

## LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE NF- $\kappa$ B ES DIFERENCIALMENTE REGULADA POR DOMINIOS ESPECIFICOS DEL COACTIVADOR TIF2\*

IGNACIO M. NOJEK<sup>1</sup>, SANTIAGO E. WERBAJH<sup>2</sup>, GEORGINA P. COLO<sup>1</sup>, FERNANDA M. RUBIO<sup>1</sup>, LORENA D. FRANCO<sup>3</sup>, VICTOR E. NAHMOD<sup>1</sup>, MONICA A. COSTAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, <sup>2</sup>Fundación Instituto Leloir,

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** Demostramos previamente que la sobreexpresión de coactivadores de receptores nucleares aumenta la actividad NF- $\kappa$ B en forma dosis dependiente. Se estudió el mecanismo por el cual el coactivador TIF2 regula la actividad de NF- $\kappa$ B. Determinamos que: 1) el inhibidor específico de p38 disminuye al 50% la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, aún en células que sobreexpresan distintas delecciones de TIF2; 2) existe interacción física directa de TIF2 con p38; y RelA determinada a través de ensayos de unión con proteína traducida *in vitro*; 3) TIF2 es sustrato de p38; 4) mediante ensayos de unión con extractos proteicos de células HEK 293 estimuladas o no con TNF- $\alpha$  20 ng/ml existe interacción física de TIF2 con IKK, e I $\kappa$ B $\alpha$  sólo en condiciones basales. Este complejo que contiene a NF- $\kappa$ B regula su actividad y la expresión de genes blanco de este factor de transcripción en un contexto fisiológico determinado dependiendo del contenido del complejo coactivador.

**Palabras clave:** coactivadores de receptores nucleares, NF- $\kappa$ B, MAPK, TIF2

**Abstract** *Different enzymatic activities recruitment by specific domains of TIF2 are involved in NF- $\kappa$ B transactivation.* We have previously shown that nuclear receptor coactivator overexpression significantly enhanced NF- $\kappa$ B activity in a dose response manner. We studied the mechanism by which TIF2 regulates NF- $\kappa$ B activity. We determined that: 1) the p38 specific inhibitor reduces 50% NF- $\kappa$ B transcriptional activity, even in cells that overexpress distinct TIF2 deletions; 2) there is a physical interaction between TIF2 and p38 and RelA determined through *in vitro* translated protein binding assays; 3) TIF2 is a p38 substrate; 4) there is a physical interaction between TIF2 and IKK in TNF- $\alpha$  20 ng/ml stimulated or not HEK 293 cell protein extract, and I $\kappa$ B only in basal conditions, determined by binding pull down assays. This NF- $\kappa$ B complex regulates its activity and targets gene expression in a determined physiologic context depending on the coactivator complex content.

**Key words:** nuclear receptor coactivators, NF- $\kappa$ B, MAPK, TIF2

NF- $\kappa$ B es un heterodímero compuesto por las subunidades p65 y p50 en la mayoría de los casos. Este factor es activado por una gran variedad de estímulos incluyendo citoquinas como TNF- $\alpha$  y oncoproteínas. En células no estimuladas NF- $\kappa$ B se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, asociado con una familia de moléculas inhibitorias llamadas I $\kappa$ Bs<sup>1, 2</sup>. El mecanismo clásico de activación de NF- $\kappa$ B consiste en la fosforilación de I $\kappa$ B en dos residuos de serinas a través de IKK. Una vez fosforilado I $\kappa$ B es blanco de ubiquitinación y subsecuentemente degradado por el proteosoma 26 S,

quien permite que la forma libre de NF- $\kappa$ B transloque al núcleo, donde activa la transcripción de aquellos genes que responden a NF- $\kappa$ B.

Entre las respuestas celulares involucradas con la activación de NF- $\kappa$ B se encuentran: la activación de células del sistema inmune a través de la inducción de

### Abreviaturas

AP1: factor de transcripción activado por ésteres de forbol  
 CBP: proteína de unión a CREB  
 GST: glutatión S transferasa  
 HEK 293: células embrionarias de riñón humano 293  
 HAT: actividad histona acetil transferasa  
 I $\kappa$ B: factor inhibitorio de NF- $\kappa$ B  
 IKK: quinasa que fosforila a I $\kappa$ B  
 NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B  
 RAC3: coactivador asociado a receptor esteroideo/nuclear 3  
 SRC: coactivadores de receptores esteroideos  
 SRC-1: coactivador de receptor esteroideo 1  
 TIF2: factor intermediario de transcripción 2  
 SB: inhibidor específico de p38 MAPK  
 IP: inmunoprecipitado  
 TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

\* Este trabajo mereció el Premio Cherny otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) durante su reunión anual en Mar del Plata, noviembre 2003

**Dirección Postal:** Dra. Mónica A. Costas, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina.  
 Fax: (54-11) 4523-8947. e-mail: mcostas@bg.fcen.uba.ar

citoquinas, la migración celular y reparación de tejidos a través de la inducción de moléculas de adhesión, inflamación a través de la inducción de proteínas de fase aguda, inhibición de la apoptosis y tumorigénesis a través de la regulación de protooncogenes<sup>3</sup>.

Los últimos estudios demuestran que diversas cascadas de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) contribuyen a la transmisión de estímulos extracelulares que finalmente terminan en la fosforilación directa o indirecta de varios factores de transcripción, produciendo alteraciones en la expresión génica. En particular, la MAPK p38 es capaz de modular la expresión génica de RelA/p65, y es requerida para la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B<sup>4</sup>. La estimulación de RelA/p65 no es debida a la fosforilación directa de RelA/p65 por p38. Nuestra hipótesis es que p38 activa a NF- $\kappa$ B a través de la cooperación con coactivadores.

Los coactivadores son moléculas que se encuentran en forma limitante dentro de la célula, capaces de formar complejos que regulan la actividad transcripcional, interactuando con receptores nucleares<sup>5</sup>. El contenido del complejo coactivador en un determinado contexto fisiológico regulará en forma positiva o negativa la actividad transcripcional de cada factor de transcripción con el que interactúa.

Los SRCs de la familia p160 son capaces de formar complejos que contienen a CBP, p300, metiltransferasas, y otras enzimas remodeladoras de la cromatina que son reclutadas en la zona promotora de numerosos genes. Los tres miembros de esta familia (SRC-1, TIF2, RAC3) fueron inicialmente descriptos por su capacidad de interactuar con múltiples receptores nucleares y promover significativamente su actividad transcripcional<sup>6</sup>. Nosotros y otros autores observamos que estas moléculas son capaces también de interactuar y promover significativamente la actividad transcripcional de otros factores de transcripción como AP-1, NF- $\kappa$ B, interferón alfa y CREB<sup>7, 8, 9, 10</sup>. Se sugiere que los distintos SRCs juegan roles diferenciales en procesos biológicos y esta diferencia funcional puede resultar en parte por el reclutamiento preferencial de coactivadores.

En particular TIF2 fue detectado en placenta, testículos, cerebro, corazón, hígado, páncreas y útero<sup>11</sup>. Juega un rol importante en el metabolismo de lípidos y en el balance energético<sup>12</sup>. Está demostrada la participación de estas moléculas en el desarrollo de leucemias, tal es el caso de TIF2 y CBP, en los cuales se observan eventos de translocación y fusión a otras proteínas clave en la patología<sup>13</sup>. Nosotros y otros autores hemos demostrado que este coactivador también lo es de NF- $\kappa$ B, y dado que se conocen los dominios involucrados en la interacción con los receptores nucleares y nada se sabe acerca de qué dominios son los involucrados en la activación de NF- $\kappa$ B, quisimos ver mediante qué dominios existe esta interacción y transactivación con NF- $\kappa$ B. Para

determinar de qué manera TIF2 promueve la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B decidimos estudiar el contexto en el que se encuentra mediante ensayos de asociación con p38 MAPK, IKK, e I $\kappa$ B, y qué dominios de esta molécula estarían involucrados en la unión de cada uno de sus componentes.

Para determinar el efecto que tiene la inactivación de p38 MAPK en la línea celular embrionaria de riñón humano HEK 293, se realizaron ensayos de actividad de NF- $\kappa$ B efectuando co-transfección en forma transitoria con plásmidos de expresión de los distintos dominios de TIF2 junto con el plásmido reportero que expresa luciferasa co-transfección regulada por elementos que responden a NF- $\kappa$ B.

En ensayos de transactivación de NF- $\kappa$ B se observa que la presencia de un inhibidor específico de p38 MAPK produce una disminución del 48% de su actividad cuando las células están estimuladas con TNF- $\alpha$  (Fig. 1). Este efecto inhibitorio de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B no se revierte cuando se sobreexpresa la forma salvaje de TIF2, determinando que la actividad de p38 MAPK sería esencial para la normal transactivación de NF- $\kappa$ B. Observamos también que la sobreexpresión de diferentes dominios de TIF2 no es capaz de promover la transactivación de NF- $\kappa$ B de la misma manera que la forma salvaje de esta proteína, determinando que se requeriría la secuencia completa de aminoácidos de TIF2 con todos sus dominios, para que aumente significativamente la actividad de NF- $\kappa$ B. Observamos en estos

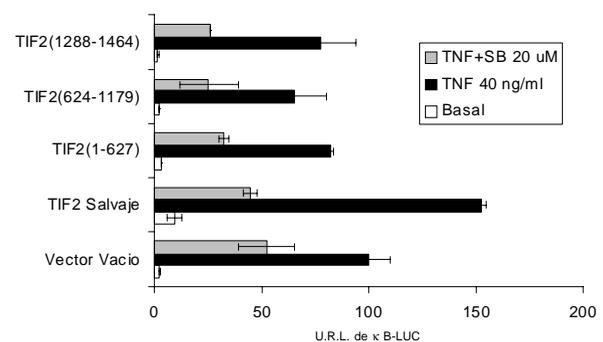


Fig. 1.— La inhibición de p38 MAPK disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B aun en condiciones de sobreexpresión de TIF2. Células HEK 293 fueron cotransfectadas en forma transitoria con el plásmido reportero que expresa luciferasa regulada por un promotor que contiene elementos que responden a NF- $\kappa$ B, junto con las distintas delecciones del coactivador TIF2 o vector vacío. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos en cuanto a su ubicación en la cadena polipeptídica. Luego estas células fueron o no estimuladas con 20 ng/ml de TNF- $\alpha$ , o coestimuladas con TNF- $\alpha$  y 20  $\mu$ M de un inhibidor específico de p38 MAPK (SB 203580 de Calbiochem). Se midieron en un contador beta las unidades relativas de luciferasa (URL de  $\kappa$ B-LUC) de los extractos proteicos. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes.

casos que la actividad de p38 MAPK en la regulación de la actividad NF- $\kappa$ B es igualmente esencial para una transactivación normal (Fig. 1).

Para determinar qué papel juega p38 MAPK en la transactivación de NF- $\kappa$ B regulada por TIF2, decidimos buscar si existen secuencias específicas de fosforilación de p38 en TIF2. Con programas de bioinformática encontramos que podría existir fosforilación en la serina 1322 de TIF2, y por medio de ensayos de quinasa, utilizando anticuerpos específicos para p38, determinamos que TIF2 es capaz de fosforilarse por medio de un complejo que contiene, al menos, a p38 MAPK (datos no mostrados).

Para determinar si existe interacción física entre el coactivador TIF2 y la p38 MAPK realizamos ensayos de unión por medio de proteínas quimeras que tienen fusio-

nado el dominio de la glutatión S transferasa (GST), con proteína traducida *in vitro*. De esta manera observamos que tanto el dominio carboxi terminal de TIF2 como el dominio amino terminal (en menor medida) son capaces de interactuar físicamente, y en forma directa, con p38 MAPK traducida *in vitro* tanto en condiciones basales, como estimuladas con TNF- $\alpha$ . Así determinamos que se estaría formando un complejo que contiene al coactivador junto con la p38 (datos no mostrados).

Para determinar la funcionalidad de este complejo que es capaz de regular la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, decidimos ver si TIF2 también es capaz de interactuar físicamente, y en forma directa, con RelA. Por medio de ensayos de unión de proteína quimera de TIF2 fusionada con el dominio de GST con RelA traducida *in vitro*, determinamos que existe una interacción física directa de RelA con ambos dominios del coactivador (datos no mostrados).

Para ver qué otros componentes forman parte de este complejo que terminan regulando la actividad de NF- $\kappa$ B realizamos ensayos de unión con proteína coactivador con extracto de proteínas de células HEK 293 estimuladas o no con TNF- $\alpha$ . Para determinar qué proteínas forman parte del complejo se realizaron ensayos de *western blot* con anticuerpos específicos para distintas proteínas. En primer lugar, determinamos que IKK es capaz de interactuar con este complejo, mayoritariamente con el que contiene al dominio carboxiterminal de TIF2, y su presencia no está sujeta a la estimulación de las células con TNF- $\alpha$ . En cambio sí observamos una diferencia con I $\kappa$ B en células estimuladas con TNF- $\alpha$ : en aquellas células estimuladas con TNF- $\alpha$  no se ve interacción de I $\kappa$ B con el complejo que contiene a alguno de los dominios del coactivador (datos no mostrados).

De acuerdo con estos resultados, el aumento en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B por el coactivador TIF2, podría estar siendo regulada a través de un complejo general formado por, al menos, p38 MAPK, RelA, IKK e I $\kappa$ B (Fig. 2). La interacción de estos componentes entre sí, y su activación dada por las distintas señales (en este caso TNF- $\alpha$ ) llevaría a la activación general del complejo que contiene a NF- $\kappa$ B, a través de la liberación de I $\kappa$ B del mismo, y por lo tanto a la inducción de aquellos genes que controlan las diversas actividades biológicas. Estos estudios resultarían de gran importancia para el diseño de fármacos con una acción específica en el control de la expresión de genes blanco de NF- $\kappa$ B en aquellas enfermedades donde este factor de transcripción estuviera involucrado.

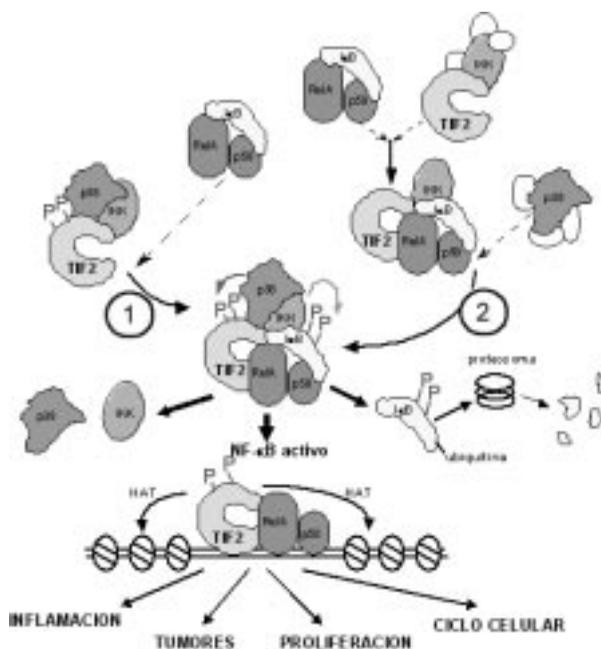


Fig. 2.— TIF2 interactúa físicamente con p38 MAPK, RelA, I $\kappa$ B e IKK. El esquema muestra los dos posibles mecanismos por los cuales podría activarse NF- $\kappa$ B. Dado que hemos observado que IKK se encuentra asociada a TIF2 constitutivamente (independiente de estímulo con TNF- $\alpha$ ) podrían existir complejos del coactivador y la enzima preformados, que ante señales estimuladoras de la vía de p38 luego se asocian con esta quinasa que fosforila a TIF2. El complejo activo se asociaría entonces con NF- $\kappa$ B inactivo (asociado al inhibidor I $\kappa$ B). Por fosforilación de I $\kappa$ B a través de la IKK, se libera y se degrada el inhibidor I $\kappa$ B dejando libre el complejo NF- $\kappa$ B/coactivador activo y con capacidad de unirse a secuencias específicas en el promotor. A través de actividad acetilasa de histonas aportada por las proteínas reclutadas por TIF2 se favorece la transcripción (1). Otra posibilidad es el armado de todo el complejo en una secuencia como se muestra en el esquema a la derecha (2).

## Bibliografía

1. Matthews JR, Hay RT. Regulation of the DNA binding activity of NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 865-79.

2. Finco TS, Baldwin AS. Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* 1995; 3: 263-72.
3. Kopp EB, Ghosh S. NF-kappa B and Rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995; 58: 1-27.
4. Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, Hunninghake GW. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem* 1999; 274: 30858-63.
5. Rosenfeld MG, Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 2001; 276: 36865-8.
6. Xu J, O'Malley BW. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord* 2002; 3: 185-92.
7. Lee SK, Kim HJ, Na SY, Kim TS, Choi HS, Im SY, Lee JW. Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem* 1998; 273: 16651-4.
8. Na SY, Lee SK, Han SJ, Choi HS, Im SY, Lee JW. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem* 1998; 273: 10831-4.
9. Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 1997; 387: 677-84.
10. Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett* 2000; 485: 195-9.
11. Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 1996; 15: 3667-75.
12. Picard F, Gehin M, Annicotte J, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* 2002; 111: 931-41.
13. Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 2000; 14: 1553-77.

-----

*Thus, there will, of necessity, always be a sense of quiet unease in an academic-like environment. The desire of the students and younger faculty to reexamine, if not overturn, the inadequate ideas of the past will often be in conflict with the purposes of the more senior professors who themselves a generation before may have come to power through their ability to think differently. A major factor determining the quality of a given institution is thus the ability of its faculty to reward intellectual success even when it leads to the effective academic redundancy of many of its older members.*

Habrá siempre, necesariamente, un sentido de cierta intranquilidad en un ambiente académico. El deseo de los estudiantes y de los profesores más jóvenes de re-examinar, sino revocar, las ideas del pasado ya superadas entrará en conflicto con los propósitos de los profesores de más edad, los mismos que una generación antes llegaron al poder por su habilidad de pensar en forma diferente. El principal factor determinante de la calidad de una institución reside en la habilidad de sus miembros de premiar al éxito intelectual aun cuando lleve a finalizar con la labor académica de sus miembros más antiguos.

James D. Watson (1928- )

*A Passion for DNA. Genes, Genomes, and Society.* Cold Spring Harbor NY:  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, p 110