estas expresan de manera estable el transactivador tTA que responde uniéndose a tetraciclina despegándose del promotor, de modo ligando dependiente, y por lo tanto dando cese a la transcripción. Consideramos importante tener una línea celular en la que los resultados de estos ensayos fueran reproducibles. Además, el reportero pLucFosWT, expresaba una menor cantidad de reportero y quisimos elegir una línea en la que estos niveles de expresión fueran detectables (Figura R9). Es probable que dado que la línea HeLa TetOff expresa una versión más moderna del tTA, fuera la línea que mejor se ajustaba a nuestros requerimientos: se obtiene un mejor control de la expresión (Figura R8), niveles más altos de mensajero y proteína del gen reportero (Figura R9) y resultados reproducibles.

La cantidad de reportero transfectado también debe ser considerada como relevante en el diseño de los ensayos de decaimiento (253). Muy poca cantidad de ADN transfectado puede no llegar a expresar buenos niveles de mensajero detectables por la medición de qPCR, mientras que una cantidad excesiva de vector puede saturar el mecanismo de degradación de ARNms dentro de la célula. Luego de ensayar distintas cantidades (Figura R10), consideramos que un 25% del ADN total transfectado correspondiera a vector reportero en los sucesivos experimentos.

Una vez puesto a punto el sistema, comenzamos la evaluación de los reporteros en distintas condiciones. Pudimos comprobar que el ARNm de luciferasa que presenta el 3'UTR de *c-fos* en su forma salvaje decae rápidamente, llegando a un 20% de la cantidad inicial luego de detener la transcripción durante 5 horas en células proliferando. También comprobamos que es el elemento ARE el responsable por este comportamiento, ya que al eliminarlo (pLuc Δ ARE) el reportero se estabiliza (Figura R11). Luego de varios experimentos repetidos concluimos que este sistema de medición es confiable y entrega datos reproducibles, por lo que continuamos utilizándolo en la

búsqueda de los elementos responsables del rápido decaimiento del mensajero reportero híbrido Luc-fos.

3. Estudio de las vías de señalización involucradas en la regulación post-transcripcional del ARN de *c-fos*. Influencia de la vía de p38 SAPK en el decaimiento del ARNm de *c-fos*.

Retomamos los resultados obtenidos en la Figura R1, en donde la inhibición de la actividad de p38 produce un incremento en la cantidad de mensajero de *c-fos* a un determinado tiempo, y testeamos el inhibidor pero esta vez en una curva de tiempo de estímulo. Tanto en la Figura R12 como en la Figura R13, el tratamiento con el SB203580 retrasa la degradación del ARNm de *c-fos*. La forma de graficar estos resultados, como un cociente entre la cantidad de ARN a los 60 minutos sobre la cantidad a los 30 minutos responde a fines prácticos. Quisimos expresarlo de esta manera para no tener que comparar curvas de tiempo en las que testeamos de 5 a 8 tiempos de estímulo distintos. Este cociente nos indica fácilmente que en los casos en los que inhibimos a p38, el mensajero de *c-fos* endógeno tarda más tiempo en ser degradado. Más aún cuando inhibimos la actividad de la quinasa activada por p38, MK2 con su inhibidor observamos el mismo patrón de retraso. Esto nos sugiere con mayor firmeza que la vía de p38, directamente por su actividad, o mediante la actividad de una quinasa río abajo como lo es MK2, se encuentra regulando el proceso de decaimiento del mensajero de *c-fos*.

El sistema TetOff para medir el decaimiento del ARNm de *c-fos* nos permite profundizar en las características de esta regulación. La vía de p38 estaría regulando el decaimiento del mensajero de *c-fos* provocado específicamente por el elemento ARE. En las Figuras R14 y R15 podemos observar evidencias de ello. Inhibir tanto la vía de p38 como la actividad de MK2 impide el decaimiento del mensajero WT, que posee el ARE (Figura R15 A). El uso de una dominante negativa de la quinasa activadora de p38, MEK3 (MEK3AA) implica una alternativa para interferir en la activación de esta vía. En la Figura R14 la co-expresión de esta dominante negativa junto con el mensajero reportero que lleva el ARE, también impide el decaimiento de este último.

Por lo tanto, concluimos que la vía de p38 estaría regulando de manera específica el decaimiento del ARN mensajero de *c-fos* provocado por su región ARE en base a evidencias obtenidas utilizando aproximaciones experimentales alternativas.

4. Estudio de los posibles factores esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de *c-fos*

4.1 Búsqueda de factores asociados a la región ARE de *c-fos*

Si bien se sabe que distintas AUBPs son capaces de asociarse al ARE de *c-fos*, no existe un reporte detallado de todas las proteínas que se unen a este elemento a lo largo de la vida del mensajero.

Utilizando una sonda de ARN biotinilada en un extremo y siguiendo el diseño experimental de la Figura R16, secuenciamos por espectrometría de masa todas las proteínas que se encuentran asociadas al ARE de *c-fos*. Las sondas que utilizamos para comparar los resultados obtenidos son 2, una presenta la secuencia salvaje del ARE y la otra posee mutaciones en los 3 sitios consenso descritos como esenciales para la unión de las AUBPs (AUUUA por AGGGA). Ambas tienen 40 bases y comprenden el núcleo de la región ARE, incluyendo a las secuencias consenso.

La lista de proteínas identificadas en estos experimentos de “pull-down” contiene factores que intervienen en distintos procesos. Queremos remarcar la presencia de 3 de estas proteínas, miembros de la familia de las AUBPs: KSRP, AUF1 y HuR. Estos 3 factores son los únicos de todos los secuenciados que se asocian en mayor medida a la sonda de secuencia WT que a la mutante. Este resultado sugiere la importancia del reconocimiento específico del elemento ARE por parte de las AUBPs y descarta que su asociación se deba simplemente a la interacción con una secuencia de ARN.

A continuación mencionaremos a algunas de las proteínas identificadas en los experimentos de “pull-down” y cómo se relacionan con la regulación post-transcripcional de los mensajeros.

Los trabajos que indican a KSRP como una AUBP relevante en la regulación del proceso de degradación del ARNm de *c-fos*, involucran ensayos de decaimiento *in vitro*. En estos ensayos, extractos citoplasmáticos de células son incubados en presencia de una sonda de ARN marcada internamente con nucleótidos radiactivos. Luego se agregan a la mezcla anticuerpos contra KSRP o se realiza una depleción previa de KSRP por ARN de interferencia y se observa la desaparición o no de la sonda. Los reportes concluyen que KSRP es necesaria para la degradación de distintas sondas correspondientes a regiones AREs, entre ellas para la de *c-fos* (41). Por otra parte concluyen que KSRP media la degradación de los mensajeros que contienen los ARE a

través del reclutamiento de factores que componen el exosoma (42). Aunque los resultados de la precipitación e identificación de factores asociados al ARE no especifica qué proteína interactúa con cual se puede llegar a reconstruir el patrón de las asociaciones comparando interacciones previas reportadas: KSRP se ha reportado como asociado a proteínas del exosoma. Este complejo consta de 10 subunidades y KSRP se asocia a la región denominada “cap”, encargada del reconocimiento de los mensajeros (41,43,273). En este sentido, hemos encontrado en nuestra búsqueda a DIS3, también conocida como RRP44. Esta proteína, miembro del complejo exosomal, es una enzima perteneciente a la familia de las RNasas de tipo II y es la subunidad catalítica del exosoma (273). Su presencia en complejos ARE-proteínas podría responder a un reclutamiento mediado por KSRP, y apoya la teoría de la influencia de KSRP como mediadora de la degradación del ARNm de *c-fos*.

La influencia de AUF1 sobre la regulación post-transcripcional de *c-fos* es difícil de abordar. La existencia de 4 isoformas de splicing alternativo (p37, p40, p42 y p45), que pueden compartir algunas funciones entre sí pero que poseen características particulares que las diferencian, dificulta la identificación de una isoforma en particular como responsable de eventos regulatorios. Por ejemplo, como comentaremos más adelante, las bases de datos de interacciones proteicas se manejan utilizando los nombres de los genes como identificadores de los nombres de las proteínas, lo que provoca que proteínas diferentes sintetizadas a partir de un mismo transcripto primario que sufre splicing alternativo se confundan en una sola proteína. Los reportes indicarían que son p37 y p42 las isoformas que más afectarían el decaimiento del ARNm de *c-fos*. Sin embargo en distintos contextos celulares, estas proteínas serían capaces tanto de desestabilizar a este mensajero (40) como de estabilizarlo bloqueando la degradación dependiente del ARE de *c-fos* (39).

En nuestros ensayos pudimos detectar específicamente a péptidos que corresponden al exón 2 (presente en las isoformas p40 y p45) en 2 de los 3 replicados, sin embargo no pudimos identificar ningún péptido correspondiente al exón 7 (presente en las isoformas p42 y p45). Si bien no podemos descartar que los péptidos encontrados correspondan a cualquiera de las 4 isoformas, dado que encontramos indicios de la región peptídica correspondiente al exón 2 y no al exón 7, pensamos que esos péptidos corresponden a la isoforma de AUF1 p40 o bien a la de p37. Por otra parte un interactivo de AUF1 aparece en la lista de proteínas identificadas, IGF2BP2 (VICKZ2 o IMP2) también reportado como parte de gránulos de estrés citoplasmáticos (274).

La asociación de HuR al ARE de *c-fos* y el efecto que provoca en la estabilidad del mensajero están mejor estudiados. HuR se une al elemento ARE y estabiliza al

mensajero endógeno y a cualquier ARNm reportero que contenga a esta secuencia (44,45,275).

También es interesante destacar que se identificaron 2 factores reportados como asociados al CRD (“coding region determinant”) de *c-fos* y relevantes en la degradación del mensajero debido a este elemento y acoplada a la traducción. Estos factores son PABPC1 o PABP1 y CSDE1 o UNR (37). Además la proteína STRAP o UNRIP (“UNR interacting protein”) fue reportada como asociada a CSDE1 (276).

G3BP1 posee actividades endonucleolíticas y de helicasa, y podría ser esencial en el ensamblaje de los gránulos de estrés. G3BP1 interactúa con la activadora de Ras, RasGAP y de allí deriva su nombre (“GAP SH3 domain-binding protein 1). Además G3BP1 está involucrada en el clivaje del ARE del mensajero de *c-myc*, implicando que podría estar involucrada en la vía de degradación mediada por este tipo de elementos (277).

La asociación de hnRNP A0 a elementos ARE fue reportada para el caso de procesos inflamatorios, que involucraban la estabilización de los mensajeros de la interleuquina 6 o IL-6, de COX 2 y de TNF α . Los resultados indicarían que hnRNP A0 es sustrato de la vía de p38 a través de la acción de MK2, y que su fosforilación estimula la asociación y estabilización de dichos mensajeros (278).

hnRNP C también ha sido encontrada como proteína asociada tanto a 5' UTR como a 3' UTR y a segmentos de poli-uracilos. hnRNP C modularía la estabilidad y la traducción de los mensajeros a los que se une (279,280).

Todas las proteínas mencionadas hasta aquí se encuentran involucradas o se relacionan con el mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por los elementos ARE.

Posteriormente a la secuenciación de las proteínas obtenidas por “pull-down” mediante espectrometría de masa se suelen validar los resultados encontrados utilizando técnicas bioquímicas, por ejemplo, revelando los precipitados proteicos con anticuerpos específicos.

El experimento de la Figura R19 responde a esta validación individual de las proteínas candidato inidentificadas inicialmente en un análisis global. Las bandas encontradas y marcadas en el panel superior, sólo encontradas asociadas a la sonda de *c-fos* ARE WT coinciden con 2 AUBPs previamente identificadas; con KSRP, de aproximadamente 80 kDa y con HuR, de 34 kDa.

4.2. Estudio de la influencia de los factores de unión a la región ARE en el proceso de decaimiento del ARNm de *c-fos*

4.2.1. Influencia de la AUBP HuR

Como mencionamos en la sección anterior, el efecto de HuR al asociarse al ARE de *c-fos* es estabilizar a su mensajero. Nuestros resultados refuerzan esa teoría por diferentes técnicas y aproximaciones. En principio, una evidencia indirecta de la participación de HuR en eventos regulatorios del ARN luego del estímulo de proliferación se observa en la Figura R20. El tratamiento con PDGF durante 60 minutos induce una translocación de HuR desde el núcleo, en donde se encuentra la mayor parte del ciclo celular (214), al citoplasma. Esta translocación sería necesaria para poder estabilizar mensajeros.

La depleción de HuR provoca una drástica disminución en la cantidad de proteína Fos sintetizada, implicando su importancia en el proceso de estabilidad y traducción de su mensajero. En la Figura R21 se observa como disminuir la cantidad de HuR dentro de la célula provoca el mismo efecto en la expresión de c-Fos.

Más aún, la co-expresión de HuR con el vector reportero pLucFosWT provoca su estabilización, como podemos observar en la Figura R22.

4.2.1.1. Análisis de los caminos de transducción de señales que afectan la fosforilación de HuR

Hemos mencionado en la Introducción (Sección 3.5) algunos antecedentes sobre las vías de señalización que modulan la actividad de HuR. Brevemente, la fosforilación de HuR por la quinasa Chk2 (checkpoint kinase 2) luego del tratamiento con H₂O₂, impide que HuR se una y estabilice al gen de respuesta a estrés SIRT1. La quinasa Cdk1 también fosforila a HuR produciendo su acumulación dentro del núcleo e inhibiendo el transporte al citoplasma y consecuente estabilización de mensajeros (48). p38 SAPK también fosforilaría a HuR luego del tratamiento con radiación gamma pero en este caso la modificación aumentaría la capacidad de HuR de estabilizar ARNms (53). También se ha reportado a la isoforma de la quinasa PKC, PKC δ como capaz de fosforilar a HuR. La

fosforilación de esta quinasa permitiría la estabilización de sus mensajeros blanco (49-52,219).

Una de las primeras aproximaciones para dilucidar la relación que pudiese existir entre la regulación por la vía de p38 que encontramos anteriormente y la actividad de HuR como proteína de unión estabilizadora del mensajero de *c-fos*, la encontramos en la Figura R23. Allí se muestra un experimento de fosforilación *in vitro* en fase sólida o “solid phase kinase assay”. La inhibición de la vía de p38 produce un incremento en la cantidad de HuR fosforilada. Este resultado podría indicar que esta vía o bien estaría impidiendo la activación de quinasas que actúan sobre HuR o bien podría activar fosfatasa encargadas de remover los fosfatos de HuR. Dado que hasta el momento no hemos podido encontrar una conexión directa entre las quinasas de HuR y p38, nos inclinamos hacia la segunda hipótesis, que p38 pueda estar regulando a enzimas encargadas de desfosforilar a HuR. Está hipótesis, en realidad también podría sostener el hecho de que estas fosfatasas actúen sobre las quinasas de HuR inactivándolas, y podrían estar sucediendo ambos fenómenos: p38 podría regular, a través de la activación de fosfatasas, la remoción de los fosfatos de quinasas específicas de HuR y de la misma proteína HuR. En el ensayo de fosforilación en gel de la Figura R26, se observa justamente como la inhibición de la vía de p38 utilizando el inhibidor SB203580, produce un incremento en la activación de quinasas específicas de HuR de identidad desconocida. Comparamos los pesos moleculares encontrados con los de las quinasas descritas que fosforilan a HuR: Chk2, 62 kDa; Cdk1, 33kDa; PKC δ , 77kDa; p38 SAPK, 43 kDa. Las bandas encontradas corresponden a proteínas de aproximadamente 32, 34 y 72 kDa, por lo cual podríamos sugerir una similitud con Cdk1 y con PKC δ .

Sin embargo no podemos ignorar el hecho de que existe un trabajo en donde se reporta la fosforilación directa de p38 sobre HuR (53). En nuestro sistema no hemos sido capaces de reproducir este resultado. Ensayos de fosforilación *in vitro*, en donde las quinasas activadas son incubadas en presencia del sustrato, como el que se observa en la Figura R27, no han arrojado, en nuestras manos, datos positivos acerca de la fosforilación de HuR por ninguna isoforma de p38 ni por la quinasa activada por p38, MK2.

Observamos el efecto general que tiene la vía de p38 sobre residuos fosforilables como serinas, treoninas o tirosinas en la Figura R24. Estos experimentos los realizamos utilizando el sistema de expresión del epítipo Strep. Este sistema representa un avance en cuanto a la purificación de proteínas de expresión ectópica con respecto al aislamiento utilizando anticuerpos. Resulta más eficiente en cuanto a la cantidad de proteína aislada y no es necesario el uso de anticuerpos que entorpecen la detección

cuando se realiza un Western Blot. El epítotope Strep deriva del sistema de biotina-estreptavidina y es reconocido por una resina y un anticuerpo específico. Los resultados de esta sobre-expresión y purificación indican que, en el caso de las serinas fosforiladas, podemos comprobar la tendencia de los resultados anteriores: la inhibición de la vía de p38 incrementa la fosforilación en serina de HuR.

Sin embargo, al observar las fosforilaciones sobre tirosinas en la secuencia de HuR, el efecto de p38 es inverso al anterior. No existen reportes acerca de la regulación de HuR por fosforilación en tirosina hasta el momento, sólo se han reportado tirosinas fosforiladas como resultado de experimentos del tipo “High Throughput” (221,222). Sería interesante poder profundizar en este aspecto, ya que podría suceder un fenómeno análogo al que ocurre con la proteína c-Fos, las fosforilaciones en serinas y treoninas regulan su actividad como factor de transcripción (65,66,281) mientras que las fosforilaciones sobre tirosinas regulan su actividad como mediador de la síntesis de fosfolípidos (67). En el caso de HuR el cambio de tipo de aminoácido fosforilado podría determinar un cambio en la funcionalidad de HuR que merece una exploración mas profunda.

El efecto algunas de las fosforilaciones posibles sobre HuR, es el de promover su acción como proteína estabilizadora de mensajeros. En la Figura R25, co-expresamos un triple mutante de HuR (en donde los residuos S202, S221 y T118 han sido mutados a 3 alaninas). Este mutante es incapaz de producir el efecto de estabilizar al mensajero reportero pLucFosWT como sí puede hacerlo su contraparte salvaje. El efecto positivo de la fosforilación en S221 y T118 sobre la capacidad de unión de HuR ha sido reportada (50,53).

Por lo tanto, la vía de p38 estaría modulando la actividad de fosfatasa que actuarían sobre residuos fosforilados de HuR (disminuyendo su actividad como AUBP estabilizadora).

Otra posibilidad, aunque especulativa, sería que la activación de fosfatasa p38 dependientes pueda afectar a quinasas encargadas de modular la actividad de HuR (serían quinasas que regulen de forma negativa la asociación de HuR al ARN). Estas quinasas fosforilarían a HuR en residuos diferentes de los testados con el triple mutante (Figura R25). Esta hipótesis deriva de los resultados encontrados en la Figura R26.

4.2.1.2. Estudio de la actividad de HuR como proteína de unión al ARE de *c-fos*.

Mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética del ARN, testeamos la presencia de distintos factores asociados al ARE de *c-fos*. Detectamos 2 complejos específicos mayoritarios (C1 y C2, Figura R28). Uno de estos complejos posee en su composición a HuR (complejo marcado por una flecha en la Figura R29). A medida que se sucede el tiempo de estímulo podemos observar que la asociación de HuR cambia: aumenta al principio y llega a un máximo a los 30 minutos post-estímulo para luego disminuir (Figura R31). Este patrón se correlaciona con el patrón de expresión del mensajero de *c-fos* que también presenta un pico máximo a los 30 minutos luego del estímulo. Esta asociación se encuentra regulada por la vía de p38, dado que su inhibición provoca un incremento en la asociación de HuR a la sonda del ARE (Figura R32).

Por lo tanto la regulación del estado de fosforilación de HuR mediada por la vía de p38, estaría afectando de forma negativa la unión de esta proteína al ARE de *c-fos*.

4.2.1.3 Correlación entre la presencia de HuR y de *c-Fos* en un microarreglo de tumores de pulmón

HuR se ha reportado como proteína estabilizadora de diversos ARN mensajeros asociados con la progresión tumoral (282). HuR estabiliza mensajeros involucrados en distintos eventos que afectan a la vida de la célula, entre ellos podemos mencionar la proliferación celular (GM-CSF, EGF, *c-fos*, *c-myc*, las ciclinas A, B1 y D1), la invasión y metástasis (MMP-9, uPA) y la angiogénesis (VEGF, HIF-1) entre otros (282). La sobreexpresión de HuR podría afectar la expresión de estos genes facilitando eventos carcinogénicos. En diversos tipos de cáncer se ha encontrado la sobreexpresión de HuR en tejidos tumorales con respecto a sus contrapartes normales (259,282,283).

Con el objetivo de abordar la relación entre HuR y la regulación de la expresión de *c-fos* dentro de un contexto fisiológico de patología tumoral, evaluamos la correlación entre la expresión de HuR y *c-Fos* en tejidos tumorales de cáncer de pulmón dispuestos en un microarreglo.

En un 90% de los tejidos en los que encontramos una alta expresión de *c-Fos* también presentan una alta expresión de HuR (Figura R35) y esa expresión elevada de

c-Fos correlaciona con una localización citoplasmática de HuR (relacionada con sus efectos estabilizadores de ARNms) (Tabla R36).

4.2.2. Influencia de la AUBP KSRP

La evaluación de KSRP como posible reguladora de la estabilidad del ARNm de *c-fos* indica que KSRP es capaz de revertir el efecto tanto de la inhibición de la vía de p38 como el efecto de la sobreexpresión de HuR. En la Figura R37 observamos como KSRP impide la estabilización del reportero pLucFosWT resultante del tratamiento con el SB203580. Asimismo, KSRP puede reestablecer el proceso de decaimiento inhibido por la sobreexpresión de la AUBP estabilizadora HuR.

KSRP también es capaz de unirse al ARE de *c-fos* en los mismos sitios (o en sitios muy cercanos) a los que se une HuR. La Figura R38 muestra como pequeñas cantidades de HuR desplazan la unión de KSRP a la sonda de secuencia ARE.

Por lo tanto KSRP, como se ha reportado en otros sistemas, podría afectar al ARNm de *c-fos* promoviendo su decaimiento. El hecho de que reconozca los mismos sitios que HuR dentro del elemento ARE, sugiere que el mecanismo de acción por el cual KSRP podría actuar sería el desplazamiento por competencia de HuR de sus sitios de unión. Este modelo ha sido previamente sugerido por otros laboratorios para genes diferentes a *c-fos* (284). Se ha publicado que los niveles relativos de KSRP y HuR modulan la estabilidad de transcritos involucrados en la diferenciación de mioblastos. En condiciones de proliferación, HuR se encuentra en el núcleo y KSRP es capaz de unirse y desestabilizar ARNms relacionados con la diferenciación celular, en el citoplasma. En cambio, en condiciones de diferenciación, HuR translocaría al citoplasma y estabilizaría estos mensajeros, mientras que KSRP es secuestrado debido a fosforilaciones p38 dependientes (54).

5. Búsqueda informática de nuevos factores e interacciones esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de *c-fos*

Decidimos realizar un análisis bioinformático que contemplara todo el universo de interacciones entre proteínas con el objetivo de poder dilucidar el mecanismo de regulación post-transcripcional de *c-fos*. Este tipo de análisis no requiere del diseño de

experimentos nuevos, sino que utiliza los miles de datos reportados en la bibliografía hasta el momento sobre interacciones proteicas.

Es importante al abordar este tipo de análisis tener una pregunta biológica a contestar. Nuestra pregunta era la siguiente: ¿Existe una relación entre la vía de p38 SAPK y las proteínas que regulan la estabilidad del ARNm de *c-fos* a través de su elemento ARE?. Luego es importante tener proteínas “query” o interrogantes (utilizamos las 4 isoformas de p38, MK2 y las 5 AUBPs más importantes descritas en la Introducción, Figura R39). Durante el proceso de edición, en el cual recortamos aquellas interacciones no relevantes para nuestra pregunta inicial, descartamos interacciones que no relacionaban a las p38 SAPKs con las AUBPs o que involucraban proteínas no relacionadas con los procesos de regulación post-transcripcional del ARN.

Por un lado, observando las interacciones directas de las AUBPs que encontramos asociadas al ARE, la Figura R41 revela que KSRP y AUF1 interactúan con proteínas relacionadas con la degradación de mensajeros. Estas proteínas incluyen a miembros del exosoma (EXOCS2, EXOCS3, PARN, DCP2, EXOCS4), reguladores de la deadenilación y el proceso de decaimiento acoplado a la traducción (PABPC1, PAIP1, IGF2BP2, CSDE1, SYNCRIP, YBX1) y otra AUBP relacionadas con el decaimiento (TTP). KSRP y AUF1 podrían estar formando parte de un mismo complejo dado que ambas se encuentran conectadas a 2 proteínas del tipo hnRNP (HNRNPA1 y HNRNPH1) (Figura R41).

Las interacciones que involucran a AUF1 requieren una aclaración debido a que la presencia de AUF1 en la célula se puede dar en 4 isoformas diferentes producidas por “splicing” alternativo como ya hemos mencionado. Por ejemplo, 3 proteínas asociadas a AUF1 (YBX1, IGF2BP2 y SYNCRIP) han sido reportadas como sólo asociadas a las isoformas p37 y p40 de AUF1 (274) y PABPC1 y PAIP1 se han encontrado asociadas a la isoforma p37(37). Es importante remarcar que todas las interacciones que se encuentren por esta metodología bioinformática deben ser chequeadas con sus respectivas referencias, sobre todo en el caso de genes que sufran splicing alternativo y produzcan varias proteínas de un mismo transcrito primario. En el caso de estos genes, las bases de datos no son capaces de diferenciar las distintas isoformas, considerándolas a todas bajo el mismo nombre.

Los interactores de HuR encontrados parecen ser proteínas relacionadas con una actividad de fosfatasa. En la Figura R41 podemos observar una interacción (aun no caracterizada) con la subunidad regulatoria de la fosfatasa PP2A (PPP2R2B) e interacciones con las proteínas SET, pp32 y APRIL, 3 inhibidores de PP2A.

Enriqueciendo el interactoma utilizando datos de expresión (obtenidos luego de realizar un doble KO para p38 α), pudimos observar nuevas relaciones funcionales (Figura R42). En principio hay algunos genes relacionados con el procesos de degradación de mensajeros que se encuentran regulados de manera positiva por p38 α SAPK, como por ejemplo TTP, lo cual apoya que el efecto de p38 sobre los ARN mensajeros no sería exclusivamente de estabilización como ha sido reportado en varios casos sino que también podría tener un efecto positivo sobre la degradación tal cual reportamos en esta tesis. Por otra parte, el hecho de que un interactor de HuR, la subunidad regulatoria de PP2A, PPP2R2B, también vea su expresión incrementada gracias a la presencia y/o actividad de p38 α SAPK es muy interesante e indica un efecto en el mismo sentido. Este concepto, p38 α SAPK como promotor de la degradación de ARN mensajeros para ciertos casos resulta también apoyado por el hecho de que p38 regula negativamente a otra proteína asociada a HuR e inhibidora de PP2A, llamada pp32.

La Figura R43 muestra el interactoma final enriquecido con el resultados de las proteínas identificadas como asociadas al ARE de *c-fos*. Encontramos 3 interactores de AUF1 también asociados al ARE (PABPC1, IGF2BP2 y CSDE1), y 2 de ellos presentan una expresión regulada por p38 SAPK.

6. Estudio de la influencia sobre la regulación post-transcripcional de *c-fos* de factores encontrados en la búsqueda informática

Evaluamos la influencia de 2 proteínas asociadas a HuR, pp32 y APRIL. La co-expresión de cualquiera de estos factores con el reportero, provoca la estabilización de su mensajero (Figura R44). Este resultado demostraría la importancia de estas proteínas asociadas a HuR en el mecanismo de estabilización. Tanto pp32 como APRIL se asocian a HuR y se ha postulado que cada una por separado contribuyen al transporte de HuR, unido a mensajeros blanco, desde el núcleo al citoplasma en condiciones de shock térmico. Una vez allí, HuR se localiza tanto en polisomas como en gránulos de ARN, mientras que pp32 y APRIL solo se encuentran en estos últimos (263). pp32 ha sido reportado como un inhibidor de la fosfatasa PP2A (285). APRIL comparte un 70% de similitud con pp32 y se supone también comparte la función inhibitoria de PP2A (263). pp32 y APRIL podrían modular la actividad de HuR como estabilizador de mensajeros a través, no sólo de la regulación de su localización subcelular, sino también impidiendo la desforilación de la AUBP.

A lo largo del trabajo, encontramos diferentes evidencias de que la actividad de enzimas fosfatasa sería importante en la regulación de post-transcripcional del ARNm de *c-fos* de modo dependiente de p38, entre ellas podemos nombrar las siguientes:

- La inhibición de la vía de p38 SAPK produce un aumento en los niveles generales de fosforilación de HuR (Figura R23 A) y particularmente en los niveles de fosforilación en serina (Figura R24 A);

- La inhibición de la vía de p38 SAPK produce un aumento en los niveles generales de fosforilación de quinasas que actúan sobre HuR (Figura R26);

- HuR se ha encontrado asociado a una subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A, encargada del reconocimiento de sustrato (PPP2R2B) (Figura R41);

- Las proteínas pp32 y APRIL, interactores de HuR y potenciales inhibidores de la fosfatasa PP2A, estabilizan al mensajero reportero (Figura R44).

Por lo tanto decidimos evaluar la influencia que posee la actividad de fosfatasa utilizando inhibidores farmacológicos. El Endotal es un inhibidor de las fosfatasa PP2A y PP1, y al colocarlo en el medio de cultivo celular, se observa una inhibición del decaimiento del ARNm reportero (Figura R45). Este resultado apoya la idea de que la vía de p38 SAPK, podría estar regulando la estabilidad del mensajero de *c-fos*, principalmente mediante la activación de enzimas como PP2A o PP1.

Todas las evidencias obtenidas a lo largo de este trabajo, nos permiten esquematizar los posibles mecanismos de regulación post-transcripcional de *c-fos* en un modelo. En la Figura D2 observamos la primera parte del modelo propuesto. Señales proliferativas extracelulares inician caminos de transducción intracelulares a través de la activación tanto de receptores GPCR o TKR. Se inician cascadas de señalización por MAPKs que involucran aquellas activadas rápidamente o MAPKs de activación temprana, entre las que encontramos a ERK1/2, y MAPKs de activación tardía como las p38s SAPKs.

ERK2 es la quinasa principal implicada en la activación transcripcional del promotor de *c-fos*, y junto con las p38s son las encargadas de fosforilar a la proteína *c-Fos* y favorecer su translocación nuclear y transactivación (65,66,281,286).

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, una vez sintetizado el ARN mensajero de *c-fos*, HuR (fosforilado en residuos promotores de su unión a mensajeros) se uniría al elemento ARE presente en su región 3'UTR. Esa unión produciría una estabilización transitoria que permitiría dar lugar a su traducción y a un

pico de expresión de su proteína, en otro caso imposibilitada por la degradación inmediata del mensajero.

En el núcleo HuR se une a sus proteínas asociadas, pp32, APRIL, SET y la exportina XPO1 permitiendo el correcto transporte del mensajero al citoplasma (261,263). Estas proteínas, al ser inhibidoras de la actividad de la fosfatasa PP2A podrían proteger transitoriamente a HuR de la remoción de sus fosfatos permitiendo que se mantenga unido al ARE de *c-fos*. Por su parte, la vía de p38 podría modular eventos de regulación post-transcripcional de *c-fos*, primero mediante la fosforilación de proteínas involucradas en el reclutamiento del exosoma al mensajero de *c-fos*, como pueden ser KSRP o TTP. Una vez fosforiladas, estas proteínas se asociarían a miembros de la familia de factores 14-3-3, impidiendo su unión a mensajeros blanco (171,241).

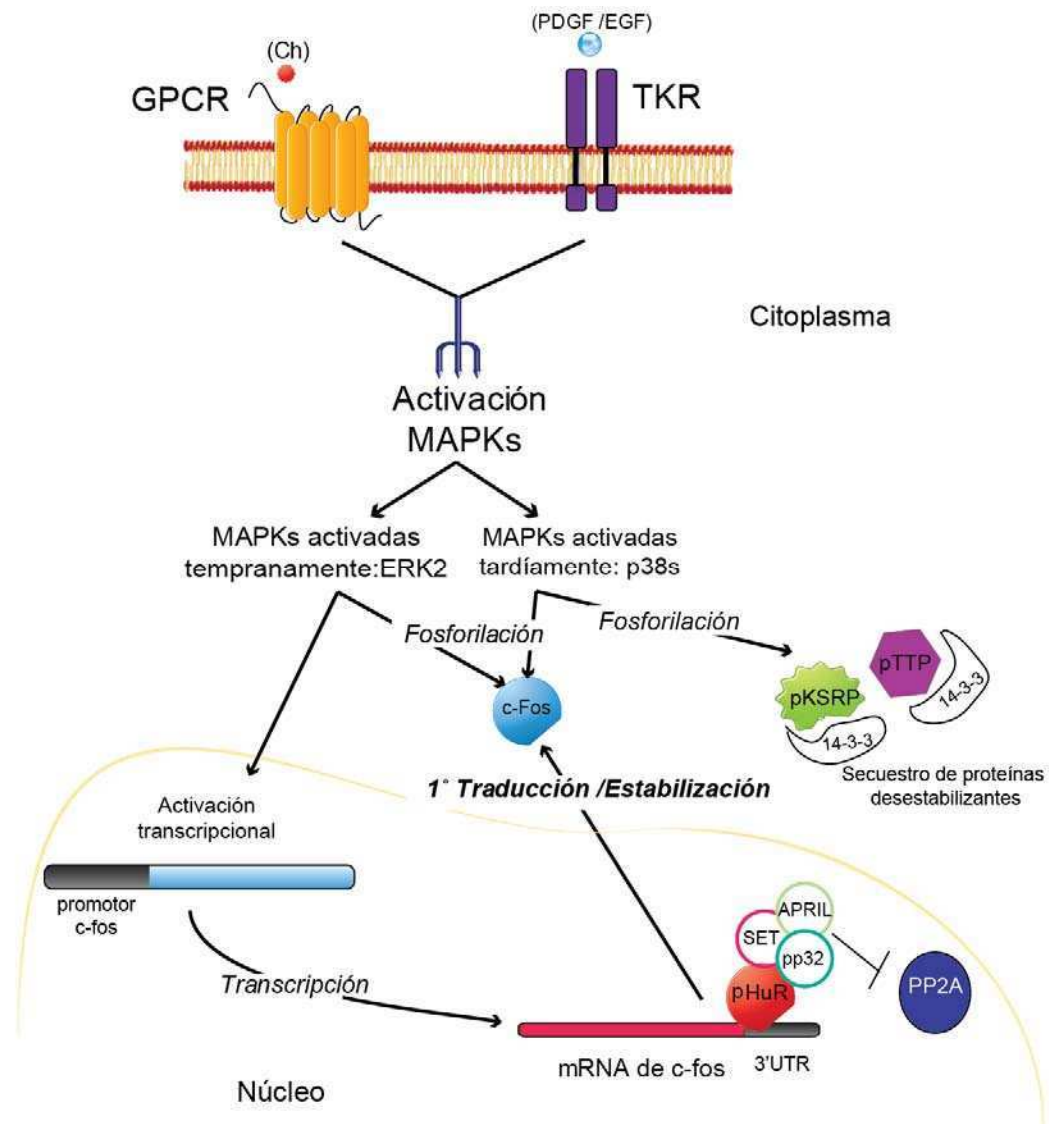


Figura D2. Modelo de los posibles mecanismos de regulación de la expresión de *c-fos*. Primera parte.

En la Figura D3, La vía de p38 podría ejercer su efecto a través de la activación de fosfatasas, entre ellas PP2A. Esta activación de la actividad fosfatasa podría tener múltiples efectos. Por un lado, se produce la desfosforilación de los factores desestabilizantes secuestrados, al no estar fosforilados, ya no son reconocidos por las proteínas 14-3-3 y son capaces de unirse a los elementos ARE de los mensajeros. Por otra parte, PP2A podría estar actuando sobre HuR y desfavorecer su asociación al ARE del ARNm de *c-fos*. Esta disociación sumada a una posible competencia de KSRP por los sitios de unión, promueve la unión de KSRP y el consecuente reclutamiento del exosoma y decaimiento del ARNm de *c-fos*.

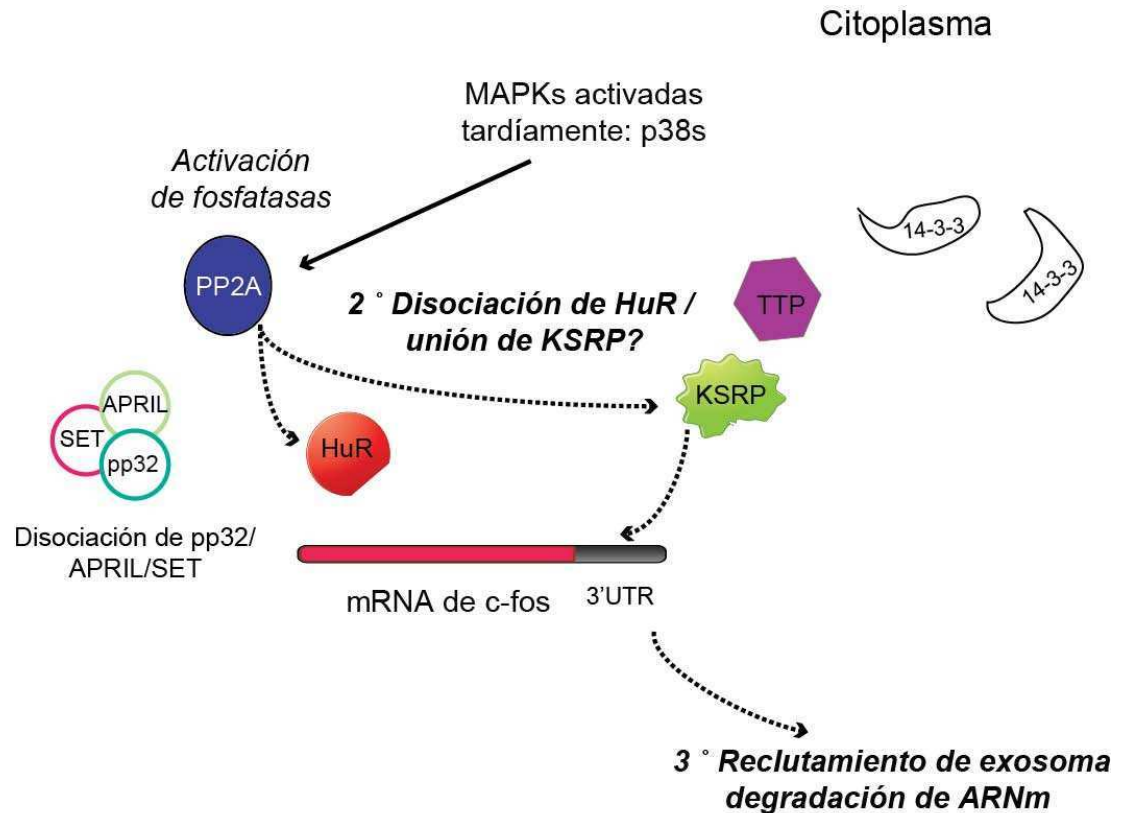


Figura D3. Modelo de los posibles mecanismos de regulación de la expresión de c-fos. Segunda parte.

Si sumamos las evidencias obtenidas durante este trabajo de tesis a resultados previos del grupo y los ponemos en el contexto de la información bibliográfica disponible podemos decir que se apoya un modelo que muestra como un agonista que regula la expresión de c-fos lo hace mediante dos cascadas de señalización separadas en el tiempo.

Mientras que las MAPKs de activación temprana como ERK2 señalizan sobre el promotor induciendo la rápida síntesis de ARN mensajero y proteína, esta luego es fosforilada adquiriendo su funcionalidad como factor de transcripción de la familia AP-1 que da lugar a la inducción de una segunda oleada de genes, aquellos con elementos TRE en sus promotores.

Una vez garantizado ese proceso la proteína c-Fos ya no es necesitada y su pico de expresión y actividad decrecen merced a la acción de MAPKs de activación mas tardía como las p38 MAPKs, que promueven la degradación de su ARN mensajero.

Resulta particularmente armónico para quienes estudiamos la dinámica de los fenómenos de regulación celular el hecho de que sea precisamente aquella familia de

MAPKs que hemos reportado como responsable de la fosforilación de la proteína c-Fos la misma que promueve la disminución de los niveles de su ARN mensajero llevándolos al bajo o nulo nivel basal de origen. Esta es la característica que define a *c-fos* como un gen de respuesta temprana inmediata o IEG, rápida y transitoriamente regulado en función de señales externas por los mecanismos que hemos contribuido a describir con este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de líneas Celulares

HEK 293T (Células embrionarias humanas de hígado, “human embryonic kidney”, immortalizadas con el antígeno T): fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), L- glutamina 2 mM (Sigma), y una solución de penicilina, estreptomycin y anfotericina B (Invitrogen), a 37°C y 5 % de CO₂.

NIH 3T3 (Fibroblastos de ratón): fueron cultivadas en medio DMEM alta glucosa (Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternera (CALF) (Hyclone), glutamina 2 mM (Invitrogen), y una solución de penicilina , estreptomycin y anfotericina B (Invitrogen), a 37°C y 5 % de CO₂.

M1.2 (Fibroblastos NIH 3T3 que expresan el receptor muscarínico humano M1): fueron cultivados en las mismas condiciones que las NIH 3T3 (287).

HeLa TetOff (Células humanas derivadas de cáncer de cuello de útero que expresan establemente el transactivador que responde a tetraciclina, tTAS2 (Clontech)): fueron cultivadas en las mismas condiciones que las células HEK pero sin el agregado del piruvato de sodio (249).

Las células se repicaron cada 48/72 hs según su confluencia, con una solución de TripLE express 1X (Invitrogen), un reemplazo recombinante de la tripsina animal. Previo a este paso, las células fueron lavadas con una solución de PBS 1X (PBS 10X: NaCl 1.37M, KCl 26.8mM, KH₂PO₄ 14.7mM, NaH₂PO₄ 43mM. pH=7.4).

2. Transfecciones

Transfecciones con Polietileiminina o PEI

Células HEK 293T, NIH 3T3, m1.2 y HeLa TetOff fueron sembradas en medio completo y se permitió su proliferación durante toda la noche (overnight: ON) hasta llegar a una confluencia de 70-80 %, en placas de 6 pocillos, 6 cm de diámetro o 10 cm según

el caso. Luego de 3 lavados con una solución de PBS 1X, las células fueron transfectadas con una solución compuesta por 2, 4 o 16 ug de ADN total respectivamente y un volumen de PEI (concentración stock de 1ug/ul en agua, pH 7,2), en una relación de a 3:1 (PEI:DNA) para las células HEK 293T o HeLa TetOff y una relación de 7:1 para las células NIH 3T3 y m1.2. Los complejos PEI-DNA fueron incubados en medio Optimem (Invitrogen) durante 10 minutos y, luego de ser agregados a las células se los incubó durante 3 hrs (HEK 293T y HeLa TetOff) o 5 hrs (NIH 3T3 y m1.2). Pasado el tiempo de transfección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X e incubadas con medio completo durante 24 o 48 hrs.

Transfección con liposomas catiónicos y neutros

Para evaluar la acción del ARN de interferencia o siARN se utilizó este método de transfección de alta eficiencia y baja toxicidad. El día previo a la transfección se plaquearon aproximadamente 3×10^5 células NIH 3T3 en placas de seis pocillos. Al día siguiente se realizaron los complejos siARN y liposomas (entre 20 y 40 uM de ARN por pocillo) (Hiperfect, Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células fueron incubadas durante tres horas con medio Optimem más la mezcla de liposomas. Al menos 48 hrs post-transfección se realizaron los tratamientos indicados, se incubaron a las células en medio sin suero ON y luego se realizó el estímulo con PDGF. El siARN evaluado correspondía a la secuencia murina de HuR (Qiagen), y la secuencia blanco era la siguiente: 5'-CACAGTGAAGTTTGCAGCCAA-3'. Los controles se realizaron evaluando siARN mezcla inespecífico (AllStar oligo, Qiagen)

3. Plásmidos

Luciferasa

El plásmido pc-fosLuc fue obtenido a partir del clonado del promotor de c-fos murino dentro del vector pGL3 (Promega) preparado para recibir secuencias de ADN río arriba del gen de la luciferasa.

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

Para los ensayos de decaimiento se utilizó el grupo de vectores derivados del pTRE2hygluc (Clontech). Dentro de este vector se colocaron las secuencias del 3'UTR de c-fos murino utilizando los primers:

- Primer forward 0 (con adaptador para NheI): 5'-GCgctagcCAGAGAAGGCAAGGCAGC-3'
- Primer reverse 0 (con adaptador para ClaI): 5'-GCatcgatGCTTTTATTGACAATGTCTTGG-3'

A partir de ADNc de células NIH3T3 estimuladas con PDGF, se realizó la reacción de amplificación de PCR utilizando los primers descriptos. El producto amplificado fue purificado, digerido con las enzimas NheI y ClaI y ligado al vector pTRE2hygluc. El clonado del 3'UTR completo del ARNm de c-fos murino constituyó el vector pLucFos WT.

El control pLuc β Globin que posee el 3'UTR completo del gen de la β -globina (737 pb) fue cedido por J. LaMarre. La construcción del reportero pLuc Δ ARE se explica en la sección Resultados (Figura R6) con los siguientes primers:

- Primer 1 (NheI): Idem Primer forward 0
- Primer 2 (AgeI): 5'-GCaccggtCGTTTTTCATGGAAACTG-3'
- Primer 3 (AgeI): 5'-GCaccggtCTACCCTGAGGTCTTTCGACATGTGG-3'
- Primer 4 (ClaI): Idem Primer reverse 0

Además se construyó un vector que posee solamente la región ARE, más 100 pares de bases río abajo, también con primers específicos que se denominó pLucARE.

- Primer forward (NheI): 5'-GGgctagcTAACAGTTTTCCATGAAAACG-3'
- Primer reverse (ClaI): Idem Primer reverse 0

Vectores para sintetizar ARN

En los ensayos de movilidad electroforética del ARN, se utilizó como sonda una secuencia de ARN sintetizada a partir de un plásmido que presenta un promotor de la T7 ARN polimerasa, como lo es el pBluescript. Se subclonó a partir del pLucARE la región del ARE (170 pb) utilizando las enzimas de restricción dentro del pBluescriptKS(+). Este vector se denominó pBSFosARE. El vector control se realizó subclonando la región 3'UTR de la beta-globina a partir del pLuc β Globin dentro del pBluescriptSK(+). Este último vector fue denominado pBSBG.

Previo a la síntesis del ARN a partir de un kit de transcripción in vitro, ambos plásmidos fueron linealizados digiriéndolos con la enzima HindIII generando 2 fragmentos de tamaño similar (170 pb en el caso del ARE de c-fos y 145 pb en el caso de β -globina).

AUBPs y proteínas asociadas

A partir de vectores de expresión pcDNA3 de las proteínas murinas HuR, TTP, BRF1 cedidas por J. LaMarre se amplificaron utilizando primers específicos con

adaptadores para las enzimas BgIII y EcoRI. Cada ADNc se subclonó en los vectores pCEFL-HA, pGEX4T3 y pBAXEN:

Oligos para HuR:

- Forward: 5' CGagatctATGTCTAATGGTTATGAAGACC 3'

- Reverse: 5' CGgaattcTTATTTGTGGGACTTGTGG 3'.

Oligos para TTP:

- Forward: 5' cgagatctATGGATCTCTCTGCCATCTACG 3'

- Reverse: 5' cgggaattcTCACTCAGAGACAGAGATACG 3'

Oligos para BRF1:

- Forward: 5' CGagatctATGACCACCACCCTCGTGTCC 3'

- Reverse: 5' CGgaattcTTAGTCATCTGAGATGG 3'

Los vectores pCEFL-HA-AUF1 (humana) p37, p40, p42 y p45, fueron construidos mediante un subclonado con primers específicos, con adaptadores para las enzimas BamHI y EcoRI, a partir de vectores pcDNA3 que los contenían cedidos por G. Brewer (224):

Oligos para AUF1:

- Forward: 5' CGggatccATGTCGGAGGAGCAGTTCCG 3'

- Reverse: 5' CGgaattcTTAGTATGGTTTGTAGC 3'

Por otra parte se utilizó un vector de expresión con el epítipo Strep-tag (8 aminoácidos: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) de la proteína murina HuR, pcDNA3-Strep2-HuR cedido por J. LaMarre.

Las construcciones pCEFL-HA -hHuR WT (forma humana de HuR en su versión salvaje) y pCEFL-HA -hHuR 3xM (versión humana con 3 sustituciones en sitios de fosforilación S202A, S221A y T118A) fueron obtenidas mediante el subclonado con enzimas de restricción (BamHI y NotI) a partir de vectores pcDNA3 cedidos por A. Nebreda (53).

H. Kleinert nos cedió los plásmido de expresión para células de mamífero y para bacterias de la AUBP KSRP (55). Para producir la proteína recombinante en bacterias se utilizó el pET15bKSRP, que expresa la proteína con un epítipo de 6 histidinas. Para la expresión en células humanas se utilizó el vector pcDNA3-4TO-EGFP-KSRP WT, el cual requiere ser transfectado en células que expresen un transactivador de respuesta a tetraciclina.

Los vectores de expresión para las proteínas pp32 y APRIL fueron cedidos por el laboratorio de J. Steitz. Los vectores utilizados fueron los pcDNA3-FLAG-pp32 y APRIL en sus formas salvajes (261).

Quinasas

Los vectores de expresión para pCEFL-HA-JNK, ERK2, ERK5, p38 α , p38 β , p38 γ , y p38 δ , y pGEX4T3-ATF2 fueron descritos en trabajos del Dr. Silvio Gutkind (288). El vector que expresa la isoforma salvaje y fusionada al epítipo myc de la quinasa MK2 o MAPKAP2, el pcDNA3-myc-MK2 fue cedida por M.Gaesthel (173).

4. Estímulos

Carbacol: Se utiliza una concentración final de 100 mM de Carbacol. El stock 1000X se realiza resuspendiendo el liofilizado en solución acuosa (Sigma)

Anisomisina: Se utiliza una concentración final de 10 μ g/ml durante 20 minutos (Sigma). La anisomicina fue resuspendida en etanol 100 % a una concentración 500X.

PDGF humano bb: Se utiliza a una concentración de 100 ng/mL. El stock 2000X se realiza en solución acuosa (donación laboratorios Beta).

EGF: Se utiliza a una concentración de 10 ng/mL (Invitrogen). El stock 1000X se realiza en solución acuosa.

5. Anticuerpos

- Anti c-Fos: Anticuerpo que reconoce la región C-terminal de c-Fos, Santa Cruz Biotechnology (sc-7202). Dilución 1:1000, incubado 16 hrs en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada (ver sección Western Blot).

- Anti epítomos: HA, Covance (HA.11) y Santa Cruz Biotechnology (sc-7392); GFP, Santa Cruz Biotechnology (sc-9996); FLAG, Sigma (F3165); Myc, Covance (9E10); Strep-tag, BioTAG technology. Utilizados en una dilución 1:1000, incubado 3 - 16 hrs en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada.

- Anti AUBPs: HuR, Santa Cruz Biotechnology (sc-5261); KSRP, Cell Signaling (#5398); AUF1 Santa Cruz Biotechnology (sc-22369); TTP Santa Cruz Biotechnology (sc-376162). Utilizados en una dilución 1:1000 o 1:500 (AUF1 y TTP), incubado 16 hrs en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada.

- Anticuerpos control: β -tubulina, Santa Cruz Biotechnology (sc-9104); actina, Santa Cruz Biotechnology (sc-1616-R). Utilizados en una dilución 1:1000 o 1:500 (β -tubulina), incubado 3 - 16 hrs en una solución de TTBS 0.05% 5% leche descremada.

- Anticuerpos que reconocen aminoácidos fosforilados: pSer, Chemicon-Millipore (ab1607); pTyr, Upstate-Millipore (05-777). Utilizados en una dilución 1:500, incubado 16 hrs en una solución de TTBS 0.05% 5% BSA.

- Anticuerpos secundarios: anti Mouse, anti Rabitt y anti Goat conjugados a peroxidasa, Santa Cruz Biotechnology. Utilizados en una dilución 1:5000 - 1:10000, incubados en una solución de TTBS 0.05% 5 % leche descremada durante 1-3 hrs.

6. Inhibidores

- SB203580 (Calbiochem): inhibidor de la actividad de p38 alfa (aproximadamente inhibe el 70% de su actividad) y beta (aproximadamente inhibe el 20% de su actividad). Se utiliza en una concentración final de 10 uM. El stock es resuspendido en DMSO (dimetilsulfóxido);

- SP600125 (Calbiochem): inhibidor de la actividad de JNK. Se utiliza en una concentración final de 20 uM. El stock es resuspendido en DMSO;

- PD98059 (Calbiochem): inhibidor de MEK1/2, inhibe la activación de ERK de manera indirecta. Se utiliza en una concentración final de 20 uM. El stock es resuspendido en DMSO;

- Endotal (Millipore): inhibidor de la actividad de las fosfatasa PP2A y PP1. Se utiliza en una concentración final de 50 uM. El stock es resuspendido en agua.

7. Antibióticos

- Tetraciclina: Se utilizó este antibiótico para los ensayos de decaimiento del mensajero en células HeLa TetOff. El stock fue resuspendido en etanol 100% en una concentración de 5 mg/mL (Invitrogen);

- Doxiciclina: Se utilizó este antibiótico para los ensayos de decaimiento del mensajero en células NIH TetOff. El stock fue resuspendido en etanol 100% en una concentración de 10 mg/mL (Sigma).

8. Secuenciación

Todos los ADNcs clonados y el chequeo de las secuencias subclonadas se realizó utilizando el servicio de secuenciación del Departamento de Ecología, Genética y Evolución, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

9. Preparación de Bacterias Competentes

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

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

10. Transformación Bacteriana

50-100 ul de bacterias competentes DH5 alfa (eficiencia de al menos 1×10^7 colonias/ml), almacenadas a -80°C son descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez que se descongelan se agregan entre 25 ng y 100 ng de plásmido, y se las incuba 30 min en hielo. Luego se les aplica un shock térmico de 90 seg a 42°C y nuevamente se las coloca en hielo. Se agregan 700 ul de medio SOC sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C. Finalmente, se toman cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500 ul), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquean en placas de LB con el antibiótico correspondiente según el vector utilizado.

Soluciones utilizadas:

LB: 0.5% p/v extracto de levadura, 1% p/v bacto-triptona, 1% p/v NaCl

LB agar: LB + 1.5% p/v bacto-agar

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

SOB: 2 % p/v bacto-triptona, 0.5 % p/v extracto de levadura, 0.05 % p/v NaCl.

SOC: SOB + Glucosa 20mM.

Inoue: 55 mM MnCl₂• 4H₂O, 15 mM CaCl₂• 2H₂O, 250 mM KCl, 10 mM PIPES.

11. Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones

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

12. Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxipreparaciones

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

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

de lavado QC. Finalmente el ADN atrapado en la columna es eluído con 15 ml buffer de elución QF.

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

13. Cuantificación del ADN plasmídico

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

14. Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción

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

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

15. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit QIAquick Purification kit (Qiagen). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó bajo luz UV, y se siguieron las instrucciones del fabricante. El mismo kit se utilizó para

purificar fragmentos provenientes de reacciones de amplificación por PCR y de reacciones enzimáticas.

16. Ligaciones

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo, en relaciones inserto:vector que variaban desde 3:1 a 20:1. Una reacción típica llevaba de 20 a 50 ng de vector. Antes de la ligación los vectores, previamente linealizados con la/las enzimas correspondientes, fueron tratados con la enzima SAP (Shrimp alkaline phosphatase), una fosfatasa alcalina que remueve los fosfatos de los extremos 5' del ADN del vector con el objetivo de evitar el religado sin inserto (Promega). La reacción se llevó a cabo durante 15 minutos a 37 °C. La enzima fue inactivada durante 15 minutos a 70°C. Las reacciones de ligación se realizaron a 20 µl de volumen final con 1 U de la ADN ligasa del fago T4 (Promega) y 2 ul del buffer de la enzima 10 X. La incubación sucedió a 16°C durante toda la noche. Como control se incubó el vector con enzima y buffer, pero sin agregar inserto. Se transformaron bacterias competentes con 5-20 µl de la reacción de ligación (con y sin inserto). Se plaquearon desde 200 µl hasta todo el volumen de cada transformación en placas de LB/agar con el antibiótico correspondiente y se permitió el crecimiento bacteriano durante una noche en una estufa a 37°C.

17. PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa

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

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

18. Preparación de ADNc

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

19. qPCR o PCR en Tiempo Real

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

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

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

La siguiente tabla muestra la temperatura de annealing y la concentración óptima de cada par de primers utilizado en este trabajo:

Primer	Secuencia	Temperatura (°C)	Magnesio (mM)
c-Fos	PrimerF 5'-TCCCTGGATTTGACTGGAGGTCTG-3'	68	4
	PrimerR 5'-ACAGCTTGGGAAGGAGTCAGC-3'		
Actina	PrimerF 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	61	3
	PrimerR 5'-CTAGAAGCATTTCGGTGGACGATGGAGGG-3'		
GAPDH	PrimerF 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC-3'	60	3
	PrimerR 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG-3'		
Luciferasa	PrimerF 5'-CCGCCGTTGTTGTTTTG-3'	61	4
	PrimerR 5'-ACACAACCTCCTCCGCGC-3'		
Higromicina	PrimerF 5'-GGAATCCCCGAACATCG-3'	61	3
	PrimerR 5'-GCAGACGCGCTACTTCG-3'		

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

Para las PCR se utilizaron ciclos con las siguientes características:

- 1-95°C 3 minutos
- 2-95°C 20 segundos
- 3-68, 60 ó 61°C por 20 seg
- 4-72°C por 20 seg
- 6-Leer placa
- 7-Ir al paso 2, 40 veces
- 8-95 °C 1 min
- 9-Curva de melting: de 65°C a 95°C, leer cada 0.1°C

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

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

20. Extracción del ARN

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

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

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

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

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

Otra forma de comprobar la calidad y cantidad relativa de las muestras es realizar una electroforesis a 30 V/cm en geles de agarosa 1 % en buffer TBE 1X teñidos con

bromuro de etidio. Solo son utilizadas aquellas muestras que no mostraron ningún grado de degradación.

21. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética de ARN

Este ensayo se realizó basado en el descrito en (258).

Preparación de los extractos proteicos celulares

Células NIH3T3 confluentes fueron hambreadas durante 16 hrs y tratadas durante distintos tiempos con PDGF 100 ng/ml y, en algunos casos, pretratadas con el inhibidor SB 203580. Luego se lavaron con PBS 1X frío y se les agregó 200 ul de buffer de lisis (10mM HEPES pH7.6, 3mM MgCl₂, 40mM KCl, 2mM DTT, 5% glicerol, 0.5% NP-40, más el agregado de un cóctel de inhibidores de proteasas y de fosfatasa). Luego fueron levantadas de la placa utilizando un "scrapper". Se transfirieron a tubos eppendorff y se centrifugaron a 14000 rpm 5 minutos 4 °C. El pellet es descartado. Se cuantificaron las proteínas totales presentes en cada lisado y se utilizaron de 5 a 7 ug de extracto para realizar los experimentos de unión.

Síntesis de las sondas de ARN radiactivas

A partir de los plásmidos pBSFosARE y pBSBG, previamente linealizados y purificados utilizando la técnica de PIC (fenol, cloroformo, isoamílico), se sintetizaron ambas sondas de ARN mediante en kit de transcripción in vitro (Promega). Este kit provee la enzima T7, los ribonucleótidos y el buffer de la enzima 5X. Tanto las sondas frías como marcadas radiactivamente fueron sintetizadas utilizando esta técnica siguiendo las especificaciones del fabricante. En el caso de las sondas marcadas, se realizó un mix de ribonucleótidos que no posee rUTP y aparte se realizó una dilución de este nucleótido 25 veces más diluída con el fin de que el ARN final incorpore rUTP marcado. Se realizó la reacción en presencia de una cantidad de [α^{32} P]-rUTP y las sondas marcadas se precipitaron durante toda la noche a -80°C utilizando etanol, y centrifugando 30 minutos a 14000 rpm a 4°C. La sonda precipitada fue resuspendida en 20 ul de agua y cuantificada.

Reacción de Binding

5 a 7 ug de extractos celulares se incubaron con 1 a 4 ng de sonda radiactiva en buffer de binding (buffer de lisis + 10 ug/ml Heparina, 200 ng/ml tRNA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0.6 unidades de la ARNasa T1,

(que solo digiere ARN simple cadena, con el fin de que quedaran solo aquellas regiones del ARN protegido por proteínas y fuera más simple la corrida y el análisis de los complejos) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó buffer de siembra de ARN 10X y se guardaron las muestras en hielo hasta ser separadas en geles nativos de poliacrilamida.

Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

Los complejos entre el ARN y las proteínas de unión fueron resueltos en un gel 6 % de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.

Este gel se realizó de la siguiente manera: 50 ml de un gel de acrilamida 6%: 10 ml acrilamida-bis 30% 29-1, 5 ml TBE 5X, 35 ml H₂O, 500 µl 10% APS, 50 µl TEMED. El gel se pre-corrió durante 20 minutos a 150 V a 4°C y se sembraron las muestras.

La electroforesis se realiza a 150 V a 4°C durante 1 hora y media o el tiempo necesario para separar los complejos. Luego los geles se secaron por 2 horas a 80°C y los resultados fueron visualizados por autorradiografía de los geles secos.

Súper shift

En los ensayos de Súper-shift, se utilizó el mismo protocolo que el mencionado para la reacción de binding, excepto que antes de sembrar las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente en presencia de 1 ug del anticuerpo utilizado. Luego se procedió de la misma manera que la descrita previamente.

Incubación con proteínas recombinantes

Ídem que en el caso del supershift pero esta vez se les agregó a las muestras 100 ng de las proteínas recombinantes expresadas en bacterias. Se utilizaron las proteínas GST-HuR, GST-TTP, GST-BRF1 and His-KSRP.

Crosslinking

Para los experimentos de crosslinkeo o crosslinking de las proteínas al ARN marcado, luego de todas las incubaciones, se irradiaron las muestras con luz ultravioleta a 260 nm durante 5 minutos a una distancia menor de 5 centímetros. Se agregó a cada muestra el volumen indicado de buffer laemmli y fueron corridas en geles de acrilamida desnaturalizantes. Luego de la corrida las proteínas fueron transferidas a membranas de

PVDF y reveladas por autorradiografía o incubadas con los anticuerpos indicados como en un experimento regular de western blot.

22. Cuantificación de Proteínas

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

23. Ensayos de detección de la actividad luciferasa

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

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

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

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

24. Medición de la actividad de β -galactosidasa

En tubos eppendorff se mezclan: un volumen de buffer β -gal 2X (0.2 M Fosfato de sodio pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 0.1 M β -mercaptoetanol; 1.33 mg/ml (ONPG) Orto-nitro-fenil-galactopiranosido) y un volumen del extracto de células transfectadas. Las reacciones se

realizaron en un volumen final de 100 μ l. Luego Se incubaba a 37 °C hasta la aparición de color amarillo moderado.

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

25. Western Blot

Preparación de los extractos celulares

Se prepara el buffer de lisis agregando a ultimo momento el DDT y el PMSF (25 mM HEPES, pH7.5, 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 20 mM beta-glycerofosfato, 1 mM sodio vanadato, and 1 mM PMSF, and 0.4 M NaCl). Se lavan las células con PBS 1X frio, y se agrega buffer de lisis.

Una vez que los lisados celulares se pasaron a tubos eppendorfs se dejan en hielo durante 10-20 minutos y luego se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

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

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

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12 %* o al 10 %** de 1.5 ó 0.75 mm de espesor. Luego de la siembra de las muestras, la corrida electroforética fue llevada a cabo en una cuba de electroforesis (mini ProteanIII, Bio-Rad) a 100 V constante en buffer de electroforesis (15.1g Tris; 94 g glicina; 50 ml de SDS 10 %) durante 1 a 3 hs.

Preparación de geles:

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

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

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

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

Transferencia a membranas de PVDF

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

Luego la membrana se bloquea una hora con 5% leche descremada. (Con la finalidad de que no haya pegado en toda la membrana del primer anticuerpo. Las proteínas de la leche se pegarán a toda la membrana en donde no haya proteína pegada). Se hacen 3 lavados con T-TBS 0.05 % Tween-20, de 5' cada uno. Se agrega el primer anticuerpo a la concentración óptima y se incuba el tiempo óptimo. Se realizan 3 lavados con TTBS 0.05%, de 10 minutos cada uno. Se agrega el segundo anticuerpo 1:5000 durante 60'. Finalmente se realizan 3 lavados con TTBS 0.1% de 10' cada uno y un lavado con TBS, para eliminar exceso de segundo anticuerpo y restos de detergente que interfieren con la reacción enzimática posterior. La proteína HRP - peroxidasa (horse-radish peroxidase) acoplada al anticuerpo secundario, reacciona con el reactivo ECL (Enhanced chemoluminescence, Millipore) para dar quimioluminiscencia que puede ser observada con un dispositivo especial o mediante placas fotosensibles. Luego del agregado del reactivo y de la exposición, se revela mediante exposición a placas radiográficas.

Soluciones:

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

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

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

TTBS: Tris 20mM pH=7.5, NaCl 9g/litro, 0.05% -0.1% Tween 20.

26. Ensayos de detección de proteínas fluorescentes

Para realizar los ensayos de visualización de proteínas fluorescentes, células NIH3T3 fueron plaqueadas sobre cubreobjetos y transfectadas con PEI y el plásmido

pBAXEN-CFP-HuR. Las células fueron hambreadas durante 16 hs y estimuladas con PDGF. Luego se lavaron con PBS1X 3 veces, se fijaron y permeabilizaron con Formaldehído 4% y 0.05% Triton X-100 en PBS 1X por 10 min. Luego de 3 lavados con PBS1X los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos.

El medio de montaje utilizado fue una solución PBS 1X, Glicerol 20%. La visualización de la localización subcelular de la proteína se realizó en un microscopio confocal Olympus, Fluoview FV1000, mediante un láser de 415 nm y un objetivo 60X de agua. El software pertenecía al fabricante.

Para cuantificar la cantidad de fluorescencia presente en citoplasma y núcleo, se utilizó el software gratuito ImageJ. Se trazaron varias líneas a lo largo de la célula (al menos 10 células por cada cubreobjeto) y se midió la intensidad de fluorescencia a lo largo de ese trayecto. Se realizó el promedio de las intensidades en la región citoplasmática y nuclear, al mismo tiempo que se promediaron todos los valores en cada punto de la curva de estímulo. El resultado se grafica como porcentaje de la proteína presente en el núcleo.

27. Purificación de Proteínas expresadas en bacterias fusionadas a GST

Se inoculó un cultivo de 20ml de LB/Amp de bacterias BL21 transformadas con un plásmido que codifica para la proteína de fusión GST-X. Una vez saturado el cultivo, se pasó a un matraz erlenmeyer conteniendo 500ml de LB/Amp. Se dejó por una hora hasta que el cultivo estuviese en crecimiento exponencial y se agregó IPTG (0.2 mM). Luego de 3 horas de crecimiento, se colectaron las bacterias a 6000g por 15'. Se procedió a la purificación de la proteína de fusión utilizando el siguiente protocolo: Resuspender el pellet en 10 ml de 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM PMSF/PBS. Congelar y descongelar en nitrógeno líquido y en baño a 37°C dos veces. Sonicar las muestras 3 veces por 10 segundos. Centrifugar por 15 minutos a 14.000RPM. Agregar al sobrenadante 500 µl de glutatión-agarosa. Dejar incubando en agitación por 1 hora a 4°C. Centrifugar a 3000RPM por 5'. Descartar el sobrenadante y diluir con 1ml 1% Triton-X, 1mM PMSF en PBS y pasar a tubo limpio. Lavar 3 veces con 1% Triton-X, 100mM PMSF en PBS. Lavar 2 veces con 1mM PMSF en PBS. Resuspender en una solución de 0.03g de glutatión en 10ml de Tris 0.25M, pH=7.5-8. Se resuspende por 5' a 4°C. Centrifugar y coleccionar el sobrenadante. Repetir 2 veces los pasos 11 y 12, combinando los sobrenadantes. Agregar 2X freezing solution (1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glicerol). Se cuantifica en gel de poliacrilamida con standards de BSA. Guardar la proteína a -20°C.

Unos microlitros de la proteína purificada se mezcla con Laemmli buffer para ser corrida en un gel de poliacrilamida. La cuantificación se realiza con estándares de BSA y posterior tinción con el colorante *Coomassie Blue*. Las proteínas se evidencian al someter al gel teñido a la solución decolorante.

28. Ensayos de Fosforilación in vitro

Los ensayos de actividad de MAPKs se realizaron según el protocolo descrito por Coso y colaboradores en 1995 (289). Células NIH3T3 o m1.2 fueron transfectadas con los vectores que codifican para las quinasas fusionadas al epítotope HA (pCEFL-HA) o al epitotope myc (pcDNA3-myc-MK2). Un día después de la transfección las células fueron hambreadas durante 2 hs en medio sin suero (en el caso de JNK, p38 SAPKs y MK2) o durante 16 hrs. Luego las células fueron estimuladas con carbacol o PDGF, lavadas con PBS frío y lisadas con el buffer de lisis (25 mM Hepes pH 7,5; 0,3 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT; 1 % Triton X-100; 0,5 % vanadato de sodio; 1 mM PMSF; 20 µg/ml de leupeptina) a 4 °C. Se centrifugaron y el sobrenadante fue incubado con el anticuerpo correspondiente (anti-HA, o anti-myc) durante 1 hora a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron del resto de las proteínas del lisado celular mediante el uso de bolitas A/G-agarosa que se unen a inmunoglobulinas (Santa Cruz Biotechnology), luego se lavaron 3 veces con buffer 1 (PBS 1X; 1 % NP-40; 2mM de vanadato de sodio), 1 vez con buffer 2 (100 mM Tris pH 7,5; 0,5 M LiCl) y 1 vez con buffer de reacción de quinasas (12,5 mM MOPS pH 7,5; 12,5 mM β-glicerofosfato; 7,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA; 0,5 mM de fluoruro de sodio; 0,5 mM de vanadato de sodio).

Posteriormente para ensayar la actividad quinasa, las proteínas inmunoprecipitadas fueron resuspendidas en 30 µl del buffer de reacción conteniendo 1 µCi de [³²P]-γ-ATP, 20 µM de ATP frío y 1µg de sustrato (GST-ATF2, GST-HuR, MBP o Hsp25) e incubadas 30 min a 30°C. La reacción se detuvo con el agregado de 10 µl del buffer Laemmli 5X. Por último las muestras se incubaron durante 5 min a 95 °C y se sembraron en geles de poliacrilamida 10 ó 12 %. Cada gel se secó durante 2 hs. a 80 °C y se los expuso a una placa radiográfica durante 1 día o el tiempo necesario a -80°C.

29. Ensayo de fosforilación en fase sólida o Solid phase kinase assay

Células NIH 3T3 fueron llevadas a un 80% de confluencia, hambreadas en medio sin suero durante toda la noche y estimuladas con PDGF durante los tiempos descriptos.

Las placas fueron lavadas con PBS 1X frío y lisadas con un buffer que contenía 25 mM HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM -glicerofosfato, 1 mM Vanadato de sodio y 1 mM PMSF. Se agregó a cada tubo conteniendo el extracto proteico un mix de bolitas glutatión-sefarosa unidas a 4 ug de GST-HuR. Se incubaron las mezclas toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se precipitaron las bolitas a 3000 rpm durante 30 segundos. Las bolitas precipitadas fueron lavadas y sometidas a un ensayo de fosforilación in vitro como el descrito previamente.

30. Ensayo de fosforilación en gel o In-gel kinase assay

Para este ensayo se copolimerizaron junto con la poliacrilamida en geles 10 % de 0,25 a 0,5 mg/ml de sustrato (GST-HuR / GST) con el objetivo de que las proteínas queden embebidas dentro de la estructura del gel. Luego una serie de lisados celulares fueron desnaturalizados en buffer laemmli 5x pero no hervidos y separados en estos geles especiales. Luego de la corrida, las proteínas separadas fueron renaturalizadas a su forma nativa. Primero se desnaturalizan a temperatura ambiente: 2 lavados de 30 minutos en 50 mM hepes pH7.6, 20% isopropanol (Wash buffer); 2 lavados de 30 minutos en 50 mM hepes pH7.6, 5 mM β-mercaptoethanol (Buffer A); 2 lavados de 15 minutos en Buffer A más 6 M urea. Renaturalización a 4 °C: 6 lavados de 15 minutos en Buffer A 0.05%Tween. Incubación a 30°C: 30 minutos en 20mM hepes pH7.6, 20mM MgCl₂ (Buffer K); 2 hrs en Buffer K más 25 mM DTT y 150 uCi [γ-³²P] ATP. Finalmente la reacción se detuvo mediante lavados durante un período de 12-24 hrs, y de 15 minutos como mínimo cada uno, en 5 % ácido tricloroacético y 1% pirofosfato de sodio, hasta que el background radioactivo alcance niveles normales. Los geles son secados 2 hrs a 80°C y revelados por autoradiografía.

31. Pull down de ARN

El protocolo se basó en el descrito en (290). Se adquirieron oligonucleótidos de ARN comerciales (Thermo) de 40 pb que contenían parte de la región ARE de c-fos, a los cuales se les acopló un grupo biotina en su extremos 5'. Una de las sondas presenta la secuencia del ARE salvaje (ARE-WT) que presentaba los 3 sitios consenso 3 AUUUA. La segunda sonda presenta estos 3 sitios mutados de la forma AGGA.

- ARN Oligo ARE WT: biot-5'-UUCAAUUUAUUUAUUUAAGAUGGAUUCUCAGAUUUUUUAU-3'

- ARN Oligo ARE MUT: biot-5'-UUCAAGGGAGGGAUUAAGAUGGAUUCUCAGAUAGGGGAU-3'

El control negativo se realizó, o bien sin agregar sonda o bien con un fragmento del gen de la fibronectina, el segmento EDI de 47 pb de longitud. Lisados celulares en buffer de lisis (10mM HEPES pH7.6, 3mM MgCl₂, 40mM KCl, 2mM DTT, 5% glicerol, 0.5% NP-40) de células HEK293 y NIH3T3 fueron cuantificados, y preincubados con bolitas de Streptavidina-agarosa (Thermo) durante 60 minutos a 4°C. Se utilizaron 100 ug de extracto proteico. La cantidad de cada sonda agregada fue del orden de 0.5 nmol durante 10 minutos a temperatura ambiente en presencia de 0.5 mg/ml de tRNA y 10 ug/ml de Heparina. Luego de 4 lavados en buffer de lisis las bolitas fueron incubadas con buffer laemmli, hervidas durante 5 minutos y sembradas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Los geles fueron o bien transferidos a membranas de PVDF o bien teñidos con nitrato de plata o coomassie coloidal.

32. Tinción con nitrato de plata y coomassie coloidal

Nitrato de plata

Luego de la corrida de los geles desnaturalizantes SDS-PAGE, las proteínas presentes en cada gel fueron fijadas y teñidas siguiendo el siguiente protocolo: fijación con 50% metanol, 12% ácido acético, 0.05% formaldehido (2 X, 15 minutos), lavado con 35% etanol (3 X, 6 minutos), sensibilizante, 0.02 % Na₂S₂O₃ (1 X, 9 minutos), lavados con agua miliQ (2 X, 5 minutos), teñido con 0.2 % AgNO₃, 0.076% formaldehido (1 X, 9 minutos), 2 lavados con agua miliQ de 1 minuto, revelador, 6% Na₂CO₃, 0.05% formaldehido, 0.0004% Na₂S₂O₃. La reacción se detiene con 5 % ácido acético una vez que aparecen las bandas.

Coomassie Coloidal

Luego de la corrida el gel fue sumergido en una solución que contenía 0.12% Coomassie Blue G -250, 10% sulfato de amonio, 10% ácido fosfórico y 20% metanol. Es importante el orden en que se agrega cada componente a la solución y fue el siguiente: a una solución de agua de un décimo del volumen final se agrega la cantidad deseada de ácido fosfórico, luego el sulfato de amonio. Una vez que el sulfato de amonio se disuelve se agrega el Coomassie Blue G-250 y se agrega agua hasta un 80 %. Finalmente se completa con el metanol. Las bandas comienzan a aparecer a partir de las 4 horas de incubación, que puede alcanzar las 48 hrs. Este método no necesita desteñido.

33. Secuenciación de proteínas mediante espectrometría de masa LC-MS

Digestión “in-gel”

Las bandas escindidas del gel teñido con coomassie coloidal fueron primero lavadas y luego reducidas con iodoacetamida. La digestión proteolítica se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C utilizando tripsina modificada (Promega) en bicarbonato de amonio 50mM (pH 8.3). Los péptidos fueron extraídos del gel y concentrados por Speed Vac previa a la secuenciación con LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry: espectrometría de masa luego de una separación por cromatografía líquida).

LC-MS

Las muestras secadas fueron resuspendidas en un solvente de loading para LC-MS (2% Acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico) y separadas por HPLC (nanoAcquity-Waters). Las muestras fueron primero capturadas y lavadas antes de la separación analítica. Se corrió un gradiente bifásico de 80 min comenzando con un 100% del solvente A (2% Acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico) a un 90% de solvente B (100% Acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico). La espectrometría on line se detectó en un LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific). Para cada scan MS, los 10 iones más intensos fueron fragmentados y excluidos por los siguientes 30 segundos.

Tratamiento de los datos

Los datos experimentales generados pro la secuenciación de los péptidos fueron introducidos en las bases de datos Proteome Discoverer 1.1 (Thermo Scientific) y Mascot 2.3 (Matrix Science). Estas bases de datos se restringieron para proteínas humanas de Uniprot (Uniprot release 2011_07- May 31, 2011). El software de análisis de las proteínas identificadas en última instancia fue el Scaffold 3 Viewer (software proteómico).

34. Análisis bioinformático y Data mining

Para realizar el análisis bioinformático se utilizó una red integrada de interacciones proteicas o PPI (protein-protein interactions) para PPIs humanas. De esa red total se extrajo la información para las proteínas de interés: p38 alfa (MAPK14), p38 beta (MAPK11), p38 gamma (MAPK12), p38 delta (MAPK13), MK2 (MAPKAPK2), TTP

(ZFP36), HuR (ELAVL1), BRF1 (ZFP36L1), KSRP (KHSRP) y AUF1 (HNRNPD). En total 4 MAPKs, 1 quinasa activada por MAPK o MAPKAP, MK2, y 5 AUBPS. Esto significa que se obtiene una única red en la cual se encuentran nuestras proteínas de interés y sus interactores primarios, y al mismo tiempo se pueden conservar las interacciones entre estas proteínas interactoras. Todas las redes se manejaron utilizando el software gratuito Cytoscape (<http://www.cytoscape.org> website). La red resultante fue actualizada extrayendo cualquier nueva interacción presente en las bases de datos públicas BioGrid e IntAct. Si bien se toma la red de interacciones humanas, las interacciones presentes en otros organismos (*S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *S. pombe*, *C. elegans*, *M. musculus*, *A. thaliana*) también se unen, homologando los nombres de los genes y señalando de cual organismo proviene cada interacción. Este tipo de análisis permite generar datos predictivos que tendrían que comprobarse en el caso de un contexto humano. La red de interacciones final fue curada utilizando literatura relacionada con proteínas de unión a regiones AU-rich y con caminos de transducción de señales.

Una vez que se obtiene la red se la puede enriquecer de maneras diversas. Por ejemplo agregando datos de expresión utilizando resultados publicados de microarreglos de ADNc. Se utilizó en este caso el set de datos correspondiente al trabajo de Ferreiro et al. en donde analizan la expresión de distintos genes en células de ratón KO para el gen de p38alfa SAPK.

Esta metodología se describe en los trabajos de Echeverría et al, 2011 (260,291).

35. Ensayos de decaimiento del ARNm

Células HeLa TetOff o NIH3T3 TetOff (Clontech) fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones: pLucFosWT, pLucFos Δ ARE o pLucbetaGlobin, utilizando el método PEI. Luego de cada transfección las células se incubaron en medio completo sin tetraciclina ni doxiciclina durante 24 hrs para permitir la transcripción de los reporteros. Luego la tetraciclina o doxiciclina fueron agregadas a una concentración final de 1 μ g/ml o 10 μ g/ml respectivamente al medio de crecimiento por un período de hasta 5 hrs. Luego de esta incubación, a las células se les extrajo el medio y se les agregó un volumen del reactivo Tri Reagent (Genbiotech) para extraer el ARN. Luego de la extracción del ARN y la síntesis del ADNc se midió la cantidad de ARN de luciferasa e higromicina para cada muestra. El software del termociclador MXPro (Stratagene) calculó automáticamente la cantidad presente en cada tubo tomando en cuenta duplicados o triplicados, gen normalizador (higromicina) y punto inicial, primero seteando manualmente el Ct (o ciclo umbral) y descartando aquellas reacciones no válidas. Cada

curva fue normalizada tomando en cuenta al punto sin agregado de antibiótico como 100% del ARN de luciferasa total. Esta metodología se encuentra descrita en (38).

36. Inmunohistoquímica

Cada anticuerpo utilizado requirió una puesta a punto, de todas maneras presentamos un protocolo estándar de trabajo.

Como se indicó en la sección Resultados, los microarreglos de tejidos fueron confeccionadas utilizando tejidos de tumores de pulmón y sus tejidos normales adyacentes de 341 pacientes que se sometieron a cirugía en el Hospital Durand y en el Centro Gallego entre enero de 1990 y diciembre de 2004. Se obtuvo el consentimiento de cada paciente y el protocolo fue aprobado por el comité de ética de cada hospital. Se tomaron las partes viables de cada tumor con la ayuda de un patólogo e inmediatamente se embebió a cada muestra en parafina luego de ser fijado en formaldehído. Un equipo Beecher se utilizó para confeccionar el microarreglo de los tejidos viables, cada tejido presentaba un diámetro de 0.6 mm. El microarreglo final presentaba 87 carcinomas de células escamosas, 205 adenocarcinomas, 2 carcinomas de células grandes, 18 carcinomas poco diferenciados, 11 bronquiolo-alveolo carcinomas y 10 carcinomas de otros tipos.

Cada portaobjeto conteniendo el microarreglo fue sometido a la técnica de inmunohistoquímica clásica de la siguiente manera: Las muestras fueron tratadas con solventes orgánicos: 2X 10 min y 1X 5 min xilol, 2X 5 min etanol 100%, 1X 3 min etanol 95%, 1X 3 min etanol 70%, 1X 3min etanol 50%, 1X 3min etanol 30%, 1X 3 min agua. El antígeno es expuesto incubando durante 15 minutos en una solución HCl 3,6% v/v (1 N) a temperatura ambiente.

Se realizan 2 lavados en TBS 0,025% Tritón x-100 durante 5 minutos. Las muestras son bloqueadas durante 30 minutos con una solución de BSA en TBS 1X. Sin lavar, se incuba toda la noche con el anticuerpo primario, diluido en BSA-TBS 1X. Los preparados son lavados 2X 5 minutos con TBS 1X 0.025%. Se bloquea la peroxidasa endógena en una solución de 0,3% H₂O₂ TBS durante 15 min. Se lavan los preparados 3x en TBS 1X durante 5 minutos.

El anticuerpo secundario es incubado diluido en BSA-TBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se prepara el reactivo AB (kit Vectastain), en TBS 1X, y se lo pone a incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos antes de su utilización. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS 1X y el reactivo DAB (diaminobenzidina) se agrega sobre el tejido en el microscopio para observar la aparición de la coloración marrón. La reacción se corta colocando el preparado en agua. Los

preparados se sumergen en una solución de hematoxilina durante unos segundos hasta que aparezca la coloración azul. Las muestras se deshidratan con incubaciones sucesivas en etanol cada vez más concentrado. Los preparados deshidratados se montan con bálsamo de Canadá. Los resultados son analizados con la ayuda de un patólogo especializado.

Publicaciones realizadas durante el período de tesis

Trabajos publicados:

1) *Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data.* **Degese MS**, Mendizabal JE, Gandini NA, Gutkind JS, Molinolo A, Hewitt SM, Curino AC, Coso OA, Facchinetti MM. ***Lung Cancer***, 2012,Jun. 1;**444**(2):211-8

2) *Involvement of trypomastigote small surface antigen (TSSA) in Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells.* Cánepa GE, **Degese MS**, Budu A, Garcia CR, Buscaglia CA. ***Biochem J.***, 2012, Jul.;**77**(1):168-75.

Trabajos enviados (no aceptados aún):

3) *The use of alternative polyadenylation sites renders β 1-integrin mRNA isoforms with differential stability during mammary gland development.* Naipauer J, Gattelli A, **Degese MS**, Slomiansky V, LaMarre J, Castilla L, Abba M, Kordon E, Coso OA.

Trabajos en preparación:

3) *Post-transcriptional regulation of c-fos after proliferative stimuli. Interactive involvement of AUBPs and the p38 MAPK pathway in the regulation of c-fos mRNA stability.* **Degese MS**, Tanos T, Naipauer J, Gingerich T, Chiappe D, Echeverria P, LaMarre J, Gutkind JS, Coso OA.

REFERENCIAS

Referencias

1. **Shyu, A. B., Greenberg, M. E., and Belasco, J. G.** The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. 1989. *Genes Dev.* **3**:60-72.
2. **Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P.** 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. 1987. *Mol. Cell Biol.* **7**(6):2256-2266.
3. **Lee, W., Mitchell, P., and Tjian, R.** Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. 6-19-1987. *Cell.* **49**(6):741-752.
4. **van, Dam H. and Castellazzi, M.** Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. 4-30-2001. *Oncogene.* **20**(19):2453-2464.
5. **Curran, T. and Franza, B. R., Jr.** Fos and Jun: the AP-1 connection. 11-4-1988. *Cell.* **55**(3):395-397.
6. **Hai, T. and Curran, T.** Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. 5-1-1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**(9):3720-3724.
7. **Lukasiuk, K. and Kaczmarek, L.** AP-1 and CRE DNA binding activities in rat brain following pentylentetrazole induced seizures. 4-18-1994. *Brain Res.* **643**(1-2):227-233.
8. **van, Straaten F., Muller, R., Curran, T., Van, Beveren C., and Verma, I. M.** Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**(11):3183-3187.
9. **Curran, T. and Teich, N. M.** Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. 1-15-1982. *Virology.* **116**(1):221-235.
10. **Curran, T. and Teich, N. M.** Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: characterization of a 55,000-dalton phosphoprotein. 1982. *J. Virol.* **42**(1):114-122.
11. **Verma, I. M.** From c-fos to v-fos. 1984. *Nature.* **308**:317-317.
12. **Curran, T., Rauscher, F. J., III, Cohen, D. R., and Franza, B. R., Jr.** Beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors. 1988. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **53 Pt 2**:769-777.
13. **Avraham, R. et. al.** EGF Decreases the Abundance of MicroRNAs That Restrain Oncogenic Transcription Factors. 2010. *Cancer Biol.* **3**(124)
14. **Piechaczyk, M. and Blanchard, J. M.** c-fos proto-oncogene regulation and function. 1994. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **17**(2):93-131.

15. **Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T., and Muller, R.** Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle. 1986. *EMBO J.* **5**(4):695-700.
16. **Holt, J. T., Gopal, T. V., Moulton, A. D., and Nienhuis, A. W.** Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. 1986. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83**(13):4794-4798.
17. **Morgan, J. I. and Curran, T.** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. 1991. *Annu.Rev.Neurosci.* **14**:421-451.
18. **Coso, O. A., Chiarello, M., Kalinec, G., Kyriakis, J. M., Woodgett, J., and Gutkind, J. S.** Transforming G Protein-Coupled Receptors Activate JNK (SAPK). 1995. *J.Biol.Chem.* **270**(10):5620-5624.
19. **Janknecht, R., Cahill, M. A., and Nordheim, A.** Signal integration at the c-fos promoter. 1995. *Carcinogenesis.* **16**(3):443-450.
20. **Treisman, R.** The serum response element. 1992. *Trends Biochem.Sci.* **17**(10):423-426.
21. **Hill, C. S. and Treisman, R.** Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. 10-16-1995. *EMBO J.* **14**(20):5037-5047.
22. **Hill, C. S. and Treisman, R.** Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. 1-27-1995. *Cell.* **80**(2):199-211.
23. **Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X., and Karin, M.** Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. 12-1-1995. *EMBO J.* **14**(23):5957-5964.
24. **Simi, A., Edling, Y., Ingelman-Sundberg, M., and Tindberg, N.** Activation of c-fos by lipopolysaccharide in glial cells via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of serum or cyclic AMP/calcium response element. 2005. *J.Neurochem.* **92**(4):915-924.
25. **Fromm, C., Coso, O. A., Montaner, S., Xu, N., and Gutkind, J. S.** The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation. 9-16-1997. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**(19):10098-10103.
26. **Yang, E., Lerner, L., Besser, D., and Darnell, J. E., Jr.** Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3. 5-2-2003. *J.Biol.Chem.* **278**(18):15794-15799.
27. **Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., Morgan, J. I., and Curran, T.** Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. 1995. *Neuron.* **14**(2):241-252.
28. **Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., and Cochran, B. H.** The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. 1990. *EMBO J.* **9**(13):4477-4484.

29. **Gonzalez, G. A., Yamamoto, K. K., Fischer, W. H., Karr, D., Menzel, P., Biggs, W., III, Vale, W. W., and Montminy, M. R.** A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. 2-23-1989. *Nature*. **337**(6209):749-752.
30. **Bito, H., Deisseroth, K., and Tsien, R. W.** CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. 12-27-1996. *Cell*. **87**(7):1203-1214.
31. **Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., and Verma, I. M.** Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. 7-28-1988. *Nature*. **334**(6180):314-319.
32. **Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S., and Montminy, M.** Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. 7-10-1992. *Cell*. **70**(1):105-113.
33. **Janknecht, R. and Hunter, T.** Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. 4-1-1997. *EMBO J*. **16**(7):1620-1627.
34. **Meijlink, F., Curran, T., Miller, A. D., and Verma, I. M.** Removal of a 67-base-pair sequence in the noncoding region of protooncogene fos converts it to a transforming gene. 1985. *PNAS*. **82**(15):4987-4991.
35. **Chen, C. A., You, Y., and Shyu, A. B.** Two cellular proteins that bind to a specific purine-rich necessary for the destabilization function of a *c-fos* protein-coding region determinant of mRNA instability. 1992. *Mol.Cell.Biol*. **12**(12):5748-5757.
36. **Schiavi, S. C., Wellington, C. L., Shyu, A. B., Chen, C. A., Greenberg, M. E., and Belasco, J. G.** Multiple Elements in the *c-fos* Protein-coding Region Facilitate mRNA Deadenylation and Decay by a Mechanism Coupled to Translation. 1994. *J.Biol.Chem*. **269**(5):3441-3448.
37. **Grosset, C., Chen, C. A., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., and Shyu, A. B.** A Mechanism for Translationally Coupled mRNA Turnover: Interaction between the Poly(A) Tail and a *c-fos* RNA Coding Determinant via a Protein Complex. 2000. *Cell*. **103**:29-40.
38. **Loflin, P., Chen, C. A., Xu, N., and Shyu, A. B.** Transcriptional Pulsing Approaches for Analysis of mRNA Turnover in Mammalian Cells. 1999. *METHODS*. **17**:11-20.
39. **Xu, N., Chen, C. A., and Shyu, A. B.** Versatile Role for hnRNP D Isoforms in the Differential Regulation of Cytoplasmic mRNA Turnover. 2001. *Mol.Cell.Biol*. **21**(20):6960-6971.
40. **Loflin, P., Chen, C. A., and Shyu, A. B.** Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. 1999. *Genes Dev*. **13**:1884-1897.
41. **Gherzi, R., Lee, KY. L., Briata, P., Wegmuller, D., Moroni, C., Karin, M., and Chen, CY.** A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery. 2004. *Mol.Cell*. **14**:571-583.

42. **Chen, CY., Gherzi, R., Ong, SE., Chan, E. L., Raijmakers, R., Prujin, G. J. M., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M.** AU Binding Proteins Recruit the Exosome to Degrade ARE-Containing mRNAs. 2001. *Cell*. **107**:451-464.
43. **Chou, CF., Mulky, A., Maitra, S., Lin, WJ., Gherzi, R., Kappes, J., and Chen, CY.** Tethering KSRP, a Decay-Promoting AU-Rich Element-Binding Protein, to mRNAs Elicits mRNA Decay. 2006. *Mol.Cell.Biol.* **26**(10):3695-3706.
44. **Peng, S. S. Y., Chen, C. A., Xu, N., and Shyu, A. B.** RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. 1998. *EMBO J.* **17**(12):3461-3470.
45. **Chen, C. A., Xu, N., and Shyu, A. B.** Highly Selective Actions of HuR in Antagonizing AU-Rich Element-Mediated mRNA Destabilization. 2002. *Mol.Cell.Biol.* **22**(20):7268-7278.
46. **Abdelmohsen, K., Pullman, R., Lal, A., Kim, H. H., Galban, S., Yang, X., Beltrow, J. D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D. A., Furneaux, H., and Gorospe, M.** Phosphorylation of HuR by Chk2 Regulates SIRT1 Expression. 2007. *Mol.Cell.* **25**(543):557-
47. **Liu, L., Rao, J. N., Zou, T., Xiao, L., Wang, PY., Turner, D. J., Gorospe, M., and Wang, JY.** Polyamines Regulate c-Myc Translation through Chk2-dependent HuR Phosphorylation. 2009. *Mol.Biol.Cell.* **20**:4885-4898.
48. **Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Pullman, R., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J. L., Blethrow, J., Shokat, K. M., and Gorospe, M.** Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. 2008. *Genes Dev.* **22**:1804-1815.
49. **Doller, A., Huwiler, A., Muller, R., Radeke, H. H., Pfeilsschifter, J., and Eberhardt, W.** Protein Kinase C-dependent Phosphorylation of the mRNA-stabilizing Factor HuR: Implications for Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2. 2007. *Mol.Biol.Cell.* **18**:2137-2148.
50. **Doller, A., Akool, ES., Huwiler, A., Muller, R., Radeke, H. H., Pfeilsschifter, J., and Eberhardt, W.** Posttranslational Modification of the AU-Rich Element Binding Protein HuR by Protein Kinase C Elicits Angiotensin II-Induced Stabilization and Nuclear Export of Cyclooxygenase 2 mRNA. 2008. *Mol.Cell.Biol.* **28**(8):2608-2625.
51. **Doller, A., Schlepckow, K., Schwalbe, H., Pfeilsschifter, J., and Eberhardt, W.** Tandem Phosphorylation of Serines 221 and 318 by Protein Kinase C Coordinates mRNA Binding and Nucleocytoplasmic Shuttling of HuR. 2010. *Mol.Cell.Biol.* **30**(6):1397-1410.
52. **Doller, A., Winkler, C., Azrillian, I., Schulz, S., Hartman, S., Pfeilsschifter, J., and Eberhardt, W.** High-constitutive HuR phosphorylation at Ser 318 by PKC δ propagates tumor relevant functions in colon carcinoma cells. 2011. *Carcinogenesis.* **32**(5):676-685.
53. **Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengochea, R., Fernandez-Capetillo, O., and Nebreda, A. R.** p38 Mitogen-Activated Protein Kinase- and HuR-Dependent Stabilization of p21Cip1 mRNA Mediates the G1/S Checkpoint. 2009. *Mol.Cell.Biol.* **29**(16):4341-4351.

54. **Briata, P., Forcales, S. V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, CY., Karin, M., Puri, P. L., and Gherzi, R.** p38-Dependent Phosphorylation of the mRNA Decay-Promoting Factor KSRP Controls the Stability of Select Myogenic Transcripts. 2005. *Mol.Cell.* **20**:891-903.
55. **Linker, K., Pautz, A., Fehir, M., Hubrich, T., Greeve, J., and Kleinert, H.** Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression—complex interplay of KSRP with TTP and HuR. 2005. *Nucleic Acids Res.* **33**(15):4813-4827.
56. **Ferrara, P., Andermarcher, E., Bossis, G., Acquaviva, C., Brockly, F., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M.** The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. 3-13-2003. *Oncogene.* **22**(10):1461-1474.
57. **Salvat, C., Jariel-Encontre, I., Acquaviva, C., Omura, S., and Piechaczyk, M.** Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts. 7-23-1998. *Oncogene.* **17**(3):327-337.
58. **Acquaviva, C., Brockly, F., Ferrara, P., Bossis, G., Salvat, C., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M.** Identification of a C-terminal tripeptide motif involved in the control of rapid proteasomal degradation of c-Fos proto-oncoprotein during the G(0)-to-S phase transition. 11-8-2001. *Oncogene.* **20**(51):7563-7572.
59. **Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M.** c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. 2003. *Mol.Cell Biol.* **23**(20):7425-7436.
60. **Sasaki, T., Kojima, H., Kishimoto, R., Ikeda, A., Kunimoto, H., and Nakajima, K.** Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. 2006. *Mol.Cell.* **24**(1):63-75.
61. **Gomard, T., Jariel-Encontre, I., Basbous, J., Bossis, G., Mocquet-Torcy, G., and Piechaczyk, M.** Fos family protein degradation by the proteasome. 2008. *Biochem.Soc.Trans.* **36**(5)
62. **Abate, C., Marshak, D. R., and Curran, T.** Fos is phosphorylated by p34cdc2, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. 1991. *Oncogene.* **6**(12):2179-2185.
63. **Ofir, R., Dwarki, V. J., Rashid, D., and Verma, I. M.** Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. 11-1-1990. *Nature.* **348**(6296):80-82.
64. **Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., and Blenis, J.** Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. 2002. *Nat.Cell Biol.* **4**(8):556-564.
65. **Monje, P., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S.** Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. 2003. *Mol.Cell Biol.* **23**(19):7030-7043.

66. **Tanos, T., Marinissen, M. J., Coluccio-Leskow, F., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J. S., and Coso, O. A.** Phosphorylation of c-Fos by Members of the p38 MAPK Family. 2005. *J.Biol.Chem.* **280**(19):18842-18852.
67. **Portal, M. M., Ferrero, G. O., and Caputto, B. L.** N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. 5-24-2007. *Oncogene.* **26**(24):3551-3558.
68. **Coulombe, P. and Meloche, S.** Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. 2007. *Biochim.Biophys.Acta.* **1773**(8):1376-1387.
69. **Seger, R. and Krebs, E. G.** The MAPK signaling cascade. 1995. *FASEB J.* **9**(9):726-735.
70. **Karin, M. and Hunter, T.** Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. 7-1-1995. *Curr.Biol.* **5**(7):747-757.
71. **McKay, M. M. and Morrison, D. K.** Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. 5-14-2007. *Oncogene.* **26**(22):3113-3121.
72. **Goldsmith, Z. G. and Dhanasekaran, D. N.** G protein regulation of MAPK networks. 5-14-2007. *Oncogene.* **26**(22):3122-3142.
73. **Gutkind, J. S., Novotny, E. A., Brann, M. R., and Robbins, K. C.** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. 6-1-1991. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**(11):4703-4707.
74. **Gutkind, J. S.** Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. 7-11-2000. *Sci.STKE.* **2000**(40):RE1-
75. **Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S.** G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. 2001. *Trends Pharmacol.Sci.* **22**(7):368-376.
76. **Owens, D. M. and Keyse, S. M.** Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. 5-14-2007. *Oncogene.* **26**(22):3203-3213.
77. **Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D.** ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. 5-17-1991. *Cell.* **65**(4):663-675.
78. **Ullrich, A. and Schlessinger, J.** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. 4-20-1990. *Cell.* **61**(2):203-212.
79. **Schlessinger, J.** How receptor tyrosine kinases activate Ras. 1993. *Trends Biochem.Sci.* **18**(8):273-275.
80. **Downward, J.** Control of ras activation. 1996. *Cancer Surv.* **27**:87-100.
81. **van Der, Geer P., Wiley, S., Lai, V. K., Olivier, J. P., Gish, G. D., Stephens, R., Kaplan, D., Shoelson, S., and Pawson, T.** A conserved amino-terminal Shc

- domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. 4-1-1995. *Curr.Biol.* **5**(4):404-412.
82. **Pawson, T.** Protein modules and signalling networks. 2-16-1995. *Nature.* **373**(6515):573-580.
83. **Sasaoka, T., Langlois, W. J., Leitner, J. W., Draznin, B., and Olefsky, J. M.** The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. 12-23-1994. *J.Biol.Chem.* **269**(51):32621-32625.
84. **Davis, R. J.** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. 7-15-1993. *J.Biol.Chem.* **268**(20):14553-14556.
85. **Zhang, J., Zhou, B., Zheng, C. F., and Zhang, Z. Y.** A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. 8-8-2003. *J.Biol.Chem.* **278**(32):29901-29912.
86. **Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., and Morrison, D. K.** Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. 1-21-2005. *Mol.Cell.* **17**(2):215-224.
87. **Turjanski, A. G., Vaque, J. P., and Gutkind, J. S.** MAP kinases and the control of nuclear events. 5-14-2007. *Oncogene.* **26**(22):3240-3253.
88. **Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C. J.** Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. 6-17-1994. *Cell.* **77**(6):841-852.
89. **Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F., and Ahn, N. G.** Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. 8-12-1994. *Science.* **265**(5174):966-970.
90. **Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., and Pouyssegur, J.** Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. 9-15-1993. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**(18):8319-8323.
91. **Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i S, Wada, H., Fujimoto, J., and Kohno, M.** Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. 1-21-1999. *Oncogene.* **18**(3):813-822.
92. **Davis, R. J.** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. 10-13-2000. *Cell.* **103**(2):239-252.
93. **Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., and Davis, R. J.** Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. 6-3-1996. *EMBO J.* **15**(11):2760-2770.
94. **Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J.** JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. 3-25-1994. *Cell.* **76**(6):1025-1037.

95. **Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J. R.** Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. 10-17-1991. *Nature*. **353**(6345):670-674.
96. **Ip, Y. T. and Davis, R. J.** Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. 1998. *Curr.Opin.Cell Biol.* **10**(2):205-219.
97. **Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F., and Kraft, A. S.** Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. 8-25-1992. *J.Biol.Chem.* **267**(24):17001-17005.
98. **Teramoto, H., Coso, O. A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., and Gutkind, J. S.** Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. 11-1-1996. *J.Biol.Chem.* **271**(44):27225-27228.
99. **Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L.** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? 1997. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **7**(1):67-74.
100. **Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T.** Protein tyrosine phosphatases in the human genome. 6-11-2004. *Cell.* **117**(6):699-711.
101. **Torres, M.** Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. 1-1-2003. *Front Biosci.* **8**:d369-d391.
102. **Weston, C. R. and Davis, R. J.** The JNK signal transduction pathway. 2007. *Curr.Opin.Cell Biol.* **19**(2):142-149.
103. **Johnson, R., Spiegelman, B., Hanahan, D., and Wisdom, R.** Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. 1996. *Mol.Cell Biol.* **16**(8):4504-4511.
104. **Behrens, A., Sabapathy, K., Graef, I., Cleary, M., Crabtree, G. R., and Wagner, E. F.** Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT). 2-13-2001. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**(4):1769-1774.
105. **Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J.** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. 8-5-1994. *Science.* **265**(5173):808-811.
106. **Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J.** Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). 7-26-1996. *J.Biol.Chem.* **271**(30):17920-17926.
107. **Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P., and Ullrich, A.** ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. 4-30-1996. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**(9):4355-4359.
108. **Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di, Padova F., Ulevitch, R. J., and Han, J.** Characterization of the structure and function of the

- fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. 11-28-1997. *J.Biol.Chem.* **272**(48):30122-30128.
109. **Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R. J., and Han, J.** The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. 11-12-1996. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **228**(2):334-340.
110. **Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J.** Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. 9-23-1994. *Cell.* **78**(6):1039-1049.
111. **Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J.** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. 3-31-1995. *J.Biol.Chem.* **270**(13):7420-7426.
112. **Pietersma, A., Tilly, B. C., Gaestel, M., de Jong N., Lee, J. C., Koster, J. F., and Sluiter, W.** p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. 1-3-1997. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **230**(1):44-48.
113. **Foltz, I. N., Lee, J. C., Young, P. R., and Schrader, J. W.** Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. 2-7-1997. *J.Biol.Chem.* **272**(6):3296-3301.
114. **Brewster, J. L., de Valoir T., Dwyer, N. D., Winter, E., and Gustin, M. C.** An osmosensing signal transduction pathway in yeast. 3-19-1993. *Science.* **259**(5102):1760-1763.
115. **Berman, K., McKay, J., Avery, L., and Cobb, M.** Isolation and characterization of pmk-(1-3): three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans*. 2001. *Mol.Cell Biol.Res.Comm.* **4**(6):337-344.
116. **Enslin, H., Raingaud, J., and Davis, R. J.** Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. 1-16-1998. *J.Biol.Chem.* **273**(3):1741-1748.
117. **Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A., and Davis, R. J.** Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. 8-15-2003. *Genes Dev.* **17**(16):1969-1978.
118. **Hu, M. C., Wang, Y. P., Mikhail, A., Qiu, W. R., and Tan, T. H.** Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. 3-12-1999. *J.Biol.Chem.* **274**(11):7095-7102.
119. **Hanks, S. K. and Hunter, T.** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. 1995. *FASEB J.* **9**(8):576-596.
120. **Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., and Hagiwara, M.** A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. 6-7-1996. *J.Biol.Chem.* **271**(23):13675-13679.

121. **Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten, Dijke P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y.** Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. 1-3-1997. *Science*. **275**(5296):90-94.
122. **Hirai, S., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Rana, A., Avruch, J., and Ohno, S.** MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. 6-13-1997. *J.Biol.Chem.* **272**(24):15167-15173.
123. **Ubeda, M., Wang, X. Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J. F., and Ron, D.** Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. 1996. *Mol.Cell Biol.* **16**(4):1479-1489.
124. **Takekawa, M., Posas, F., and Saito, H.** A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. 8-15-1997. *EMBO J.* **16**(16):4973-4982.
125. **Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J., and Bokoch, G. M.** Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. 10-13-1995. *J.Biol.Chem.* **270**(41):23934-23936.
126. **Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J., and Cerione, R. A.** Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. 11-24-1995. *J.Biol.Chem.* **270**(47):27995-27998.
127. **Ge, B., Gram, H., Di, Padova F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y., and Han, J.** MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. 2-15-2002. *Science*. **295**(5558):1291-1294.
128. **Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F., and Tonks, N. K.** MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. 11-5-1993. *Cell*. **75**(3):487-493.
129. **Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., and Arkinstall, S.** The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. 11-1-1996. *J.Biol.Chem.* **271**(44):27205-27208.
130. **Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., and Saito, H.** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. 5-19-1994. *Nature*. **369**(6477):242-245.
131. **Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., and Saito, H.** Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. 9-20-1996. *Cell*. **86**(6):865-875.
132. **Takekawa, M., Maeda, T., and Saito, H.** Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. 8-17-1998. *EMBO J.* **17**(16):4744-4752.

133. **Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M.,onso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. 9-23-1994. *Cell*. **78**(6):1027-1037.
134. **Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., and Gaestel, M.** Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. 11-30-1992. *FEBS Lett*. **313**(3):307-313.
135. **Huang, C. K., Zhan, L., Ai, Y., and Jongstra, J.** LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. 1-3-1997. *J.Biol.Chem*. **272**(1):17-19.
136. **Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariatì, S., Cohen, P., and Comb, M. J.** FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. 9-2-1996. *EMBO J*. **15**(17):4629-4642.
137. **Hazzalin, C. A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M. J., Cohen, P., and Mahadevan, L. C.** p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. 8-1-1996. *Curr.Biol*. **6**(8):1028-1031.
138. **Whitmarsh, A. J., Yang, S. H., Su, M. S., Sharrocks, A. D., and Davis, R. J.** Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. 1997. *Mol.Cell Biol*. **17**(5):2360-2371.
139. **Wang, X. Z. and Ron, D.** Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. 5-31-1996. *Science*. **272**(5266):1347-1349.
140. **Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V., and Ulevitch, R. J.** Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. 3-20-1997. *Nature*. **386**(6622):296-299.
141. **Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., Di, Padova F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J., and Han, J.** Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. 1999. *Mol.Cell Biol*. **19**(1):21-30.
142. **Gomez del Arco P., Martinez-Martinez, S., Maldonado, J. L., Ortega-Perez, I., and Redondo, J. M.** A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. 5-5-2000. *J.Biol.Chem*. **275**(18):13872-13878.
143. **Heidenreich, O., Neininger, A., Schrott, G., Zinck, R., Cahill, M. A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M., and Nordheim, A.** MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. 5-14-1999. *J.Biol.Chem*. **274**(20):14434-14443.
144. **Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A.** Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. 4-15-1997. *EMBO J*. **16**(8):1909-1920.
145. **Fukunaga, R. and Hunter, T.** MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. 4-15-1997. *EMBO J*. **16**(8):1921-1933.

146. **Kusuhara, M., Takahashi, E., Peterson, T. E., Abe, J., Ishida, M., Han, J., Ulevitch, R., and Berk, B. C.** p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. 10-19-1998. *Circ.Res.* **83**(8):824-831.
147. **Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A., and Anderton, B. H.** Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. 1997. *J.Neurochem.* **69**(1):191-198.
148. **Feng, L., Zhou, X., Liao, J., and Omary, M. B.** Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. 1999. *J.Cell Sci.* **112 (Pt 13)**:2081-2090.
149. **Johnson, G. V. and Bailey, C. D.** The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. 2003. *Exp.Neurol.* **183**(2):263-268.
150. **Hollenbach, E., Neumann, M., Vieth, M., Roessner, A., Malfertheiner, P., and Naumann, M.** Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. 2004. *FASEB J.* **18**(13):1550-1552.
151. **Perregaux, D. G., Dean, D., Cronan, M., Connelly, P., and Gabel, C. A.** Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. 1995. *Mol.Pharmacol.* **48**(3):433-442.
152. **Guan, Z., Buckman, S. Y., Pentland, A. P., Templeton, D. J., and Morrison, A. R.** Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. 5-22-1998. *J.Biol.Chem.* **273**(21):12901-12908.
153. **Badger, A. M., Cook, M. N., Lark, M. W., Newman-Tarr, T. M., Swift, B. A., Nelson, A. H., Barone, F. C., and Kumar, S.** SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. 7-1-1998. *J.Immunol.* **161**(1):467-473.
154. **Da, Silva J., Pierrat, B., Mary, J. L., and Lesslauer, W.** Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. 11-7-1997. *J.Biol.Chem.* **272**(45):28373-28380.
155. **Takenaka, K., Moriguchi, T., and Nishida, E.** Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. 4-24-1998. *Science.* **280**(5363):599-602.
156. **Molnar, A., Theodoras, A. M., Zon, L. I., and Kyriakis, J. M.** Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. 5-16-1997. *J.Biol.Chem.* **272**(20):13229-13235.
157. **Engelman, J. A., Lisanti, M. P., and Scherer, P. E.** Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. 11-27-1998. *J.Biol.Chem.* **273**(48):32111-32120.
158. **Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R. J., and Todokoro, K.** Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. 9-15-1998. *Blood.* **92**(6):1859-1869.

159. **Efimova, T., Broome, A. M., and Eckert, R. L.** A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. 9-5-2003. *J.Biol.Chem.* **278**(36):34277-34285.
160. **Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S., and Sun, P.** Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. 2002. *Mol.Cell Biol.* **22**(10):3389-3403.
161. **Haq, R., Brenton, J. D., Takahashi, M., Finan, D., Finkielstein, A., Damaraju, S., Rottapel, R., and Zanke, B.** Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. 9-1-2002. *Cancer Res.* **62**(17):5076-5082.
162. **Bulavin, D. V., Demidov, O. N., Saito, S., Kauraniemi, P., Phillips, C., Amundson, S. A., Ambrosino, C., Sauter, G., Nebreda, A. R., Anderson, C. W., Kallioniemi, A., Fornace, A. J., Jr., and Appella, E.** Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. 2002. *Nat.Genet.* **31**(2):210-215.
163. **Pramanik, R., Qi, X., Borowicz, S., Choubey, D., Schultz, R. M., Han, J., and Chen, G.** p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity. 2-14-2003. *J.Biol.Chem.* **278**(7):4831-4839.
164. **Askari, N., Diskin, R., Avitzour, M., Capone, R., Livnah, O., and Engelberg, D.** Hyperactive variants of p38alpha induce, whereas hyperactive variants of p38gamma suppress, activating protein 1-mediated transcription. 1-5-2007. *J.Biol.Chem.* **282**(1):91-99.
165. **Wang, Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J., Jr., Brown, J. H., Han, J., and Chien, K. R.** Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. 1-23-1998. *J.Biol.Chem.* **273**(4):2161-2168.
166. **Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., and Lin, A.** Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. 6-26-1998. *J.Biol.Chem.* **273**(26):16415-16420.
167. **Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S.** Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. 6-27-1996. *Nature.* **381**(6585):800-803.
168. **Shiryaev, A. and Moens, U.** Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: Ménage à trois or ménage à quatre? 2010. *Cell.Signal.* **22**:1185-1192.
169. **Gaesthel, M.** Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: Kinases' Tango Nuevo. 2008. *Front.Biosci.* **13**(6050):6059-
170. **Gaesthel, M.** MAPKAP kinases — MKs — two's company, three's a crowd. 2006. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* **7**:120-130.
171. **Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F. C., Blackwell, T. K., and Anderson, P.** MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. 2004. *EMBO J.* **23**:1313-1324.

172. **Tchen, C. R., Brook, B., Saklatvala, J., and Clark, A. R.** The Stability of Tristetraprolin mRNA Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase p38 and by Tristetraprolin Itself. 2004. *J.Biol.Chem.* **279**(31):32393-32400.
173. **Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., Radzioch, D., Clark, A. R., Blackshear, P. J., Kotlyarov, A., and Gaesthel, M.** Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 Regulates Tumor Necrosis Factor mRNA Stability and Translation Mainly by Altering Tristetraprolin Expression, Stability, and Binding to Adenine/Uridine-Rich Element. 2006. *Mol.Cell.Biol.* **26**(6):2399-2407.
174. **Sun, L., Stoecklin, G., Van Way, S., Hinkovska-Galcheva, V., Guo, R. F., Anderson, P., and Shanley, T. P.** Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2A and stabilizes tumor necrosis factor- α mRNA. 2007. *J.Biol.Chem.* **282**:3766-3777.
175. **Maitra, S., Chou, C. F., Lubber, C. A., Lee, K. Y., Mann, M., and Chen, C. Y.** The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. 2008. *RNA.* **5**:950-959.
176. **Audic, Y. and Hartley, R. S.** Post-transcriptional regulation in cancer. 2004. *BioCell.* **96**:479-498.
177. **Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S.** Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. 2001. *EMBO Rep.* **2**:893-898.
178. **Stoneley, M., Paulin, E. E., Le Quesne, J. P., Chapell, S. A., and Willis, A. E.** c-myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. 1998. *Oncogene.* **16**:423-428.
179. **Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Voudsen, K. H., and Weissman, A. M.** Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. 2000. *J.Biol.Chem.* **275**:8945-8951.
180. **Bortner, D. M. and Rosenberg, M. P.** Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. 1997. *Mol.Cell.Biol.* **17**:453-459.
181. **Okumura, N., Saji, S., Eguchi, H., Nakashima, S., and Hayashi, S.** Distinct promoter usage of mdm2 gene in human breast cancer. 2002. *Oncol.Rep.* **9**:557-563.
182. **Muckenthaler, M., Gray, N. K., and Hentze, M. W.** IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of small ribosomal subunit by cap-binding complex eIF4F. 1998. *Mol.Cell.* **2**:383-388.
183. **Vanita, V., Hejtmancik, J. F., Hennies, H. C., Guleria, K., Nurnberg, P., Singh, D., Sperling, K., and Singh, J. R.** Sutural cataract associated with a mutation in the ferritin light chain gene (FTL) in a family of Indian origin. 2006. *Mol.Vis.* **12**:93-99.
184. **Wahle, E.** Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. 1995. *J.Biol.Chem.* **270**(6):2800-2808.

185. **Badis, G., Saveneau, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A.** Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. 2004. *Mol.Cell.* **15**:5-15.
186. **Garneau, N. L., Wilusz, J., and Wilusz, C. J.** The highways and byways of mRNA decay. 2007. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* **8**:113-126.
187. **Jiao, X., Xiang, S., Oh, CS, Martin, C. E., Tong, L., and Kiledjian, M.** Identification of a quality-control mechanism for mRNA 5'-end capping. 2010. *Nature.* **467**:608-612.
188. **Roy, G., De Crescenzo, G., Kaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N.** Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. 2002. *Mol.Cell.Biol.* **22**(11):3769-3782.
189. **Kaygun, H. and Marzluff, G.** Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. 2005. *Nature Struct.Mol.Biol.* **12**:794-800.
190. **Doma, M. K. and Parker, R.** Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. 2006. *Nature.* **440**:561-564.
191. **Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A.** Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. 1986. *PNAS.* **83**(6):1670-1674.
192. **Shaw, G and Kamen, R.** A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. 1986. *Cell.* **46**(5):659-667.
193. **Chen, C. A. and Shyu, A. B.** AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. 1995. *Trends Biochem.Sci.* **20**(11):465-470.
194. **Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, B.** AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? 2005. *Nucleic Acids Res.* **33**(22):7138-7150.
195. **Gingerich, T. J., Feige, JJ., and LaMarre, J.** AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. 2004. *Anim.Health Res.Rev.* **5**(1):49-63.
196. **Diaz-Moreno, I., Hollingworth, D., Frenkiel, T. A., Kelly, G., Martin, S., Garcia-Mayoral, M., Gherzi, R., Briata, P., and Ramos, A.** Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding. 2009. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **16**(3):238-246.
197. **Sandler, H. and Stoecklin, G.** Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraproline. 2008. *Biochem.Soc.Trans.* **36**:491-496.
198. **Wu, X. and Brewer, G.** The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. 2012. *Gene.* **500**(1):10-21.
199. **Rodriguez, A. J. et. al.** Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. 2008. *Curr.Opin.Cell Biol.* **20**:144-149.

200. **Parker, R. and Sheth, U.** P bodies and the control of mRNA translation and degradation. 2007. *Mol.Cell.* **25**:635-646.
201. **Anderson, P. and Kedersha, N.** Stress granules: the Tao of RNA triage. 2008. *Trends Biochem.Sci.* **3**:141-150.
202. **Kedersha, N., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P.** RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. 1999. *J.Cell Biol.* **147**:1431-1441.
203. **Johnstone, O. and Lasko, P.** Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. 2001. *Annu.Rev.Genet.* **35**:365-406.
204. **Wilczynska, A. et al.** The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. 2005. *J.Cell Sci.* **118**:981-992.
205. **Bashrikov, V. I. et al.** A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. 1997. *J.Cell Biol.* **136**(761):773-
206. **Van Dijk, E. et al.** Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. 2002. *EMBO J.* **21**:6915-6924.
207. **Ingelfinger, D. et. al.** The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. 2002. *RNA.* **8**:1489-1501.
208. **Sen, G. L. and Blau, H. M.** Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. 2005. *Nature Cell Biol.* **7**:633-636.
209. **Anderson, P. and Kedersha, N.** RNA granules. 2006. *J.Cell Biol.* **172**(6):803-808.
210. **Esteller, M.** Non-coding RNAs in human disease. 2011. *Nat.Rev.Genet.* **12**:861-874.
211. **Robinow, S. et. al.** The elav Gene Product of *Drosophila*, Required in Neurons, Has Three RNP Consensus Motifs. 1988. *Science.* **242**(4885):1570-1572.
212. **Liu, J., Dalmau, J., Szabo, A., Rosenfeld, M., Huber, J., and Furneaux, H.** Paraneoplastic Encephalomyelitis Antigens Bind to the AU-rich Elements of mRNA. 1995. *Neurology.* **45**:544-550.
213. **Ma, WJ., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., and Furneaux, H.** Cloning and Characterization of HuR, a Ubiquitously Expressed Elav-like Protein. 1996. *J.Biol.Chem.* **271**(14):8144-8151.
214. **Fan, X. C. and Steitz, J. A.** Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. 1998. *EMBO J.* **17**(12):3448-3460.
215. **Wengong, W., Caldwell, M. C., Lin, S., Furneaux, H., and Gorospe, M.** HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. 2000. *EMBO J.* **19**(10):2340-2350.

216. **Sengupta, S., Jang, BC., Wu, MT., Paik, JH., Furneaux, H., and Hla, T.** The RNA-binding Protein HuR Regulates the Expression of Cyclooxygenase-2. 2003. *J.Biol.Chem.* **278**(27):25227-25233.
217. **Kurosu, T. et. al.** HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. 2011. *Br.J.Cancer.* **104**:819-829.
218. **Kim, H. H., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M.** Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. 2010. *J.Nucleic Acids.* **2010**
219. **Doller, A., Pfeilsschifter, J., and Eberhardt, W.** Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. 2008. *Cell.Signal.* **20**:2165-2173.
220. **Kim, H. H., Yang, X., Kuwano, Y., and Gorospe, M.** Modification at HuR(S242) Alters HuR Localization and Proliferative Influence. 2008. *Cell Cycle.* **7**(21):3371-3377.
221. **Gu, TL. et. al.** A novel fusion of RBM6 to CSF1R in acute megakaryoblastic leukemia. 2007. *BLOOD.* **110**(323):333-
222. **Luo, W. et. al.** Global Impact of Oncogenic Src on a Phosphotyrosine Proteome. 2008. *J.Proteome Res.* **7**(8):3447-3460.
223. **Brewer, G. and Ross, J.** Regulation of c-myc mRNA stability in vitro by a labile destabilizer with an essential nucleic acid component. 1989. *Mol.Cell.Biol.* **9**(5):1996-2006.
224. **Wagner, B. J., DeMaria, C. T., Sun, Y., Wilson, G. M, and Brewer, G.** Structure and Genomic Organization of the Human AUF1 Gene: Alternative Pre-mRNA Splicing Generates Four Protein Isoforms. 1998. *Genomics.* **48**:195-202.
225. **Sarkar, B., Lu, J. Y., and Schneider, R. J.** Nuclear import and export functions in the different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family. 2003. *J.Biol.Chem.* **278**(23):20700-20707.
226. **Xu, N., Chen, C. A., and Shyu, A. B.** Modulation of the Fate of Cytoplasmic mRNA by AU-Rich Elements: Key Sequence Features Controlling mRNA Deadenylation and Decay. 1997. *Mol.Cell.Biol.* **17**(8):4611-4621.
227. **Wilson, G. M, Lu, J., Sutphen, K., Suarez, Y., Sinha, Y., Brewer, B., Villanueva-Feliciano, E. C., Ysla, R. M., and Brewer, G.** Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. 2003. *J.Biol.Chem.* **278**(35):33039-33048.
228. **Wilson, G. M, Lu, J., Sutphen, K., Sun, Y., Huynh, Y., and Brewer, G.** Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1. 2003. *J.Biol.Chem.* **278**(35):33029-33038.
229. **Fawal, M., Armstrong, F., Ollier, S., Dupont, H., Touriol, C., Monsarrat, B., Delsol, G., Payrastra, B., and Morello, D.** A "liaison dangereuse" between AUF1/hnRNPd and the oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK. 2006. *BLOOD.* **108**(8):2780-2788.

230. **Carballo, E., Lai, W. S., and Blackshear, P. J.** Feedback Inhibition of Macrophage Tumor Necrosis Factor- α Production by Tristetraprolin. 1998. *Science*. **281**:1001-1005.
231. **Blackshear P.J.** Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. 2002. *Biochem.Soc.Trans.* **30**:945-952.
232. **Cao, H.** Expression, Purification, and Biochemical Characterization of the Antiinflammatory Tristetraprolin: A Zinc-Dependent mRNA Binding Protein Affected by Posttranslational Modifications. 2004. *Biochemistry*. **43**:13724-13738.
233. **Mahtani, K. R., Brook, M., Dean, J. L. E., Sully, G., Saklatvala, J., and Clark, A. R.** Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Controls the Expression and Posttranslational Modification of Tristetraprolin, a Regulator of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Stability. 2001. *Mol.Cell.Biol.* **21**(19):6461-6469.
234. **Lee, W. H. et. al.** Casein kinase 2 regulates the mRNA-destabilizing activity of tristetraprolin. 2011. *J.Biol.Chem.* **286**(24):21577-21587.
235. **Stoecklin, G., Colombi, M., Reineri, I., Leuenberger, S. A., Mallaun, M., Schmidlin, M., Gross, B., Lu, M., Kitamura, T., and Moroni, C.** Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. 2002. *EMBO J.* **21**(17):4709-4718.
236. **Lai, W. S., Kennington, E. A., and Blackshear, P. J.** Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. 2003. *Mol.Cell.Biol.* **23**(11):3798-3812.
237. **Fairley, J. A., Scott, P. H., and White, R. J.** TFIIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. 2003. *EMBO J.* **22**:5841-5850.
238. **Franks, T. M. and Lykke-Andersen, J.** TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. 2007. *Genes Dev.* **21**(6):719-735.
239. **Schmidlin, M., Lu, M., Leuenberger, S. A., Stoecklin, G., Mallaun, M., Gross, B., Gherzi, R., Hess, D., Hemmings, B. A., and Moroni, C.** The ARE-dependent mRNA-destabilizing activity of BRF1 is regulated by protein kinase B. 2004. *EMBO J.* **23**:4760-4769.
240. **Graham, J. R., Hendershott, M. C., Terragni, J., and Cooper, G. M.** mRNA degradation plays a significant role in the program of gene expression regulated by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. 2010. *Mol.Cell.Biol.* **30**(22):5295-5305.
241. **Briata, P., Chen, CY., Giovarelli, M., Pasero, M., Trabuchi, M., Ramos, A., and Gherzi, R.** KSRP, many functions for a single protein. 2011. *Front.Biosci.* **16**:1787-1796.
242. **Gherzi, R., Trabuchi, M., Ponassi, M., Ruggiero, T., Corte, G., Moroni, C., Chen, CY., Khabar, K. S. A., Andersen, J. S., and Briata, P.** The RNA-Binding Protein KSRP Promotes Decay of b-Catenin mRNA and Is Inactivated by PI3K-AKT Signaling. 2006. *PLoS Biology.* **5**(1):82-95.

243. **Diaz-Moreno, I., Hollingworth, D., Frenkiel, T. A., Kelly, G., Martin, S., Garcia-Mayoral, M., Gherzi, R., Briata, P., and Ramos, A.** PHOSPHORYLATION-MEDIATED UNFOLDING OF A KH DOMAIN REGULATES KSRP LOCALISATION VIA 14-3-3 BINDING. 2009. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **16**(3):238-246.
244. **Trabuchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, W., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.** The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. 2009. *Nature.* **459**:1010-1014.
245. **Schoenberg, D. R. and Maquat, L. E.** Regulation of cytoplasmic mRNA decay. 2012. *Nat.Rev.Genet.* **13**(4):246-259.
246. **Tanos, T.** *Eventos regulatorios mediados por MAPKs sobre el gen de respuesta temprana c-Fos. Tesis Doctoral.* 2007. 1-193.
247. **Cuadrado, A. and Nebreda, A. R.** Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. 2010. *Biochem.J.* **429**:403-417.
248. **Chen, C. A., Chen, T. M., and Shyu, A. B.** Interplay of Two Functionally and Structurally Distinct Domains of the *c-fos* AU-Rich Element Specifies Its mRNA-Destabilizing Function. 1994. *Mol.Cell.Biol.* **14**(1):416-426.
249. **Clontech.** Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression Systems User Manual. 2009. http://www.clontech.com/US/Products/Inducible_Systems/Tetracycline-Inducible_Expression/Cell_Lines/Tet-Off.
250. **Bensuade, O.** Inhibiting eukaryotic transcription. 2011. *Transcription.* **2**(3):103-108.
251. **Choong, ML., Yang, H., Lee, M. A., and Lane, D. P.** Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D. 2009. *Cell Cycle.* **8**(17):2810-2818.
252. **Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G. A., and Hillen, W.** Structural Requirements of Tetracycline-Tet Repressor Interaction: Determination of Equilibrium Binding Constants for Tetracycline Analogs with the Tet Repressor. 1991. *Antimicrobs.Agents Chemoter.* **35**(8):1591-1595.
253. **Chen, C. A., Yamashita, Y., Chang, TC., Yamashita, A., Zhu, W., Zhong, Z., and Shyu, A. B.** Versatile applications of transcriptional pulsing to study mRNA turnover in mammalian cells. 2007. *RNA.* **13**:1775-1786.
254. **Zheng, C., Lin, Z., Zhao, Z. J., Yang, Y., Niu, H., and Shen, X.** MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27. 2006. *J.Biol.Chem.* **281**(48):37215-37226.
255. **Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhem, A., Chen, C. A., Shyu, A. B., Muller, M., Gaesthel, M., Resch, K., and Holtmann, H.** The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. 1999. *EMBO J.* **18**(18):4969-4980.
256. **Levine, T. D., Gao, F., King, P. H., Andrews, L. G., and Keene, J. D.** Hel-Ni: an Autoimmune RNA-Binding Protein with Specificity for 3' Uridylate-Rich

- Untranslated Regions of Growth Factor mRNAs. 1993. *Mol.Cell.Biol.* **13**(6):3494-3504.
257. **Srebrow, A., Blaustein, M., and Kornblihtt, A. R.** Regulation of fibronectin alternative splicing by a basement membrane-like extracellular matrix. 2002. *FEBS Letters.* **514**(2):285-289.
258. **You, Y., Chen, C. A., and Shyu, A. B.** U-Rich Sequence-Binding Proteins (URBPs) Interacting with a 20-Nucleotide U-Rich Sequence in the 3' Untranslated Region of *c-fos* mRNA May Be Involved in the First Step of *c-fos* mRNA Degradation. 1992. *Mol.Cell.Biol.* **12**(7):2931-2940.
259. **Patel, V., Hood, B. L., Molinolo, A. A., Lee, N. H., Conrads, T. P., Braisted, J. C., Krizman, D. B., Veenstra, T. D., and Gutkind, J. S.** Proteomic Analysis of Laser-Captured Paraffin-Embedded Tissues: A Molecular Portrait of Head and Neck Cancer Progression. 2008. *Clin.Cancer Res.* **14**(4):1002-1014.
260. **Echeverria, P. C, Bernthaler, A., Dupuis, P., Mayer, B., and Picard, D.** An Interaction Network Predicted from Public Data as a Discovery Tool: Application to the Hsp90 Molecular Chaperone Machine. 2011. *PLoS One.* **6**(10)
261. **Brennan, C. M., Gallouzi, I., and Steitz, J. A.** Protein Ligands to HuR Modulate Its Interaction with Target mRNAs In Vivo. 2000. *J.Cell Biol.* **151**(1):1-13.
262. **Ferreiro, I., Joquin, M., Islam, A., Gomez-Lopez, G., Barragan, M., Lombardia, L., Dominguez, O., Pisano, D. G., Lopez-Bigas, N., Nebreda, A. R., and Posas, F.** Whole genome analysis of p38 SAPK-mediated gene expression upon stress. 2010. *BMC Genomics.* **11**(144):1-17.
263. **Gallouzi, I., Brennan, C. M., and Steitz, J. A.** Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. 2001. *RNA.* **7**:1348-1361.
264. **Shaulian, E. and Karin, M.** AP-1 in cell proliferation and survival. 4-30-2001. *Oncogene.* **20**(19):2390-2400.
265. **Zhang, Q. and Claret, F. X.** Phosphatases: The New Brakes for Cancer Development? 2012. *Enzyme Res.* **2012**:1-11.
266. **Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J.** The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. 2004. *Cell Signal.* **16**(10):1113-1121.
267. **Dean, J. L. E., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J.** The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. 2004. *Cell.Signal.* **16**:1113-1121.
268. **Clark, A. R., Dean, J. L. E., Tudor, C., and Saklatvala, J.** Post-transcriptional gene regulation by MAP kinases via AU-rich elements. 2009. *Front.Biosci.* **14**:847-871.
269. **Min, H., Turck, C., Nikolic, J. M., and Black, D. L.** A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. 1997. *Genes Dev.* **11**:1023-1036.

270. **Acquaviva, C., Bossis, G., Ferrara, P., Brockly, F., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M.** Multiple degradation pathways for Fos family proteins. 2002. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **973**:426-434.
271. **Winzen, R., Gowrishankar, G., Bollig, F., Redich, N., Resch, K., and Holtmann, H.** Distinct Domains of AU-Rich Elements Exert Different Functions in mRNA Destabilization and Stabilization by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase or HuR. 2004. *Mol.Cell.Biol.* **24**(11):4835-4847.
272. **Sapsic, M. et. al.** Genome-Wide Assessment of AU-Rich Elements by the AREScore Algorithm. 2012. *PLoS Genetics.* **8**(1)
273. **Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F. P., Dastidar, E. G., Sanchez-Rotunno, M., Arraino, C. M., and van Hoof, A.** The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. 2009. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **16**(1):56-62.
274. **Moraes, K. C., Quaresma, A. J., Maehns, K., and Kobarg, J.** Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D). 2003. *Biol.chem.* **384**(1):25-37.
275. **Brennan, C. M. and Steitz, J. A.** HuR and mRNA stability. 2001. *Cell.Mol.Life Sci.* **58**(2):266-277.
276. **Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N., and Jackson, R. J.** unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. 1999. *Genes Dev.* **13**(4):437-448.
277. **Tourrière, H. et. al.** RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. 2001. *Mol.Cell.Biol.* **21**(22):7747-7760.
278. **Rousseau, S. et. al.** Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. 2002. *EMBO J.* **21**(23):6505-6514.
279. **Shetty, S.** Regulation of urokinase receptor mRNA stability by hnRNP C in lung epithelial cells. 2005. *Mol.Cell.Biochem.* **272**(1-2):107-118.
280. **Kim, J. H. et. al.** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. 2003. *Mol.Cell.Biol.* **23**(2):708-720.
281. **Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R. J., Castellone, M. D., and Gutkind, J. S.** Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. 10-21-2005. *J.Biol.Chem.* **280**(42):35081-35084.
282. **Lopez de Silanes, I., Lal, A., and Gorospe, M.** HuR, Post-Transcriptional Paths to Malignancy. 2005. *RNA biol.* **2**(1):11-13.
283. **Lopez de Silanes, I., Fan, J., Yang, X., Potapova, O., Zonderman, A. B., Pizer, E. S., and Gorospe, M.** Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. 2003. *Oncogene.* **22**:7146-7154.

284. **Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T., Greeve, J., and Kleinert, H.** Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. 2005. *Nucleic Acids Res.* **33**(15):4813-4827.
285. **Saito, S., Miyaji-Yamaguchi, M., Shimoyama, T., and Nagata, K.** Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. 1999. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **259**:471-475.
286. **Monje, P., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S.** Phosphorylation of the Carboxyl-Terminal Transactivation Domain of c-Fos by Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates the Transcriptional Activation of AP-1 and Cellular Transformation Induced by Platelet-Derived Growth Factor. 2003. *Mol.Cell.Biol.* **23**(19):7030-7043.
287. **Crespo, P., Xu, N., Daniotti, J. L., Troppmair, J., Rapp, U. R., and Gutkind, J. S.** Signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C-independent pathway. 8-19-1994. *J.Biol.Chem.* **269**(33):21103-21109.
288. **Marinissen, M. J., Chiariello, M., Tanos, T., Bernard, O., Narumiya, S., and Gutkind, J. S.** The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. 4-9-2004. *Mol.Cell.* **14**(1):29-41.
289. **Coso, O. A., Chiariello, M., Kalinec, G., Kyriakis, J. M., Woodgett, J., and Gutkind, J. S.** Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. 3-10-1995. *J.Biol.Chem.* **270**(10):5620-5624.
290. **Rodgers, J. T., Patel, P., Hennes, J. L., Bolognia, S. L., and Mascotti, D. P.** Use of Biotin-Labeled Nucleic Acids for Protein Purification and Agarose-Based Chemiluminescent Electromobility Shift Assays. 2000. *Anal.Biochem.* **277**:254-259.
291. **Echeverria, P. C., Forafonov, F., Pandey, D. P., Mulebach, G., and Picard, D.** Detection of changes in gene regulatory patterns, elicited by perturbations of the Hsp90 molecular chaperone complex, by visualizing multiple experiments with an animation. 2011. *BioData Mining.* **4**(15)

INDICE

RESUMEN en CASTELLANO	2
RESUMEN en INGLÉS	4
Agradecimientos	6
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	9
1. El Factor de Transcripción c-Fos	11
1.1. Regulación de la expresión de c-fos a nivel de la activación transcripcional	13
1.3. Regulación de la vida media de c-Fos	20
1.4. Modificaciones post traduccionales de c-Fos	20
2. MAPKs	21
2.1. ERK1/2	25
2.2. JNK	26
2.3. p38	27
2.4. MK2 o MAPKAPK2	30
3. Regulación Post-transcripcional del ARN	30
3.1. Región 5´ no traducible o 5´UTR	32
IRES	32
Marcos abiertos de lectura (ORFs) localizados río arriba del ATG principal (uORFs)	33
Estructura secundaria y proteínas de unión al ARN	33
Decapping y degradación 5´- 3´	33
3.2. Región codificante u ORF	34
CRD	34
NMD	34
NSD	35
NGD	35
3.3. Región 3´ no traducible o 3´UTR	35
Regiones ricas en AU o AREs	35
Degradación 3´-5´	37
3.4. Mecanismos generales	37
Localización del ARNm	37
ARNncs o ARNs no codificantes	38
3.5. Proteínas de unión a los AREs y vías de transducción de señales involucradas	38
en su regulación	38
AUF1	41
TTP	42
BRF1	43
KSRP	44
OBJETIVOS	46
RESULTADOS	49
1. Observaciones preliminares	50
1.1. Determinación de tiempos de activación óptimos de MAPKs	53
2. Obtención y puesta a punto de un sistema para el estudio de la regulación pos-	54
transcripcional del mensajero de c-fos	54

2.1. Clonado del 3'UTR de c-fos	54
3. Estudio de las vías de señalización involucradas en la regulación post-transcripcional del ARN de c-fos. Influencia de la vía de p38 SAPK en el decaimiento del ARNm de c-fos.	63
4.1 Búsqueda de factores asociados a la región ARE de c-fos.....	68
4.2. Estudio de la influencia de los factores de unión a la región ARE en el proceso de decaimiento del ARNm de c-fos	73
4.2.1. Influencia de la AUBP HuR.....	73
4.2.1.1. Análisis de los caminos de transducción de señales que afectan la fosforilación de HuR	76
4.2.1.2. Estudio de la actividad de HuR como proteína de unión al ARE de c-fos... ..	81
4.2.1.3 Correlación entre la presencia de HuR y de c-Fos en un microarreglo de tumores de pulmón	90
4.2.2. Influencia de la AUBP KSRP	92
5. Búsqueda informática de nuevos factores e interacciones esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de c-fos.....	95
6. Estudio de la influencia sobre la regulación post-transcripcional de c-fos de factores encontrados en la búsqueda informática.....	102
DISCUSIÓN.....	105
1. Observaciones preliminares. Resultados que dieron lugar a la hipótesis de trabajo	107
1.2 Elementos regulatorios de c-fos	108
2. Obtención y puesta a punto de un sistema para el estudio de la regulación post-transcripcional del mensajero de c-fos	109
3. Estudio de las vías de señalización involucradas en la regulación post-transcripcional del ARN de c-fos. Influencia de la vía de p38 SAPK en el decaimiento del ARNm de c-fos.	112
4. Estudio de los posibles factores esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de c-fos	113
4.1 Búsqueda de factores asociados a la región ARE de c-fos.....	113
4.2. Estudio de la influencia de los factores de unión a la región ARE en el proceso de decaimiento del ARNm de c-fos	115
4.2.1. Influencia de la AUBP HuR.....	116
4.2.1.1. Análisis de los caminos de transducción de señales que afectan la fosforilación de HuR	116
4.2.1.2. Estudio de la actividad de HuR como proteína de unión al ARE de c-fos.	119
4.2.1.3 Correlación entre la presencia de HuR y de c-Fos en un microarreglo de tumores de pulmón	119
4.2.2. Influencia de la AUBP KSRP	120
5. Búsqueda informática de nuevos factores e interacciones esenciales para la regulación post-transcripcional del ARN de c-fos.....	120
6. Estudio de la influencia sobre la regulación post-transcripcional de c-fos de factores encontrados en la búsqueda informática.....	122
MATERIALES Y MÉTODOS	128
1. Cultivo de líneas Celulares.....	129
2. Transfecciones	129

Transfecciones con Polietiliminina o PEI	129
Transfección con liposomas catiónicos y neutros	130
3. Plásmidos	130
Luciferasa	130
Vectores para sintetizar ARN	131
AUBPs y proteínas asociada	131
Quinasas.....	133
4. Estímulos.....	133
5. Anticuerpos.....	133
6. Inhibidores	134
7. Antibióticos	134
8. Secuenciación	134
9. Preparación de Bacterias Competentes	135
10. Transformación Bacteriana	135
11. Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones	136
12. Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxipreparaciones	136
13. Cuantificación del ADN plasmídico.....	137
14. Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción.....	137
15. Purificación de fragmentos de ADN.....	137
16. Ligaciones	138
17. PCR, Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	138
18. Preparación de ADNc.....	139
19. qPCR o PCR en Tiempo Real	139
20. Extracción del ARN	141
21. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética de ARN	142
Preparación de los extractos proteicos celulares	142
Síntesis de las sondas de ARN radiactivas	142
Reacción de Binding.....	142
Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes	143
Súper shift.....	143
Incubación con proteínas recombinantes	143
22. Cuantificación de Proteínas.....	144
23. Ensayos de detección de la actividad luciferasa	144
24. Medición de la actividad de β -galactosidasa	144
25. Western Blot	145
Preparación de los extractos celulares.....	145
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	145
Transferencia a membranas de PVDF	146
26. Ensayos de detección de proteínas fluorescentes	146
27. Purificación de Proteínas expresadas en bacterias fusionadas a GST.....	147
28. Ensayos de Fosforilación in vitro	148
29. Ensayo de fosforilación en fase sólida o Solid phase kinase assay.....	148
30. Ensayo de fosforilación en gel o In-gel kinase assay	149
31. Pull down ARN	149
32. Tinción con nitrato de plata y coomassie coloidal	150
Nitrato de plata	150
Coomassie Coloidal.....	150

33. Secuenciación de proteínas mediante espectrometría de masa LC-MS.....	151
Digestión “in-gel”.....	151
LC-MS.....	151
Tratamiento de los datos	151
34. Análisis bioinformático y Data mining	151
35. Ensayos de decaimiento del ARNm	152
36. Inmunohistoquímica	153
REFERENCIAS	156

Índice de Figuras:

INTRODUCCIÓN

Figura I1. Esquema de la proteína c-Fos	13
Figura I2. Esquema del promotor de <i>c-fos</i>	15
Figura I3. Inducción de la expresión de <i>c-fos</i>	16
Figura I3. Esquema del ARN mensajero de <i>c-fos</i> murino	19
Figura I4. Sitios consenso de fosforilación por MAPKKs (quinasas de fosforilación dual) sobre MAPKs	22
Figura I5. Esquema de las cascadas de señalización de MAPKs	24
Figura I6. Procesos y eventos regulatorios post-transcripcionales que afectan a los ARN mensajeros	32
Tabla I7. Resumen del conocimiento actual sobre la fosforilación de HuR	40
Figura I8. Esquema de las vías de señalización que influyen directamente sobre el decaimiento del ARN	45

RESULTADOS

Figura R1. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de <i>c-fos</i>	51
Figura R2. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de <i>c-fos</i>	51
Figura R3. Influencia de las MAPKs sobre la actividad promotora de <i>c-fos</i>	52
Figura R4. Tiempos óptimos de activación de las MAPKs	53
Figura R5. Esquema del vector de clonado de la secuencia 3'UTR de <i>c-fos</i> y de todas las regiones evaluadas	55
Figura R6. Esquema del sistema TetOff	56
Figura R7. Esquema del protocolo utilizado para obtener la delección de la región ARE	57
Figura R8. Puesta a punto de la cantidad de tetraciclina a utilizar en experimentos TetOff	58
Figura R9. Comparación de los niveles de expresión de los reporteros pLuc	59
Figura R10. Puesta a punto de la cantidad de ADN a transfectar en los ensayos	61

TetOff	
Figura R11. Patrón de decaimiento de los reporteros pLuc	62
Figura R12. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de <i>c-fos</i>	64
Figura R13. Influencia de p38 SAPK sobre el nivel del ARNm de <i>c-fos</i>	65
Figura R14. Influencia de la vía de p38 SAPK sobre el decaimiento del ARNm de <i>c-fos</i>	66
Figura R15. Influencia de p38 SAPK sobre el decaimiento del ARNm de <i>c-fos</i>	67
Figura R16. Diagrama del diseño experimental de la purificación de complejos proteína - sonda de ARN biotinilada	69
Tabla R17. Lista de proteínas asociadas al ARE de <i>c-fos</i>	70
Figura R18. AUBPs asociadas al ARE de <i>c-fos</i>	71
Figura R19. Proteínas asociadas al ARE de <i>c-fos</i>	72
Figura R20. Estudio de la localización subcelular de CFP-HuR	73
Figura R21. Efectos de la depleción de HuR	74
Figura R22. Influencia de HuR sobre el decaimiento del ARNm de <i>c-fos</i>	75
Figura R23. Influencia de p38 SAPK sobre el estado de fosforilación de HuR	77
Figura R24. Influencia de la vía de p38 SAPK sobre la fosforilación de HuR	78
Figura R25. Influencia de los sitios de fosforilación de HuR sobre el decaimiento del ARNm de luciferasa	79
Figura R26. Ensayo de fosforilación en gel	81
Figura R27. Ensayos de fosforilación in vitro utilizando HuR como sustrato	82
Figura R28. Complejos ARN ARE <i>c-fos</i> y proteínas de unión	83
Figura R29. Identificación de los componentes de los complejos ARN ARE <i>c-fos</i>	84
Figura R30. Distintos complejos ARE-proteínas según las características de los lisados utilizados	86
Figura R31. Variación de la asociación de los complejos C1 y C2 a la región ARE	87
Figura R32. Asociación de HuR al ARE de <i>c-fos</i> luego de inhibir la vía de p38 SAPK	88
Figura R33. Complejo ARN ARE de <i>c-fos</i> y GST-HuR	89
Figura R34. Complejos ARN ARE de <i>c-fos</i> y proteínas recombinantes	90
Figura R35. Correlación entre la expresión de c-Fos y HuR	91
Tabla R36. Correlación entre la expresión de c-Fos y la localización subcelular de HuR	92
Figura R37. Influencia de KSRP sobre la estabilidad de <i>c-fos</i>	93
Figura R38. Competencia entre HuR y KSRP por el ARE de <i>c-fos</i>	94
Figura R39. Diagrama de la construcción de interactomas para el análisis de PPIs	97
Figura R40. Esquema del interactoma de QP final	98
Figura R41. Características de los interactores de las AUBPs.	99

Figura R42. Genes regulados por p38 α SAPK	101
Figura R43. Interactoma final	102
Figura R44. Influencia de las proteínas pp32 y APRIL sobre el decaimiento del ARNm de <i>c-fos</i>	103
Figura R45. Influencia de la actividad fosfatasa de PP2A y PP1 sobre la estabilidad del ARNm de <i>c-fos</i>	104
DISCUSIÓN	
Figura D1. Diferencias estructurales entre la forma transformante de Fos, v-Fos y la forma celular, c-Fos	109
Figura D2. Modelo de los posibles mecanismos de regulación de la expresión de <i>c-fos</i> . Primera parte	125
Figura D3. Modelo de los posibles mecanismos de regulación de la expresión de <i>c-fos</i> . Segunda parte	126