



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa de doctorado en Biotecnología

JunB y la proliferación celular: mecanismos de control y dianas transcripcionales

Tesis presentada por:
Beatriz Pérez Benavente

Directores de tesis:
Dra. Rosa Farràs Rivera
Dr. José Enrique O'Connor Blasco

Valencia, 2015

La Doctora ROSA FARRÀS RIVERA, investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe y el Doctor JOSÉ ENRIQUE O'CONNOR BLASCO, Catedrático de la Universidad de Valencia

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: "JunB y la proliferación celular: mecanismos de control y dianas transcripcionales" ha sido realizada bajo su dirección por BEATRIZ PÉREZ BENAVENTE, licenciada en Química y en Bioquímica por la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente escrito

Valencia, Junio de 2015

Fdo.: Rosa Farràs Rivera

Fdo.: José Enrique O'Connor Blasco

El trabajo aquí presentado ha sido realizado en el Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia y en el Instituto de Genética Molecular de Montpellier, Francia, y ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (P108-1127) y por la Generalitat Valenciana (AP-039/10 y AP-007/11).

Beatriz Pérez Benavente ha sido beneficiaria de una beca de formación de personal investigador del Centro de Investigación Príncipe Felipe (PR07/2009) y de una ayuda VALi+d para investigadores en formación de la Generalitat Valenciana (ACIF/2012/098). Las estancias en el Instituto de Genética Molecular de Montpellier se realizaron gracias a la obtención de una beca para estancias de contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunidad Valenciana de la Generalitat Valenciana (BEFPI/2013/060) y de una beca para estancias cortas de la Federación Europea de Sociedades Bioquímicas (FEBS).

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido un camino largo y, en ocasiones, difícil que he compartido desde sus inicios con mi directora de tesis, Rosa Farràs. A ella he de agradecerle su continuo apoyo durante todos estos años, la motivación en los momentos difíciles, sus enseñanzas y su implicación en esta tesis, que no habría sido posible sin su ayuda.

Fue al laboratorio de Biología Estructural del CIPF al que me incorporé siendo todavía estudiante de máster y al que agradezco la oportunidad de comenzar mi tesis doctoral. Transcurrido un tiempo pasé a formar parte del grupo de Citómica dirigido por José Enrique O'Connor que se convirtió en mi director de tesis. A él quiero agradecerle la buena acogida en su grupo desde el principio y su apoyo en todo momento.

Gracias también a José Enrique Pérez Ortín, que me ha estado asesorando sobre la trayectoria profesional a seguir desde que era estudiante de Bioquímica y que en aquella época me permitió colaborar en su grupo de investigación para aprender de primera mano cómo se trabaja en un laboratorio de investigación bioquímica.

Mi paso por diferentes grupos durante la realización de esta tesis doctoral me ha permitido trabajar cerca de un gran número de personas que me han aportado mucho, tanto profesional como personalmente. Empezando por la gente del laboratorio de bioquímica estructural que, de una manera u otra, me ayudaron en mis inicios: Silvia, Pablo, Jehzabel, Martina, Beatriz...; los citómicos, tanto del CIPF como de la UV, siempre tan dispuestos a echarme una mano con el citómetro:

Alicia, Angie, Laura, Domingo, Lupe, Sandra, Paco...; el grupo de Deborah Burks, con los que he compartido laboratorio y risas de forma intermitente durante los últimos años: Luke, Arantxa, Carlos, Vero...; Ana Conesa y Lorena por su ayuda con el análisis bioinformático y, en general, toda la gente del CIPF y de la UV que en algún momento me ha aportado ideas, me ha ayudado a solucionar problemas, me ha mostrado su solidaridad en los momentos duros, incluso sin apenas conocerme, o me ha arrancado una sonrisa por los pasillos.

Una de las experiencias más enriquecedoras de estos años ha sido mi paso por el Instituto de Genética Molecular de Montpellier. Quiero agradecerle a Marc el abrirme las puertas de su laboratorio y a Isa el estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que necesitara. Gracias a los dos por las fructíferas discusiones. Y gracias a todo el grupo de Oncogenesis and Immunotherapy: Tamara, Mar, Mireia, Claire, Hayeon, Chams, Marko, Guillaume, Frederique... por la estupenda acogida que me dieron desde el primer día y por su ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio. Me traje buenas amistades que espero perduren en el tiempo.

Gracias a mis amigas de siempre, escolapias y esclavas, por todos los buenos momentos compartidos antes, durante y después de esta tesis. Porque sin nuestros juevintxos y nuestras risas este camino hubiera sido mucho más difícil. Y gracias a mis excompañeras de Universidad y también amigas por compartir inquietudes, éxitos y fracasos, aunque sea en la distancia.

Un agradecimiento especial se merecen mis padres y mis hermanas que han vivido en primera persona y desde el primer día la realización de esta tesis doctoral y los contratiempos que han acontecido. Gracias por aguantar mis altibajos y por vuestro amor incondicional.

Y gracias a Carlos, por su inestimable apoyo y su infinita paciencia, especialmente en la última etapa. Gracias por darme fuerza cuando me faltaba y hacerme ver las cosas menos complicadas de lo que me parecían. Tu confianza y tu amor han sido fundamentales.

Tabla de contenidos

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	19
1. Cáncer	19
2. El ciclo celular	26
2.1. Fases del ciclo celular	26
2.2. Control del ciclo celular	28
3. El sistema ubiquitina proteasoma y su implicación en el control del ciclo celular	30
3.1. El proteasoma	31
3.2. La ubiquitinación de los sustratos.	32
3.3. Ligasas E3 implicadas en el control del ciclo celular	34
3.3.1. Control del ciclo celular por el complejo APC/C	35
3.3.2. Control del ciclo celular por el complejo SCF	36
3.4. Fbxw7	37
4. El complejo transcripcional AP-1	39
4.1. Miembros del complejo transcripcional AP-1	39
4.2. Regulación de la actividad AP-1	40
4.2.1. Regulación transcripcional y post-traducciona	40
4.2.2. Composición del dímero formado	41

4.2.3.	Unión a otras proteínas	42
4.3.	Funciones fisiológicas de AP-1. Implicación en cáncer	43
5.	Papel de JunB en la proliferación celular	44
5.1.	Regulación de JunB durante el ciclo celular	44
5.2.	JunB: oncogén o supresor tumoral	45
6.	Linfoma anaplásico de células grandes	47
6.1.	Características generales de LACG	47
6.2.	Mecanismos por los que NPM-ALK media el desarrollo tumoral	47
6.2.1.	Ruta de señalización JAK/STAT en LACG ALK+	48
6.2.2.	Ruta de señalización PI3K/AKT en LACG ALK+	49
6.2.3.	Ruta de señalización MEK/ERK en LACG ALK+	49
6.3.	Papel de JunB en LACG ALK+	50
OBJETIVOS		53
METODOLOGÍA		55
1.	Obtención de ADNs	55
1.1.	ADNs y plásmidos	55
1.2.	Transformación de bacterias por choque térmico	55
1.3.	Purificación del ADN plasmídico	56
1.4.	Electroforesis en geles de agarosa	57
2.	Cultivo celular de líneas celulares de origen humano	57
2.1.	Líneas celulares	57
2.2.	Generación de líneas celulares estables	58
3.	Tratamientos y ensayos celulares	61
3.1.	Tratamientos farmacológicos	61
3.2.	Sincronización de células	61
3.2.1.	Sincronización en G1/S	62
3.2.2.	Sincronización en G2/M	63
3.3.	Transfecciones transitorias	63

3.4.	Silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia	64
3.5.	Ensayos de vida media	65
4.	Técnicas de análisis celular	66
4.1.	Citometría de flujo	66
4.1.1.	Análisis del contenido de ADN de las células	66
4.1.2.	Ensayo de incorporación de EdU	67
4.2.	Microscopía de fluorescencia	68
4.3.	Análisis citogenéticos y FISH	68
5.	Análisis de expresión proteica	69
5.1.	Preparación de extractos proteicos	69
5.2.	Medida de la concentración de proteínas	70
5.3.	Separación electroforética de proteínas	70
5.4.	Inmunotransferencia (Western blot)	71
6.	Análisis de expresión génica	73
6.1.	Extracción de ARN	73
6.2.	Medida de la concentración de ácidos nucleicos	73
6.3.	RT-qPCR	74
6.3.1.	Transcripción reversa	74
6.3.2.	PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	74
6.4.	Micromatriz para RT-qPCR de genes de ciclo celular	76
6.5.	Análisis transcriptómico	76
7.	Análisis de interacciones macromoleculares	77
7.1.	Coinmunoprecipitación de proteínas	77
7.2.	Ensayos de ubiquitinación	78
7.3.	Inmunoprecipitación de cromatina	78
7.3.1.	Entrecruzamiento de las células con formaldehído	79
7.3.2.	Lisis celular y fragmentación de la cromatina	80
7.3.3.	Inmunoprecipitación de la cromatina	80
7.3.4.	Purificación del ADN	81
7.3.5.	Amplificación de las regiones del promotor de <i>DDX11</i>	81
7.3.6.	ChIP-seq	81

8. Análisis bioinformático	82
8.1. Identificación de sitios de unión de proteínas asociadas al genoma a partir de datos de ChIP-seq	82
8.2. Identificación de genes diferencialmente expresados a partir de datos de análisis transcriptómico	83
8.3. Análisis de secuencias	84

RESULTADOS 1: Caracterización del mecanismo molecular que regula la estabilidad de JunB en G2 85

1. JunB es sustrato de la E3 ligasa Fbxw7	85
2. GSK3 fosforila a JunB en su motivo fosfodegrón	89
3. Las fosforilaciones de la S251, la T255 y la S259 regulan la estabilidad de JunB	92
4. GSK3 β regula la estabilidad de JunB en G2	96
5. Posible papel de otros residuos de JunB en su estabilidad en G2	101
6. La degradación de cJun por GSK3-Fbxw7 no ocurre en G2	104

RESULTADOS 2: Consecuencias de la acumulación de JunB en mitosis. Implicación en neoplasias humanas. 107

1. La expresión de Ciclina A2 aumenta en células donde el mecanismo de degradación de JunB es defectuoso	107
2. DDX11 es una nueva diana transcripcional de JunB	109
3. La represión de <i>DDX11</i> causa defectos de cohesión en las cromátidas hermanas	115
4. El mecanismo de degradación de JunB está alterado en linfoma anaplásico de células grandes ALK positivo	117
5. Células derivadas de LACG presentan niveles reprimidos de DDX11 y defectos de cohesión en las cromátidas hermanas	119

RESULTADOS 3: Identificación de nuevas dianas transcripcionales de JunB implicadas en el control del ciclo celular.	123
1. El silenciamiento de JunB da lugar a una menor población de células en fase S.	123
2. Identificación de genes diferencialmente expresados al silenciar JunB en células U2OS	125
3. Identificación de potenciales dianas transcripcionales directas de JunB mediante ChIP-seq.	131
4. Identificación de dianas transcripcionales de JunB mediante ChIP-seq y análisis transcriptómico.	133
DISCUSIÓN	141
1. Regulación de la degradación de JunB en G2 por GSK3 β -SCF ^{Fbxw7}	141
2. Consecuencias de la acumulación de JunB en mitosis. Implicación en neoplasias humanas	146
3. Identificación de nuevas dianas transcripcionales de JunB implicadas en el control del ciclo celular.	151
CONCLUSIONES	163
REFERENCIAS	165
ANEXO	(CD adjunto)

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
APC/C	Complejo promotor de la anafase/ciclosoma
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
BSA	Albúmina de suero bovino
cADN	ADN complementario
CAK	Quinasa activadora de CDK
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CHX	Cicloheximida
CKI	Inhibidor de CDK
CPD	Fosfodegrón consenso
CRE	Elemento de respuesta a cAMP
CTD	Dominio C terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAsa	Desoxirribunucleasa
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E1	Enzima activadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina

E3	Enzima ligasa de ubiquitina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDU	5-etinil-2'-desoxiuridina
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil)
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
ENCODE	Enciclopedia de elementos de ADN
FDR	Tasa de descubrimientos falsos
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GO	Ontología génica
GTPasa	Guanidina trifosfatasa
HA	Hemaglutinina
HRP	Peroxidasa de rábano
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
LACG	Linfoma anaplásico de células grandes
LACG ALK+	LACG positivo para ALK
mARN	ARN mensajero
miARN	micro ARN
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
OD	Densidad óptica
ORF	Pauta abierta de lectura
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Yoduro de propidio
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNAsa	Ribonucleasa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCF	Complejo formado por Skp1, Cullin y proteína F-box
SDS	Dodecilsulfato sódico
siARN	ARN pequeño de interferencia
TBS	Tampón tris salino
Tc	Tetraciclina
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRE	Elemento de respuesta a TPA
TRE	Elemento de respuesta a tetraciclina
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UV	Ultravioleta

Aminoácidos

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutámico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

Introducción

1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales las células dejan de responder a las señales que normalmente gobiernan su comportamiento dentro de un tejido. Las células cancerosas crecen y se dividen cuando no deberían y no se mueren cuando deberían (Morgan, 2007). En el proceso de transformación neoplásica las células normales evolucionan progresivamente adquiriendo una serie de capacidades biológicas que conducen a su conversión tumorigénica (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011) y que se describen a continuación:

- Mantenimiento de la señalización proliferativa

Una de las principales características de las células cancerosas es su habilidad para proliferar de manera descontrolada. En las células sanas la entrada y progresión en el ciclo celular está controlada por la adecuada producción y liberación de factores de crecimiento que se unen a receptores situados en la superficie celular. Estos receptores contienen normalmente dominios tirosina quinasa intracelulares que, tras su activación, inician una cascada de señalización que regula la progresión del ciclo celular y el crecimiento celular. Las células poseen, además, unos mecanismos de retroalimentación negativa que tienen como objetivo atenuar la señalización proliferativa (Weinberg, 2014).

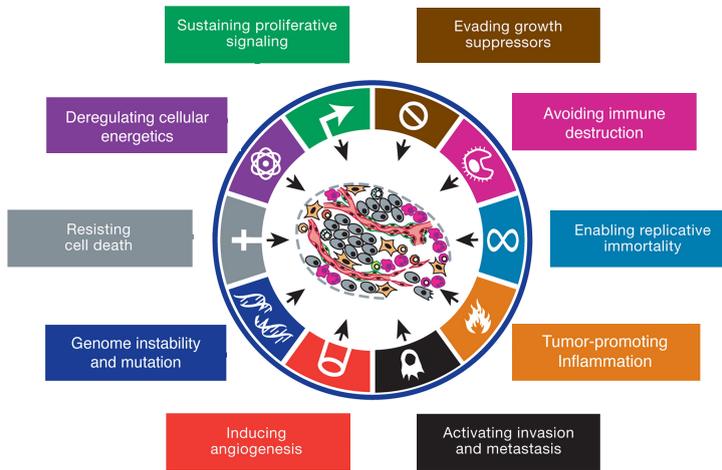


Figura 1: Capacidades biológicas adquiridas por las células cancerosas. (Hanahan & Weinberg, 2011)

En las células cancerosas varios mecanismos pueden conducir a una señalización proliferativa continuada: la producción intrínseca o por células de su entorno de factores de crecimiento, el incremento de la cantidad de receptores presentes en la superficie celular, la alteración de las moléculas receptoras que facilite su activación en ausencia de ligando, la activación constitutiva de alguno de los componentes de la ruta de señalización que actúan tras la activación de los receptores o la aparición de defectos en los mecanismos de apagado de la señalización (Bhowmick et al., 2004; Lemmon & Schlessinger, 2010).

- Evasión de supresores tumorales

Los supresores tumorales son moléculas que limitan el crecimiento celular y la proliferación por lo que su inactivación contribuye al desarrollo tumoral. Entre ellas destacan la proteína p53 y la proteína del retinoblastoma (pRb) que se encuentran mutadas en un gran número de cánceres humanos. Ambas proteínas detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a señales extracelulares o intracelulares. pRb inhibe la expresión de genes que promueven la entrada en el ciclo celular a través de su unión a los factores de transcripción E2F (Chinnam & Goodrich, 2011). A

p53 se le conoce como el “guardián del genoma” por su papel fundamental en evitar la acumulación de daño genético en la célula (Lane, 1992). Se activa al detectarse un daño en el ADN y su función es detener el ciclo celular hasta que los mecanismos de reparación del ADN reparen la lesión. Si el daño es tan grave que la célula no puede repararlo, p53 promueve la apoptosis celular evitando así que el daño en el ADN se transmita a las células hijas.

- Resistencia a la muerte celular

La muerte celular programada por apoptosis constituye una barrera natural contra el desarrollo del cáncer. La apoptosis puede ser inducida por señales extracelulares que activan los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (vía extrínseca) o en respuesta a estrés intracelular (vía intrínseca o mitocondrial). En ambos casos el resultado es la activación de las proteínas caspasas que desencadenan una cascada de proteólisis que acaba en la desintegración de la célula y su fagocitosis por las células vecinas (Lowe et al., 2004).

Durante el curso de la tumorigénesis la apoptosis puede desencadenarse en respuesta a los estreses fisiológicos que las células experimentan tales como daño en el ADN, desequilibrios en la señalización provocados por la acción de oncogenes o una señalización insuficiente de factores de supervivencia. Sin embargo, las células tumorales son capaces de desarrollar mecanismos que evitan la apoptosis. Entre ellos hay que destacar la pérdida del supresor tumoral p53, el incremento de moléculas antiapoptóticas, como Bcl-2 o Bcl-x_L, o la disminución de los factores proapoptóticos, como Bax o Bim (Adams & Cory, 2007; Lowe et al., 2004).

- Potencial replicativo ilimitado

Las células normales son capaces de sufrir un número limitado de divisiones celulares antes de entrar en senescencia o sufrir muerte celular (Hayflick, 1997). En este proceso juegan un importante papel los telómeros, compuestos de múltiples repeticiones de hexanucleótidos y situados en los

extremos de los cromosomas. Su misión es evitar las posibles fusiones entre los extremos de dos cromosomas distintos que afectarían a la viabilidad celular. Los telómeros se acortan progresivamente a medida que la célula se divide perdiendo de esta manera su capacidad protectora y desencadenando finalmente la muerte celular (Donate & Blasco, 2011).

Las células tumorales poseen un potencial replicativo ilimitado gracias a que adquieren la habilidad de mantener la longitud de los telómeros lo suficientemente elevada para evitar la entrada en senescencia o la muerte celular. Esta habilidad la consiguen mediante la expresión de la enzima telomerasa, una polimerasa de ADN que añade repeticiones de hexanucleótidos a los extremos del ADN telomérico. Esta enzima, prácticamente ausente en células normales, se expresa en la gran mayoría de las células tumorales humanas. Otro mecanismo menos habitual de mantenimiento de los telómeros es a través de intercambios de información genética entre cromosomas distintos por recombinación (Blasco, 2005; Osterhage & Friedman, 2009).

- Inducción de angiogénesis

Las células tumorales necesitan el aporte continuo de nutrientes y de oxígeno así como la eliminación de desechos y de dióxido de carbono para su supervivencia. Para satisfacer estas necesidades inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes en un proceso conocido como angiogénesis (Eichhorn et al., 2007). Este proceso, que es muy importante durante el desarrollo embrionario, en adultos permanece generalmente inactivo a excepción de determinadas circunstancias como la cicatrización de heridas o el ciclo reproductivo femenino en las que se activa de forma transitoria.

El control de la angiogénesis se ejerce a través de un equilibrio entre factores que promueven la angiogénesis y factores que la inhiben. Entre los factores proangiogénicos implicados en la activación permanente de la angiogénesis en las células tumorales se encuentra el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que se une a receptores estimuladores de la

superficie de las células endoteliales (Carmeliet, 2005). El incremento de su expresión en células tumorales puede ser mediado por señalización oncogénica o por situaciones de hipoxia. Adicionalmente, puede ser secuestrado por proteínas de la matriz extracelular a la espera de que las proteasas que la degradan lo liberen (Kessenbrock et al., 2010).

- Activación de la invasión y la metástasis

Los procesos de invasión y metástasis ocurren a través de una sucesión de eventos biológicos conocidos como cascada de invasión-metástasis. En primer lugar se produce la invasión local de los tejidos adyacentes por las células del tumor primario que va seguida de su intravasación en vasos sanguíneos o linfáticos cercanos. Las células cancerosas circulan entonces por los sistemas sanguíneo o linfático hasta que alcanzan tejidos lejanos en donde penetran (extravasación) y forman pequeños nódulos de células cancerosas conocidos como micrometástasis. Finalmente, las lesiones micrometastáticas instaladas en tejidos alejados del tumor primario crecen hasta convertirse en tumores macroscópicos, proceso conocido como colonización (Gupta & Massague, 2006; Nguyen et al., 2009).

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un proceso implicado en la morfogénesis embrionaria que las células tumorales utilizan para mediar los procesos de invasión y metástasis (Polyak & Weinberg, 2009). Durante la embriogénesis la activación de una serie de factores de transcripción como Snail, Slug o Twist dan lugar a un conjunto de eventos biológicos que incluyen la pérdida de uniones adherentes y la asociada conversión de la morfología celular poligonal/epitelial a alargada/fibroblástica, la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular, el incremento de la movilidad y la aumentada resistencia a la apoptosis, todos ellos eventos implicados en los procesos de invasión y metástasis. Estos factores transcripcionales se encuentran expresados en diferentes tipos tumorales y parece que son capaces de orquestar la mayoría de los procesos de la cascada de invasión-metástasis a excepción del paso final de colonización (Micalizzi et al., 2010; Yang & Weinberg, 2008).

- Reprogramación del metabolismo energético

Para poder mantener el continuo crecimiento celular y la proliferación característicos del proceso neoplásico las células tumorales han de realizar ajustes en su metabolismo energético. Incluso en presencia de oxígeno las células cancerosas utilizan preferentemente la vía glicolítica anaeróbica de obtención de energía frente a la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que es conocido como “efecto Warburg” (Warburg, 1956). La menor eficiencia en la producción de ATP de la vía anaeróbica frente a la mitocondrial dependiente de oxígeno es compensada, en parte, por las células tumorales mediante el incremento en el número de transportadores de glucosa. Este aumento en los receptores de glucosa así como un incremento en la síntesis de enzimas implicadas en la ruta glicolítica es característico de las células tumorales que se encuentran en condiciones de hipoxia (Hsu & Sabatini, 2008; Jones & Thompson, 2009).

Aunque el motivo por el que las células tumorales prefieren la ruta anaeróbica incluso en presencia de oxígeno no está muy entendido, dicha predilección podría explicarse por la cantidad de intermediarios glicolíticos generados que se desvían a diferentes rutas biosintéticas. Entre ellas se incluyen las implicadas en la generación de nucleósidos y aminoácidos que facilitarían, a su vez, la biosíntesis de las macromoléculas requeridas para el ensamblaje de las nuevas células (Vander Heiden et al., 2009).

- Evasión de la destrucción inmune

El sistema inmune parece operar como una barrera significativa al desarrollo tumoral. Según la teoría de la vigilancia inmune (Burnet, 1970), este sistema parece ser responsable del reconocimiento y la eliminación de la mayoría de células cancerosas incipientes y, por tanto, de los tumores nacientes. Acorde con esta teoría, los tumores sólidos habrían desarrollado mecanismos para evitar la detección por las células del sistema inmune o para limitar los mecanismos inmunológicos conducentes a su muerte (Zitvogel et al., 2006).

- **Inflamación**

El sistema inmune también puede ejercer un efecto positivo sobre el desarrollo tumoral (Colotta et al., 2009). Así, la inflamación puede contribuir a la adquisición de las capacidades biológicas que conducen a las células a su conversión tumorigénica mediante la liberación por parte de las células del sistema inmune de moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores proangiogénicos, enzimas modificadores de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis y señales que conducen a la activación de la transición epitelio mesenquimal. Además, pueden liberar especies reactivas de oxígeno que incrementan las tasa de mutación de las células vecinas.

- **Inestabilidad genómica**

El desarrollo de inestabilidad genómica constituye un mecanismo por el que las células cancerosas acumulan los cambios genéticos que conducen a la adquisición de las diferentes capacidades biológicas que les permiten proliferar, sobrevivir y diseminarse (Negrini et al., 2010).

Las células poseen unos sistemas de mantenimiento del genoma que detectan y reparan los defectos en el ADN asegurando que la tasa de mutación espontánea se mantenga muy baja durante cada generación celular (Jackson & Bartek, 2009). Además, poseen mecanismos para interceptar e inactivar moléculas mutagénicas antes de que puedan dañar el ADN. Las células cancerosas a menudo incrementan su tasa de mutación debido a un aumento de su sensibilidad frente a agentes mutagénicos, a defectos en la detección o reparación del ADN dañado o a la alteración de los mecanismos que conducen a las células dañadas de forma irreparable a su muerte celular.

Otra fuente de inestabilidad genómica asociada a tumores la constituye la inestabilidad cromosómica caracterizada por la ganancia o pérdida de grandes fragmentos cromosómicos o por la alteración del

número total de cromosomas en una célula (aneuploidía). La adecuada segregación de los cromosomas en las dos células hijas durante la mitosis es esencial para evitar la inestabilidad cromosómica (Rajagopalan & Lengauer, 2004). Otro mecanismo que contribuye a la inestabilidad cariotípica es la pérdida del ADN telomérico que facilita que tengan lugar fusiones entre los extremos de dos cromosomas distintos (Artandi & DePinho, 2010).

2. El ciclo celular

2.1. Fases del ciclo celular

Como se ha comentado en el apartado anterior, una de las principales características del cáncer es la proliferación descontrolada de las células como resultado de la alteración en los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular. El ciclo celular es el conjunto de eventos moleculares que conducen a la división de una célula en dos células hijas idénticas y está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (Figura 2). Durante la fase G1, las células crecen en tamaño y sintetizan las proteínas y ARNs necesarios para la síntesis de ADN que tendrá lugar en la fase siguiente. La fase G1 constituye un importante periodo regulador ya que es aquí cuando las células deciden si continúan dividiéndose o si entran en un estado quiescente (G0), decisión que está fuertemente influida por la presencia o no de factores de crecimiento mitogénicos (Weinberg, 2014). Si la célula decide continuar en el ciclo pasa a la fase S o de síntesis que es donde tiene lugar la replicación del ADN y la duplicación de los cromosomas, que requiere de la síntesis de histonas para su correcto empaquetamiento. En esta fase, además, se depositan sobre los cromosomas las proteínas responsables de mantener la cohesión entre las cromátidas hermanas hasta su separación en mitosis (Morgan, 2007).

A continuación, las células entran en G2 donde se preparan para la fase M. Durante la fase M se produce la división nuclear (mitosis) y celular (citocinesis), de manera que los cromosomas duplicados son repartidos de

forma equitativa entre las dos células hijas. La mitosis se divide en 5 etapas (Figura 2) que comienzan en la profase donde tiene lugar la condensación de los cromosomas, la separación de los centrosomas y se inicia el ensamblaje del huso mitótico. Durante la prometafase se produce la rotura de la envoltura nuclear y las cromátidas hermanas se unen a los microtúbulos del huso mitótico a través de los cinetocoros y migran hasta la región central. La metafase se caracteriza por el alineamiento de las cromátidas hermanas en el plato metafásico donde permanecen a la espera de la señal para separarse. En la anafase se rompe la cohesión que mantiene unidas a las cromátidas hermanas y estas se separan gracias a la acción de los microtúbulos del huso mitótico que tiran de ellas en direcciones opuestas de la célula. La mitosis se completa en la telofase cuando se desensambla el huso mitótico y los cromosomas se descondensan y empaquetan dentro de nuevas envolturas nucleares formadas en cada una de las células hijas (Morgan, 2007).

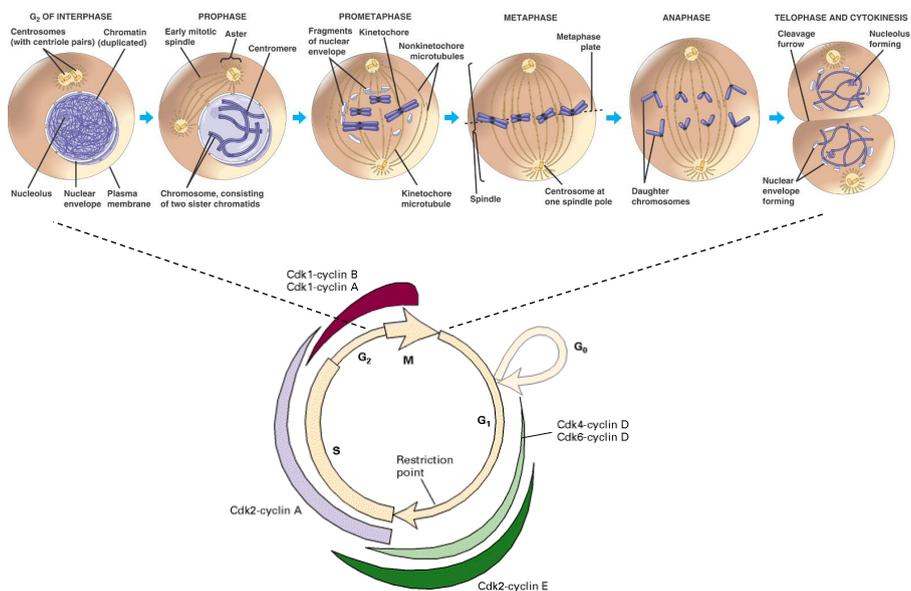


Figura 2: El ciclo celular. El ciclo celular se divide en 4 fases: G₁, S, G₂ y M. La fase M está, a su vez, dividida en 5 etapas que van de la profase a la telofase y citocinesis. La progresión por las diferentes fases del ciclo celular está controlada por la formación de diferentes complejos CDK-Ciclina (Campbell & Reece, 2001; Lodish et al., 2004).

2.2. Control del ciclo celular

La progresión a través de las diferentes fases del ciclo celular está controlada por proteínas quinasas heterodiméricas constituidas por subunidades reguladoras llamadas ciclinas y por subunidades catalíticas quinasas dependientes de ciclina (CDKs). La actividad de los complejos CDK-Ciclina oscila durante el ciclo celular generándose ondas de actividad de los diferentes complejos que se suceden a lo largo del ciclo. Cada complejo que se activa actúa sobre diferentes sustratos activándolos o inactivándolos mediante fosforilaciones para que se lleven a cabo los procesos correspondientes a ese momento del ciclo. Una vez realizada su función su actividad se apaga para poder avanzar a la siguiente fase asegurando, de esta manera, un desarrollo secuencial de los procesos del ciclo celular. En la Figura 2 se representan esquemáticamente los periodos del ciclo durante los que se activan cada uno de los complejos CDK-Ciclina: la Ciclina D se asocia a CDK4 y CDK6 en G1 controlando la entrada en el ciclo celular, el complejo CDK2-Ciclina E es responsable de la transición G1/S, CDK2-Ciclina A y CDK1-Ciclina A están implicadas en la progresión por la fase S y la transición G2/M, respectivamente, mientras que CDK2-Ciclina B se activa para promover la entrada mitótica (Lodish et al., 2004).

El control de la actividad de los diferentes complejos CDK-Ciclina se realiza mediante varios mecanismos. La formación de los diferentes complejos depende, en primer lugar, de los niveles de ciclinas presentes a lo largo del ciclo (Figura 3) que están regulados por la activación de su expresión génica y su degradación proteosomal en momentos concretos del ciclo. Además de la unión de la ciclina, las CDKs han de ser fosforiladas en un residuo adyacente a su sitio catalítico para ser completamente activas. Esta fosforilación la lleva a cabo el complejo CAK (*CDK Activating Kinase*), formado por la asociación de la quinasa CDK7, la Ciclina H y la proteína Mat1. La fosforilación en otros residuos puede, por el contrario, tener un efecto inhibitor sobre la actividad CDK. Por ejemplo, las fosforilaciones en la Thr-14 y Tyr-15 mediadas por las quinasas Wee1 y Myt1 inhiben su actividad y es necesario su eliminación por la familia de fosfatasa Cdc25 para activar los complejos. Un tercer nivel de regulación lo constituye la unión de proteínas inhibitoras de CDKs, las CKIs, cuyos niveles están, a su

vez, controlados por degradación proteasomal. Se han descrito 7 proteínas CKIs que se unen a los complejos CDK-Ciclina inhibiendo su actividad catalítica: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, de la familia INK4, que se unen específicamente a los complejos que contienen CDK4 y CDK6 y p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, de la familia CIP/KIP, inhibidores generales de los complejos CDK-Ciclina (Morgan, 2007; Weinberg, 2014). A diferencia de las modificaciones reversibles como la fosforilación o la asociación con CKIs, la degradación proteasomal es un mecanismo irreversible que asegura la estricta unidireccionalidad del ciclo celular jugando, por tanto, un papel central en su regulación (Bassermann et al., 2014).

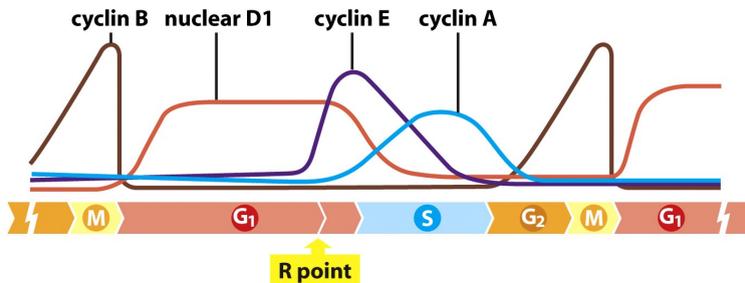


Figura 3: Niveles de ciclinas durante el ciclo celular. Los niveles de las Ciclinas B, D, E y A oscilan de forma periódica durante el ciclo celular (Weinberg, 2014).

Las células que se encuentran en estado quiescente se caracterizan por poseer niveles bajos de ciclinas y altos de CKIs. La estimulación mitogénica conduce a la activación de la síntesis de Ciclina D y la disminución de los niveles de sus inhibidores. La Ciclina D se une entonces a CDK4/6 y fosforila la proteína de retinoblastoma (pRb) lo que la libera de su asociación inhibidora con los factores de transcripción E2F. Una vez liberados, los factores E2F activan la transcripción de las Ciclinas E y A y de otras proteínas necesarias para el correcto desarrollo de la fase S. La Ciclina E se une a CDK2 y fosforila a pRb contribuyendo a la activación de E2F y estableciendo así un lazo de retroalimentación positivo que conducirá finalmente al paso a través del punto de restricción. A partir de este momento la célula no necesita estímulos mitogénicos adicionales para completar las siguientes etapas del ciclo; los diferentes complejos CDK-

Ciclina se irán activando secuencialmente controlado la progresión por las fases S, G2 y M (Morgan, 2007; Weinberg, 2014).

La célula está dotada de mecanismos de control capaces de inhibir los diferentes complejos CDK-Ciclina y frenar la progresión del ciclo celular en caso de detectar alguna anomalía, evitando así que se produzcan errores en la duplicación del material genético o en su reparto entre las dos células hijas (Figura 4). Ante la detección de un daño en el ADN, las quinasas ATM y ATR inician unas cascadas de señalización que conducen a la inactivación de los complejos CDK-Ciclina y a la parada del ciclo en G1, S y G2/M hasta que el daño en el ADN es reparado. Central en la respuesta al daño en el ADN es la activación del factor de transcripción p53. Al final de G2, además, se comprueba si el ADN está correctamente replicado y si no es así se bloquea la entrada en mitosis mediante la inhibición de los complejos CDK-Ciclina mitóticos. Otro punto de control se encuentra en la transición de la metafase a la anafase: si los cromosomas no están correctamente ensamblados al huso mitótico se detiene la maquinaria de degradación proteolítica mediada por el proteasoma que conduce al inicio de la anafase impidiendo la separación de las cromátidas hermanas (Lodish et al., 2004; Morgan, 2007).

3. El sistema ubiquitina proteasoma y su implicación en el control del ciclo celular

El sistema ubiquitina proteasoma es responsable de la degradación selectiva de multitud de proteínas en las células eucarióticas. Las proteínas sustrato son marcadas con la proteína ubiquitina para ser, a continuación, degradadas por el proteasoma. La degradación de proteínas mediada por este sistema juega un papel central en el control de numerosos procesos incluyendo la progresión por el ciclo celular, la transducción de señal o la regulación transcripcional, entre otros. Defectos en este sistema de degradación pueden conducir a condiciones patológicas incluyendo la transformación neoplásica (Hershko & Ciechanover, 1998).

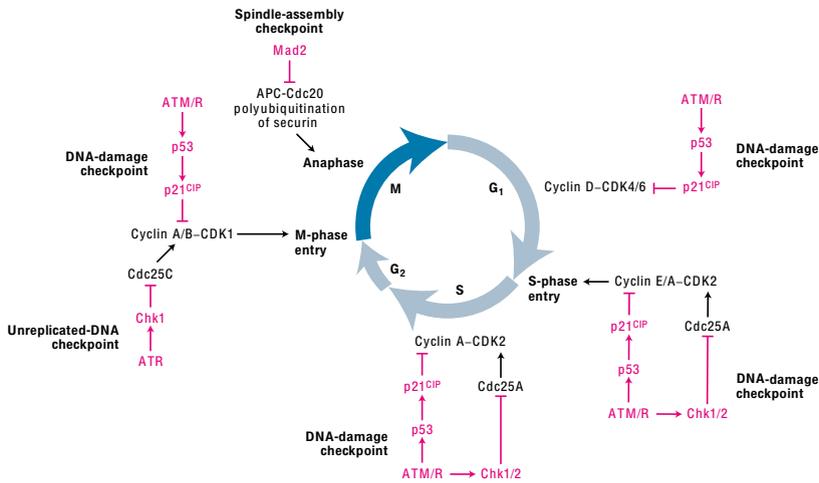


Figura 4: Mecanismos de control del ciclo celular. El punto de control de la replicación del ADN previene la activación de los complejos CDK1-Ciclina A y CDK1-Ciclina B mediante la activación de la cascada de quinasas ATR-Chk1 que fosforila e inactiva Cdc25C inhibiendo la entrada en mitosis. En el punto de control del ensamblaje del huso mitótico Mad2 y otras proteínas inhiben la activación del factor Cdc20 que se requiere para la ubiquitinación y degradación proteasomal de la securina previniendo así la entrada en anafase. Ante la detección de un daño en el ADN se activan las quinasas ATM y ATR poniendo en marcha dos mecanismos: la ruta Chk1/2-Cdc25A que bloquea la fase S, ya sea a su entrada o a lo largo de ella, y la ruta p53-p21 que conduce a un arresto en G₁, S y G₂ (Lodish et al., 2004).

3.1. El proteasoma

El proteasoma 26S es un macrocomplejo proteolítico de unos 2500 kDa compuesto por dos tipos de subcomplejos: la partícula central 20S y la partícula reguladora 19S, también conocida como PA700. El complejo central 20S alberga las actividades proteolíticas mientras que la partícula reguladora 19S es la responsable del reconocimiento, desubiquitinación y desplegamiento de los sustratos poliubiquitinados (Figura 5) (Kunjappu & Hochstrasser, 2014).

La partícula central 20S tiene forma de barril y está formada por 28 subunidades repartidas en 4 anillos heptaméricos apilados. Los dos anillos exteriores son idénticos y están constituidos por 7 subunidades α distintas. Son los encargados de regular la entrada de los sustratos a la cámara proteolítica interior. Esta está formada por los dos anillos interiores, también

idénticos entre sí, constituidos por 7 subunidades β diferentes, tres de las cuales poseen actividades catalíticas (β_1 , β_2 y β_5) (Farras et al., 2005).

La entrada del sustrato a la cámara proteolítica está bloqueada por un mecanismo topológico y se requiere la unión de la subunidad reguladora 19S para que sea accesible. Esta partícula abre una vía de acceso para el sustrato a la vez que le ayuda en su desplazamiento al interior de la cámara. Está constituida por más de 17 subunidades repartidas en dos subestructuras: la base y la tapa. La base contiene un anillo de ATPasas en contacto directo con la partícula 20S que controla la apertura del orificio del proteasoma 20S mientras que la tapa es esencial para la eliminación de las ubiquitininas unidas al sustrato (Farras et al., 2005; Finley, 2009).

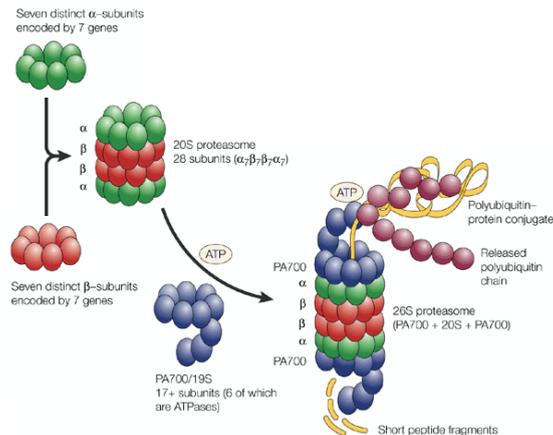


Figura 5: Componentes del complejo proteasomal 26S. El proteasoma 26S está constituido por la partícula central 20S y la partícula 19S que regula la entrada del sustrato poliubiquitinado. Modificado a partir de (McNaught et al., 2001).

3.2. La ubiquitinación de los sustratos.

La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos que se une covalentemente a residuos lisina de los sustratos proteicos mediante un mecanismo de tres pasos secuenciales (Figura 6). La ubiquitina es activada por la enzima E1 en una reacción dependiente de ATP y transferida a continuación a la enzima de conjugación de ubiquitina o E2. Finalmente, la ligasa E3 de ubiquitina une específicamente al sustrato proteico y media la transferencia de la ubiquitina al mismo. La sucesiva adición de ubiquitininas

genera una cadena de poliubiquitinas que sirve de señal para que la proteína sea degradada por el proteasoma 26S (Welchman et al., 2005).

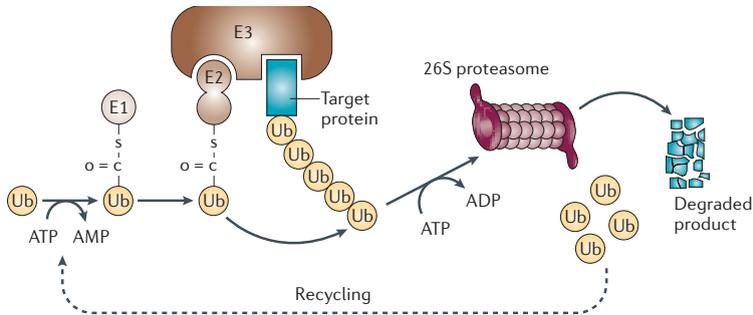


Figura 6: Vía de degradación ubiquitina-proteasoma. En la ubiquitinación de un sustrato proteico intervienen tres actividades enzimáticas: E1, E2 y E3. El sustrato poliubiquitinado es degradado por el proteasoma y las ubiquitinas recicladas (Nakayama & Nakayama, 2006).

Las ligasas E3 de ubiquitina juegan un papel central en la degradación selectiva de proteínas mediada por la vía ubiquitina proteasoma ya que son las que reconocen de forma específica al sustrato. Existen dos clases principales de ligasas E3 dependiendo del tipo de dominio que posean: la familia HECT y la familia RING. Las primeras se unen de forma covalente a la ubiquitina durante el proceso de ubiquitinación mientras que las de la familia RING no interaccionan directamente con la ubiquitina sino que median su transferencia desde la E2 al sustrato (Wertz & Dixit, 2010).

Los miembros de la familia RING pueden funcionar como monómeros, como dímeros o como complejos multiméricos. La dimerización generalmente ocurre a través del dominio RING o las regiones cercanas y puede dar lugar a homodímeros, como en los casos de cIAP o TRAF2, o heterodímeros, como los formados por MDM2 y MDMX o por BRCA1 y BARD1. En los complejos multiméricos el reconocimiento del sustrato lo realiza una subunidad proteica diferente a la que posee actividad ligasa que está enlazada a ella a través de varias proteínas adaptadoras (Metzger et al., 2012).

3.3. Ligasas E3 implicadas en el control del ciclo celular

En el control del ciclo celular están implicadas dos ligasas E3 de la familia RING: SCF, que recibe su nombre de sus componentes principales (Skp1, Cullin y proteína F-box) y APC/C (*anaphase promoting complex/ciclosome*). Ambas pertenecen a la subfamilia de las cullinas o CRL (*cullin RING ligase*) y forman complejos multiméricos (Figura 7). Dentro del complejo las proteínas Cul1 o Apc2 hacen la función de andamio molecular de SCF y APC/C, respectivamente. Por un lado se unen a la proteína que posee el dominio RING, Rbx1 en el caso de SCF y Apc11 en el caso de APC/C, las cuales, a su vez, reclutan a la enzima E2 conjugada a la ubiquitina. Por el otro lado Cul1 y Apc2 se enlazan a la subunidad que reconoce específicamente el sustrato a través de moléculas adaptadoras. En el caso de SCF el reconocimiento del sustrato la realiza una proteína F-box, mientras que en el complejo APC/C son las proteínas Cdc20 o Cdh1 las que reclutan el sustrato (Bassermann et al., 2014; Nakayama & Nakayama, 2006).

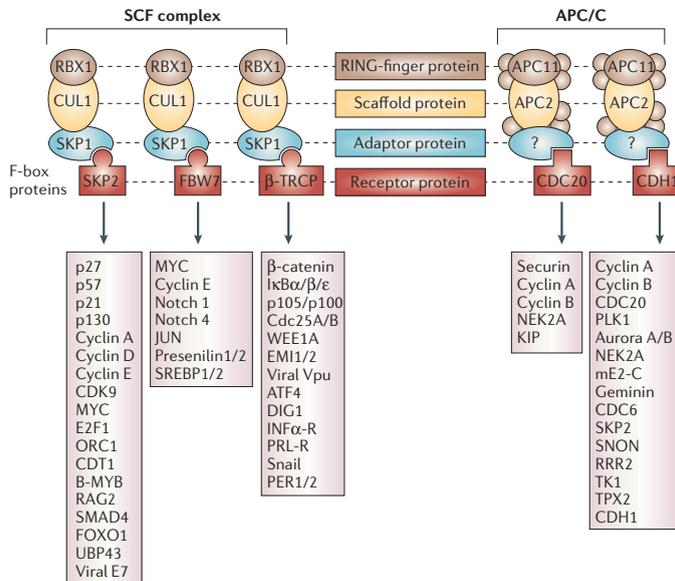


Figura 7: Estructura y sustratos de las ligasas E3 de ubiquitina SCF y APC/C. Las ligasas E3 SCF y APC/C son complejos multiméricos constituidos por varias subunidades proteicas. El componente variable de cada complejo es la proteína encargada del reconocimiento del sustrato: las proteínas F-box Skp2, Fbxw7 y β-TrCP en el caso del complejo SCF y las proteínas Cdc20 y Cdh1 en el complejo APC/C. Se muestran sustratos de cada subunidad variable de SCF y APC/C (Nakayama & Nakayama, 2006).

Una diferencia fundamental entre ambos complejos reside en la forma en la que reconocen al sustrato. El complejo APC/C reconoce motivos específicos presentes en la estructura primaria del sustrato, como los motivos D-box o KEN-box, mientras que los complejos SCF, en la mayoría de los casos, solo reconocen al sustrato después de su fosforilación en unos determinados residuos mediada por quinasas específicas (Yamasaki & Pagano, 2004).

3.3.1. Control del ciclo celular por el complejo APC/C

Según lleve unida la proteína activadora Cdc20 o Cdh1, el complejo APC/C actúa sobre unos sustratos diferentes en el período del ciclo celular que va desde mitad de la mitosis hasta el final de la fase G1, jugando un papel fundamental en el control de la progresión mitótica, la salida de mitosis y el establecimiento de G1 (Nakayama & Nakayama, 2006).

APC/C^{Cdc20} está activa desde prometafase hasta telofase y entre sus sustratos se encuentra la securina. Durante la metafase las cromátidas hermanas permanecen unidas gracias a la acción del complejo cohesina. La securina se une e inhibe a la separasa, que es una enzima que rompe el complejo cohesina dando lugar a la separación de las cromátidas hermanas. La degradación de la securina por APC/C^{Cdc20} permite, por tanto, el inicio de la anafase. La actividad de APC/C^{Cdc20} está controlada por el punto de control del ensamblaje del huso mitótico. En presencia de cinetocoros no ensamblados al huso mitótico proteínas como Mad2 y BubR1 se activan y se unen a Cdc20 inhibiendo su función. De esta manera se evita que la anafase comience antes de que los cromosomas están correctamente alineados y fijados al huso mitótico lo que podría conducir a defectos en la segregación cromosómica. Además de la separasa, la E3 ligasa APC/C^{Cdc20} también controla la degradación de las ciclinas mitóticas, Ciclina B y Ciclina A, disminuyendo la actividad de CDK1 (Peters, 2006).

APC/C^{Cdh1} permanece inactiva desde el final de la fase G1 hasta mitosis tardía debido, en parte, a la fosforilación de Cdh1 mediada por CDKs que previene su unión al complejo APC/C. La disminución de la actividad de CDK1 en mitosis conduce a la activación del complejo

APC/C^{Cdh1} (Skaar & Pagano, 2009). Entre sus sustratos se encuentran las quinasas mitóticas Aurora A, Aurora B y Plk1, las Ciclinas A y B y la fosfatasa Cdc25A lo que conduce a la completa inactivación de CDK1 y promueve la salida de mitosis. APC/C^{Cdh1} media, además, la degradación de Cdc20, inactivando el complejo APC/C^{Cdc20}, y de Skp2, una de las proteínas F-box implicadas en el control del ciclo celular por la ligasa E3 SCF, lo que resulta en la activación de los inhibidores de CDKs p21 y p27. La degradación de Skp2 al inicio de G1 evita la activación prematura del complejo SCF^{Skp2}, promotor de la entrada en fase S. En la transición G1/S la fosforilación de Cdh1 mediada por CDK2 conduce a su disociación de APC/C y a la inactivación del complejo. Posteriormente, en fase S un complejo SCF todavía por identificar promueve la degradación de Cdh1 (Bassermann et al., 2014).

La actividad APC/C está regulada además por su asociación con el pseudosustrato inhibidor EMI1 que facilita la inactivación de APC/C desde G1 tardía hasta mitosis temprana. Su degradación mediada por SCF^{β-TrCP} al inicio de mitosis permite la activación de APC/C (Frescas & Pagano, 2008).

3.3.2. Control del ciclo celular por el complejo SCF

El complejo SCF está implicado principalmente en la degradación de proteínas desde G1 hasta el principio de mitosis. Las proteínas F-box son los componentes del complejo SCF encargados del reconocimiento específico del sustrato proteico. Se clasifican en tres categorías: las que poseen dominios WD40 (FBXWs), las que contienen repeticiones ricas en leucinas (FBXLs) y las que contienen otros dominios (FBXOs). Las principales proteínas F-box implicadas en el control del ciclo celular son: Fbxw7 y β-TrCP, de la categoría FBXW, y Skp2, perteneciente a la clase FBXL (Nakayama & Nakayama, 2005).

SCF^{Skp2} está activo durante las fases S y G2 y es responsable de la degradación de varios reguladores negativos del ciclo celular entre los que se encuentran varios inhibidores de CDKs. La disminución de la actividad APC/C^{Cdh1} al final de G1 conduce a la acumulación de su sustrato Skp2 y, como consecuencia, a la degradación proteasomal de p21, p27 y p57, lo que

conlleva la activación de CDK1 y CDK2 y la progresión por las fases S, G2 y M. Debido a su papel promotor de la división celular este complejo ubiquitina ligasa se comporta como un oncogén y es frecuente encontrarlo sobreexpresado en cánceres humanos (Frescas & Pagano, 2008).

SCF ^{β -TrCP} está implicado en la degradación de proteínas que juegan un papel tanto positivo como negativo en la progresión por el ciclo celular pudiendo comportarse como oncogén o como supresor tumoral. Entre sus dianas se encuentran las fosfatasa Cdc25A y Cdc25B, que contribuyen a la activación de las CDKs mediante la eliminación de residuos fosforilados, y la quinasa Wee1, que fosforila CDK1 inhibiendo su actividad. SCF ^{β -TrCP} está implicado en la respuesta al daño en el ADN contribuyendo a la disminución de la actividad CDK1 mediante la degradación de Cdc25A, previniendo así la progresión por el ciclo celular antes de que el ADN esté reparado (Chen et al., 2015).

SCF^{Fbxw7} está considerado un supresor tumoral debido a que está implicado en la degradación proteica de numerosos oncogenes entre los que se encuentran la Ciclina E, cMyc, cJun y Notch-1 (Welcker & Clurman, 2008).

En la Figura 8 se muestra un esquema del control de las diferentes fases del ciclo celular mediado por el sistema ubiquitina-proteasoma.

3.4. Fbxw7

Fbxw7 es el componente encargado del reconocimiento del sustrato en el complejo ligasa E3 de ubiquitina SCF^{Fbxw7}. La proteína Fbxw7 humana tiene 3 isoformas, α , β y γ , producidas por splicing alternativo de su mARN. Cada mARN consiste en un primer exón específico de cada isoforma seguido de diez exones comunes, lo que permite un control transcripcional distinto para cada isoforma. El extremo N terminal variable contiene las señales de localización que dirigen a cada isoforma a un compartimento subcelular: Fbxw7 α , que es la isoforma más abundante, se localiza en el nucleoplasma, Fbxw7 β en el citoplasma y Fbxw7 γ en el nucleolo. Las tres isoformas comparten varios dominios de interacción con proteínas: el dominio F-box, que recluta al resto del complejo ligasa de ubiquitina SCF mediante su unión

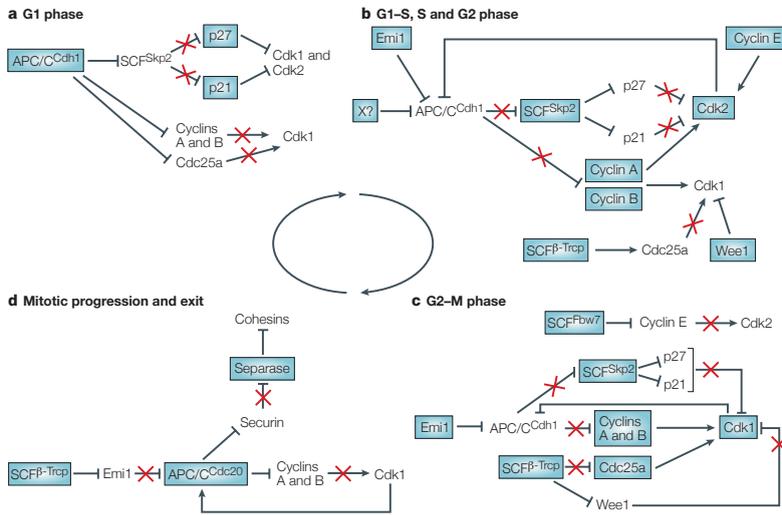


Figura 8: Esquema del control de la progresión por ciclo celular mediado por el sistema ubiquitina-proteasoma. Las cajas azules indican proteínas activas, mientras que los nombres sin caja indican proteínas inactivas o degradadas. Durante G1 (a) las quinasas CDK1 y CDK2 se mantienen inhibidas por la presencia de los inhibidores p27 y p21 y por la degradación de las Ciclinas A y B y de Cdc25A por APC/C^{Cdh1}. A partir de G1/S (b) Emi1 se une e inhibe a APC/C^{Cdh1}, el complejo SCF^{Skp2} se activa y ubiquitina p21 y p27, las Ciclinas E y A se unen y activan a CDK2 que, a su vez, contribuye a la inactivación de APC/C^{Cdh1} mediante la fosforilación de Cdh1. La quinasa CDK1 permanece inactiva por la fosforilación mediada por Wee1 y la degradación de la fosfatasa Cdc25A por SCF^{Trcp}. A medida que avanza la fase S la Ciclina E es autofosforilada por el complejo CDK2-Ciclina E lo que conduce a su degradación por SCF^{Fbw7} (c). En G2 tardía SCF^{Trcp} promueve la activación de CDK1 mediante la degradación de Wee1. En mitosis (d) SCF^{Trcp} degrada Emi1 liberando al complejo APC/C de su inhibidor. El complejo APC/C^{Cdc20} degrada la securina dando inicio a la anafase y degrada las Ciclinas A y B inactivando a la quinasa CDK1 (Cardozo & Pagano, 2004).

directa a Skp1, el dominio WD40 que media el reconocimiento del sustrato y un dominio de dimerización (DD) (Welcker & Clurman, 2008).

La unión de Fbxw7 al sustrato proteico a través del dominio WD40 se produce tras su fosforilación en un motivo consenso denominado fosfodegrón. Este motivo, presente en todos los sustratos conocidos de Fbxw7, consiste en un residuo fosforilable en la posición central seguido de una prolina y de otro residuo fosforilable en posición +4. La fosforilación del residuo fosforilable central es mediada, en muchos casos, por la quinasa GSK3. En algunos sustratos la secuencia del fosfodegrón se aleja ligeramente de la óptima, por ejemplo por la presencia de un aminoácido cargado en lugar del residuo fosforilable en posición +4, lo que disminuye su afinidad por la proteína F-box (Cheng & Li, 2012; Davis et al., 2014).

La proteína Fbxw7 puede dimerizar a través de su dominio D. La presencia de dos dominios WD40 permite la unión simultánea de dos fosfodegrones que pueden estar localizados en la misma proteína, como ocurre en el caso de la Ciclina E (Welcker & Clurman, 2007). Además, la dimerización promueve la degradación del sustrato ya que amplía el número de residuos de lisina del sustrato susceptibles de ser ubiquitinados (Davis et al., 2014)

La mayoría de los sustratos de Fbxw7 son oncogenes implicados en un amplio rango de cánceres humanos entre los que se encuentran la Ciclina E, cMyc, Notch, cJun, mTOR o Aurora A. Fbxw7 es, por tanto, un supresor tumoral y se han encontrado mutaciones en varias neoplasias humanas incluyendo cáncer de colon, estómago, colangiocarcinoma y leucemia linfoblástica aguda de células T (Akhoondi et al., 2007; Welcker & Clurman, 2008). Entre las mutaciones más frecuentes se encuentran aquellas que afectan a los residuos de arginina implicados en el establecimiento de las interacciones con el fosfodegrón de los sustratos (R465, R479 y R505) (Hao et al., 2007; Orlicky et al., 2003) lo que conduce a una reducida afinidad de los sustratos por Fbxw7. Otro mecanismo de inactivación de Fbxw7 descrito en cánceres humanos incluye la acción de varios miARNs oncogénicos que suprimen la expresión de Fbxw7 (Wang et al., 2014).

4. El complejo transcripcional AP-1

4.1. Miembros del complejo transcripcional AP-1

El complejo transcripcional AP-1 está compuesto por distintas combinaciones de dímeros formados por factores de transcripción que contienen en su estructura el motivo de cremallera de leucina (bZIP). Los componentes del complejo AP-1 más conocidos son los miembros de la familias Jun (cJun, JunB y JunD) y Fos (cFos, FosB, Fra1 y Fra2), los cuales se unen al ADN mediante un motivo básico de unión a ADN. Miembros de las familias ATF (ATF2, ATF3 y B-ATF), MAF (v-Maf, c-Maf, MafB, MafF, MafG,

MafK y Nrl) y las parejas de dimerización de Jun (JDP1 y JDP2) son también parte del complejo transcripcional AP-1 (Jochum et al., 2001; Shaulian & Karin, 2001).

4.2. Regulación de la actividad AP-1

La actividad de los diferentes miembros del complejo transcripcional AP-1 depende del contexto celular en el que se expresen. Pueden tanto activar como reprimir la transcripción de sus genes diana y entre los mecanismos que afectan a su actividad se incluye su regulación transcripcional y post-traducciona, la dimerización selectiva entre los diferentes miembros y las interacciones con otras proteínas reguladoras (Chinenov & Kerppola, 2001).

4.2.1. Regulación transcripcional y post-traducciona

La transcripción de los miembros de la familia AP-1 es inducida de manera rápida y transitoria por diferentes estímulos tales como factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias o estreses genotóxicos como la radiación UV, que desencadenan la activación de las MAPKs de las familias JNK, ERK1/2 o p38. Las MAPKs fosforilan diferentes factores de transcripción que activan la expresión de los distintos miembros AP-1 aumentando, por tanto, el número de complejos AP-1 y afectando, como consecuencia, la transcripción de los genes diana de AP-1 (Eferl & Wagner, 2003; Shaulian & Karin, 2002).

Además de inducir su expresión transcripcional, las MAPKs pueden fosforilar directamente a los miembros AP-1 regulando su actividad. Por ejemplo, la quinasa JNK se une a cJun y lo fosforila en su extremo N terminal lo que resulta en un aumento de su capacidad transcripcional y de su estabilidad proteica. La habilidad de JNK para fosforilar JunB es más controvertida. Posee un sitio de unión para JNK pero carece de los residuos de serina aceptores e inicialmente se descartó que fuera fosforilado por esta quinasa (Kallunki et al., 1996). Sin embargo, un estudio posterior (Li et al., 1999) mostró que JNK sí fosforila a JunB en las treoninas 102 y 104 afectando

a su habilidad para controlar la expresión de IL-4 en células T (Eferl & Wagner, 2003; Shaulian, 2010).

La actividad de los miembros de la familia AP-1 también puede verse afectada por otras modificaciones post-traduccionales como ubiquitinación o sumoilación. JunB, por ejemplo, es sumoilado en células T lo que regula su habilidad para inducir la expresión génica de determinadas citoquinas (Garaude et al., 2008).

4.2.2. Composición del dímero formado

Los componentes del complejo transcripcional AP-1 poseen en su estructura proteica dos importantes dominios estructurales: un dominio de unión al ADN y un dominio de cremallera de leucina. La dimerización a través de este último es esencial para que se produzca la unión al ADN. Gracias a ella se produce el solapamiento entre las dos regiones básicas de unión al ADN formándose una superficie continua de contacto con el ADN en la que cada monómero interacciona con unos residuos específicos del ADN (Figura 9) (Chinenov & Kerppola, 2001; van Dam & Castellazzi, 2001).

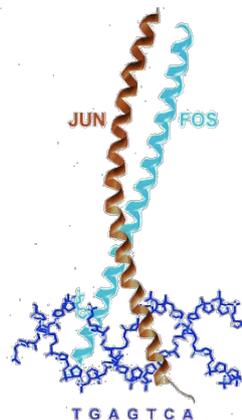


Figura 9: Estructura del complejo transcripcional AP-1 unido al ADN. Se muestra la estructura del heterodímero cJun-cFos unida a una secuencia TRE del ADN. Adaptado de (Chinenov & Kerppola, 2001).

Los diferentes miembros AP-1 pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros transcripcionalmente activos, a excepción de los

miembros de la familia Fos que sólo son capaces de formar heterodímeros con otros miembros AP-1. Las afinidades de unión al ADN y las capacidades de transactivación varían considerablemente entre los diferentes miembros AP-1. En el caso de la familia Jun, por ejemplo, cJun es el que exhibe un mayor potencial transactivador que aumenta al heterodimerizar con cFos mientras que su dimerización con JunB lo atenúa. Además, diferentes dímeros AP-1 pueden actuar antagonistamente sobre la expresión de un mismo gen (Bakiri et al., 2000; Jochum et al., 2001; Shaulian & Karin, 2001).

Los dímeros AP-1 se unen al ADN a través de elementos de respuesta a TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), conocidos como motivos TREs (5'-TGAG/CTCA-3'), y de elementos de respuesta a cAMP, o motivos CREs (5'-TGAGCTCA-3'), que se encuentran en un amplio rango de promotores y regiones reguladoras del ADN. Los dímeros formados por Jun y Fos se unen con una afinidad ligeramente superior a la secuencia de reconocimiento AP-1/TRE frente a la secuencia AP-1/CRE. Sin embargo, su heterodimerización con miembros ATF suele dirigirlos preferentemente a secuencias CRE (Chinenov & Kerppola, 2001; Shaulian & Karin, 2001).

4.2.3. Unión a otras proteínas

Los factores de transcripción AP-1 también pueden interactuar con coactivadores transcripcionales que no se unen directamente al ADN y con otras proteínas de unión al ADN no relacionadas estructuralmente con ellas. Entre estas últimas se encuentran varios factores de transcripción como NFAT, ETS y SMAD que pueden activar o reprimir la transcripción en conjunción con las proteínas AP-1 mediante la unión a elementos reguladores adyacentes a los sitios AP-1. Los complejos multiproteicos formados son más estables que los complejos formados por los factores de transcripción individuales en sus correspondientes sitios de reconocimiento. Su interacción puede dirigir a los componentes AP-1 a secuencias promotoras que solo ligeramente se parecen a los motivos consenso AP-1 fomentando la unión a elementos reguladores a los que las proteínas

individuales no se unen. (Chinenov & Kerppola, 2001; Mehta-Grigoriou et al., 2001)

4.3. Funciones fisiológicas de AP-1. Implicación en cáncer

El complejo transcripcional AP-1 convierte las señales extracelulares en cambios de expresión de genes diana específicos que poseen sitios de unión AP-1 en su promotor o en regiones reguladoras. Sus efectos son variables y dependientes tanto del contexto celular como de los miembros AP-1 implicados. Puesto que los motivos AP-1 están presentes en un gran número de genes, AP-1 regula numerosos procesos celulares fundamentales incluyendo proliferación, diferenciación, respuesta inmune, apoptosis y respuesta a estrés, y es esencial para numerosas funciones fisiológicas a nivel de todo el organismo. AP-1 está implicado en diversas patologías, notablemente en cáncer debido a sus múltiples efectos sobre el destino celular (Eferl & Wagner, 2003; Piechaczyk & Farras, 2008; Shaulian & Karin, 2002).

El papel de AP-1 en la proliferación celular se sugirió inicialmente en base a la observación de que su actividad está inducida por estimulación mitogénica y que las diferentes proteínas Fos y Jun tienen patrones de expresión diferentes durante la progresión por el ciclo celular (Jochum et al., 2001). Actualmente, se han identificado diferentes genes diana de AP-1 que relacionan directamente la expresión de AP-1 con la maquinaria del ciclo celular y se ha observado que los diferentes miembros AP-1 pueden tener funciones opuestas en la regulación de la proliferación celular (Lopez-Bergami et al., 2009; Shaulian, 2010). Además de su habilidad para regular la proliferación celular y la supervivencia, las proteínas AP-1 son capaces de modular la matriz extracelular afectando, por tanto, la invasividad y las capacidades metastáticas del tumor (Eferl & Wagner, 2003) y contribuyen a la angiogénesis aumentando la habilidad de los tumores de adaptarse a la ausencia de oxígeno (Folkman, 2004; Laderoute, 2005). Además, la capacidad del complejo transcripcional AP-1 para regular las respuestas inflamatorias también contribuye al desarrollo del cáncer (Shaulian, 2010).

5. Papel de JunB en la proliferación celular

5.1. Regulación de JunB durante el ciclo celular

JunB se expresa en numerosos tipos celulares y su abundancia varía durante la progresión del ciclo celular. La expresión de JunB en células quiescentes es muy baja. Sin embargo, aumenta considerablemente en respuesta a la estimulación mitogénica alcanzando un máximo de expresión durante la transición G0/G1 antes de regresar a niveles intermedios. En células proliferativas, sus niveles son bajos durante las fases M y G1 temprana, aumentando a medida que la célula progresa a través de G1 y entra en la fase S, hasta experimentar una brusca caída en la transición G2/M (Figura 10) (Kovary & Bravo, 1991; Lallemand et al., 1997; Piechaczyk & Farras, 2008).

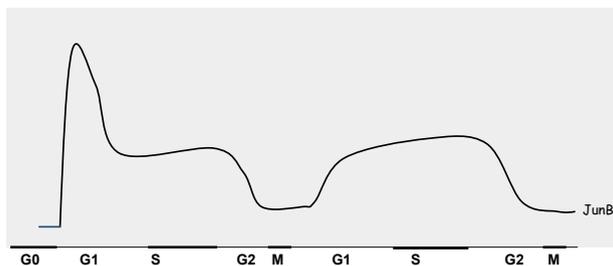


Figura 10: Variación de los niveles de JunB durante el ciclo celular. Adaptado de (Piechaczyk & Farras, 2008).

La regulación de los niveles de JunB durante el ciclo celular es necesaria para el correcto desarrollo del mismo. Si sus niveles se mantienen elevados en mitosis se produce un retraso considerable de la profase a la anafase y una citocinesis anormal (Farras et al., 2008). La disminución de los niveles de JunB en la transición G2/M es debida a su degradación mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma (Perez-Benavente et al., 2013). El mecanismo molecular encargado de su regulación ha sido objeto de estudio de esta tesis doctoral.

5.2. JunB: oncogén o supresor tumoral

Varios estudios sugieren que JunB es un regulador negativo de la proliferación celular. A diferencia de cJun cuya sobreexpresión es suficiente para la transformación de fibroblastos murinos inmortalizados, la sobreexpresión de JunB no solo no transforma estas células sino que inhibe la transformación mediada por cJun (Schutte et al., 1989). Además, fibroblastos embrionarios derivados de ratón transgénico donde JunB está sobreexpresado muestran una reducción significativa de la transformación mediada por v-ras o v-src. Estas células presentan defectos en la proliferación debido a la extensión de la fase G1. La acumulación de JunB induce la expresión del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} que inhibe la actividad quinasa del complejo CDK4/6-Ciclina D1 resultando en una fosforilación reducida de pRb y, por tanto, en una progresión retardada de la fase G1 a S (Passegue & Wagner, 2000). La sobreexpresión de JunB parece, además, tener un efecto antagónico en la inducción de Ciclina D1 mediada por cJun en G1 conduciendo a un bloqueo de las células antes de la entrada en la fase S (Bakiri et al., 2000).

La actividad antioncogénica de JunB ha sido confirmada también *in vivo* con el uso de ratones JunB deficientes que contienen un transgén JunB. Dicho transgén fue capaz de rescatar la letalidad producida en los embriones JunB deficientes, pero su expresión estaba silenciada en las células mieloides. La consecuencia observada fue el desarrollo de una leucemia mielode progresiva con un incremento en la proliferación de las células granulocíticas progenitoras (Passegue et al., 2001). En línea con los resultados obtenidos en los modelos experimentales de ratón, se ha observado la inactivación de la expresión de JunB por metilación de su promotor en pacientes con leucemia mielode crónica (Yang et al., 2003) y la disminución de su expresión en pacientes con leucemia mielode aguda (Dorsam et al., 2004; Steidl et al., 2006). Además, JunB regula negativamente la proliferación de células madre hematopoyéticas sugiriendo que los procesos oncogénicos que conducen a tumores mieloides comienzan en estas células (Passegue et al., 2004).

Sin embargo, JunB muestra también actividad promotora del crecimiento celular. La expresión de JunB es necesaria para la entrada de nuevo en el ciclo celular tras un estado quiescente (Kovary & Bravo, 1991). JunB puede cooperar con cJun en el desarrollo de fibrosarcoma en ratón (Bossy-Wetzel et al., 1992) y en ratones cJun deficientes es capaz de rescatar los defectos proliferativos asociados a la pérdida de cJun (Passegue et al., 2002). JunB activa la expresión de la interleuquina-4 y conduce a la diferenciación de linfocitos T helper (Li et al., 1999). Notablemente, la expresión de JunB es necesaria para la adecuada progresión de las células por la fase S del ciclo celular ya que activa transcripcionalmente a la Ciclina A2 (Andrecht et al., 2002). En línea con esta actividad promotora de la división celular, JunB está sobreexpresado en algunos cánceres humanos contribuyendo al desarrollo neoplásico, concretamente en linfoma anaplásico de células grandes (LACG) y ciertos linfomas de Hodgkin (Mathas et al., 2002; Rassidakis et al., 2005) y también en cáncer de pecho y de estómago (Kharman-Biz et al., 2013; Lee & Kim, 2012).

La implicación de JunB en cáncer es, pues, dependiente del contexto celular. En la Figura 11 se muestran las dianas transcripcionales de JunB implicadas en el ciclo celular identificadas hasta la fecha que ponen de manifiesto el papel dual de este factor de transcripción en la promoción de la división celular.

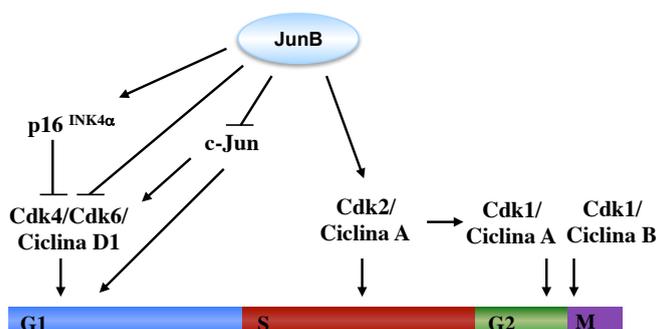


Figura 11: Papel dual de JunB en el ciclo celular. Entre las dianas transcripcionales conocidas de JunB se encuentran el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina p16^{INK4α} al que activa y la Ciclina D1 sobre la que ejerce una acción negativa. Es por ello que a JunB se le ha atribuido un papel como inhibidor de la proliferación. Sin embargo, JunB también tiene como diana transcripcional a Ciclina A2, a la que activa durante la fase S, jugando por tanto también un papel como promotor de la división celular. Adaptado de (Piechaczyk & Farras, 2008).

6. Linfoma anaplásico de células grandes

6.1. Características generales de LACG

El linfoma anaplásico de células grandes (LACG) es un tipo de linfoma no Hodgkin constituido por células T linfoides grandes y de formas irregulares con abundante citoplasma y núcleos polilobulados que expresan de manera constante el receptor CD30. Representa alrededor del 3% de todos los linfomas no Hodgkin en adultos y el 10-15% de los linfomas en niños y aproximadamente la mitad de ellos expresa de manera aberrante la proteína quinasa ALK debido a traslocaciones cromosómicas que implican al locus de *ALK* (Medeiros & Elenitoba-Johnson, 2007). De ellas, la más común es t(2;5)(p23;q35) que fusiona el gen de la nucleofosmina (*NPM*) con el de *ALK* dando lugar a la proteína quimérica NPM-ALK que combina el dominio catalítico de ALK con el dominio N terminal de NPM (Morris et al., 1994). El gen *ALK* codifica un receptor tirosina quinasa de la superfamilia de los receptores de insulina y está normalmente silenciado en las células linfoides. Sin embargo, a consecuencia de la traslocación cromosómica se sitúa bajo regulación del promotor fuerte del gen de *NPM* que es expresado de forma ubicua. La proteína de fusión resultante dimeriza gracias a la presencia del dominio de oligomerización de NPM lo que da lugar a la autofosforilación de AKT y a su activación constitutiva (Amin & Lai, 2007; Palmer et al., 2009).

6.2. Mecanismos por los que NPM-ALK media el desarrollo tumoral

La oncoproteína NPM-ALK promueve el desarrollo tumoral a través de la interacción con numerosas moléculas que conducen a la activación de diversas rutas de señalización como son JAK/STAT, PI3K/AKT y MEK/ERK dando lugar a una proliferación celular incrementada y a la inhibición de la apoptosis (Amin & Lai, 2007; Chiarle et al., 2008). Algunos de los mecanismos descritos hasta la fecha mediados por estas rutas de señalización en LACG ALK+ y que contribuyen a la proliferación y la supervivencia celular se muestran en la Figura 12.

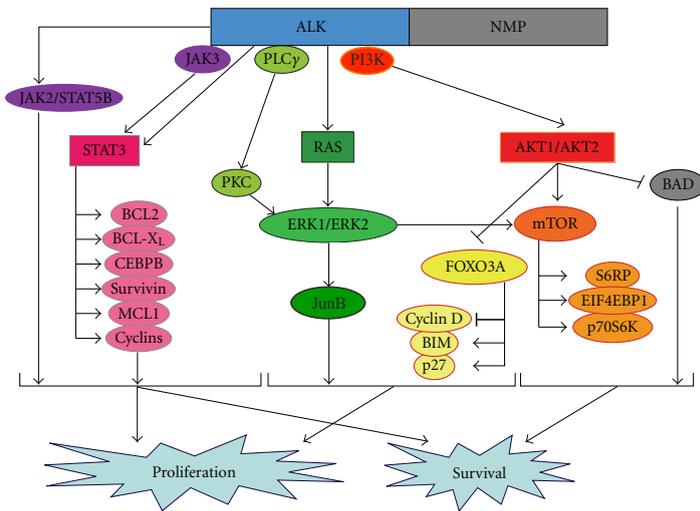


Figura 12: Esquema de las principales rutas de señalización activadas por la oncoproteína de fusión NPM-ALK en LACG ALK+. La activación constitutiva de ALK conduce a la activación de varias rutas de señalización que promueven la proliferación celular y la supervivencia. Modificado a partir de (Piccaluga et al., 2010).

6.2.1. Ruta de señalización JAK/STAT en LACG ALK+

Los factores de transcripción de la familia STAT se activan por fosforilación mediada por tirosina quinasas, lo que favorece su dimerización y su traslocación al núcleo donde activan la transcripción de numerosos genes. Una de las familias de tirosina quinasas que fosforila a los factores de transcripción STAT son las quinasas Janus (JAK) que se unen a receptores de citoquinas y se activan mediante su autofosforilación en residuos tirosina. Además de la familia JAK, los factores de transcripción STAT también pueden activarse mediante su interacción con receptores tirosina quinasa, tales como los receptores de factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y los epidérmicos (EGF), o por la acción de tirosinas quinasa citoplasmáticas, tales como Src y Abl (Levy & Darnell, 2002).

STAT3 está constitutivamente activo en LACG ALK+. NPM-ALK media esta activación de forma directa a través de su unión y fosforilación a STAT3 y de forma indirecta al unirse a JAK3 promoviendo su autofosforilación. Además, la expresión de la fosfatasa Shp1 que modula la señalización JAK/STAT vía su unión a JAK y la desfosforilación de residuos

clave de tirosina está disminuida, contribuyendo a la activación de STAT3. Este factor de transcripción ejerce sus efectos biológicos en LACG ALK+ regulando positivamente la expresión de múltiples genes que promueven la proliferación y la supervivencia celular. Además de JAK3/STAT3, JAK2/STAT5 también parece estar constitutivamente activada por NPM-ALK contribuyendo a la proliferación celular (Amin & Lai, 2007; Chiarle et al., 2008; Pearson et al., 2012).

6.2.2. Ruta de señalización PI3K/AKT en LACG ALK+

La ruta PI3K/AKT regula una amplia variedad de procesos celulares críticos para la tumorigénesis incluyendo proliferación, supervivencia, crecimiento y movilidad. La quinasa PI3K está compuesta por una subunidad catalítica (p110) y una reguladora (p85). NPM-ALK se une y activa PI3K a través de su subunidad reguladora p85 en células LACG ALK+ lo que conduce a la fosforilación de sus efectores AKT1/AKT2. AKT ejerce un efecto antiapoptótico secuestrando la proteína proapoptótica Bad. Previene además la localización nuclear del miembro FOXO3A de la familia de factores de transcripción Forkhead lo que conduce a la inhibición de su actividad transcripcional. Esto resulta en un aumento de la expresión de Ciclina D y una disminución de p27 y de BIM favoreciendo la supervivencia celular y la progresión por el ciclo celular. PI3K/AKT contribuye junto a la ruta MEK/ERK a la activación de mTOR en LACG favoreciendo la supervivencia celular. mTOR fosforila las proteínas p70S6K y S6RP que estimulan la traducción de proteínas y la biogénesis de ribosomas, estimulando el crecimiento celular. Fosforila también a la proteína de unión del factor eucariótico de iniciación 4E, EIF4EBP1, lo que conduce a su disociación de EIF4E promoviendo la traducción de mARNs dependiente de caperuza (Amin & Lai, 2007; Chiarle et al., 2008; Pearson et al., 2012).

6.2.3. Ruta de señalización MEK/ERK en LACG ALK+

La señalización mediada por las quinasas ERK1/ERK2 promueve proliferación, supervivencia celular, diferenciación y migración. Estas

serina/treonina quinasas son activadas por muchos factores de crecimiento a través de una cascada de quinasas que es iniciada por la activación de la GTPasa Ras. Ras activa a Raf-1 que a su vez activa las quinasas MEK1/2 que finalmente fosforilan y activan ERK1/ERK2. La activación de Ras por tirosinas quinasas es mediada vía proteínas adaptadoras que contienen dominios SH2 y SH3 tales como Grb2, Shc e IRS-1, las cuales interaccionan con NPM-ALK en LACG ALK+ induciendo la activación de Ras y la consecuente activación de ERK1/2 (Amin & Lai, 2007; Pearson et al., 2012).

Por otro lado, la fosfolipasa C gamma (PLC- γ) está físicamente asociada a NPM-ALK y contribuye a su potencial transformante. La activación de PLC- γ a través de su interacción con receptores tirosina quinasas conduce a la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) en dos mensajeros secundarios: inositol trifosfato (IP3) soluble y diacilglicerol (DAG) (Akhoondi et al., 2007) asociado a membrana. IP3 estimula la liberación de calcio del retículo endoplasmático y DAG se une y activa a la quinasa PKC contribuyendo al activación de ERK1/ERK2. Dos principales efectores de la señalización mediada por MEK/ERK en LACG ALK+ son JunB y mTOR (Amin & Lai, 2007; Chiarle et al., 2008; Pearson et al., 2012).

6.3. Papel de JunB en LACG ALK+

La transcripción de JunB está promovida por la señalización MEK/ERK en LACG ALK+. Las quinasas ERK1/ERK2 fosforilan el factor de transcripción Ets-1 que promueve la transcripción de JunB. Además, la señalización mediada por mTOR estimula la traducción de JunB en estas células contribuyendo a su acumulación (Staber et al., 2007; Watanabe et al., 2012).

JunB juega un papel esencial en la patogénesis de LACG en parte a través de la inducción del promotor de CD30 (Watanabe et al., 2005). CD30 es un receptor transmembrana y miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) cuya expresión se encuentra incrementada en otros tipos de linfoma además de LACG como son el linfoma de Hodgkin o ciertos linfomas difusos de células B grandes (de Leval & Gaulard, 2010). En todos estos linfomas se encuentra una correlación entre los altos niveles de CD30 y la expresión incrementada de

JunB (Rassidakis et al., 2005). De hecho, se ha identificado un mecanismo autoregulatorio por el cual CD30, a su vez, induce la expresión de JunB a través de la ruta de señalización de la MAPK ERK1/2, contribuyendo de esta manera a mantener elevados sus niveles de expresión (Watanabe et al., 2005). Además de su papel en la inducción de CD30, también se ha descrito un papel de JunB como activador transcripcional de la serina proteasa citotóxica Granzima B que podría estar implicada en la invasividad del LACG ALK+ (Pearson et al., 2011).

Pese al reconocido papel de JunB en la patogénesis de estos linfomas, los mecanismos moleculares por los que JunB contribuye a su desarrollo neoplásico están poco caracterizados.

Objetivos

Los objetivos planteados para esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Caracterización del mecanismo molecular que regula el recambio metabólico de JunB en la transición G2/M del ciclo celular.
2. Identificación de nuevas dianas transcripcionales de JunB implicadas en el control del ciclo celular a través de las cuales pudiera estar contribuyendo al desarrollo tumoral.

Metodología

1. Obtención de ADNs

1.1. ADNs y plásmidos

Los plásmidos pTRE2, pIRES2-EGFP y pHygr son de Clontech y pcDNA3 de Invitrogen.

Los diferentes mutantes de JunB se generaron mediante mutagénesis dirigida con el kit QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis de Stratagene a partir de JunB etiquetado con el epítipo HA y clonado en el vector pcDNA3 (Farras et al., 2008).

Los plásmidos para la generación de las líneas celulares estables, pTRE2-JunB-HA-IRES-EGFP y pTRE2-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB-HA-IRES-EGFP, se obtuvieron por clonación de JunB-HA y S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB-HA en pTRE2-IRES-EGFP (Farras et al., 2008).

En la Tabla 1 se muestra la procedencia de las construcciones de ADN utilizadas que no fueron generadas en el laboratorio.

1.2. Transformación de bacterias por choque térmico

La transformación de bacterias químicamente competentes One Shot TOP 10 *E. Coli* (Invitrogen) se llevó a cabo por choque térmico. Para ello se introdujo

Tabla 1: Construcciones de ADN utilizadas

Construcción ADN	Procedencia
AKT(E40K)-HA	P.K. Vogt (The Scripps Research Institute)
Flag-Cdc20	M. Pagano (Howard Hughes Medical Institute)
Flag-Cdh1	M. Pagano (Howard Hughes Medical Institute)
DDX11-Flag	E. Noguchi (Drexel University College of Medicine)
Flag-Fbxw7αR465A	C. Bonne-Andrea (Centre Reserche Biochimie Macromoléculaire)
Flag-Fbxw7α	O. Sangfelt (Karolinska Institutet)
Myc-GSK3β	Addgene
His₆-Ubiquitina	M.S. Rodríguez (CIC bioGUNE)
Flag-Skp2	M. Pagano (Howard Hughes Medical Institute)

el ADN en un vial de células y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. A continuación se realizó el choque térmico incubando las células a 42°C durante 45 segundos seguido de 2 min de incubación en hielo. Se añadió 1 ml de medio LB (10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de bacto-extracto de levadura y 10 g/l de NaCl) y las células se incubaron durante 1 h a 37°C. Finalmente, se sembraron las células en placas de LB-agar (medio LB con 15 g/l de bacto-agar) conteniendo los antibióticos adecuados para la selección y se dejaron crecer un mínimo de 16 h a 37°C.

1.3. Purificación del ADN plasmídico

El ADN plasmídico utilizado en los experimentos se obtuvo de los cultivos de *E. Coli*. Se aislaron colonias de las placas de LB-agar y se crecieron en medio LB selectivo durante 16 h a 37°C y en agitación.

Para la identificación de transformantes positivos se utilizó un método de purificación de ADN plasmídico a pequeña escala. Las colonias aisladas de las placas de LB-agar se crecieron en 3 ml de medio LB selectivo y se utilizó el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche. La extracción de ADN plasmídico a gran escala se llevó a cabo con el kit Nucleobond Xtra Maxi de Macherey-Nagel partiendo de 250 ml de cultivo.

Ambos kits se basan en el método alcalino de lisis (Birnboim & Doly, 1979) y utilizan columnas de intercambio aniónico para purificar el ADN plasmídico. Una vez eluido el ADN se resuspendió en Tris 10 mM a pH 8.

1.4. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TAE (40 mM de Tris-acetato y 1 mM de EDTA) con una concentración de agarosa entre el 1 y el 2 % en función del tamaño de los fragmentos a resolver y en presencia de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de ADN. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6x de Fermentas y la electroforesis se llevó a cabo a 90 V en tampón TAE. Se utilizaron marcadores de ADN de Fermentas para estimar el tamaño de los fragmentos y se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador de luz UV de Bio-Rad.

2. Cultivo celular de líneas celulares de origen humano

Todos los medios de cultivo, antibióticos y suplementos utilizados en el mantenimiento y la generación de las líneas celulares fueron adquiridos de Gibco, excepto el medio de cultivo DMEM y el antibiótico tetraciclina que son de Sigma, el suero bovino fetal que es de Hyclone y la higromicina B que es de Invitrogen.

2.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas son de origen humano (Tabla 2) y su mantenimiento se realizó a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Para su manipulación en condiciones de esterilidad se utilizó una cabina de flujo laminar tipo IIA de Telstar.

Las células U2OS, UTA6, HeLa y HEK293T se crecieron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) y las células DLD1 y DLD1^{FBXW7^{-/-}} en medio McCoy's 5A. Todas estas líneas celulares crecen adheridas a la placa de cultivo y para despegarlas se utilizó tripsina-EDTA al 0.05%. Las líneas celulares Jurkat, Karpas 299 y SU-DHL1 crecen en suspensión y en medio de cultivo RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640. Todos los medios fueron suplementados con un 10% de suero bovino

Tabla 2: Líneas celulares utilizadas

Línea celular	Tipo celular	Procedencia
U2OS	Osteosarcoma	Cedidas por Veronique Baldin (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire-CNRS)
UTA6	Osteosarcoma (clon derivado de U2OS)	Cedidas por Veronique Baldin (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire-CNRS)
HEK293T	Embrionarias de riñón	Cedidas por Erwin Knecht (Centro de Investigación Príncipe Felipe)
Hela	Adenocarcinoma de cérvix	Cedidas por Jonathon Pines (The Gurdon Institute and Department of Zoology, University of Cambridge)
DLD1	Adenocarcinoma de colon	Cedidas por Bert Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute)
DLD1^{FBXW7-/-}	Adenocarcinoma de colon	Cedidas por Bert Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute)
Jurkat	Leucemia de células T	Cedidas por Eloísa Jantus (Hospital General de Valencia)
Karpas 299	Linfoma anaplástico de células grandes	Colección alemana de microorganismos y cultivo celular (DSMZ)
SU-DHL1	Linfoma anaplástico de células grandes	Colección alemana de microorganismos y cultivo celular (DSMZ)

fetal, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. En el caso de las Jurkat también se añadió L-glutamina 2mM al medio de cultivo.

2.2. Generación de líneas celulares estables

Para generar líneas celulares estables que expresen de forma condicional JunB salvaje (wt-JunB) o el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se utilizó el sistema Tet-Off de Clontech. Este sistema de expresión se basa en la proteína represora Tet de *E. Coli* (TetR) que, en ausencia de tetraciclina, se une a secuencias del operador tet (tetO) bloqueando la transcripción de genes. La fusión entre una porción de TetR y la región C-terminal del dominio de activación VP16 del virus del Herpes simple convierte a tetR en un activador transcripcional. La proteína de fusión resultante (tTA) se une en ausencia de tetraciclina a secuencias TRE (elemento de respuesta a tetraciclina) constituidas por varias copias del operador tetO, activándose así la expresión del gen de interés (Figura 13).

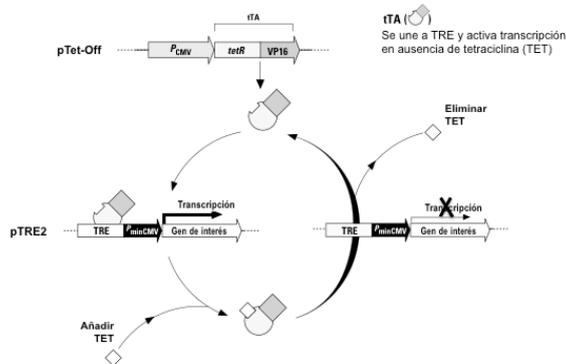


Figura 13: Sistema de expresión condicional Tet-Off. En ausencia de tetraciclina el elemento transactivador tTA expresado por el plásmido pTet-Off se une a la secuencia TRE del promotor del vector pTRE2 que lleva insertado el gen de interés y activa su expresión. Si hay presente tetraciclina, esta se une a tTA impidiendo su unión al promotor y, por lo tanto, la expresión del gen de interés. Modificado a partir de www.clontech.com

Las líneas celulares estables se generaron a partir de células UTA6 (Englert et al., 1995). Estas células son un clon estable derivado de células U2OS que llevan el plásmido regulador pTet-Off el cual expresa el elemento transactivador tTA. El vector pTRE2 contiene el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), constituido por varias secuencias tetO, y en él se insertaron las construcciones de ADN que expresan JunB salvaje o S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB, etiquetadas ambas con el epítipo HA, junto con la secuencia IRES-EGFP. Se generaron así vectores bicistrónicos en los que un solo promotor dirige la transcripción de un ARN mensajero que se traducirá finalmente en dos proteínas independientes (Figura 14). De esta manera, la expresión de la proteína fluorescente GFP sirve para identificar las células que se han transfectado con éxito y que, por tanto, también expresarán la proteína de interés.

Células UTA6 se crecieron en medio DMEM suplementado con suero, penicilina/estreptomicina y con 500 µg/ml del antibiótico genético (G418) que selecciona las células portadoras del plásmido pTet-Off. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se cotransfectaron con 1 µg del plásmido pTRE2-JunB-HA-IRES-EGFP, pTRE2-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB-HA-IRES-EGFP o el plásmido pTRE2-IRES-EGFP sin JunB para generar la línea celular UTA6-Control y con 0.33 µg del plásmido pHygr que confiere

resistencia a higromicina usando el reactivo de transfección FuGENE HD de Roche a una ratio ADN:FuGENE de 1:3 y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transfección se realizó en presencia de 1 µg/ml de tetraciclina y se utilizó medio de cultivo OptiMEM para preparar la mezcla de transfección.

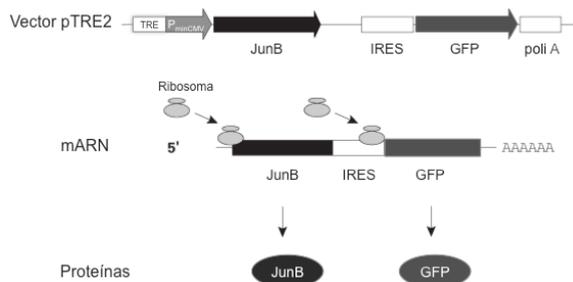


Figura 14: Esquema del vector bicistrónico utilizado. La ORF o pauta abierta de lectura de JunB está clonada tras el promotor controlado por tetraciclina y a continuación se encuentra la secuencia IRES seguida de la ORF de GFP. Los ribosomas se unen tanto al extremo 5' de JunB como a la secuencia IRES del mARN transcrito traduciéndolo a dos proteínas independientes. Modificado a partir de www.clontech.com.

Transcurridas 24 h se cambió el medio de cultivo por medio selectivo conteniendo, además de 500 µg/ml de G418 y 1 µg/ml de tetraciclina, 150 µg/ml de higromicina B y se mantuvieron en cultivo durante varias semanas. La expresión de GFP en los clones resistentes se comprobó mediante microscopía de fluorescencia tras inducir las células durante 24 h en ausencia de tetraciclina.

Todos los clones resistentes de cada línea celular se juntaron y las poblaciones obtenidas se estimularon durante 24 h en ausencia de tetraciclina y se hicieron pasar a través de un separador celular de alta velocidad MoFlo (Beckman Coulter) en el servicio de Citómica del CIPF. Este sistema permite la separación de las células en función de alguna característica, como puede ser la emisión fluorescente. Las células pasan a través de un conducto donde son excitadas; sólo aquellas que expresen GFP emitirán fluorescencia lo que servirá de señal para ser separadas del resto. De esta manera se consiguieron poblaciones enriquecidas en clones positivos. Una vez recuperadas las células se mantuvieron en cultivo en presencia de 1 µg/ml de tetraciclina.

3. Tratamientos y ensayos celulares

Si no se especifica lo contrario, tras cada experimento las células se recogieron de la siguiente manera: las células adherentes se lavaron con PBS frío en la placa de cultivo y se recogieron en 5 ml de PBS frío con ayuda de un rascador. Las células sedimentaron tras centrifugar 5 min a 200 g a 4°C y se eliminó el PBS. En el caso de las células que crecen en suspensión, se recogieron directamente del frasco de cultivo, se centrifugaron 5 min a 200 g y se lavaron con PBS frío. En ambos casos las células se procesaron inmediatamente o se guardaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

3.1. Tratamientos farmacológicos

Cuando se indica las células se trataron con los compuestos recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3: Tratamientos farmacológicos

Compuesto	Efecto	Concentración	Casa comercial
Cicloheximida	Inhíbe la síntesis proteica	100 µg/ml	Fluka
Colcemida	Interfiere en la organización de los microtúbulos	1 µg/ml	Sigma
Inhibidor VIII GSK3β	Inhíbe la quinasa GSK3β	25 µM	Calbiochem
LYS294002	Inhíbe la quinasa PI3K	10-20 nM	Cell Signaling
MG132	Inhíbe el proteasoma	30 µM	Biomol
Nocodazol	Interfiere en la organización de los microtúbulos	40 ng/ml	Fluka
Timidina	En exceso inhíbe la síntesis de desoxinucleótidos	2.5 mM	Sigma

3.2. Sincronización de células

Para estudiar los fenómenos que ocurren en determinados momentos del ciclo celular es necesario obtener poblaciones de células que se encuentren sincronizadas en la misma fase del ciclo celular. La sincronización de células puede conseguirse mediante el uso de inhibidores específicos que bloquean la progresión a través de la fase S o de la mitosis (Jackman & O'Connor, 2001).

3.2.1. Sincronización en G1/S

Para lograr la sincronización de las células en la transición G1/S se suelen utilizar inhibidores químicos que bloquean la síntesis de ADN. Entre ellos se encuentra la timidina, que en exceso inhibe la síntesis de desoxinucleótidos.

Para la sincronización en G1/S de células U2OS o de las líneas celulares estables derivadas del clon UTA6 se realizó un doble bloqueo con timidina. Se sembraron 6×10^5 células en placas de 10 cm de diámetro y transcurridas 24 h se añadió al medio timidina a una concentración final de 2.5 mM. La timidina se dejó actuar 24 h, tiempo durante el cual las células que se hallaban en fase S quedaron bloqueadas y el resto siguió progresando por las diferentes fases del ciclo hasta alcanzar la fase S, quedando bloqueadas al inicio de la misma. Debido a que las células quedan bloqueadas a lo largo de toda la fase S y no en un punto concreto, un único bloqueo con timidina no es suficiente para obtener una buena sincronización. Se eliminó la timidina del medio lavando las células 3 veces con medio DMEM y se dejó que las células progresasen normalmente por el ciclo durante 12 h antes de añadir otra vez timidina a una concentración final de 2.5 mM. Este tiempo está optimizado de acuerdo al tiempo que las células tardan en completar su ciclo (que debe ser menor de 24 h) y es el adecuado para asegurar que las células bloqueadas al inicio de la fase S la completen totalmente antes del siguiente bloqueo y que las células que habían quedado bloqueadas al final de la fase S no dispongan de tiempo suficiente para completar el ciclo y volver a entrar en esa fase. La incubación con timidina durante otras 24 h conduce a que un elevado porcentaje de las células se encuentren al inicio de la fase S cuando se liberen del bloqueo. Esta liberación se produce eliminando la timidina del medio mediante 3 lavados con medio DMEM a 37°C. En este momento también se añadió 40 ng/ml de nocodazol para evitar que las células progresasen más allá de mitosis ya que el nocodazol interfiere en la polimerización de microtúbulos arrojando las células en prometafase. En el caso de las líneas celulares estables, la sincronización se realizó en presencia de tetraciclina, que fue eliminada del medio en este punto.

3.2.2. Sincronización en G2/M

Se puede lograr una población enriquecida en células en la transición G2/M mediante la adición de drogas tales como nocodazol o colcemida que intervienen en la polimerización de los microtúbulos provocando el bloqueo de las células en mitosis.

En el caso de las líneas celulares adherentes, la adición de 40 ng/ml de nocodazol al medio de cultivo entre 16 y 18 h antes de recoger las células fue suficiente para obtener una buena sincronización de las células en G2/M. Además, el hecho de que las células mitóticas experimentan un cambio de morfología haciéndose más redondas y perdiendo adherencia a la placa de cultivo, permite que mediante unos ligeros golpes se despeguen de la placa y puedan separarse de las células que permanecen adheridas a la placa, las cuales se encuentran mayoritariamente en fase G2.

En el caso de las líneas celulares procedentes de leucemia o linfoma el tratamiento con nocodazol se realizó durante 24 h y debido a que estas células crecen en suspensión no fue posible la separación entre las células en fase G2 y las mitóticas.

3.3. Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias se realizaron utilizando el reactivo de transfección FuGENE HD de Roche a una ratio ADN:FuGENE de 1:3. Este reactivo contiene una mezcla de lípidos y otros componentes que forma un complejo estable con el ADN facilitando su entrada en las células.

Se sembraron 3×10^5 células por pocillo cuando los ensayos se realizaron en placas de 6 cm de diámetro o 1.5×10^6 células cuando se utilizaron placas de 10 cm. Trascorridas 24 h se cambió el medio de cultivo suplementado con suero y antibióticos y se transfectaron entre 0.5 y 1 μ g de ADN en el caso de placas de 6 cm y entre 1.5 y 3 μ g para los ensayos en placa de 10 cm. La mezcla de los ADNs con el reactivo FuGENE HD se preparó en medio OptiMEM y se procedió siguiendo las instrucciones de Roche. Normalmente, las células se cotransfectaron con el plásmido pIRES-EGFP a modo de control de la transfección.

Cuando la transfección se realizó en alguna de las líneas celulares que expresan de forma condicional JunB, el medio de cultivo también contenía tetraciclina, la cual se eliminó en el momento de la transfección para permitir la expresión de JunB exógeno.

Transcurridas entre 24 y 48 h desde la transfección se recogieron las células y se congelaron a -80°C o se utilizaron inmediatamente para su análisis.

3.4. Silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia

La introducción de ARN pequeño de interferencia (siARN por *small interfering ARN*) en las células es una herramienta para silenciar de forma específica la expresión génica. Su acción se basa en la complementariedad de secuencia entre la hebra antisentido del siARN (hebra guía) y el ARN mensajero (mARN) del gen diana. Cuando el siARN penetra en la célula se ensambla con el complejo RISC y se unen al mARN diana provocando su ruptura y degradación (Rana, 2007) (Figura 15).

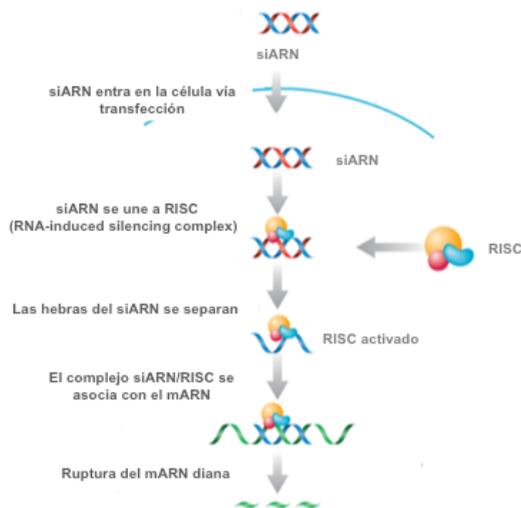


Figura 15: Silenciamiento génico mediado por ARN pequeño de interferencia (siARN). El oligonucleótido de ARN de secuencia complementaria al mARN diana se introduce en la célula por transfección donde se une al complejo RISC y se asocia al mARN diana provocando su ruptura. Modificado a partir de www.scbt.com

Se plaquearon 1.5×10^5 células por pocillo en placas de 6 cm en el caso de líneas celulares adherentes y 3×10^5 células en el caso de células en suspensión 24 h antes de la transfección. El siARN de interés se mezcló con 500 μ l de medio de cultivo OptiMEM y con 10 μ l del reactivo de transfección Interferine de Polyplus y tras 10 min de incubación a temperatura ambiente la mezcla se añadió a las células. Los oligonucleótidos utilizados vienen recogidos en la Tabla 4 y se usaron a una concentración final entre 8 y 100 nM dependiendo del siARN y de las células utilizadas. En todos los experimentos se transfectaron células en paralelo con un siARN control cuya secuencia no corresponde con ningún gen conocido. Cuando la disminución de la expresión del gen de interés no resultó eficiente se realizó un doble silenciamiento, repitiendo la transfección 16 h después de la primera con el fin de lograr un mejor silenciamiento.

En los experimentos en poblaciones celulares en crecimiento asincrónico las células se recogieron 48 h después de la transfección. En el caso de células sincronizadas en G2/M se añadió 40 ng/ml de nocodazol al medio transcurridas 24 h desde la transfección y se dejó actuar entre 16 y 24 h antes de recoger las células, bien todas juntas o bien separando las células mitóticas de las adherentes (mayoritariamente en fase G2).

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados en el silenciamiento génico

Gen diana	Referencia y casa comercial
JUNB-792	hebra sentido, 5'-AGACCAAGAGCGCAUCAAA-3' de Eurogentec
JUNB-848	NM_002229 SASI_Hs01_00204774 de Sigma
GSK3α	s6236 de Ambion
GSK3β	s6241 de Ambion
CCNA2	ON-Targetplus SMART pool L-003205-00-0005 de Dharmacon
CCNB1	ON-Targetplus SMART pool L-003206-00-0005 de Dharmacon
Control	Silencer Negative control No. 1 siRNA AM4611 de Ambion

3.5. Ensayos de vida media

Para estudiar la estabilidad de JunB y de sus diferentes mutantes se analizó la disminución de los niveles de proteína en presencia de cicloheximida que es un inhibidor de la síntesis proteica. Células UTA6 se cotransfectaron con 1 μ g de JunB-HA o sus mutantes, 1 μ g de Flag-Fbxw7 α o Flag-Fbxw7 α R465A y 0.5 μ g del plásmido pIRES2-EGFP que sirvió de control de

la transfección. Transcurridas 24 h se añadió 100 µg/ml de cicloheximida y se recogieron las células a intervalos de 2 h para preparar extractos proteicos.

Cuando en el ensayo de vida media se estudió la estabilidad de JunB en presencia del inhibidor VIII de GSK3β este se añadió 3 h antes de la adición de cicloheximida a una concentración final de 25 µM.

El análisis de los niveles de proteínas se realizó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia como se describe en los apartados 5.3 y 5.4. La densidad de las bandas obtenidas fue cuantificada usando el programa ImageJ. En cada muestra los valores obtenidos para JunB se normalizaron respecto a los de GAPDH y se expresaron como porcentaje de la cantidad inicial de JunB.

4. Técnicas de análisis celular

4.1. Citometría de flujo

Para obtener información sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se empleó la citometría de flujo. Esta técnica permite el análisis célula a célula de diferentes parámetros, como son el tamaño y la complejidad celular y, en el caso de marcaje con algún fluorocromo, la emisión fluorescente.

4.1.1. Análisis del contenido de ADN de las células

Debido a la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular las células que se encuentran en G2 y en mitosis poseen el doble de ADN que las células que están en G1 o G0 y las células que están en S van aumentando su contenido en ADN a medida que la replicación avanza. Por lo tanto, la determinación del contenido en ADN de las células proporciona información sobre la fase del ciclo celular en la que se encuentran. Para determinar el contenido de ADN de cada célula se realizó un marcaje con

yoduro de propidio, fluorocromo que de forma estequiométrica se une a ADN o ARN intercalándose entre sus bases y se detectó su emisión fluorescente por citometría de flujo.

Las células se tripsinizaron y recogieron en PBS y se fijaron con etanol al 70% a -20°C durante 1 h como mínimo. A continuación se eliminó el etanol mediante dos lavados con PBS y las células se resuspendieron en 500 µl de solución de PBS conteniendo 50 µg/ml de yoduro de propidio y 0.1 mg/ml de RNasa A y se incubaron durante 30 min a 37°C en oscuridad. La medida de la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio se realizó en un citómetro de flujo FC500 de Beckman Coulter.

4.1.2. Ensayo de incorporación de EdU

Un método complementario al descrito en el apartado anterior y que proporciona una medida del número de células en fase S activa es la medida de la síntesis del ADN. Esta se puede realizar mediante un ensayo con el reactivo EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) (Invitrogen), nucleósido análogo a la timidina que se incorpora al ADN a medida que este se va sintetizando. Una vez incorporado su detección se realiza gracias a una reacción covalente tipo click entre el grupo alquino del EdU y una azida conjugada a un fluoróforo.

Las células se trataron con EdU 2 µM y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se tripsinizaron y recogieron en PBS y se fijaron con etanol al 70% a -20°C durante 1 h. Tras eliminar el etanol lavando con PBS se añadió la mezcla de reacción preparada según las indicaciones de Invitrogen conteniendo la azida conjugada al fluoróforo Alexa Fluor 488. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Tras un lavado con PBS las células se resuspendieron en 500 µl de solución de PBS conteniendo 4 µg/ml de yoduro de propidio y 0.1 mg/ml de RNasa A y se incubaron durante 30 min a 37°C en la oscuridad. La detección simultánea de la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio y por el fluoróforo Alexa Fluor 488 se realizó en el citómetro de flujo.

4.2. Microscopía de fluorescencia

Se colocaron láminas de 12 mm de diámetro en el fondo de las placas de cultivo donde se sembraron las células derivadas de UTA6 en medio suplementado con suero, penicilina/estreptomicina y tetraciclina. Al cabo de 24 h se eliminó la tetraciclina del medio de cultivo y la estimulación se mantuvo durante 24 h. Las células adheridas a las láminas se lavaron con PBS frío y se fijaron con para-formaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences) durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células con PBS frío y se añadieron 20 µl del medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories). El DAPI es un fluorocromo que se une al ADN de doble cadena y permite visualizar los núcleos de las células. Las láminas se colocaron en portaobjetos para visualizarlas con el microscopio de fluorescencia.

4.3. Análisis citogenéticos y FISH

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Juan Luis García del Centro de Investigación del Cáncer en Salamanca.

Células UTA6-Control y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB crecidas en ausencia de tetraciclina durante 72 h o células Karpas299 y SUDHL-1 se incubaron durante 2 h a 37°C con 1 µg/ml de colcemida, que interfiere en la polimerización de los microtúbulos, con el fin de obtener un mayor número de células metafásicas. A continuación se lavaron las células con PBS, se recogieron (mediante incubación con tripsina-EDTA en el caso de las células adherentes) y se centrifugaron 5 min a 200 g. Se eliminó el sobrenadante dejando unos 200 µl para resuspender las células, se añadieron 5 ml de citrato sódico al 0.8% y las células se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. La adición de una solución hipotónica hincha las células dando lugar a una mayor expansión de los cromosomas lo que facilita su posterior visualización. Tras centrifugar de nuevo 5 min a 200 g y eliminar el sobrenadante el precipitado se resuspendió completamente antes de añadir gota a gota 5 ml de solución fijadora compuesta por metanol y ácido acético glacial en proporción 3 a 1. Se centrifugó 5 min a 200 g y se repitió el paso de fijación. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 µl de la solución

fijadora y se dejó caer una gota de suspensión celular desde unos 10 cm de altura sobre un portaobjetos para microscopio. El fijador se evaporó durante 1 h a temperatura ambiente y los cromosomas condensados se trataron con tinción de Wright que tiñe los cromosomas con diferentes intensidades proporcionando un patrón de bandas específico conocido como bandeo-G (Moore, 2001). Se capturaron imágenes de las metafases utilizando el sistema CytoVision de Applied Imaging.

La técnica de hibridación fluorescente *in situ* o FISH (por *Fluorescence in Situ Hybridization*) permite visualizar regiones concretas de los distintos cromosomas mediante la utilización de sondas de ADN marcadas con un fluoróforo que hibridan con la región cromosómica de interés. Para marcar el centrómero del cromosoma 7 se utilizó la prueba CEP 7 (D7Z1) SpectrumGreen de Abbott Molecular que hibrida en el locus 7p11.1-q11.1 situado en el ADN satélite alfa que forma parte del centrómero. La hibridación se realizó utilizando el sistema HYbrite (Abbott Molecular) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las láminas se montaron en solución conteniendo 0.1 µg/ml de DAPI y se visualizaron mediante microscopía confocal. La distancia media entre los centrómeros se calculó utilizando el software OpenLab a una ampliación de 100X. Para cada experimento se contaron al menos 100 metafases.

5. Análisis de expresión proteica

5.1. Preparación de extractos proteicos

En el momento de la extracción proteica las células se descongelaron en hielo y dependiendo de la cantidad de células recogidas se añadió entre 50 y 150 µl de solución triplex (50 mM tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.01% SDS, 1% Igepal y 0.5% desoxicolato de sodio) conteniendo el cóctel de inhibidores de proteasas Complete de Roche. Las células se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 16000 g durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares.

5.2. Medida de la concentración de proteínas

La medida de la concentración de proteína en los extractos se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el desplazamiento del máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm que experimenta el colorante Brilliant Blue G al formar un complejo con proteínas. La absorbancia a 595 nm es proporcional a la cantidad de proteína.

Se mezclaron 200 μ l del reactivo de Bradford (Sigma) con 5 μ l de los extractos diluidos y se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm. Se empleó una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA para interpolar las concentraciones de las muestras.

5.3. Separación electroforética de proteínas

La separación de proteínas en condiciones desnaturizantes se llevó a cabo mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles de poliacrilamida utilizados se componen de dos regiones diferentes: la parte superior del gel o gel de empaquetamiento o concentrador, con un 5% de acrilamida-bisacrilamida a una ratio de 37.5:1 (Sigma), 0.1% de SDS y Tris 25 mM a pH 6.8, que permite que todas las proteínas se concentren en la superficie del gel inferior y este último, llamado gel de separación o de resolución, conteniendo entre un 8 y un 12.5% de acrilamida-bisacrilamida, en función del tamaño de las proteínas a resolver, 0.1% de SDS y Tris 375 mM a pH 8.8. Para la polimerización de ambos geles se añadió a las disoluciones 0.1% de persulfato amónico y 0.1% de TEMED.

Antes de cargar las proteínas en el gel los extractos proteicos se desnaturizaron mediante incubación a 95°C durante 5 min en solución Laemmli (2% SDS, 0.1 M DTT, 50 mM Tris a pH 6.8, 6% sacarosa y 0.1% azul de bromofenol). Se cargaron entre 10 y 50 μ g de proteína por pocillo y se utilizó el marcador de proteínas de amplio rango de Fermentas para estimar el tamaño de las proteínas separadas.

Los geles se corrieron a un voltaje inicial de 80 V, que se incrementó hasta los 120 V una vez las proteínas penetraron en el gel separador, en una solución conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS utilizando tanques y fuentes de alimentación de Bio-Rad.

5.4. Inmunotransferencia (Western blot)

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas de PVDF son muy hidrofóbicas por lo que antes de su uso se sumergieron en metanol durante 1 min, enjuagaron con agua y equilibraron en tampón de transferencia (0.6% tris y 0.31% ácido bórico). La transferencia se llevó a cabo en medio líquido durante 1 h a 4°C y 100 V o bien durante 16 h a 14 V y temperatura ambiente.

Para comprobar la eficacia de la transferencia las membranas de PVDF se tiñeron con solución de Ponceau S (0.1% Ponceau S y 1% ácido acético glacial) durante 5 min y destiñeron ligeramente en H₂O tipo II. Para eliminar completamente el tinte, las membranas se sumergieron en TBS-Tween durante 10 min.

Las proteínas inmovilizadas en las membranas se detectaron con anticuerpos específicos. Con el fin de bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos con la membrana, esta se incubó como mínimo durante 1 h con solución de bloqueo conteniendo un 5% de leche en polvo o, en el caso de la detección de proteínas fosforiladas, un 5% del reactivo de bloqueo Phosphoblocker de Cell Biolabs disueltos en el tampón de lavado TBS-Tween (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.05% Tween-20). A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 5) diluido en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente o durante 16 h a 4°C. Se realizaron tres lavados de 10 min con el tampón TBS-Tween antes de proceder a la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), enzima que cataliza la oxidación del luminol dando un producto luminiscente (Tabla 6). En el caso del anticuerpo primario anti- β -actina-HRP que directamente va conjugado a la HRP se realizó una única incubación de 1 h con el anticuerpo. Tras lavar la membrana tres veces con

TBS-Tween se realizó la detección quimioluminiscente con el kit Amersham ECL Western Blotting analysis system (GE Healthcare) o, para detecciones que requirieron una mayor sensibilidad, el sistema SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Para ambos revelados se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Se utilizaron películas fotográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

En algunas ocasiones, se eliminaron los anticuerpos unidos a las membranas mediante doble tratamiento de 10 min cada uno con 200 mM de glicina a pH 2.5 y 0.4% SDS. De esta manera las membranas pudieron utilizarse de nuevo para la detección de otras proteínas.

Tabla 5: Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia
Anti-AKT	Policlonal de conejo	1:1000	Cedido por D. Burks
Anti-Ciclina A2	Policlonal de cabra	1:1000	Santa Cruz Biotech, sc-596-G
Anti-Ciclina B1	Monoclonal de ratón	1:1000	Santa Cruz Biotech, sc-245
Anti-Ciclina D1	Monoclonal de ratón	1:500	Cell Signaling, 2926
Anti-DDX11	Monoclonal de ratón	1:2500	Abnova, H00001663-M03
Anti-Flag	Monoclonal de ratón	1:1000	Sigma, F3165
Anti-Fra1	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech, sc-605
Anti-Fra2	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech, sc-604
Anti-cFos	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech, sc-52
Anti-GAPDH	Monoclonal de ratón	1:3000	Chemicon, MAB374
Anti-GFP	Monoclonal de ratón	1:1000	Roche, 11814460001
Anti-GSK3	Monoclonal de ratón	1:1000	Calbiochem, 368662
Anti-GSK3-pS9	Policlonal de conejo	1:1000	Abcam, ab9769
Anti-GSK3-pS9/S21	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling, 9331
Anti-HA	Monoclonal de rata	1:1000	Roche, 11802600
Anti-JunB	Monoclonal de ratón	1:2500	Cedido por M. Yaniv
Anti-JunB-pS186*	Policlonal de conejo	1:1000	Eurogentec
Anti-JunB-pS251*	Policlonal de conejo	1:50	Eurogentec
Anti-JunB-pS259	Policlonal de conejo	1:1000	Abcam, ab30625
Anti-JunB-pT150*	Policlonal de conejo	1:1000	Eurogentec
Anti-JunB-pT255*	Policlonal de conejo	1:50	Eurogentec
Anti-cJun	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling, 9165
Anti-cJun-pS73	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling, 3270
Anti-JunD	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz Biotech, sc-74
Anti-β-actina-HRP	Monoclonal de ratón	1:10000	Abcam, ab20272

*Los anticuerpos contra JunB fosforilado en la S251, T255, T150 o S186 fueron obtenidos por Eurogentec tras inmunizar conejos con los péptidos EPQTVPEAR(p)SRDA, EARSRDA(p)TPPVSP, CHKMNHVT(p)TPNVS y CTNLSSYS(p)SASAS, respectivamente, acoplados a hemocianina de lapa californiana (keyhole limpet haemocyanin) y purificados por cromatografía de afinidad.

Tabla 6: Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial y referencia
Anti-cabra-HRP	Policlonal de asno	1:5000	Santa Cruz Biotech, sc-2033
Anti-conejo-HRP	Policlonal de asno	1:5000	Santa Cruz Biotech, sc-2317
Anti-rata-HRP	Policlonal de conejo	1:3000	Dakocytomation, P0450
Anti-ratón-HRP	Policlonal de conejo	1:5000	Sigma, A9044

6. Análisis de expresión génica

6.1. Extracción de ARN

La extracción del ARN se realizó con el kit Illustra RNAspin mini RNA isolation kit de GE Healthcare siguiendo sus instrucciones. Brevemente, las células se lisan en una solución conteniendo mercaptoetanol y gran cantidad de iones caotrópicos que desnaturalizan las proteínas, entre ellas las ribonucleasas, evitando así la degradación del ARN durante el proceso de extracción. Los ácidos nucleicos se unen a una membrana de sílice que es tratada posteriormente con DNasa I para eliminar al ADN. Tras lavar la membrana, el ARN se eluye con H₂O libre de RNasas.

La determinación de la concentración de las muestras reveló unas ratios OD_{260nm}/OD_{230nm} por debajo de los valores óptimos, lo que indicaba una posible contaminación con sales o compuestos aromáticos. Para purificar las muestras, la extracción de ARN se siguió de una precipitación con LiCl. La muestra se mezcló con un volumen igual de 6M LiCl (Sigma) y se incubó durante 2 h a -20°C. Se centrifugó 20 min a 16000 g y 4°C y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 30 µl de H₂O libre de RNasas y se comprobó que las ratios OD_{260nm}/OD_{230nm} eran superiores a 2 en todos los casos.

6.2. Medida de la concentración de ácidos nucleicos

Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Un valor de

OD_{260nm} de 1 corresponde a una concentración de 50 ng/μl en el caso de ADN de doble cadena y de 40 ng/μl en el caso de ARN. La calidad de las muestras se certificó por los ratios OD_{260nm}/OD_{280nm} que suele estar en el rango de 1.8 - 2 en muestras puras y OD_{260nm}/OD_{230nm} cuyos valores óptimos oscilan entre 1.8 y 2.2.

6.3. RT-qPCR

6.3.1. Transcripción reversa

En el estudio de la expresión de un determinado gen mediante PCR cuantitativa a tiempo real el primer paso es retrotranscribir el ARN mensajero a su ADN complementario (cADN). Para ello, se utilizó la transcriptasa reversa SuperScript III de Invitrogen. Entre 1 y 2 μg de ARN se mezclaron con 300 ng de una combinación aleatoria de cebadores, 1 μl de una mezcla equimolar de dNTPs 10 mM y H₂O libre de RNasas hasta un volumen final de 13 μl. El ARN se desnaturalizó durante 5 min a 65°C e inmediatamente se enfrió a 4°C durante 1 min. Se añadieron 4 μl del tampón de reacción al 5x, 1 μl de DTT 0.1 M, 1 μl de RNase Out y 1 μl de la transcriptasa reversa Superscript III y la muestra se incubó a 25°C durante 5 min seguido de 60 min a 50°C. La reacción se inactivó subiendo la temperatura a 70°C durante 15 min. El programa completo se realizó en un termociclador de Eppendorf.

6.3.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Las PCR cuantitativas se realizaron por triplicado con 1 μl de ADN a la dilución adecuada para conseguir unas condiciones de reacción óptimas y 5 μl de la mezcla de reacción Sybr Green I Master de Roche en un volumen final de reacción de 10 μl. La mezcla de reacción contiene además de la Taq polimerasa de ADN y los reactivos necesarios para la reacción de amplificación el fluoróforo Sybr Green. Esta molécula aumenta considerablemente su fluorescencia al intercalarse en el ADN de doble cadena y la detección de su emisión fluorescente permite calcular la

cantidad de ADN presente en una muestra. Los oligonucleótidos empleados así como la concentración a la que se utilizaron vienen recogidos en la Tabla 7. Excepto en los casos indicados los oligonucleótidos fueron encargados a Sigma.

Tabla 7: Oligonucleótidos cebadores para qPCR

Gen	Oligonucleótidos	Concentración
CCNA2	Directo 5'-ATCAGTTATTGCTGGAGCTGCCT-3'	0.3 µM
	Inverso 5'-TTCGTATTAATGATTCAGGCCAGCT-3'	0.05 µM
CCNE1	Directo 5'-AGACCCACAGAGACAGCTTGG-3'	0.5 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-CTGCTCTGCTTCTTACCGCTC-3'	
DDX11	PPH21151A de SABiosciences	0.4 µM cada oligonucleótido
ERCC2	Directo 5'-GTCACCATGGCAACCTTCACC-3'	0.5 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-CACAGCAATATCCTCCCGGGT-3'	
GAPDH	Directo 5'-CATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'	0.9 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-GTTACACCCATGACGAACAT-3'	
GUSB	Directo 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'	0.4 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA-3'	
JUNB	Directo 5'-CCCCTACCGGAGTCTCAAAGC-3'	0.5 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-GACAATCAGGCGTTCAGCTC-3'	
Promotor DDX11-A	Directo 5'-ATCTTCTGGGCTCTGCAA-3'	0.4 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-CGGAGAGATGGTGTCACTCA-3'	
Promotor DDX11-B	Directo 5'-GGAATGAGTGCACCTGACCA-3'	0.4 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-CTCCAACGTGCATCCTGAG-3'	
Promotor DDX11-C	Directo 5'-GAAAGGCTTGCTGCCCTTAT-3'	0.4 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-TTCAGCGTTCCTCTGCTTTT-3'	
Promotor GAPDH	Directo 5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3'	0.4 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'	
S26	Directo 5'-CTGCACTAACTGTGCCCGATGCGTG-3'	0.5 µM cada oligonucleótido
	Inverso 5'-GACGCTCGCTTCAGAAATGTCCCTG-3'	

La amplificación de los ADNs y la detección de la fluorescencia se llevaron a cabo en un termociclador LightCycler 480 de Roche. Las reacciones consistieron en una incubación previa de 5 min a 95°C para activar la Taq polimerasa de ADN, seguida de 45 ciclos de 10 segundos de desnaturalización del ADN a 95°C, 20 segundos a 60°C para permitir la unión de los cebadores y 20 segundos de elongación a 72°C. A continuación se realizó una curva de desnaturalización incrementando la temperatura desde 60°C a 97°C a una velocidad de 0.1°C/s para comprobar la especificidad de la amplificación.

Se realizó una cuantificación relativa de los datos según el método $\Delta\Delta Ct$ descrito por Applied Biosystems (Livak & Schmittgen, 2001)

normalizando las cantidades del gen de interés respecto a las de los genes de referencia *GAPDH*, *GUSB* y *S26*. Los resultados se expresaron como variaciones de expresión respecto a una muestra control.

6.4. Micromatriz para RT-qPCR de genes de ciclo celular

Para analizar simultáneamente la expresión diferencial de un conjunto de genes mediante RT-qPCR se utilizaron placas de 96 pocillos comercializadas por SABiosciences. Concretamente se utilizó la diseñada para estudiar genes implicados en el ciclo celular humano (Human Cell Cycle RT² Profiler PCR Array) que contiene oligonucleótidos específicos para 84 genes que juegan un papel clave en la regulación del ciclo celular.

Se sintetizó cADN a partir de 1 µg de ARN procedente de células UTA6-Control y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB (estimuladas durante 48 h en ausencia de tetraciclina) utilizando el kit RT² First Strand de SABiosciences y siguiendo sus indicaciones. Se añadió mezcla de reacción RT² qPCR Master Mix conteniendo Sybr Green (SABiosciences) a los cADNs sintetizados y cada muestra se repartió homogéneamente en una de las placas de 96 pocillos conteniendo los oligonucleótidos. Las reacciones de amplificación y la detección de la fluorescencia se llevaron a cabo en un termociclador LightCycler 480 de Roche.

Para el análisis de los resultados se exportaron los datos de los Ct obtenidos del termociclador a la plataforma de análisis proporcionada por SABiosciences (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com>) y la expresión de cada gen se normalizó respecto a la media de los cinco genes de referencia incluidos en la placa.

6.5. Análisis transcriptómico

Se realizó un análisis global de la expresión génica en células U2OS que fueron transfectadas con siARN control o con cada uno de los dos siARNs dirigidos contra *JUNB* (siJunB-792 y siJunB-848). 48 h después del silenciamiento se extrajo el ARN total de las células. Los ARNs procedentes de tres experimentos independientes se enviaron a la Unidad de

Investigación Genómica del CRP-Santé, en Luxemburgo, para su hibridación en una micromatriz comercial de Affymetrix conteniendo sondas específicas para más de 285.000 transcritos humanos (GeneChip Human Transcriptome Array 2.0). El análisis de los resultados se describe en el apartado 8.2.

7. Análisis de interacciones macromoleculares

7.1. Coimmunoprecipitación de proteínas

La asociación de proteínas *in vivo* se testó mediante coimmunoprecipitación de proteínas. Para ello, células HEK293 o células U2OS se cotransfectaron con los plásmidos conteniendo los ADNs de las proteínas de interés etiquetadas con los epítomos HA o Flag y se recogieron 48 h más tarde tras haber sido tratadas durante las últimas 6 h con el inhibidor del proteasoma MG132.

Las células se lisaron en 100 µl de tampón NETN (0.5% NP-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl a pH 7.4 y 150 mM NaCl) conteniendo además cóctel de inhibidores de proteasas Complete de Roche, 5 mM de NaF, 2 mM de Na₃VO₄, condiciones tales que preservan las interacciones proteína-proteína e inhiben la acción de proteasas y fosfatasa. Tras incubar en hielo durante 20 min se centrifugó a 16000 g 10 min a 4°C y se reservó una parte del extracto total para el posterior análisis. El resto del extracto proteico se incubó con la matriz de afinidad anti-HA de Roche o con agarosa anti-Flag de Sigma durante 16 h a 4°C y los precipitados se lavaron 5 veces en tampón NETN. Los inmunocomplejos se eluyeron en la solución Laemmli para electroforesis y tras su incubación durante 5 min a 95°C se analizaron junto con el extracto proteico total mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia.

7.2. Ensayos de ubiquitinación

Para analizar los conjugados de ubiquitina formados *in vivo* se siguió un protocolo basado en el método descrito por (Treier et al., 1994). Células U2OS se cotransfectaron con JunB-HA o S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB-HA, Flag-Fbxw7 y His₆-Ubiquitina. Transcurridas 36 h desde la transfección y tras haber sido tratadas durante 6 h con el inhibidor del proteasoma MG132 las células se lisaron en 2ml de una solución desnaturalizante de hidrocloreuro de guanidinio 6 M, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M y Tris-HCl 0.01 M a pH 8. Tras centrifugar 15 min a 14000g se separaron 20 µl del sobrenadante para obtener extracto proteico total que se precipitó en 1 ml de ácido tricloroacético al 5% durante 1 h a temperatura ambiente. Tras un lavado con acetona y 15 min de centrifugación a 14000g el precipitado se resuspendió en solución Laemmli para electroforesis y se hirvió durante 5 min a 95°C. Para purificar los conjugados de ubiquitina del resto del sobrenadante se utilizaron perlas magnéticas de Ni²⁺-NTA (Quiagen) que retienen proteínas fusionadas a histidinas. El extracto proteico se mezcló con 25 µl de perlas magnéticas y 10 mM de imidazol y se incubó durante 2h a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron a continuación sucesivos lavados con 2 ml de las siguientes soluciones: (1) hidrocloreuro de guanidinio 6 M, imidazol 10 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M y Tris-HCl 0.01 M a pH 8; (2) urea 8M, imidazol 10 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M y Tris-HCl 0.01 M a pH 8; dos lavados con (3) urea 8M, imidazol 10 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M a pH 6.3 y 0.2% tritón X-100; (4) urea 8M, imidazol 10 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M a pH 6.3 y 0.1% tritón X-100 y (5) urea 8M, imidazol 10 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M y Tris-HCl 0.01 M a pH 6.3. Finalmente, para eluir las proteínas ubiquitinadas se añadió 50 µl de solución Laemmli y las muestras se hirvieron durante 5 min a 95°C. El extracto total y el eluido se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia.

7.3. Inmunoprecipitación de cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina permite evaluar la asociación *in vivo* de proteínas a regiones específicas del genoma. Esto se consigue fijando las

uniones ADN-proteína antes de lisar las células y purificando la proteína de interés por inmutafinidad. Los fragmentos de ADN purificados junto con la proteína pueden analizarse bien por PCR cuantitativa a tiempo real para estudiar la unión de la proteína de interés a regiones definidas del genoma (ChIP-qPCR) o bien analizarse por secuenciación masiva para obtener información sobre todas las regiones del genoma a las que se une la proteína de interés (ChIP-seq). El protocolo seguido está basado en el descrito por el laboratorio de R. Young (Lee et al., 2006) y se esquematiza en la Figura 16.

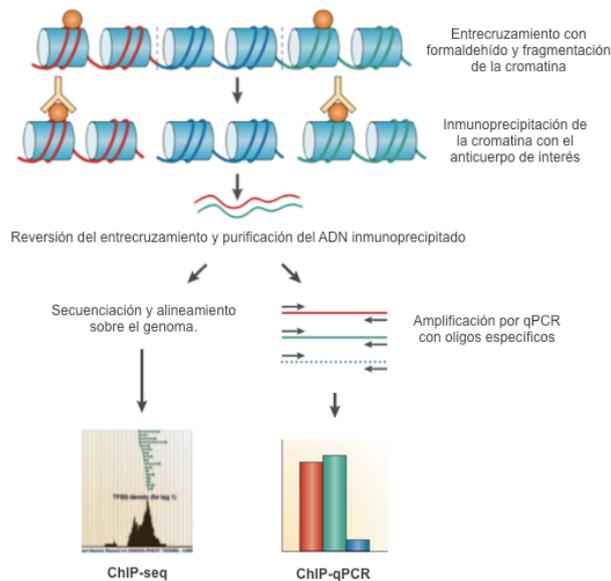


Figura 16: Representación esquemática del proceso de inmunoprecipitación de cromatina. Modificado a partir de (Spivakov & Fisher, 2007)

7.3.1. Entrecruzamiento de las células con formaldehído

Entre 8×10^6 y 1×10^7 células (crecidas durante 24 h en ausencia de tetraciclina en el caso de las células UTA6-control y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB) se fijaron con formaldehído al 1% durante 10 min. Se añadió a continuación glicina 0.125 M para detener la reacción de entrecruzamiento y se dejó actuar durante 15 min. Las células se lavaron 3 veces con PBS conteniendo 2.7 mM de EDTA antes de ser recogidas.

7.3.2. Lisis celular y fragmentación de la cromatina

Las células se lisaron en tampón de lisis 1 (50 mM HEPES-KOH a pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0.5% NP-40 y 0.25% Tritón X-100) incubando 10 min a 4°C en agitación. Tras centrifugar a 1350 g durante 5 min a 4°C se añadió tampón de lisis 2 al precipitado (10 mM Tris-HCl a pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.5 mM EGTA) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en agitación. Se centrifugó a 1350 g durante 5 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis 3 (10 mM Tris-HCl a pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% desoxicolato de sodio y 0.5% sarcosil). Todos los tampones de lisis se suplementaron con el cóctel de inhibidores de proteasas Complete de Roche antes de su uso.

Los extractos celulares se sonicaron en un Bioruptor (Diagenode) para fragmentar y solubilizar la cromatina, obteniéndose fragmentos de entre 100 y 600 pares de bases. Se añadió tritón X-100 al 1% y se centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4°C. En este punto se reservó una alícuota del extracto total para ser usada como referencia en el posterior análisis.

7.3.3. Inmunoprecipitación de la cromatina

La inmunoprecipitación de la cromatina se llevó a cabo mediante incubación de las muestras durante 16 h a 4°C con 100 µl de perlas magnéticas Dynabeads Protein G de Invitrogen previamente bloqueadas con 0.5% de BSA en PBS e incubadas durante 6 h con 10 µg de anticuerpo contra JunB (sc-73, Santa Cruz Biotechnology). En paralelo se realizó una inmunoprecipitación sin anticuerpo a modo de control negativo incubando las muestras con 100 µl de las perlas magnéticas con proteína G bloqueadas con BSA pero sin haber sido incubadas previamente con el anticuerpo contra JunB. Tras la inmunoprecipitación se realizaron 8 lavados con tampón RIPA (50 mM HEPES-KOH a pH 7.6, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 y 0.7% desoxicolato de sodio) seguido de un último lavado con tampón TE-NaCl (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA y 50 mM NaCl). Se añadieron 210 µl de tampón de elución (50 mM Tris-HCl a pH 8, 10 mM EDTA y 1% SDS) y las muestras se incubaron a 65°C durante 15 min con agitación periódica. Se separaron así los complejos ADN-proteína de las

perlas magnéticas. En este punto se recuperó el extracto total no sometido a inmunoprecipitación y se le añadió tampón de elución hasta un volumen final de 200 μ l. Se revirtió el entrecruzamiento del extracto total, del inmunoprecipitado con anticuerpo y del inmunoprecipitado sin anticuerpo mediante incubación a 65°C durante 16 h.

7.3.4. Purificación del ADN

Se añadió a las muestras 200 μ l de TE (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA) y se trataron con 0.2 mg/ml de RNasa A (Sigma) durante 2 h a 37°C, seguido de tratamiento con 0.2 mg/ml de proteinasa K (Sigma) durante 2 h a 55°C. El ADN se extrajo mediante la adición de un volumen igual al de la muestra de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en tubos Heavy Phaselock Gel (5Prime) que facilitan la separación de la fase acuosa y la orgánica al formar una barrera entre ambas. Se siguieron las indicaciones del fabricante y una vez separada la fase acuosa se mezcló con 200 mM de NaCl y 30 μ g de glucógeno y se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% para precipitar el ADN durante 30 min a -80°C. Se centrifugó a 16000 g durante 10 min a 4°C y tras un lavado con etanol al 70% el ADN precipitado se resuspendió en 10 mM Tris-HCl pH 8.

7.3.5. Amplificación de las regiones del promotor de *DDX11*

Regiones del promotor de *DDX11* identificadas como posibles sitios de unión de JunB se amplificaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) como se describe en el apartado 6.3.2. La cantidad de la secuencia de ADN amplificada en el inmunoprecipitado se expresó como enriquecimiento respecto al control negativo de la inmunoprecipitación (inmunoprecipitación sin anticuerpo) y se utilizó el promotor de *GAPDH*, al que JunB no se une, como referencia.

7.3.6. ChIP-seq

Fragmentos de ADN procedentes de cuatro inmunoprecipitaciones de cromatina con anticuerpo anti-JunB en células U2OS y en células K299 así

como sus correspondientes extractos totales se enviaron a la plataforma Montpellier GenomiX (MGX) donde las muestras de cada línea celular se mezclaron por parejas y se utilizó un equipo HiSeq 2000 de Illumina para su secuenciación. El análisis de los resultados de la secuenciación se describe en el apartado 8.1.

8. Análisis bioinformático

Estos análisis se realizaron en colaboración con Lorena de la Fuente y la Dra. Ana Conesa del grupo Genómica de la Expresión Génica del CIPF.

8.1. Identificación de sitios de unión de proteínas asociadas al genoma a partir de datos de ChIP-seq

La secuenciación, alineamiento y detección de zonas de unión de JunB al genoma a partir de las muestras inmunoprecipitadas fue realizada en la plataforma Montpellier GenomiX (MGX). El alineamiento de las secuencias sobre el genoma humano (versión hg19) se realizó con el software ELAND del paquete CASAVA proporcionado por Illumina. La identificación de las regiones del genoma enriquecidas en la muestra inmunoprecipitada respecto al extracto total se realizó con el programa MACS (*Model-based Analysis for ChIP-seq*) (Zhang et al., 2008).

Para el posterior análisis de los datos procedentes del ChIP-seq se utilizó el paquete BEDtools (Quinlan & Hall, 2010). Para cada línea celular se compararon las listas obtenidas con el programa MACS (Zhang et al., 2008) conteniendo las regiones de unión de JunB al genoma de las dos réplicas y se consideraron sólo aquellas regiones comunes a ambas réplicas. Se compararon además entre sí las regiones identificadas para cada línea celular. La visualización de las regiones de unión de JunB al genoma humano se realizó en la plataforma UCSC Genome Browser Viewer (hg 19) (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent et al., 2002) junto con datos de ChIP-seq realizados en siete líneas celulares distintas con anticuerpos contra las

modificaciones de histonas H3K4me1, H3K4me3 y H3K27Ac y datos de regiones sensibles al corte con DNasas según resultados obtenidos en 125 líneas celulares distintas y depositados en la base de datos de ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) (Rosenbloom et al., 2013). Para la visualización directa de los fragmentos de ADN obtenidos de la secuenciación alineados sobre el genoma humano así como de las regiones de unión de JunB identificadas por el programa MACS se utilizó el programa IGV (Robinson et al., 2011; Thorvaldsdottir et al., 2013).

La búsqueda de motivos se realizó con el paquete MEME (Bailey et al., 2009). Concretamente, se utilizó la herramienta MEME-ChIP (Machanick & Bailey, 2011) para la búsqueda de motivos enriquecidos en las regiones inmunoprecipitadas y la herramienta FIMO (Grant et al., 2011) para la búsqueda específica de los motivos consenso AP-1/TRE y AP-1/CRE definidos según la base de datos JASPAR (Mathelier et al., 2014) en cada región inmunoprecipitada.

Para asignar las regiones de unión de JunB al genoma a potenciales genes diana se utilizó la herramienta GREAT (McLean et al., 2010) (versión hg19 del genoma humano) utilizando como regla de asociación el criterio del gen más cercano (*single nearest gene*) hasta una distancia máxima de 10 kb.

8.2. Identificación de genes diferencialmente expresados a partir de datos de análisis transcriptómico

El análisis transcriptómico se realizó en colaboración con la Unidad de Investigación Genómica del CRP-Santé, en Luxemburgo, dirigida por el Dr. Laurent Vallar. Se utilizó el software Partek Genomics Suite para el análisis de los resultados de la hibridación y el lenguaje de programación R para el análisis estadístico de los resultados y la detección de los genes diferencialmente expresados. Se aplicó el método estadístico FDR (*False Discovery Rate*) que corrige la probabilidad de error al realizar múltiples comparaciones y se consideró significativo un valor de FDR < 0.05.

La comparación de las listas de genes se realizó con el programa BioVenn (Hulsen et al., 2008) que genera diagramas de Venn a partir de las listas proporcionadas y permite identificar los genes comunes.

El análisis de las listas de genes en busca de términos de ontología génica (GO) (Ashburner et al., 2000) asociados a procesos biológicos enriquecidos se realizó con el sistema de clasificación PANTHER (versión 9.0) (Mi et al., 2013a; Mi et al., 2013b), que aplica la corrección de Bonferroni para múltiples test, considerando significativos aquellos términos GO con un valor $p < 0.05$. Se realizó tanto un análisis completo utilizando todos los términos GO de procesos biológicos, como un análisis simplificando con la herramienta Panther GO-Slim que usa solo un conjunto seleccionado de términos GO. El sistema de clasificación Panther se utilizó también para asignar el tipo de proteína codificada a los genes identificados.

8.3. Análisis de secuencias

Las secuencias génicas y proteicas se obtuvieron de la base de datos Ensembl (Cunningham et al., 2015). La búsqueda de motivos específicos en las secuencias proteicas se realizó mediante la herramienta ScanProsite (de Castro et al., 2006) del portal de recursos bioinformáticos ExPASy (Artimo et al., 2012).

Resultados 1:

Caracterización del mecanismo molecular que regula la estabilidad de JunB en G2

1. JunB es sustrato de la E3 ligasa Fbxw7

Los niveles proteicos de JunB varían durante el ciclo celular. Aumentan a medida que las células progresan a través de G1 y entran en fase S pero disminuyen dramáticamente al llegar al final de G2. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que la disminución de los niveles proteicos de JunB es necesaria para asegurar una mitosis correcta y es dependiente de la vía ubiquitina proteasoma (Farras et al., 2008; Piechaczyk & Farras, 2008). Sin embargo, en estos estudios no se caracterizó el mecanismo molecular que controla la degradación mediada por el proteasoma de JunB en G2 tardía.

En la vía de degradación ubiquitina proteasoma el componente encargado del reconocimiento del sustrato es la enzima E3 ligasa (Hershko & Ciechanover, 1998). Por tanto, el primer paso en la caracterización del mecanismo de degradación de JunB fue la identificación de la E3 ligasa encargada de su reconocimiento. El análisis de la secuencia proteica de JunB mediante la herramienta ScanProsites (de Castro et al., 2006) nos permitió

Resultados

identificar un posible sitio de unión para la proteína Fbxw7, componente encargado de la unión al sustrato en el complejo E3 ligasa SCF^{Fbxw7}.

Los sustratos conocidos de Fbxw7, tales como Ciclina E, cMyc o cJun, poseen en su secuencia proteica un motivo consenso denominado fosfodegrón que consiste en un residuo fosforilable en la posición central seguido de una prolina en +1 y de otro residuo fosforilable en posición +4. La fosforilación de estos residuos permite la unión de la E3 ligasa Fbxw7 que media la ubiquitinación y degradación de sus sustratos (Welcker & Clurman, 2008). En el caso de JunB, la T255 y la S259 cumplen los requisitos para ser fosfodegrón de Fbxw7 (Figura 17).

JunB	249	ARSRDATPPVSP
c-Jun	233	PEMPGETPPLSPI
c-Myc	52	KFELLPTPPLSPS
Ciclina E	374	LPSGLLTPPQSGK
Ciclina E	56	PCSLIPTPDKEED
		S/TPXXS/T/E
		0 +4
		Fosfodegrón
		FBXW7

Figura 17: JunB posee un motivo fosfodegrón para Fbxw7 en su secuencia proteica. Se muestra el alineamiento de los fosfodegrones para Fbxw7 de algunos de sus sustratos conocidos junto al identificado en JunB. Datos ampliados de (Hao et al., 2007)

Para analizar la interacción entre Fbxw7 y JunB se llevó a cabo un ensayo de coimmunoprecipitación de proteínas en células U2OS cotransfectadas con plásmidos de expresión para JunB-HA y Fbxw7 α salvaje o su mutante Fbxw7 α (R465A), etiquetados con Flag. El residuo R465 de Fbxw7 forma parte del dominio de unión al sustrato y está implicado en interacciones directas con los residuos fosforilables del sustrato (Hao et al., 2007). Su mutante Fbxw7 α (R465A) es incapaz de unirse a sus sustratos y actúa como dominante negativo anulando la función de Fbxw7 salvaje (Akhoondi et al., 2007). Debido a que la interacción entre una E3 ligasa y su sustrato va seguida de la degradación del mismo por el proteasoma, añadimos a las células el inhibidor del proteasoma MG132. De esta manera evitamos la degradación de los sustratos y los posibles complejos formados son más fáciles de detectar. En la Figura 18 se observa que al inmunoprecipitar JunB con anti-HA también precipita Fbxw7 indicando que

ambas proteínas interactúan *in vivo*. Sin embargo, esta interacción no se produce con el mutante en el dominio de unión de Fbxw7.

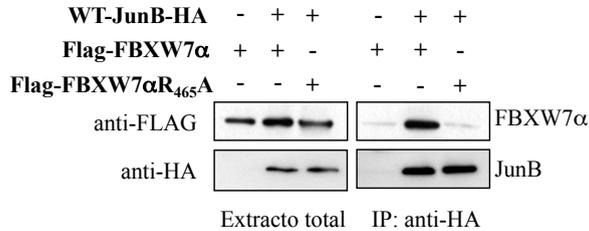


Figura 18: JunB interactúa con Fbxw7 *in vivo*. Células U2OS se cotransfectaron con JunB-HA y con Flag-Fbxw7 α o con su mutante en el dominio de unión al sustrato Flag-Fbxw7 α R465A y se recogieron 48 h después, tras haber sido tratadas previamente durante 6 h con el inhibidor del proteasoma MG132. Los complejos proteicos se inmunoprecipitaron con anti-HA (IP) y se analizaron mediante western blot junto con el extracto proteico total. Para la inmunodetección de Fbxw7 y JunB se utilizaron los anticuerpos anti-Flag y anti-HA respectivamente.

Para confirmar la especificidad de Fbxw7 realizamos otro ensayo de coimmunoprecipitación en células HEK293T utilizando además de Fbxw7 α y su mutante Fbxw7 α (R465A) las E3 ligasas Skp2, Cdc20 y Cdh1, todas ellas implicadas en la degradación de reguladores del ciclo celular. Skp2 es otra proteína F-box que forma parte del complejo SCF y Cdc20 y Cdh1 son los componentes encargados del reconocimiento del sustrato en el complejo E3

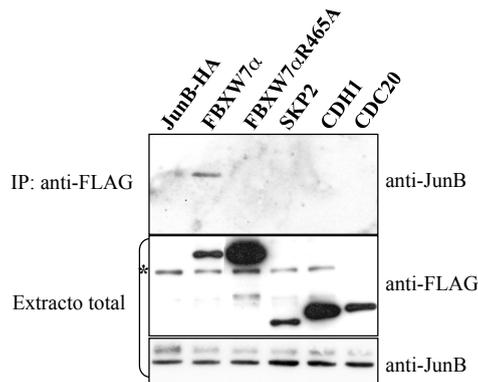


Figura 19: JunB interactúa específicamente con Fbxw7. Células HEK293T se cotransfectaron con los plásmidos que codifican JunB-HA y las E3 ligasas Fbxw7 α , Fbxw7 α R465A, Skp2, Cdh1 y Cdc20, todas ellas etiquetadas con el epítipo Flag. Antes de recogerlas se trataron durante 6 h con el inhibidor del proteasoma MG132. Los complejos proteicos se inmunoprecipitaron con anti-Flag (IP) y se analizaron junto con el extracto proteico total mediante western blot con los anticuerpos anti-JunB y anti-Flag. El asterisco indica una señal no específica.

Resultados

ligasa APC/C (Nakayama & Nakayama, 2006). Se cotransfectaron las células con JunB-HA y con los plásmidos que codifican las E3 ligasas etiquetadas con Flag y se inmunoprecipitaron los complejos proteicos con anti-Flag (Figura 19). Sólo en el caso de expresión de la proteína Fbxw7 se detecta la presencia de JunB en el inmunoprecipitado confirmándose la unión específica de JunB con esta E3 ligasa.

A continuación analizamos si la interacción entre JunB y Fbxw7 influye en la estabilidad de JunB. La adición de cicloheximida a células en cultivo inhibe la síntesis proteica, por lo tanto la determinación de los niveles de proteína a diferentes tiempos tras la adición de la droga proporciona una medida de su estabilidad. Se comparó la estabilidad de JunB en células U2OS transfectadas con Fbxw7 α salvaje o con el mutante Fbxw7 α (R465A) (Figura 20). JunB se estabiliza en presencia del mutante dominante negativo Fbxw7 α (R465A) comparado con las células que expresan Fbxw7 α salvaje indicando que la unión JunB-Fbxw7 determina la estabilidad de JunB.

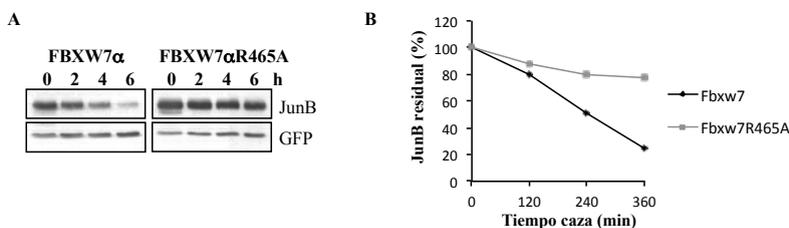


Figura 20: La expresión de un mutante negativo de Fbxw7 aumenta la estabilidad de JunB. (A) Células U2OS se cotransfectaron con JunB-HA y con Flag-Fbxw7 α o con su mutante en el dominio de unión al sustrato Flag-Fbxw7 α R465A junto con un plásmido que codifica GFP a modo de control de la transfección. Se añadió cicloheximida al medio y se recogieron células a los tiempos indicados. Se prepararon extractos proteicos y se analizaron mediante western blot con anticuerpos contra JunB y contra GFP. (B) Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante la inmunodetección de JunB y se representaron gráficamente los valores con el fin de facilitar su comparación.

Finalmente, para confirmar el papel de Fbxw7 en la degradación de JunB en G2 tardía analizamos la expresión de JunB en células DLD1^{FBXW7-/-} sincronizadas. Estas células son un clon estable de la línea celular derivada de cáncer de colon DLD1 en el que ambos alelos del gen *FBXW7* fueron inactivados mediante la delección de un fragmento del mismo (Rajagopalan et al., 2004). Cuando los niveles de una proteína varían durante el ciclo

celular no es sencillo apreciar diferencias de expresión en una población de células en crecimiento asincrónico. Por ello, se recurre a la sincronización de células que permite obtener poblaciones celulares enriquecidas en la fase de interés. En nuestro caso, puesto que los niveles de JunB disminuyen en G2/M nos interesa analizar sus niveles en estas fases concretas del ciclo por lo que recurrimos al tratamiento con nocodazol, droga que interfiere en la polimerización de los microtúbulos provocando una parada del ciclo en prometafase. En células que crecen adheridas a una placa de cultivo, como las DLD1, las células que alcanzan la mitosis adquieren una morfología redondeada, pierden adherencia y se despegan de la placa quedando suspendidas en el medio. Esta característica permite su separación del resto de células que quedan adheridas a la placa y que se encuentran mayoritariamente en fase G2. En la Figura 21 se aprecia que células DLD1^{FBXW7-/-} en crecimiento asincrónico (AS) muestran un ligero incremento en los niveles de JunB comparado con células parentales DLD1. Sin embargo, la acumulación de JunB en células DLD1^{FBXW7-/-} sincronizadas en G2 y en células mitóticas resulta mucho mayor en comparación con sus niveles en las células parentales resaltando la importancia de la E3 ligasa Fbxw7 en la degradación de JunB en G2 tardía.

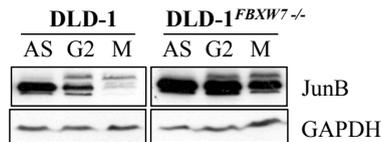


Figura 21: La delección de *FBXW7* conduce a la acumulación de JunB en células mitóticas. Células DLD1 y DLD1^{FBXW7-/-} derivadas de cáncer de colon se sincronizaron en G2/M mediante la adición de nocodazol y se separaron las poblaciones celulares enriquecidas en fase G2 de las células mitóticas (M). AS son células en crecimiento asincrónico. Los extractos proteicos se analizaron mediante western blot con los anticuerpos anti-JunB y anti-GAPDH.

2. GSK3 fosforila a JunB en su motivo fosfodegrón.

En la degradación de la mayoría de los sustratos de Fbxw7 está implicada la quinasa GSK3, que es la responsable de la fosforilación de la treonina central

Resultados

del fosfodegrón. La fosforilación mediada por GSK3 posee un requisito y es que, en general, los sustratos han de ser fosforilados primero por otra quinasa en un residuo situado en posición +4 respecto al sitio de fosforilación de GSK3 (Welcker & Clurman, 2008).

En el fosfodegrón de JunB, representado en la Figura 17, encontramos dos residuos que cumplen las condiciones para ser fosforilados por GSK3: la T255 y la S251. Con objeto de investigar si estos residuos de JunB son fosforilados por GSK3 se realizaron experimentos donde se inhibió la quinasa por dos mecanismos diferentes (farmacológica o genéticamente) y se utilizó anticuerpos fosfoespecíficos para detectar los cambios en el estado de fosforilación de los residuos de JunB. Con objeto de comprobar la fiabilidad de los anticuerpos se transfectaron en paralelo células con el plásmido que codifica el triple mutante $S_{251}A/T_{255}A/S_{259}A$ -JunB en el que los tres residuos fosforilables fueron sustituidos por alaninas. Se comprobó la especificidad de los anticuerpos aunque se detectó la aparición de una señal inespecífica con el anticuerpo contra la S251 fosforilada (asterisco en Figura 22B).

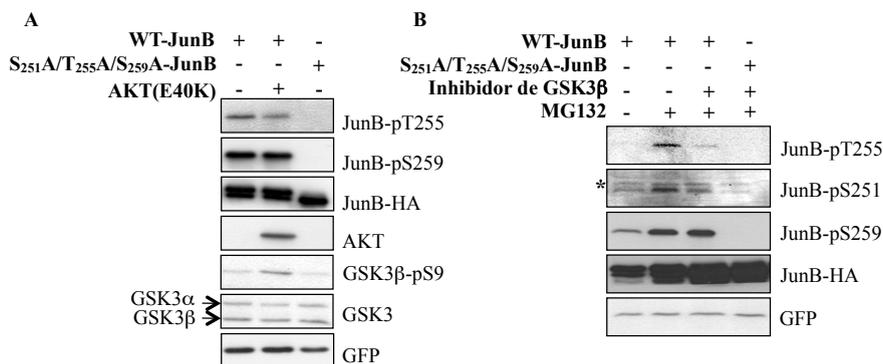


Figura 22: GSK3 fosforila la S251 y la T255 de JunB. (A) Células Hela se transfectaron con JunB salvaje sólo o junto al mutante constitutivamente activo AKT(E40K). Se trataron con el inhibidor de proteasoma MG132 6 h antes de recogerlas y los extractos proteicos se analizaron mediante western blot. El efecto de la expresión de AKT en GSK3 y en JunB se determinó con anticuerpos fosfoespecíficos contra GSK3 β -pS9, JunB-pT255 y JunB-pS259. Los niveles de proteína total se determinaron con anticuerpos anti-JunB, anti-AKT, anti-GSK3 y anti-GFP. Tanto en A como en B las células se cotransfectaron con GFP como control de la transfección y con $S_{251}A/T_{255}A/S_{259}A$ -JunB como control de la especificidad de los anticuerpos contra JunB fosforilado. (B) Células Hela trasfectadas con JunB salvaje o $S_{251}A/T_{255}A/S_{259}A$ -JunB se trataron con el inhibidor de GSK3 β y con MG132 donde se indica. El efecto de la inhibición de GSK3 β en las fosforilaciones de JunB se determinó mediante western blot con anticuerpos fosfoespecíficos. El asterisco indica una señal no específica.

En primer lugar (Figura 22A) se cotransfectaron células HeLa con los plásmidos que codifican JunB salvaje y una forma constitutivamente activa de la quinasa AKT (AKT(E40K)) (Aoki et al., 1998). GSK3 posee dos isoformas, α y β , que son reguladas de manera similar por AKT mediante la fosforilación de un residuo de Ser en el extremo N terminal. Estas fosforilaciones, en la S21 en GSK3 α y en la S9 en GSK3 β , inhiben la actividad quinasa de GSK3 (Woodgett, 2005). En la Figura 22A puede apreciarse como la inhibición de GSK3 por la vía AKT, puesta de manifiesto por el aumento en la fosforilación de la S9 de GSK3 β , conduce a una fosforilación reducida de la T255 mientras que la fosforilación de la S259 no se ve alterada.

En el segundo experimento la inhibición de GSK3 se realizó mediante tratamiento farmacológico con un inhibidor específico para la isoforma β de GSK3 (Inhibidor VIII de GSK3 β , Calbiochem) (Figura 22B). Como se aprecia en la figura, en ausencia de inhibidores apenas se detecta señal con los anticuerpos anti-JunB-pT255 y anti-JunB-pS251, por lo que para poder detectar los cambios en el estado de fosforilación se añadió el inhibidor de proteasoma MG132. Se confirma aquí lo observado en el experimento anterior al inhibir GSK3: hay una disminución en la fosforilación de la T255 y una ausencia de efecto en la fosforilación de la S259. Se observa además una reducción en la fosforilación de la S251.

Para estudiar si la fosforilación de un residuo se ve afectada por la fosforilación de los otros dos generamos mutantes puntuales mediante mutagénesis dirigida de JunB en la S251, T255 y S259 en los que cada uno de los tres residuos fosforilables fueron mutados a alanina para prevenir su fosforilación. Transfectamos células U2OS con JunB salvaje o con cada uno de los tres mutantes de JunB y analizamos las fosforilaciones de sus residuos con los anticuerpos fosfoespecíficos (Figura 23). La fosforilación en la S251 no se ve afectada por la mutación en la T255. Igualmente, la fosforilación en la T255 no se ve afectada por la mutación en la S251. Sin embargo, ambas fosforilaciones se suprimen al mutar la S259 indicando que este residuo ha de estar fosforilado para que se fosforilen la T255 y la S251.

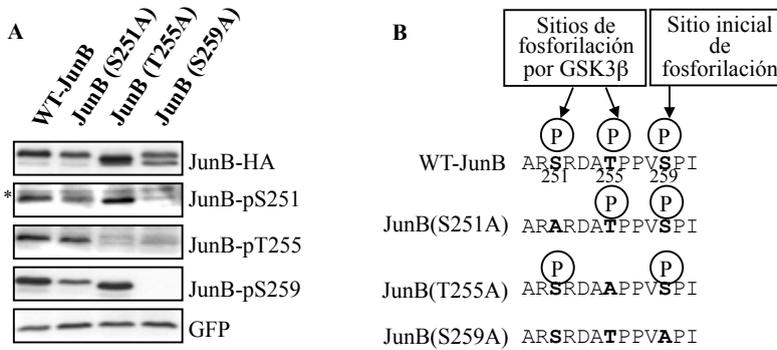


Figura 23: Las fosforilaciones en el CPD ocurren de forma secuencial. (A) Células U2OS se cotransfectaron con JunB salvaje (WT-JunB) o con sus mutantes puntuales, en los que la S251, la T255 o la S259 fueron reemplazadas por alaninas, junto con GFP a modo de control de transfección. Se trataron con MG132 6 h antes de preparar los extractos proteicos y estos se analizaron mediante western blot con anticuerpos fosfoespecíficos de JunB (anti-JunB-pS251, anti-JunB-pT255 y anti-JunB-pS259), con anti-HA para la detección de JunB total y con anti-GFP. El asterisco indica una señal no específica. **(B)** Esquema de la fosforilación de JunB. La fosforilación inicial en la S259 es necesaria para la posterior fosforilación de la T255 y la S251.

En el esquema de la Figura 23B se muestra un resumen de los resultados obtenidos. La fosforilación en la S259 de JunB es un requisito indispensable para que GSK3 fosforile la T255 y la S251.

3. Las fosforilaciones de la S251, la T255 y la S259 regulan la estabilidad de JunB.

Al comparar la vida media de JunB en células U2OS cotransfectadas con JunB y Fbxw7 sin tratar o tratadas con el inhibidor de GSK3β (Figura 24) se observa un aumento de la estabilidad de JunB a consecuencia de la inhibición de la actividad de la quinasa.

Esto coincide con nuestra hipótesis de que la fosforilación de JunB por GSK3 es necesaria para su reconocimiento por la E3 ligasa Fbxw7 y su posterior degradación en el proteasoma.

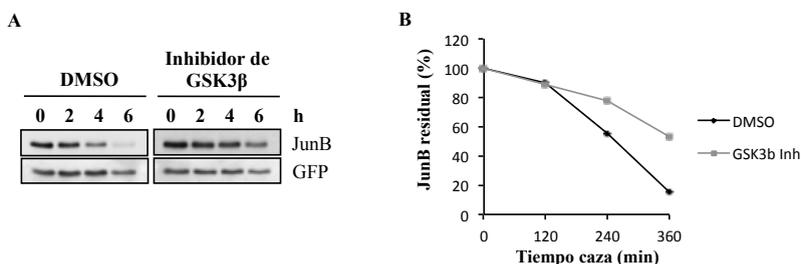


Figura 24: La estabilidad de JunB aumenta al inhibir GSK3β. (A) Células U2OS se cotransfectaron con JunB-HA, Flag-Fbxw7α y GFP y se trataron durante 3 h con el inhibidor de GSK3β o con DMSO solo antes de añadir cicloheximida al medio. Se recogieron células a los tiempos indicados y se analizaron los extractos proteicos mediante western blot con anticuerpos contra JunB y contra GFP. (B) La gráfica muestra los resultados del análisis densitométrico de las bandas.

Con objeto de analizar el papel de las fosforilaciones en la S251, la T255 y la S259 en la degradación de JunB mediada por Fbxw7 estudiamos la vida media de diferentes mutantes de JunB en células U2OS (Figura 25).

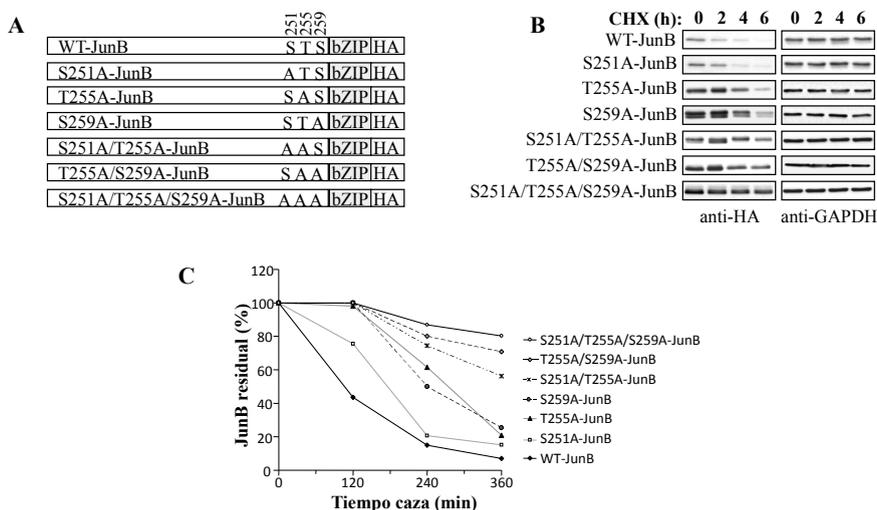


Figura 25: La estabilidad de JunB depende de la fosforilación de los residuos S251, T255 y S259. (A) Construcciones de JunB utilizadas. (B) Células U2OS se transfectaron con JunB salvaje o con cada uno de los mutantes descritos en A. Se añadió cicloheximida (CHX) al medio para inhibir la síntesis proteica y se recogieron células a los tiempos indicados. Se analizó mediante western blot la disminución de los niveles de JunB en ausencia de síntesis proteica. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-HA y anti-GAPDH. (C) La gráfica muestra los resultados del análisis densitométrico de las bandas.

Los residuos S251, T255 y S259 del fosfodegrón fueron sustituidos por alaninas, de forma individual o conjunta, para evitar su fosforilación. En la

Resultados

Figura 25A se muestra una descripción de los diferentes mutantes de JunB utilizados. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante la inmunodetección de JunB y se representaron gráficamente los valores con el fin de facilitar su comparación. Como puede apreciarse en la gráfica de la Figura 25C los mutantes con un solo residuo modificado presentan una estabilidad algo mayor que JunB salvaje, principalmente T₂₅₅A-JunB y S₂₅₉A-JunB. La estabilización resulta mucho más pronunciada en los mutantes múltiples, sobretodo en el que posee los tres residuos S251, T255 y S259 modificados poniendo de manifiesto el papel que las fosforilaciones de dichos residuos tienen en la estabilidad de JunB.

Para comprobar que el fosfodegrón de JunB es el motivo de reconocimiento de la E3 ligasa analizamos la interacción de Fbxw7 con los mutantes no fosforilables de JunB. Para ello llevamos a cabo un ensayo de coimmunoprecipitación de proteínas en células U2OS cotransfectadas con Fbxw7 α y con JunB salvaje o sus mutantes S₂₅₁A/T₂₅₅A-JunB o S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB (Figura 26).

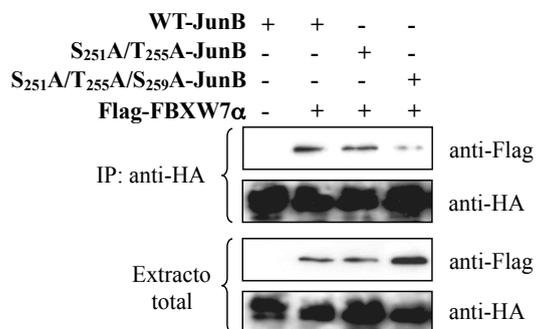


Figura 26: Las fosforilaciones en la S251, T255 y S259 son necesarias para la interacción de JunB con Fbxw7 *in vivo*. Células U2OS se cotransfectaron con JunB salvaje o sus mutantes en el fosfodegrón, etiquetados todos con el epítipo HA y Flag-Fbxw7 α . Las células se trataron con el inhibidor de proteasoma MG132 durante 6 h antes de recogerlas. Los complejos proteicos se inmunoprecipitaron con anti-HA (IP) y se analizaron por western blot junto con el extracto proteico total. Para la inmunodetección de Fbxw7 y JunB se utilizaron los anticuerpos anti-Flag y anti-HA respectivamente.

Se observa que la interacción entre Fbxw7 y el mutante disminuye considerablemente, resaltando la importancia de las fosforilaciones de JunB en la unión a la E3 ligasa. La interacción con el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A-JunB, sin embargo, no se ve muy afectada. Esto podría deberse al papel fundamental

que juega la fosforilación de la S259 en la interacción con Fbxw7. De hecho, en el análisis de las vidas medias ya se observa que este mutante no es tan estable como el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB (Figura 25).

Finalmente, para determinar si la ubiquitinación de JunB mediada por Fbxw7 es dependiente de la fosforilación de JunB en el CPD se analizaron los conjugados de ubiquitina formados *in vivo* en JunB salvaje y en su mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB. Para ello células U2OS se transfectaron con Fbxw7 α junto con ubiquitina marcada con histidinas y JunB salvaje o S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB y se trataron con el inhibidor de proteasoma MG132 durante 6 h para prevenir la degradación de las proteínas ubiquitinadas. Las células se lisaron en condiciones desnaturizantes para eliminar las interacciones proteicas no covalentes así como para prevenir la degradación o desubiquitinación de los conjugados proteína-ubiquitina. Estos se purificaron mediante la retención específica de las proteínas unidas a histidinas (Figura 27). Consistente con los resultados del ensayo de coimmunoprecipitación la ubiquitinación del mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se redujo considerablemente en comparación con JunB salvaje. Además, las células cotransfectadas con Fbxw7 α muestran una mayor ubiquitinación de JunB salvaje indicando que Fbxw7 α promueve la ubiquitinación de JunB dependiendo de su fosforilación.

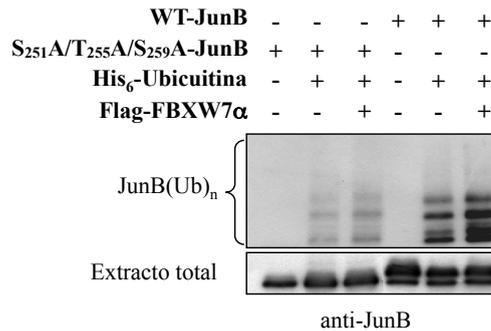


Figura 27: La ubiquitinación de JunB depende de las fosforilaciones en la S251, T255 y S259. Células U2OS se cotransfectaron con JunB salvaje o con el triple mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB junto con ubiquitina marcada con histidinas y con Flag-Fbxw7 y se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 6 h antes de recogerlas. Los conjugados de ubiquitina se purificaron mediante el uso de perlas magnéticas de Ni²⁺-NTA y se analizaron junto con el extracto proteico total mediante western blot con anti-JunB.

4. GSK3 β regula la estabilidad de JunB en G2

Para analizar si la degradación de JunB en G2 tardía depende de GSK3 β analizamos, en primer lugar, la posible correlación entre los niveles de JunB endógeno y la activación de GSK3, determinada por sus niveles de fosforilación en la S9, en células U2OS sincronizadas. Las células se sincronizaron en la transición G1/S mediante un doble bloqueo con timidina y una vez liberadas del bloqueo se dejaron progresar por el ciclo en presencia de nocodazol. El nocodazol detiene las células en prometafase y de esta manera se aprecia mejor la disminución de los niveles de JunB en esta fase del ciclo celular. La progresión a través del ciclo fue seguida mediante el análisis del contenido en ADN de las células por citometría de flujo (Figura 28B). Consistente con resultados ya publicados (Bakiri et al., 2000; Farras et al., 2008) tras la liberación del bloqueo en G1/S los niveles de JunB aumentan y se mantienen elevados a medida que las células progresan por el ciclo celular hasta decaer de forma drástica transcurridas entre 12 y 14 h (Figura 28A). A las 14 h las células se encuentran mayoritariamente en mitosis, como puede apreciarse por la acumulación de las células en la región G2/M del histograma procedente del citómetro (Figura 28B) y por el aumento en los niveles de la Ciclina B1 (Figura 28A). La variación de los niveles de Ciclina A2 sirve también como indicador de la progresión de las células en mitosis, ya que su degradación comienza en prometafase y se completa en metafase, precediendo a la degradación de la Ciclina B1 (Fung & Poon, 2005)

La comparación entre la variación en los niveles de JunB y los de la forma fosforilada e inactiva de GSK3 β muestran un aumento de la actividad de GSK3 (indicada por la disminución de su fosforilación en la S9) coincidiendo con el momento de la degradación de JunB en G2 tardía. La fosforilación de GSK3 β en la S9 aumenta en células mitóticas coincidiendo con lo descrito por (Wakefield et al., 2003)

Por otro lado, la fosforilación de JunB en la S259 se detecta desde el inicio de la sincronización y parece seguir el mismo patrón que los niveles totales de JunB, mientras que las fosforilaciones en la T255 y la S251 fueron imposibles de detectar. Esto es consistente con el papel inicial de la

fosforilación en la S259 necesario para que GSK3 fosforile la T255 y la S251. La rápida degradación de JunB tras la fosforilación de estos residuos es, probablemente, la causa de que no pudieran detectarse por western blot.

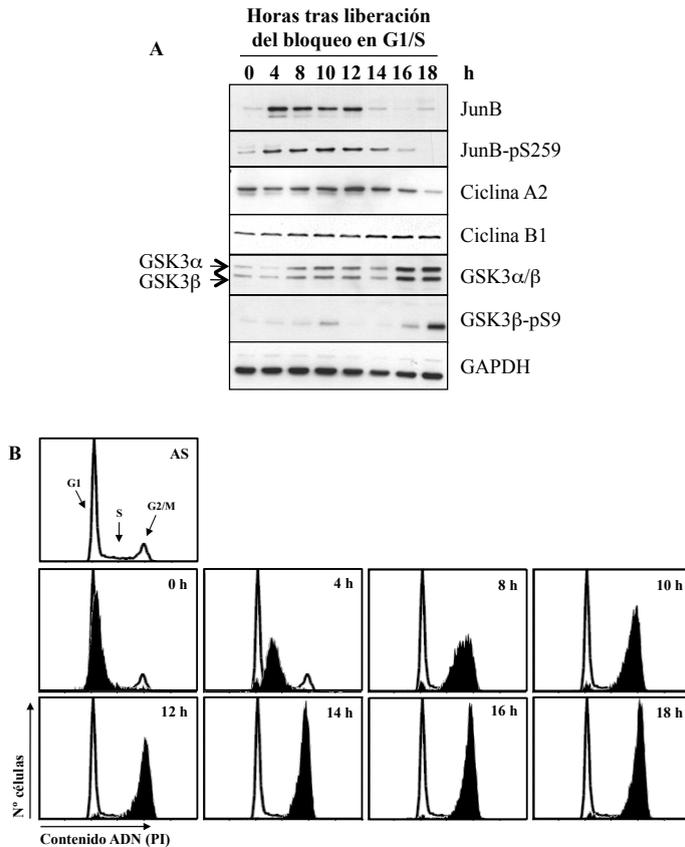


Figura 28: GSK3β está activa en el momento de la degradación de JunB. (A) Se sincronizaron células U2OS mediante un doble bloqueo con timidina y tras liberarlas del bloqueo se añadió nocodazol al medio para detener la progresión de las células en mitosis. Se prepararon extractos proteicos de células recogidas a los tiempos indicados y se analizaron mediante western blot. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos contra JunB, JunB fosforilado en la S259, Ciclina A2, Ciclina B1, GSK3α/β, GSK3β fosforilado en la S9 (forma inactiva de la quinasa) y GAPDH. La Ciclina B1 se acumula en mitosis y es indicativo del enriquecimiento en células mitóticas. (B) Células procedentes de la sincronización descrita en el apartado A se fijaron con etanol y se tiñeron con yoduro de propidio (PI) para analizar el contenido en ADN mediante citometría de flujo. En el histograma superior se observa el perfil de ciclo celular de células en crecimiento asincrónico (AS) y se indica la posición de los picos en G1 y en G2/M y la región central donde se localizan las células en fase S. Los histogramas de las células sincronizadas (negro) se han superpuesto al de las células en crecimiento asincrónico (blanco) para visualizar el desplazamiento del pico de células sincronizadas a medida que avanzan por el ciclo celular. A T0 las células se hallan mayoritariamente en la transición G1/S y a T18 en mitosis.

Resultados

A continuación, analizamos si la inhibición de GSK3 β en células sincronizadas conducía a la acumulación de JunB endógeno en mitosis. Para ello, sincronizamos células U2OS en la transición G1/S de la misma forma que se describe en el experimento anterior y transcurridas 10 h desde la liberación del bloqueo en G1/S añadimos el inhibidor de GSK3 β a las células (Figura 29). El aumento de los niveles de Ciclina A2 y Ciclina B1 es indicativo de la progresión de las células hacia mitosis.

Se observa que los niveles de JunB se mantienen elevados en mitosis en las células tratadas con el inhibidor de GSK3 β y que, al igual que se observaba en la Figura 22, la fosforilación en la S259 no se ve afectada por la inhibición de GSK3.

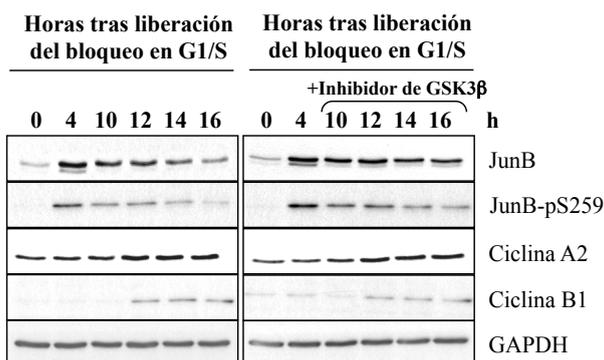


Figura 29: La inhibición de GSK3 β conduce a la acumulación de JunB en el ciclo celular. Células U2OS se sincronizaron en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina y tras liberarlas del bloqueo se dejaron progresar por el ciclo celular en presencia de nocodazol recogiendo células a los tiempos indicados. A T10 se añadió inhibidor de GSK3 β . La evolución de los niveles de JunB desde G1/S (T0) a mitosis (T16) se siguió mediante western blot utilizando los anticuerpos contra JunB total y JunB-pS259. Se detectaron también los niveles de las Ciclinas A2 y B1 y de GAPDH con sus respectivos anticuerpos.

Resultados similares se obtuvieron al sincronizar y tratar con el inhibidor de GSK3 β células UTA6 que expresan de forma estable JunB salvaje. Esta línea celular generada en el laboratorio permite la expresión condicional de JunB mediante la eliminación de tetraciclina del medio de cultivo. Una vez inducida la expresión de la proteína exógena, las células se trataron con nocodazol y con el inhibidor de GSK3 β . Las células bloqueadas en prometafase a consecuencia del tratamiento con nocodazol se separaron del resto, que quedaron mayoritariamente en G2, y se analizó la expresión

proteica mediante western blot (Figura 30). Al inhibir GSK3 β se observa un aumento de los niveles de JunB respecto a las células control, con una evidente acumulación de JunB en células mitóticas, confirmando el papel de GSK3 en la degradación de JunB en G2 tardía. De nuevo se observa que la fosforilación de la S259 no se ve afectada por la inhibición de GSK3 β , sino que parece seguir el mismo patrón que JunB total. Además, se observa que los niveles de Ciclina A2 aumentan al inhibir la degradación de JunB, corroborando resultados ya publicados sobre el papel de JunB en la activación transcripcional de la Ciclina A2 (Andrecht et al., 2002; Farras et al., 2008).

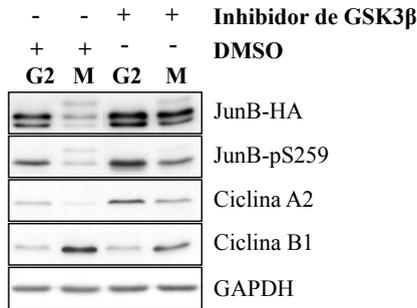


Figura 30: JunB se acumula al inhibir GSK3 β . Células UTA6 transfectadas de forma estable con JunB salvaje etiquetado con el epítipo HA se crecieron en ausencia de tetraciclina para permitir la expresión de JunB exógeno y se trataron durante 18 h con nocodazol. 6 h antes de recoger las células se incubaron con DMSO o con el inhibidor de GSK3 β . Se separaron las células mitóticas (M) de las enriquecidas en G2, que permanecen más adheridas a la placa de cultivo, y se analizaron los extractos proteicos mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-HA, para la detección de JunB total, anti-JunB fosforilado en la S259, anti-Ciclina A2, anti-Ciclina B1 y anti-GAPDH. La Ciclina B1, que se acumula en mitosis, se usó como indicador del enriquecimiento en células mitóticas.

Para complementar los resultados obtenidos mediante ensayos de inhibición farmacológica utilizamos ARN de interferencia para silenciar la expresión de GSK3 en células U2OS que se sincronizaron en G2/M mediante la adición de nocodazol (Figura 31). El silenciamiento de GSK3 total o de su isoforma GSK3 β , pero no el de GSK3 α , conduce a una disminución de la fosforilación de la T255, confirmando a GSK3 β como la quinasa responsable de la fosforilación de JunB en la T255 en G2. La fosforilación en la S259 no está afectada por el silenciamiento de GSK3, como tampoco lo está por el

Resultados

silenciamiento de la Ciclina A2 o de la Ciclina B1, sugiriendo que estas quinasas tampoco son las responsables de la fosforilación de este residuo.

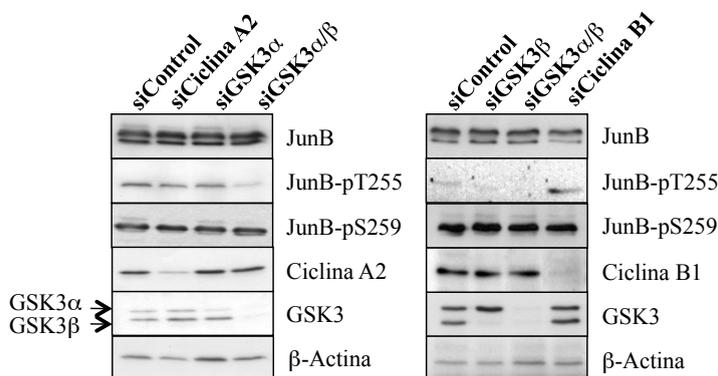


Figura 31: La isoforma β de GSK3 es la responsable de fosforilar a JunB en G2. Se llevó a cabo el silenciamiento génico de Ciclina A2, GSK3 α , GSK3 β , GSK3 α/β y Ciclina B1 mediante doble transfección de células U2OS con los siARNs específicos de cada gen. 16 h antes de recoger las células se añadió nocodazol para enriquecer las células en G2/M y se analizaron los extractos proteicos por western blot. La disminución de proteína consecuencia del silenciamiento génico se confirmó con anticuerpos contra Ciclina A2, Ciclina B1 y GSK3 y los efectos del silenciamiento en las fosforilaciones de JunB se analizaron con sus anticuerpos fosfoespecíficos.

Finalmente, con objeto de confirmar que la fosforilación de los residuos del fosfodegrón de JunB es necesaria para su degradación en G2 tardía, analizamos la variación de los niveles de JunB durante el ciclo celular en células UTA6 transfectadas de forma estable con el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB. Células UTA6-Control y células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se sincronizaron en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina y se liberaron del bloqueo en presencia de nocodazol al mismo tiempo que se eliminó la tetraciclina (Tc) del medio para permitir la expresión de la proteína exógena (Figura 32). A diferencia de JunB endógeno, el mutante es muy estable y no se degrada al final de G2, acumulándose a medida que las células alcanzan la mitosis. Además, se observa que la Ciclina A2, diana transcripcional de JunB, se acumula en las células que expresan el mutante no degradable de JunB. La débil señal que se observa con el anticuerpo anti JunB fosforilado en la S259 en las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB correspondería a JunB endógeno.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que la degradación de JunB en G2 tardía depende de la fosforilación de los residuos S251, T255 y S259. Estas fosforilaciones son necesarias para la interacción con la E3 ligasa Fbxw7 que media la ubiquitinación y posterior degradación de JunB por el proteasoma y en ellas juega un papel importante la quinasa GSK3 β como responsable de, al menos, la fosforilación en la T255.

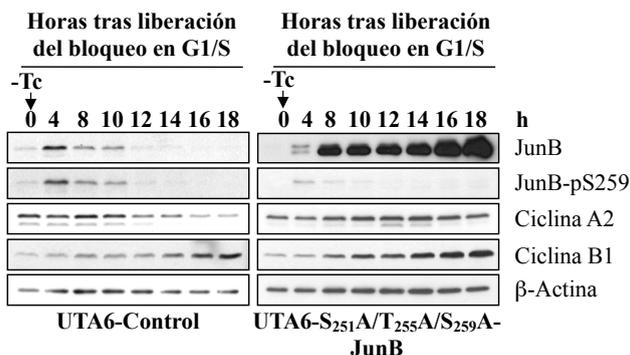


Figura 32: S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB no se degrada y se acumula a medida que las células progresan en el ciclo celular. Células UTA6 transfectadas de forma estable con S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB o con el vector vacío a modo de control se sincronizaron en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina en presencia de tetraciclina (Tc). Tras liberar las células del bloqueo se eliminó la tetraciclina del medio para permitir la expresión de S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB, se añadió nocodazol al medio y se recogieron células a las horas indicadas. A T0 las células sincronizadas se hayan en la transición G1/S y a T18 en mitosis. Como control de la sincronización se utilizó Ciclina B1 que se acumula en células mitóticas. Se prepararon extractos proteicos y se analizaron mediante western blot con los anticuerpos contra JunB, JunB fosforilado en la S259, Ciclina A2, Ciclina B1 y β -Actina.

5. Posible papel de otros residuos de JunB en su estabilidad en G2.

Además de los residuos fosforilables de JunB aquí analizados, no hay que descartar el posible papel de otros residuos en el control de su estabilidad en G2. Concretamente, se ha descrito que la mutación a alaninas de los residuos fosforilables T150 y S186 conduce a una estabilización de JunB en mitosis (Bakiri et al., 2000; Farras et al., 2008). Sin embargo, al sincronizar en G1/S células UTA6 transfectadas de forma estable con el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB y analizar la variación de los niveles de JunB en el ciclo se observa que este

Resultados

mutante, aunque más estable que JunB salvaje, continúa degradándose hacia el final de G2 (Farras et al., 2008), sugiriendo la existencia de otros residuos implicados en la estabilidad de JunB en G2. Partiendo de esa idea, en este trabajo hemos identificado los residuos S251, T255 y S259 como los residuos clave para la estabilidad de JunB en G2.

Una posibilidad que explicaría el papel de los residuos T150 y S186 en la estabilidad de JunB en G2 sería que su fosforilación fuese necesaria para la fosforilación de los residuos del fosfodegrón. Para testar esta hipótesis se analizó en primer lugar la fosforilación de JunB en el residuo S259 en células UTA6 que expresan de forma estable el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB (Farras et al., 2008) en crecimiento asincrónico y sincronizadas en fase G2 y mitosis (Figura 33). La fosforilación en la S259 se detecta tanto en las células que expresan JunB salvaje como en las que expresan su mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB, siendo mayor en las células con niveles más altos de JunB, acorde con lo observado en experimentos anteriores. Se observa además que el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB, aunque más estable que JunB salvaje, continúa degradándose antes de mitosis. En esta figura también puede apreciarse que en el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB se suprime el cambio de movilidad electroforética que experimenta el JunB salvaje que queda sin degradar en mitosis.

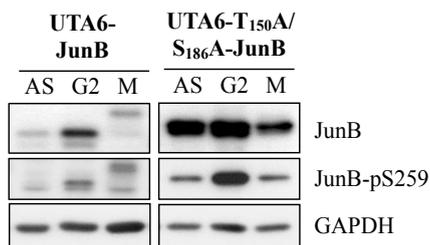


Figura 33: La fosforilación en la S259 no depende de los residuos T150 y S186. Células UTA6 transfectadas de forma estable con JunB salvaje o con el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB se crecieron en ausencia de tetraciclina y en presencia de nocodazol durante 16 h y se separaron las células enriquecidas en fase G2 de las mitóticas (M). Se crecieron además células en ausencia de nocodazol para obtener una población en crecimiento asincrónico (AS). Los extractos proteicos se analizaron mediante western blot con los anticuerpos anti-JunB, anti-JunB-pS259 y anti-GAPDH.

Para confirmar este resultado y analizar el efecto de las mutaciones en la T150 y la S186 en la fosforilación de la T255, así como el posible efecto de

las mutaciones en la S251, la T255 y la S259 en las fosforilaciones en la T150 y la S186 se realizaron transfecciones transitorias en células U2OS con JunB salvaje o con los mutantes S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB o T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB. Mediante el uso de anticuerpos fosfoespecíficos se analizaron las fosforilaciones de estos cuatro residuos. Según se aprecia en la Figura 34 no parece que haya relación entre las fosforilaciones de unos y otros residuos ya que en el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB los residuos T255 y S259 sí se fosforilan y lo mismo sucede con los residuos T150 y S186 en el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB.

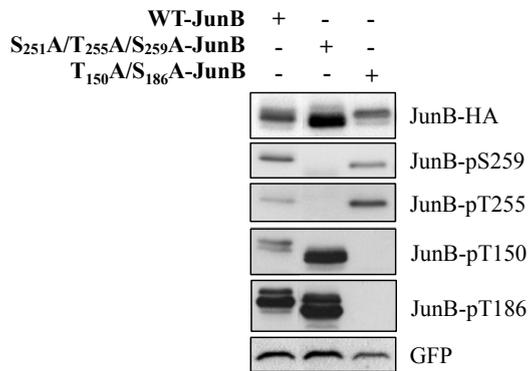


Figura 34: Mutaciones en T150 y S186 no afectan a la fosforilación del fosfodegrón ni viceversa. Se cotransfectaron células U2OS con JunB salvaje o con sus mutantes S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB o T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB junto con GFP a modo de control de la transfección. Trascorridas 36 h se prepararon extractos proteicos y se utilizaron los anticuerpos indicados a la derecha de la figura para la inmunodetección específica de las distintas formas fosforiladas de JunB.

Adicionalmente, analizamos los cambios en la fosforilaciones de los residuos T150 y S186 desde la transición G1/S a mitosis en células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB sincronizadas en G1/S comparándolos con los que suceden en células UTA6-control y UTA6-JunB sincronizadas en paralelo (Figura 35).

La fosforilación en la S186 se observa en niveles bajos a medida que las células progresan por el ciclo aumentando finalmente en células mitóticas. Este patrón se observa tanto en las células control como en las células que sobreexpresan JunB o su mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB, aunque en estas últimas los niveles de fosforilación son mayores a lo largo del ciclo

Resultados

coincidiendo con la mayor cantidad de proteína presente. La fosforilación de la T150, sin embargo, parece restringida a células mitóticas ya que no se observa aumento en su fosforilación antes de mitosis en el mutante que acumula JunB. Se ha sugerido que la fosforilación en la T150 está mediada por el complejo CDK2-Ciclina B1 basándose en resultados positivos de esta fosforilación *in vitro* (Bakiri et al., 2000). En ese sentido, se observa que el aumento en los niveles de Ciclina B1 coincide con el aumento en la fosforilación de la T150.

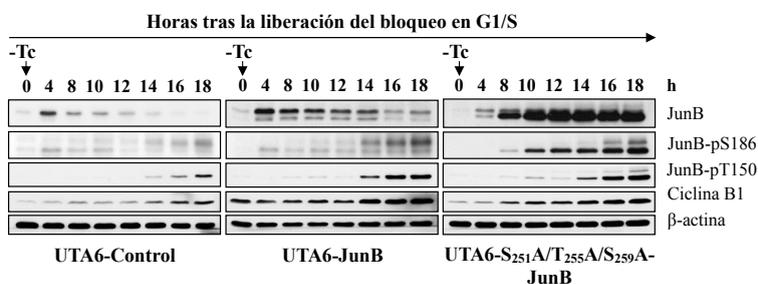


Figura 35: Las fosforilaciones en la T150 y la S186 aumentan en mitosis también en el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB. Células UTA6 transfectadas de forma estable con JunB salvaje, con su mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB o con el vector vacío (UTA6-Control) se sincronizaron en G1/S como se describe en la Figura 32 y se prepararon extractos proteicos a los tiempos indicados. A T0 las células se encuentran en la transición G1/S y a T18 en mitosis. El incremento en los niveles de Ciclina B1 es indicativo de mitosis. Se utilizaron anticuerpos fosfoespecíficos para detectar los residuos T150 y S186 de JunB fosforilados.

6. La degradación de cJun por GSK3-Fbxw7 no ocurre en G2.

Otro miembro de familia AP-1, cJun, también es reconocido por la E3 ligasa Fbxw7 para su degradación proteasomal mediante un mecanismo dependiente de GSK3 similar al aquí descrito para JunB. Esta degradación ocurre al final de la fase G1 en células estimuladas por la adición de suero (Wei et al., 2005). Sin embargo, en contraste con JunB, los niveles de cJun se mantienen estables en G2/M (Bakiri et al., 2000). Acorde con esta afirmación, nosotros hemos observado que los niveles de cJun apenas varían en células UTA6 sincronizadas que avanzan desde G1/S a mitosis (Figura 36). Se ha descrito que la fosforilación de cJun por la quinasa JNK en varios residuos

de serina de su extremo N terminal conduce a una disminución de su ubiquitinación y un consecuente aumento de su estabilidad y de su actividad transcripcional (Bakiri et al., 2000; Fuchs et al., 1996; Musti et al., 1997). Al menos uno de esos residuos N terminal, la S73, está fosforilado en el periodo de G1/S a mitosis (Figura 36) lo que podría explicar el escape de cJun a su degradación por GSK3-Fbxw7 en G2/M cuando la quinasa GSK3 está activa.

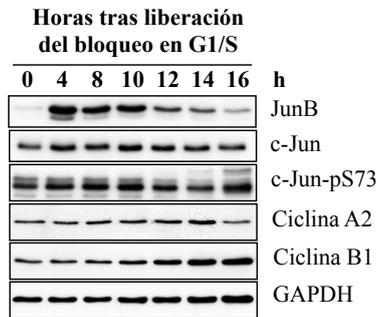


Figura 36: A diferencia de JunB, los niveles de cJun no disminuyen en G2/M. Se sincronizaron células U2OS en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina. Tras la liberación del bloqueo, se añadió nocodazol al medio para evitar que las células progresasen más allá de mitosis. Se prepararon extractos proteicos de células recogidas a los tiempos indicados que se analizaron mediante western blot con los anticuerpos indicados en la figura. A T0 las células se encuentran en G1/S y a T18 en mitosis. La detección de Ciclina A2 y de Ciclina B1 es indicativa de la progresión hacia mitosis.

La diferente regulación de JunB y cJun en G2/M pone de manifiesto la importancia de las modificaciones post-transcripcionales en el control de la estabilidad proteica y la actividad transcripcional de los miembros de la familia AP-1.

Resultados 2:

Consecuencias de la acumulación de JunB en mitosis. Implicación en neoplasias humanas.

1. La expresión de Ciclina A2 aumenta en células donde el mecanismo de degradación de JunB es defectuoso.

La Ciclina A2 es una diana transcripcional de JunB (Andrecht et al., 2002; Farras et al., 2008). En este sentido, la Figura 32 muestra como la acumulación del mutante JunB no degradable S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB en células sincronizadas desde G1/S a mitosis va acompañada de un aumento en los niveles de Ciclina A2. Para comprobar que este incremento en los niveles de Ciclina A2 es debido a un aumento de su transcripción, analizamos por RT-qPCR los niveles de su ARN mensajero en células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB en crecimiento asincrónico y sincronizadas en G2 y M (Figura 37). Comparando con las células UTA6-Control se observa como la expresión génica de *Ciclina A2* aumenta en las células que sobreexpresan JunB de forma similar a como lo hacen sus niveles proteicos.

Analizamos además los niveles de Ciclina A2 en las células DLD1^{FBXW7}-/- sincronizadas en G2 y M en las que JunB se acumula en mitosis debido a la ausencia de Fbxw7. En la Figura 38B se observa que, en comparación con las células parentales DLD1, la expresión génica de *Ciclina A2* aumenta en las células DLD1^{FBXW7}-/- en las que la degradación de JunB es

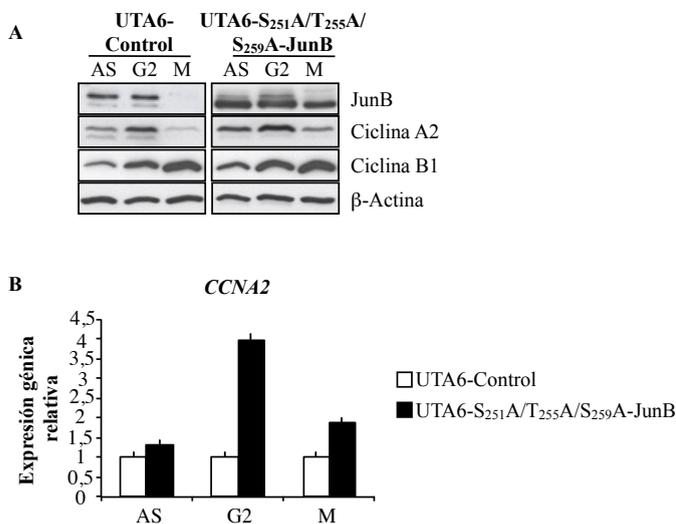


Figura 37: Los niveles de Ciclina A2 están alterados en las células que expresan de forma estable el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB. (A) Células UTA6 transfectadas de forma estable con S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB o con el vector vacío a modo de control se crecieron en ausencia de tetraciclina y en presencia de nocodazol durante 16 h y se separaron las células enriquecidas en fase G2 de las mitóticas (M). Se crecieron además células en ausencia de nocodazol para obtener una población en crecimiento asincrónico (AS). Se obtuvieron extractos proteicos y se analizaron mediante western blot con los anticuerpos contra JunB, Ciclinas A2 y B1 y β-actina. El incremento en los niveles de Ciclina B1 indica enriquecimiento en células mitóticas. (B) Se extrajo ARN total de las poblaciones celulares descritas en A y se analizaron los niveles de mRNA de *Ciclina A2* mediante RT-qPCR normalizando respecto al gen de referencia *GUSB*. Los niveles de expresión de los genes en las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se expresan como variaciones respecto a los de las células UTA6-control. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

defectuosa, sobretodo en células mitóticas. Este incremento en su transcripción se ve reflejado en el aumento de los niveles proteicos de Ciclina A2 (Figura 38A). La Figura 38A también muestra los niveles proteicos de GSK3 y de su forma inactiva (GSK3β-pS9). Coincidiendo con lo mostrado anteriormente en células U2OS (Figura 28) y con lo descrito en células HeLa (Wakefield et al., 2003), la actividad de GSK3 disminuye en células mitóticas. Como consecuencia, la fosforilación en la T255 de JunB también disminuye. Se observa, además, que la fosforilación en la S259 en las células DLD1^{FBXW7-/-} mitóticas es mayor coincidiendo con la acumulación de JunB.

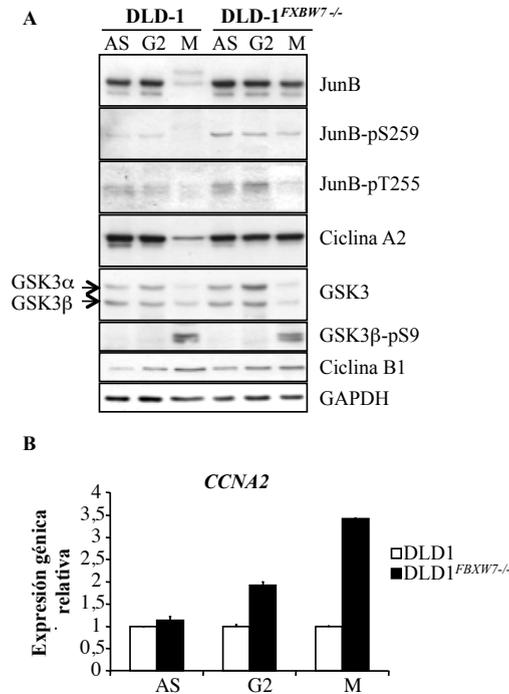


Figura 38: La deletión de *FBXW7* conduce a un aumento de los niveles de Ciclina A2. (A) Se analizaron mediante western blot extractos proteicos de células DLD1 y DLD1^{FBXW7-/-} en crecimiento asincrónico (AS) o enriquecidas en fase G2 y mitosis (M) mediante tratamiento con nocodazol y posterior separación de las poblaciones celulares. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos contra JunB total y sus formas fosforiladas en la S259 y la T255, las Ciclinas A2 y B1, GSK3 total y su isoforma β fosforilada en la S9 y GAPDH que se usó como control de carga. La acumulación de Ciclina B1 es indicativa del enriquecimiento en células mitóticas. (B) Se extrajo ARN total de las mismas poblaciones celulares descritas en A y se analizó la expresión génica de *Ciclina A2* mediante RT-qPCR normalizando los valores obtenidos respecto al gen de referencia *GUSB*. Los niveles de mRNA en las células DLD1^{FBXW7-/-} se expresaron como variación respecto a los niveles en las células DLD1 tomadas como control. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

2. DDX11 es una nueva diana transcripcional de JunB.

La degradación de JunB en la transición G2/M es importante para el correcto desarrollo de la mitosis. Si sus niveles se mantienen elevados en esta fase se produce un retraso en el desarrollo de la misma que va acompañado de la aparición de defectos mitóticos (Farras et al., 2008). Por otro lado, la

disminución de Ciclina A2 es imprescindible para el correcto desarrollo de las fases finales de mitosis y se ha observado que su sobreexpresión conduce a un retraso del inicio de la anafase y defectos mitóticos similares a lo observado para JunB (den Elzen & Pines, 2001; Farras et al., 2008). La acumulación de Ciclina A2 podría pues explicar los defectos mitóticos asociados a altos niveles de JunB en mitosis. Sin embargo, se ha comprobado que la disminución de los niveles de Ciclina A2 mediante silenciamiento génico no es suficiente para revertir el fenotipo mitótico observado en células que sobreexpresan JunB lo que podría indicar la existencia de otras dianas transcripcionales de JunB todavía no identificadas que contribuyan a un desarrollo inadecuado de la mitosis (Farras et al., 2008).

Con la finalidad de determinar si la disminución de los niveles de JunB en G2 es necesaria para la expresión adecuada de otros reguladores de ciclo celular aparte de Ciclina A2 se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real los cambios en la expresión de 84 genes involucrados en el control del ciclo celular causados por la acumulación de JunB en mitosis. Para ello células UTA6-Control y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se crecieron en ausencia de tetraciclina durante 48 h para permitir la expresión del mutante no degradable de JunB y se extrajo ARN de células en crecimiento exponencial. Para amplificar por PCR a tiempo real los 84 genes se empleó una micromatriz comercial de SABiosciences con los correspondientes oligonucleótidos ya incluidos en ella. En el gráfico de la Figura 39 se compara la expresión normalizada de cada uno de los genes en las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB y las células UTA6-Control. Los genes para los que se detectó un cambio de expresión de más de dos unidades están indicados. La lista completa de los genes incluidos en la micromatriz así como los correspondientes cambios de expresión se presenta en la Tabla A.1 del Anexo (CD adjunto).

En consistencia con el papel descrito para JunB como represor transcripcional de *Ciclina D1* (Bakiri et al., 2000), la expresión de este gen está disminuida en las células que sobreexpresan JunB no degradable. Adicionalmente se observan variaciones de expresión en dos genes hasta la fecha no identificados como dianas transcripcionales de JunB: *DIRAS3* y *DDX11*. Los niveles de mRNA de *DIRAS3*, una GTPasa homóloga a Ras,

aparecen ligeramente incrementados en las células en las que se acumula JunB. La variación más dramática la presenta *DDX11*, cuya expresión se encuentra reprimida algo más de 3.5 veces en las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB. El gen *DDX11* codifica una helicasa de ADN implicada en la regulación de la transición G2/M y que es importante para la correcta cohesión de las cromátidas hermanas (Farina et al., 2008; Parish et al., 2006).

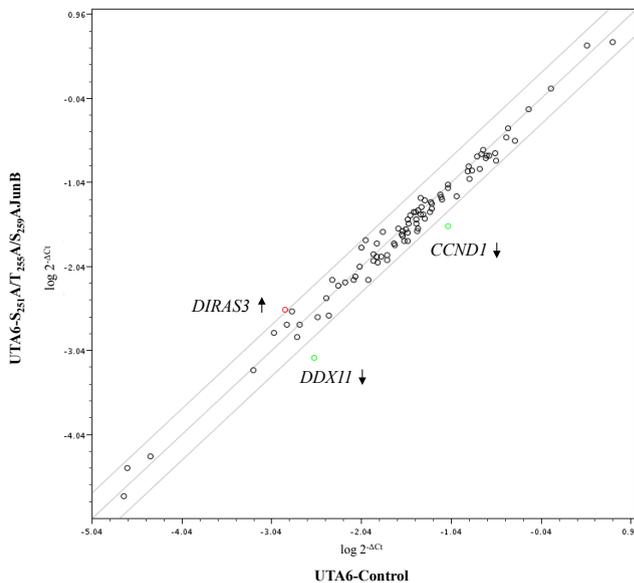


Figura 39: Análisis de expresión de genes reguladores de ciclo celular en células que sobreexpresan JunB. El gráfico compara la expresión normalizada de 84 genes implicados en el control del ciclo celular entre células UTA6 transfectadas de forma estable con S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB y células UTA6 transfectadas con el vector vacío a modo de control. Las células se crecieron durante 48 h en ausencia de tetraciclina para permitir la expresión de la proteína exógena y la expresión génica diferencial se analizó mediante una micromatriz de RT-qPCR. Los puntos incluidos en la franja central representan genes cuyos cambios de expresión están por debajo de 2 unidades. Los dos puntos que quedan por debajo de la franja corresponden a los genes *DDX11* y *CCND1* que aparecen reprimidos en células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB y el queda por encima corresponde a *DIRAS3*, ligeramente sobreexpresado.

Para confirmar la represión de *DDX11* en las células que expresan el mutante no degradable de JunB analizamos por RT-qPCR y por western blot los niveles de mRNA y proteína, respectivamente, en células en crecimiento asincrónico y en células sincronizadas en G2 y M. En las tres poblaciones celulares observamos una disminución de los niveles de *DDX11*, tanto de

Resultados

expresión génica como de proteína, en las células que expresan el mutante no degradable de JunB comparado con las células control, siendo más acusada en las células sincronizadas en G2 y M (Figura 40). Analizamos además los niveles de mRNA y de proteína de DDX11 en células DLD1^{FBXW7-/-} en crecimiento asincrónico y sincronizadas en G2 y M y se confirmó que la acumulación de JunB debido a su degradación defectuosa en G2/M conduce a la represión transcripcional de *DDX11* (Figura 40).

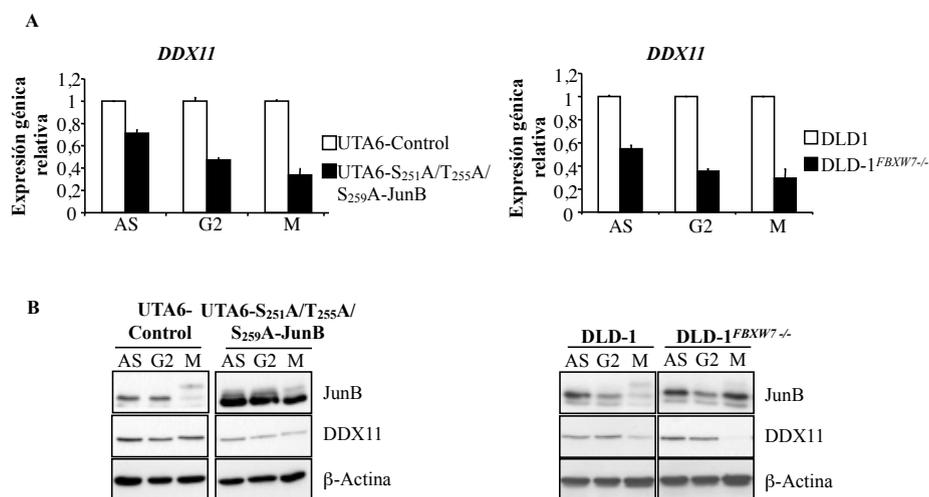


Figura 40: La degradación defectuosa de JunB reprime DDX11 en células mitóticas.

(A) Células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB y UTA6-control crecidas en ausencia de tetraciclina y células DLD1 y DLD1^{FBXW7-/-} se sincronizaron en G2/M mediante la adición de nocodazol y se separaron las poblaciones celulares enriquecidas en células en fase G2 de las células mitóticas (M). AS son células en crecimiento asincrónico. Los niveles de *DDX11* se determinaron mediante RT-qPCR usando *GAPDH* como gen de referencia y normalizando los resultados a los valores obtenidos en las células control. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. (B) Extractos proteicos de las células descritas en A se analizaron mediante western blot utilizando anticuerpos contra JunB, DDX11 y β-Actina.

Adicionalmente, disminuimos la expresión de JunB en células DLD1^{FBXW7-/-} sincronizadas en G2 y M mediante transfección con un siARN específico de JunB. La reducción en los niveles de JunB va acompañada de un aumento de DDX11 (Figura 41)

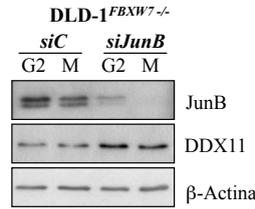


Figura 41: El restablecimiento de niveles bajos de JunB en células DLD1^{FBXW7-/-} mitóticas da lugar a un incremento de los niveles de DDX11. Células DLD1^{FBXW7-/-} se transfectaron con siARN específico de JunB (siJunB-792) o con un siARN control y posteriormente se trataron con nocodazol durante 16 h. Las células mitóticas (M) se separaron de las enriquecidas en fase G2 y sus extractos proteicos se analizaron mediante western blot con anticuerpos contra JunB, DDX11 y β-Actina.

Finalmente, transfectamos células HeLa con JunB y analizamos la expresión génica de *DDX11* en células sincronizadas en G2 y M (Figura 42). La sobreexpresión de JunB salvaje en estas células es suficiente para causar la represión de *DDX11* confirmando el papel de esta proteína en la regulación transcripcional de esta helicasa de ADN.

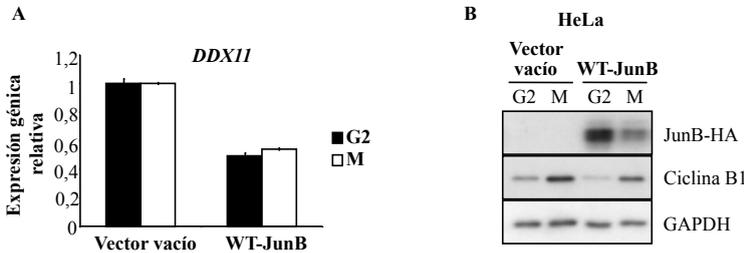


Figura 42: La sobreexpresión de JunB exógeno en células HeLa reprime *DDX11*. (A) Se transfectaron células HeLa con wt-JunB-HA o con el vector vacío y se trataron con nocodazol para obtener poblaciones enriquecidas en células en fase G2 y mitosis (M). Los niveles de *DDX11* se determinaron mediante RT-qPCR utilizando *GAPDH* como gen de referencia. Los resultados se expresan relativos a los obtenidos en las células transfectadas con el vector vacío. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. (B) Mediante western blot se analizaron los niveles de JunB exógeno en las células transfectadas utilizando un anticuerpo contra HA. La detección de Ciclina B1 indica el enriquecimiento en células mitóticas y GAPDH se utilizó como control de carga.

JunB se une preferentemente a secuencias consenso en el ADN conocidas como secuencias AP-1/CRE y AP-1/TRE (Eferl & Wagner, 2003). El análisis de la secuencia genómica de *DDX11* reveló la presencia de varias de estas secuencias TRE y CRE en su promotor. Para comprobar si JunB se une a alguno de estas secuencias consenso se inmunoprecipitó la cromatina con el anticuerpo anti-JunB en células UTA6-Control y UTA6-

Resultados

S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB, crecidas durante 24 h en ausencia de tetraciclina para inducir la expresión de JunB exógeno, y en células DLD1 y DLD1^{FBXW7-/-}. Los fragmentos de ADN inmunoprecipitados se analizaron mediante qPCR utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente tres regiones del promotor de *DDX11* conteniendo los potenciales sitios de unión de JunB. En la Figura 43A se muestra un esquema del promotor de *DDX11* donde se indican las tres regiones amplificadas.

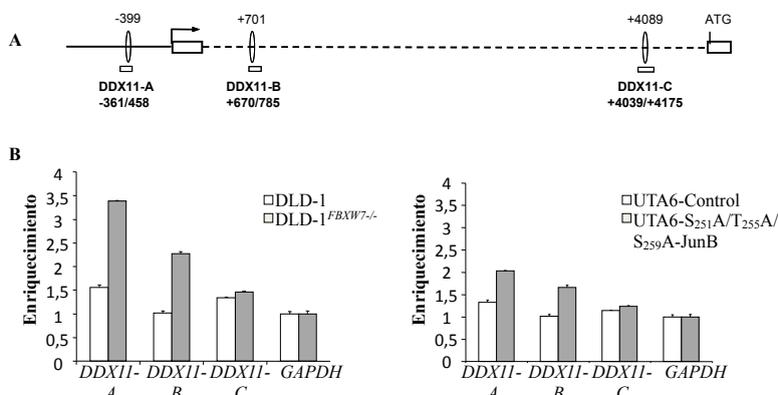


Figura 43: JunB se une al promotor de *DDX11*. (A) Esquema del promotor de *DDX11*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción y ATG el de la traducción. Los rectángulos representan exones, la línea discontinua intrones y los óvalos sitios TRE/CRE con su posición respecto al inicio de la transcripción indicada arriba. Las regiones amplificadas por PCR y su posición relativa se indican debajo de cada sitio TRE/CRE y se nombran con las letras A, B y C. (B) Se inmunoprecipitó la cromatina con anticuerpo anti-JunB en células DLD1 y DLD1^{FBXW7-/-} y células UTA6-Control y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB estimuladas durante 24 h en ausencia de tetraciclina. Las regiones A, B y C descritas en el apartado A se amplificaron mediante RT-qPCR. Los datos se expresan como enriquecimiento de la región de interés en el inmunoprecipitado respecto a su control negativo (inmunoprecipitación sin anticuerpo) y normalizados respecto a una región del promotor de *GAPDH*. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

En las células control (DLD1 y UTA6-Control) se observa la unión de JunB endógeno a la región A, que incluye el sitio de unión centrado en la posición -399 del promotor de *DDX11* (Figura 43B). Las células en las que JunB se acumula debido a su degradación defectuosa, esto es, células DLD1^{FBXW7-/-} y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB, muestran una mayor unión de JunB a esa región así como a la región B centrada en la posición +701 del promotor de *DDX11*. También se observa unión de JunB endógeno al sitio C centrado en la posición +4089 del promotor de *DDX11* y un ligero

incremento en dicha unión en las células que acumulan JunB. Estos resultados demuestran la unión *in vivo* de JunB al promotor de *DDX11*.

3. La represión de *DDX11* causa defectos de cohesión en las cromátidas hermanas.

Se ha descrito que la depleción de *DDX11* en células HeLa conduce a defectos de cohesión de las cromátidas hermanas y retraso en mitosis (Parish et al., 2006). Para comprobar si la represión de *DDX11* producida como consecuencia de la acumulación de JunB en mitosis conduce a defectos mitóticos como los descritos se visualizaron al microscopio cromosomas metafásicos de células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB.

Para analizar si la separación entre los centrómeros estaba alterada se realizaron ensayos FISH marcando específicamente el centrómero del cromosoma 7. La detección de una única señal fluorescente indica que los cromosomas están fuertemente unidos y, por tanto, no se pueden distinguir las dos señales de los centrómeros (Figura 44A panel izquierdo). La detección de dos señales indica, por el contrario, separación entre los centrómeros (Figura 44A panel derecho). El 25% de las metafases de células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB analizadas mostró una distancia media de separación entre los centrómeros de $0.51 \pm 0.2 \mu\text{m}$, indicando la presencia de defectos de cohesión centrómerica en estas células.

En los paneles de la Figura 44 se observa que las células con cohesión normal de sus cromosomas metafásicos muestran una unión muy estrecha entre sus pares de cromátidas. Sin embargo, en aquellas con defectos de cohesión los cromosomas aparecen menos compactados y con una mayor separación entre las cromátidas hermanas tanto a la altura de los centrómeros como entre los brazos. Al contabilizar los cromosomas metafásicos con defectos de cohesión en células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se obtuvo un porcentaje del 31% frente al 13% obtenido para las células UTA6-Control (Figura 44C). La pérdida de cohesión de las cromátidas hermanas en las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se recuperó al

Resultados

transfectarlas con DDX11 (Figura 44D) indicando el papel crítico que la represión de *DDX11* debida a la acumulación de JunB en mitosis tiene en la manifestación del fenotipo mitótico observado en estas células.

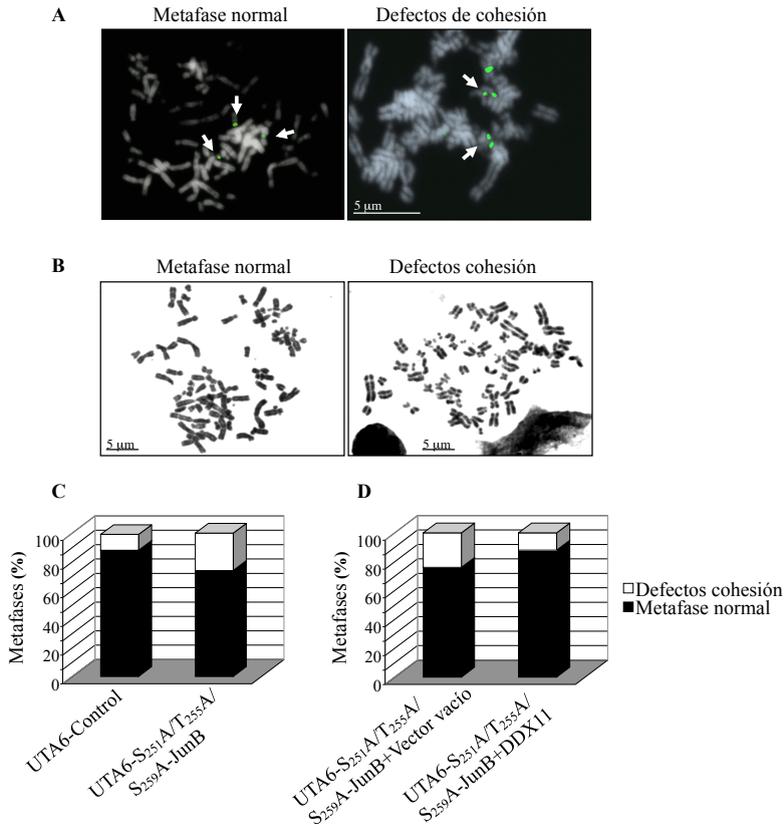


Figura 44: La degradación defectuosa de JunB conduce a defectos de cohesión en las cromátidas hermanas. (A) Células UTA6-Control y UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se crecieron durante 72 h en ausencia de tetraciclina para inducir la expresión de JunB y 2 h antes de fijar las células se les añadió colcemida. El ADN se tiñó con DAPI y se utilizó una sonda específica para marcar el centrómero del cromosoma 7. Se muestran paneles representativos de células visualizadas al microscopio confocal sin separación entre los centrómeros de cromátidas hermanas (metafase normal) y con separación anormal de los centrómeros (metafase con defectos de cohesión). (B) Se prepararon células como las descritas en A y se utilizó la tinción de Wright para la visualización de los cromosomas al microscopio. Se muestran paneles representativos de células metafásicas normales y con defectos de cohesión. (C) Se contabilizaron las células descritas en B que presentan defectos de cohesión en las cromátidas hermanas. El gráfico muestra el porcentaje de metafases que presentan defectos de cohesión de un mínimo de 100 metafases analizadas en cada línea celular. (D) Células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB se transfectaron con DDX11 o con el vector vacío en ausencia de tetraciclina y transcurridas 72 h se analizaron sus cromosomas metafásicos al microscopio. El gráfico muestra el porcentaje de células metafásicas con defectos de cohesión. Al menos 100 metafases de cada línea celular fueron analizadas.

4. El mecanismo de degradación de JunB está alterado en linfoma anaplásico de células grandes ALK positivo.

La expresión de JunB está incrementada en el linfoma anaplásico de células grandes (LACG) ALK positivo (Mathas et al., 2002; Rassidakis et al., 2005). El LACG es un tipo de linfoma no Hodgkin derivado de células T frecuentemente asociado con traslocaciones cromosómicas que implican al locus *ALK*. Una de las más frecuentes es la que resulta en la proteína de fusión NPM-ALK en la que la quinasa de linfoma anaplásico ALK está constitutivamente activada y contribuye de manera crítica a la linfomagénesis (Amin & Lai, 2007; Medeiros & Elenitoba-Johnson, 2007).

Para estudiar si la degradación de JunB en G2 está alterada en este tipo de linfoma, células derivadas de LACG portadoras de la proteína de fusión NPM-ALK (células Karpas 299 (K-299) y SU-DHL1) así como células derivadas de linfocitos T con expresión normal de JunB (células Jurkat) se sincronizaron en G2/M mediante la adición de nocodazol y los niveles de proteína se analizaron mediante western blot. Se observó que en las células derivadas de LACG ALK+ JunB se acumula en G2/M, lo que no ocurre en las células control (Figura 45). Asimismo, los niveles de fosforilación de JunB en la S259 se mantienen elevados en G2/M en las células K-299 y SU-DHL1.

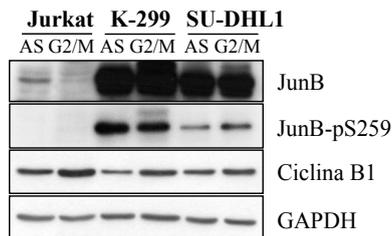


Figura 45: JunB se acumula en células prometáfásicas derivadas de linfoma anaplásico de células grandes. Se prepararon extractos proteicos de células T derivadas de leucemia linfoblástica aguda (Jurkat) y de linfoma anaplásico de células grandes (K-299 y SU-DHL1) sincronizadas en G2/M mediante tratamiento con nocodazol durante 24 h o en crecimiento asincrónico (AS). La expresión de JunB se analizó mediante western blot con anticuerpos contra JunB total y JunB fosforilado en la S259. La inmunodetección de Cyclina B1 se utilizó como indicador del enriquecimiento en células mitóticas y la de GAPDH como control de carga.

Las células de linfoma anaplásico de células grandes que expresan la oncoproteína quimérica NPM-ALK tienen activada de manera constitutiva

Resultados

la ruta PI3K/AKT (Slupianek et al., 2001). Se ha descrito que la activación constitutiva de esta ruta conduce a una disminución sustancial de la actividad de GSK3 β debido a su fosforilación en la S9 por la quinasa AKT (Singh et al., 2009). Como GSK3 β juega un papel fundamental en el marcaje de JunB para su degradación proteasomal la inhibición de esta quinasa en LACG ALK+ estaría alterando la degradación de JunB en G2 tardía. Con objeto de confirmar esta idea, células Karpas 299 y células SU-DHL1 se sincronizaron en G2/M mediante la adición de nocodazol y se trataron con concentraciones crecientes del inhibidor específico de PI3K, LY294002. La inhibición de PI3K conduce a una activación de la quinasa GSK3 que puede comprobarse analizando la disminución de la fosforilación de GSK3 en la S21 (GSK3 α) y en la S9 (GSK3 β), formas inactivas de la proteína. En la Figura 46 puede observarse como a medida que aumenta la dosis del inhibidor de PI3K, disminuye la fosforilación en la S21 (GSK3 α) y en la S9 (GSK3 β), indicando que hay activación de GSK3, y los niveles de JunB y de JunB fosforilado en la S259 disminuyen. En estas condiciones, la adición del inhibidor del proteasoma MG132 inhibe la degradación de JunB manteniendo sus niveles similares a los de la muestra sin tratar. Estos resultados confirman que la inactivación de GSK3 β por AKT mediada por NPM-ALK estabiliza a JunB y contribuye a su acumulación en mitosis en células tumorales LACG ALK+.

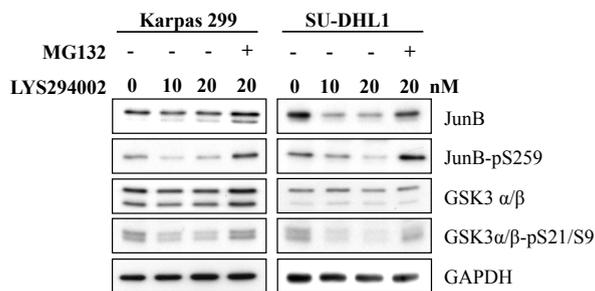


Figura 46: Alteración del mecanismo de degradación de JunB en células LACG ALK+. Células K-299 y SU-DHL1 se trataron con nocodazol durante 24 h junto con concentraciones crecientes del inhibidor de PI3K LYS294002. Donde se indica se añadió además el inhibidor del proteasoma MG132 6 h antes de recoger las células. Los extractos proteicos se analizaron mediante western blot con los anticuerpos contra JunB, JunB fosforilado en la S259, GSK3 α/β , GSK3 α/β fosforilado en la S21/S9 y GAPDH. El anticuerpo GSK3 α/β -pS21/S9 permite visualizar la forma inactiva de GSK3.

5. Células derivadas de LACG presentan niveles reprimidos de DDX11 y defectos de cohesión en las cromátidas hermanas.

Tras comprobar que el mecanismo de degradación de JunB está alterado en células derivadas de LACG quisimos comprobar si en estas células la acumulación de JunB en mitosis conduce a la represión de la helicasa DDX11 y a defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas al igual que ocurre en las células que expresan el mutante no fosforilable de JunB (células UTA6-S251A/T255A/S259A-JunB). En el western blot de la Figura 47 observamos que los niveles de DDX11 en las células Karpas 299 y SU-DHL1 disminuyen respecto a los observados en células Jurkat donde JunB no está sobreexpresado. Se observa además que los niveles de Ciclina A2, diana transcripcional de JunB sobre la que ejerce un efecto positivo, se mantienen elevados en mitosis en las células LACG.

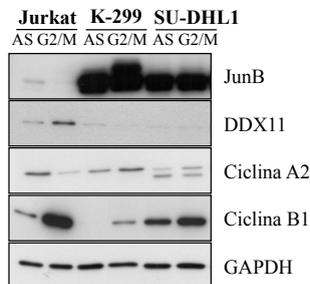


Figura 47: Células derivadas de LACG ALK+ presentan bajos niveles de DDX11. Se analizó la expresión de DDX11 mediante western blot en células Jurkat, K-299 y SU-DHL1 sincronizadas en G2/M mediante tratamiento con nocodazol o en crecimiento asincrónico (AS). La inmunodetección se realizó con anticuerpos contra JunB, DDX11, Ciclinas A2 y B1 y GAPDH. La Ciclina B1 se utilizó como marcador mitótico.

Seguidamente, decidimos disminuir los niveles de JunB para revertir el fenotipo observado. Para ello se transfectaron células Karpas 299 con siARN contra JunB. La disminución de los niveles de JunB en células Karpas 299 sincronizadas en G2/M corrige tanto la disminución de DDX11 como la acumulación de Ciclina A2 observadas en estas células (Figura 48)

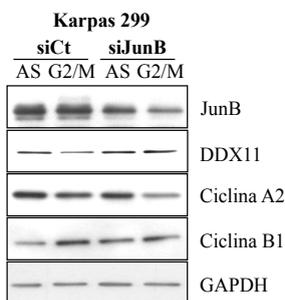


Figura 48: El silenciamiento génico de JunB en células K299 conduce a un aumento en los niveles de DDX11 y una disminución de Ciclina A2. Se realizó una doble transfección con un siARN específico de JunB (siJunB-792) o un siARN control en células Karpas 299. Transcurridas 24 h se añadió nocodazol al medio para sincronizar las células en G2/M o bien se dejaron crecer en ausencia de nocodazol para obtener una población celular en crecimiento asincrónico (AS). Se prepararon extractos proteicos y se analizaron mediante western blot utilizando anticuerpos contra las proteínas indicadas. El incremento de los niveles de Ciclina B1 en las células sincronizadas en G2/M es indicativo del enriquecimiento en células mitóticas.

Finalmente, analizamos la cohesión de las cromátidas hermanas en las células Karpas 299 y SU-DHL mediante análisis al microscopio de cromosomas metafásicos detectándose un alto porcentaje de defectos de cohesión. En la Figura 49 se muestran ejemplos de cromosomas metafásicos de células K-299 y SU-DHL1 en los que puede apreciarse una separación prematura de los centrómeros y cromátidas hermanas completamente separadas.

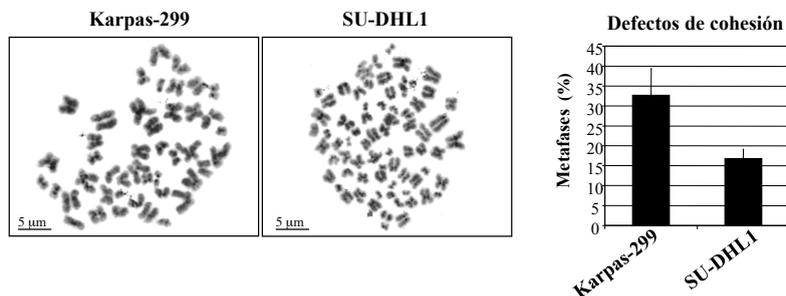


Figura 49: Células LACG presentan defectos de cohesión en sus cromátidas hermanas. Se analizaron al microscopio cromosomas metafásicos de células Karpas-299 y SU-DHL1 teñidos con tinción de Wright. Se muestran paneles representativos de metafases con cohesión defectuosa de las cromátidas hermanas. El gráfico muestra los porcentajes de células metafásicas con defectos de cohesión contabilizadas en cada línea celular. Se analizaron al menos 100 metafases en cada caso procedentes de tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

En conjunto, estos datos indican que la estabilización de JunB da lugar a una cohesión anormal de las cromátidas hermanas en células LACG ALK+ vía represión de DDX11 y pone de manifiesto la importancia de la desaparición fisiológica de JunB al final de G2 para un correcto desarrollo de la mitosis.

Resultados 3:

Identificación de nuevas dianas transcripcionales de JunB implicadas en el control del ciclo celular.

1. El silenciamiento de JunB da lugar a una menor población de células en fase S.

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de JunB oscilan durante el ciclo celular. Han de mantenerse bajos durante mitosis para evitar la aparición de defectos mitóticos y, sin embargo, son elevados durante la fase S y el inicio de G2. Tras estudiar las consecuencias aberrantes de su acumulación en mitosis, nos preguntamos si la ausencia de JunB alteraría el correcto desarrollo del ciclo celular. Para ello, analizamos el perfil de ciclo celular mediante citometría de flujo en células U2OS en las que la expresión de JunB fue silenciada mediante ARN de interferencia. Se utilizaron dos oligonucleótidos de ARN de interferencia distintos dirigidos contra JunB (siJunB-792 y siJunB-848) (Figura 50). Ambos siARNs conducen a una notable disminución de los niveles del mRNA de JunB que se acompaña de una disminución de sus niveles proteicos, si bien siJunB-792 posee mayor capacidad de silenciar que siJunB-848 (Figura 50A). En los histogramas representados en la Figura 50C que muestran la distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular observamos una disminución de la

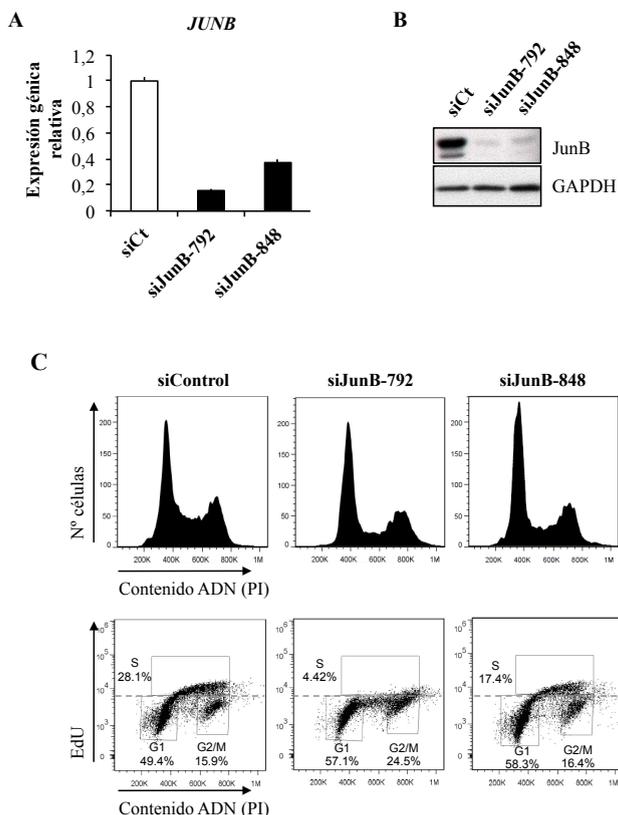


Figura 50: El número de células en fase S disminuye al silenciar JunB. (A) Células U2OS se transfectaron con siControl (siCt) o con cada uno de los dos siARNs dirigidos contra JunB (siJunB-792 y siJunB-848) y 48 h después se analizaron los niveles de mRNA de *JUNB* mediante RT-qPCR normalizando respecto al gen de referencia *S26*. Los niveles de expresión de *JUNB* en las células tratadas con los siARNs dirigidos contra él se expresan como expresión relativa respecto de las células transfectadas con siCt. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. (B) Se prepararon extractos proteicos de las poblaciones celulares descritas en el apartado A y se analizaron mediante western blot con anticuerpos contra JunB y contra GAPDH que se usó como control de carga. (C) Células U2OS se transfectaron con siControl o con los dos siARNs diferentes dirigidos contra JunB y transcurridas 72 h se incubaron durante 1 h con el reactivo EdU. Las células se fijaron y se incubaron con yoduro de propidio y con un fluoróforo que reacciona específicamente con el EdU y, mediante citometría de flujo multiparamétrica, se detectó simultáneamente el contenido en ADN y la incorporación de EdU a las células. Las células situadas en el pico de la izquierda de los histogramas se encuentran en fase G1, las que están en el pico de la derecha, con un contenido doble de ADN, se hallan en G2/M y la zona central corresponde a las células en fase S. En los gráficos inferiores las células positivas para EdU son las que se sitúan por encima de la línea discontinua. En función del contenido en ADN y de si son positivas para EdU se han delimitado las regiones correspondientes a células en G1, S y G2/M.

región central que contiene las células en fase S en células con JunB silenciado comparado con las células transfectadas con siARN control. Para tener una medida más exacta del número de células en fase S realizamos un ensayo de incorporación de EdU, nucleósido análogo a la timidina que se incorpora al ADN a medida que este se sintetiza. Gracias a la posterior unión de un fluoróforo al EdU, es posible detectar por citometría de flujo las células positivas para EdU que serán aquellas que se encuentran en fase S activa. La incorporación de EdU al ADN es mucho menor en las células con JunB silenciado, sobre todo en las silenciadas con el oligonucleótido siJunB-792, lo que apunta a un importante papel de JunB para la entrada en esta fase del ciclo celular.

2. Identificación de genes diferencialmente expresados al silenciar JunB en células U2OS

Para identificar los genes cuya expresión se ve alterada al silenciar JunB y que pueden dar lugar a la disminución de células en fase S descrita en el apartado anterior realizamos un análisis transcriptómico comparando los niveles de mARNs en células U2OS con la expresión de JunB silenciada y células control.

Células U2OS se transfectaron con un control negativo de siARN (siCt) o con cada uno de los dos siARNs dirigidos contra JunB (siJunB-792 y siJunB-848) y 48 h después se extrajo el ARN total de las células y se envió a la Unidad de Investigación Genómica del CRP-Santé, en Luxemburgo, para su hibridación en una micromatriz comercial de Affymetrix y la detección de los genes diferencialmente expresados. Los cambios de expresión obtenidos indican la expresión génica relativa en las células con JunB silenciado respecto a las células control y los datos se filtraron en función del método estadístico FDR (*False Discovery Rate*) considerando significativos aquellos con un $FDR < 0.05$. Se encontraron 1860 genes diferencialmente expresados al comparar las células transfectadas con siJunB-792 con las células control, de los cuales 866 tenían una expresión mayor en las células

con JunB silenciado y los 994 restantes una expresión menor (Tabla A.2 del Anexo, CD adjunto). En el caso del silenciamiento con siJunB-848 el número de genes con expresión diferencial disminuyó a 1507, 585 de los cuales estaban sobreexpresados en células con JunB silenciado comparado con las células control y 922 reprimidos (Tabla A.3 del Anexo en el CD adjunto). Al comparar los resultados obtenidos con los dos siARNs contra JunB sólo una fracción de los genes diferencialmente expresados, 111 en el caso de los sobreexpresados al silenciar JunB y 135 en el caso de los reprimidos, eran comunes a ambos siARNs (Figura 51 y Tabla A.4 del Anexo, CD adjunto).

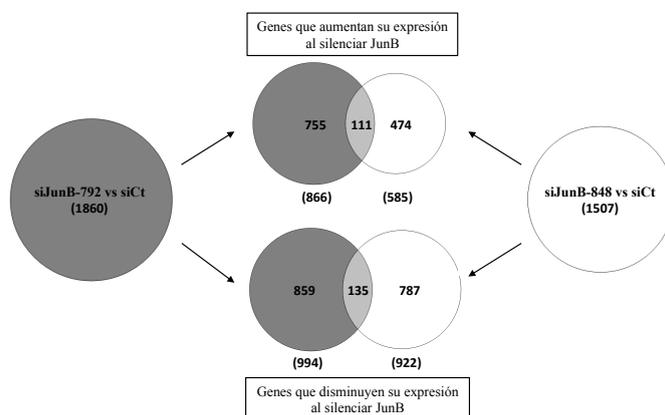


Figura 51: Genes diferencialmente expresados detectados al silenciar JunB. Se representa el total de genes diferencialmente expresados obtenidos al comparar los niveles de los mARNs de células U2OS transfectadas con siJunB-792 o siJunB-848 y células control, así como los subconjuntos de genes que presentan una expresión incrementada al silenciar JunB respecto a las células control o disminuida (FDR<0.05). Mediante diagramas de Venn se muestra el número de genes cuya expresión se ve afectada de la misma manera al silenciar JunB con ambos siARNs.

A la vista de estos resultados nos preguntamos si la diferencia en la expresión de genes según se silencie JunB con un siARN u otro podría deberse a efectos inespecíficos de los siARNs contra otros miembros de la familia AP-1. Analizamos los cambios de expresión de los miembros de las familias Jun y Fos obtenidos del análisis transcriptómico antes del filtrado en función del valor FDR y sus niveles proteicos mediante western blot (Tabla 8 y Figura 52). Lo primero que cabe destacar es la mayor disminución de los niveles de JunB al silenciar su expresión con el oligonucleótido siJunB-792 comparado con el siJunB-848, confirmando la mayor eficiencia

del primero como ya se apreciaba en el análisis por RT-qPCR mostrado en la Figura 50.

Tabla 8: Cambios de expresión respecto a las células control de las familias Jun y Fos obtenidos del análisis transcriptómico al silenciar JunB con siJunB-792 y siJunB-848.

Gen	Cambio expresión siJunB-792 vs siCt	Cambio expresión siJunB-848 vs siCt
<i>JUNB</i>	-2.56 (FDR=0.0001)	-1.66 (FDR=0.006)
<i>JUND</i>	-1.01 (FDR=1)	-1.68 (FDR=0.01)
<i>JUN</i>	1.16 (FDR=0.5)	1.08 (FDR=0.8)
<i>FOS</i>	-1.26 (FDR=0.2)	1.15 (FDR=0.5)
<i>FOSB</i>	1.01 (FDR=1)	-1.05 (FDR=0.8)
<i>FOSL1</i>	-1.28 (FDR=0.5)	-1.69 (FDR=0.07)
<i>FOSL2</i>	1.11 (FDR=0.7)	1.28 (FDR=0.2)

Al analizar los cambios de expresión de los otros miembros AP-1 no se aprecian variaciones significativas cuando se utiliza siJunB-792. En cambio, al silenciar JunB con siJunB-848 se observa una disminución de los niveles de *JUND* en la misma magnitud que la obtenida para *JUNB* y, rebajando un poco el criterio estadístico aplicado para el análisis de los resultados, esto es, considerando un FDR ligeramente superior al límite marcado en 0.05, también observamos una disminución de los niveles de *FOSL1*, el gen que codifica Fra1. Acorde con estos resultados, en la Figura 52

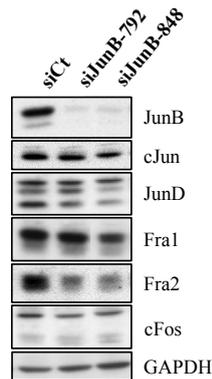


Figura 52: Alteración en la expresión proteica de otros miembros de las familias Jun y Fos al silenciar JunB. Células U2OS se transfectaron con un control negativo siControl (siCt) o con cada uno de los dos siARNs dirigidos contra JunB (siJunB-792 y siJunB-848) y 48 h después se prepararon extractos proteicos y se analizaron mediante western blot con los anticuerpos contra los diferentes miembros de la familia AP-1 indicados a la derecha de la figura. GAPDH se usó como control de carga.

se observa que los niveles proteicos de estos dos miembros AP-1, JunD y Fra1, en las células transfectadas con siJunB-848 están reducidos con respecto a las células transfectadas con el control negativo o con siJunB-792, entre las que no se aprecian diferencias. Pese a no observarse variación de su expresión en los resultados del análisis transcriptómico los niveles proteicos de Fra2 son inferiores en las células transfectadas con los dos siJunB comparadas con las células control. Al observarse en ambos casos no parece que se deba a un efecto inespecífico sino que sugiere un posible papel de JunB en la regulación de la estabilidad proteica de Fra2.

Mediante la herramienta Panther (Mi et al., 2013a; Mi et al., 2013b) realizamos un análisis de enriquecimiento de términos de ontología génica (GO) correspondientes a procesos biológicos asociados a los genes diferencialmente expresados obtenidos con cada siJunB. Se obtuvieron 132 procesos biológicos enriquecidos en el caso de los genes diferencialmente expresados al silenciar JunB con siJunB-792 (Tabla A.5 del Anexo en el CD adjunto) y 95 al utilizar siJunB-848 (Tabla A.6 del Anexo en el CD adjunto), de los cuales 71 son comunes a ambos casos. Entre ellos se encuentran procesos relacionados con la regulación de la transcripción, la transducción de señal, la respuesta a estrés, desarrollo y morfogénesis y procesos metabólicos, entre otros.

Como nos interesan principalmente los genes diferencialmente expresados con un papel en ciclo celular que pudiera explicar el fenotipo observado tras el silenciamiento de JunB, seleccionamos mediante el sistema de clasificación Panther (Mi et al., 2013a; Mi et al., 2013b) aquellos genes asociados con el ciclo celular. En el caso de las células silenciadas con siJunB-792 se obtuvieron 129 genes de ciclo celular diferencialmente expresados, 81 con su expresión disminuida respecto a las células control y 48 con su expresión incrementada (Tabla A.7 del Anexo en el CD adjunto). En las células silenciadas con siJunB-848 el número de genes de ciclo celular con expresión diferencial obtenido fue de 97, 61 de los cuales presentaban una menor expresión respecto a las células control y 36 una expresión mayor (Tabla A.8 del Anexo en el CD adjunto). Los genes con expresión diferencial implicados en el ciclo celular comunes al silenciar con ambos siJunB se muestran en la Tabla 9 junto con los cambios de expresión respecto a las

células control obtenidos con cada uno de los dos siARNs contra JunB. Entre estos genes aparece *JUNB*, como era de esperar puesto que lo hemos silenciado y está implicado en la regulación del ciclo celular, junto con 7 genes con expresión disminuida mientras que los 5 restantes tienen incrementada su expresión.

Tabla 9: Genes implicados en ciclo celular con expresión diferencial al silenciar JunB con siJunB-792 y siJunB-848 en células U2OS. Se indica el tipo de proteína codificada según la clasificación Panther.

Gen	Descripción	Tipo de proteína codificada (Panther)	Cambio expresión siJunB-792 vs siCt	Cambio expresión siJunB-848 vs siCt
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1	Activador de quinasas	-2.48	-1.61
<i>ERCC2</i>	Excision repair cross-complementation group 2	Helicasa de ADN	-1.49	-1.37
<i>ETV1</i>	Ets variant 1	Factor de transcripción	-1.45	-1.40
<i>ETV4</i>	Ets variant 4	Factor de transcripción	-1.91	-1.65
<i>EXO1</i>	Exonuclease 1	Nucleasa, proteína de unión a ADN dañado	-1.34	-1.25
<i>JUNB</i>	Jun B proto-oncogene	Factor de transcripción	-2.56	-1.66
<i>SLFN5</i>	Schlafen family member 5	-	-1.57	-1.58
<i>VEGFC</i>	Vascular endothelial growth factor C	Factor de crecimiento	-1.35	-1.38
<i>GABPA</i>	GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa	Factor de transcripción	1.70	1.33
<i>GAS2L1</i>	Growth arrest-specific 2 like 1	Proteína no motora de unión a actina	1.31	1.36
<i>WDR92</i>	WD repeat domain 92	Proteína de unión a ARN	1.33	1.37
<i>ZAK</i>	Sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	Proteína quinasa no receptora	1.49	1.48
<i>ZFP36L2</i>	Zinc finger protein 36, C3H type-like 2	Proteína de unión a ARN	1.33	1.63

Entre los genes identificados se encuentran varios que codifican factores de transcripción o proteínas de unión a ARN, los que codifican las proteínas ERCC2 y EXO1 implicadas en mecanismos de reparación del ADN y el factor de crecimiento VEGFC. El gen que presenta la mayor variación en su expresión es *CCNE1*, que aparece reprimido en las células con JunB silenciado. Se observa además una correlación entre su nivel de expresión y el de JunB siendo la disminución en su expresión mayor cuando la disminución en los niveles de JunB es más acusada a consecuencia de su silenciamiento con los dos siARNs diferentes.

La Ciclina E1 es un regulador clave del ciclo celular. Se expresa desde la fase G1 tardía hasta la fase S y mediante su unión y activación a la quinasa CDK2 regula la fosforilación de sustratos imprescindibles para la entrada en fase S (Moroy & Geisen, 2004). Para confirmar que la expresión de la Ciclina E1 está alterada en ausencia de JunB analizamos mediante RT-qPCR los niveles de su mRNA en células U2OS transfectadas con el siARN control o con cada uno de los dos siARNs contra JunB (Figura 53A), confirmando la disminución en su expresión al silenciar JunB. Los niveles disminuidos de la Ciclina E1 están en concordancia con la disminución de células en fase S observada al silenciar JunB que es, de hecho, más acusada al usar el siJunB-792 (ver Figura 50C) coincidiendo con la mayor disminución de JunB y de Ciclina E1.

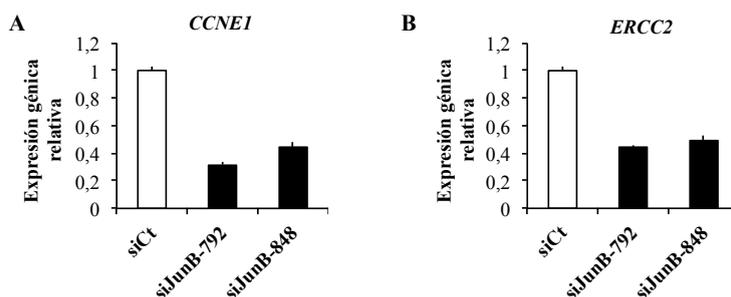


Figura 53: La expresión de *CCNE1* y de *ERCC2* disminuye al silenciar JunB en células U2OS. Células U2OS se transfectaron con siControl o con cada uno de los dos siARNs dirigidos contra JunB (siJunB-792 y siJunB-848) y 48 h después se analizaron los niveles de mRNA de *CCNE1* (A) y de *ERCC2* (B) mediante RT-qPCR normalizando respecto al gen de referencia *S26*. Los niveles de expresión de *CCNE1* y de *ERCC2* en las células tratadas con los siARNs dirigidos contra JunB indican la expresión génica relativa respecto a las células transfectadas con el siControl. Los datos representan la media de triplicados y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Mediante RT-qPCR confirmamos, además, la disminución de otro de los genes diferencialmente expresado obtenido del análisis transcriptómico al silenciar JunB con los dos siARNs: *ERCC2* (Figura 53B). Este gen codifica una helicasa de ADN dependiente de ATP implicada en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER) y en la transcripción basal mediada por la ARN polimerasa II. Interviene, además, en el control del ciclo celular mediante su acción sobre el complejo CAK (Fuss & Tainer, 2011).

3. Identificación de potenciales dianas transcripcionales directas de JunB mediante ChIP-seq.

Para detectar los sitios de unión de JunB al genoma e identificar así potenciales dianas transcripcionales directas de JunB implicadas en ciclo celular llevamos a cabo inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo anti-JunB seguida de secuenciación masiva (ChIP-seq) en células U2OS en crecimiento asincrónico. Realizamos, además, ChIP-seq en la línea celular Karpas 299 derivada de LACG ALK+ donde JunB está sobreexpresado.

Tras alinear las regiones inmunoprecipitadas sobre el genoma humano se identificaron 7572 regiones de unión de JunB en el caso de las células U2OS y 6964 regiones en las células Karpas 299, de las cuales 1072 son comunes a ambas líneas celulares. Se realizó una búsqueda de motivos en las regiones inmunoprecipitadas utilizando la herramienta MEME-ChIP (Bailey et al., 2009; Machanick & Bailey, 2011) que analiza las secuencias procedentes de experimentos de ChIP-seq en busca de motivos enriquecidos y luego los compara con los descritos en las bases de datos para factores de transcripción conocidos. En la Tabla 10 se muestran todos los motivos significativos encontrados (valor $E < 0.05$). En ambos tipos celulares el motivo más abundante resultó ser AP-1/TRE que es el motivo de reconocimiento de la familia de factores de transcripción AP-1 a la que pertenece JunB (Shaulian & Karin, 2001). Además, este motivo se encuentra centrado en las regiones inmunoprecipitadas lo que es una indicación de que JunB se une directamente al ADN a través de este motivo y confirma que se ha logrado un enriquecimiento de los putativos genes diana de AP-1 con este tipo de abordaje experimental. Se encontraron también otros motivos asociados a diferentes factores de transcripción con los que JunB podría estar interaccionando en su unión al ADN así como el motivo AP-1/CRE, que es otro motivo consenso de unión al ADN para la familia AP-1 (Shaulian & Karin, 2001).

Para asignar las regiones de unión de JunB al genoma a potenciales genes diana se utilizó la herramienta GREAT (McLean et al., 2010). Cada región se asignó al gen cuyo TSS estuviera más cercano, siempre y cuando la distancia no fuera mayor de 10 kb. Aplicando este criterio se identificaron

Resultados

975 genes con sitio de unión de JunB en el caso de la línea celular U2OS (Tabla A.9 del Anexo, CD adjunto) y 798 genes en Karpas 299 (Tabla A.10 del Anexo, CD adjunto), de los que 168 genes son comunes a ambas líneas.

Tabla 10: Motivos enriquecidos en los fragmentos inmunoprecipitados en células U2OS y Karpas 299 (K299) identificados mediante la herramienta MEME-ChIP.

U2OS			K299		
Motivo	Factores de transcripción asociados al motivo identificado	Valor E	Motivo	Factores de transcripción asociados al motivo identificado	Valor E
	JUN, FOSL2, JUNB	2.0e-1760		JUN, FOSL1, FOS	6.3e-904
	REL, RELA, STAT1	1.7e-108		STAT2:STAT1, MEF2C, MEF2A	3.8e-146
	MEF2C, MEF2A	1.0e-061		RUNX1, RUNX2, KLF1	3.2e-132
	-	9.6e-053		EHF, SPIB, ERG	6.9e-074
	EHF, SPI1, ZNF263	2.0e-034		IRF1, STAT2:STAT1, IRF2	6.2e-046
	DDIT3:CEBPA	3.5e-033		KLF5	6.8e-029
	RUNX1, RUNX2, FOXH1	2.0e-031		NKX2-5, RUNX1, GF11	7.8e-020
	SOX3, FOXP1	1.1e-028		TCF3, GF11B	2.6e-017
	ARNT, MYCN, MYC:MAX	3.8e-018		STAT4, E2F4, STAT1	2.1e-014
	NR3C1	8.8e-017		ARNT, MYCN, HIF1A:ARNT	7.7e-014
	JUN, JUND, CREB1	1.4e-012		SOX3, FOXP1, SOX6	2.5e-012
	ESR1	1.7e-011		HNF1A	2.1e-011
	-	1.3e-010		RUNX1, RUNX2, RREB1	1.8e-008
	-	1.2e-009		-	2.8e-008
	EGR2	1.8e-007		-	1.3e-006
	ARID3A	2.8e-007		TFAP2A	2.4e-006
	GABPA	6.6e-007		-	1.9e-004
	-	1.9e-006		ARID3A	6.8e-004
	NHLH1, TCF3, TCF12	2.6e-006		GATA1	1.5e-003
	RUNX1, RUNX2, KLF1	3.5e-004		KLF1, EGR2, KLF4	3.4e-003
	KLF5, KLF4, KLF1	1.6e-003		RREB1	2.8e-002
	-	4.9e-003		-	3.4e-002

Un análisis completo de los términos de ontología génica (GO) asociados a estos potenciales genes diana directos de JunB que están enriquecidos comparándolos con la distribución de términos GO asociados a todos los genes del genoma humano mediante el sistema de clasificación Panther (Mi et al., 2013a; Mi et al., 2013b) reveló 168 procesos biológicos enriquecidos en las células U2OS y 142 en el caso de las K299 (Tablas A.11 y A.12 del Anexo en CD adjunto, respectivamente). Esta diversidad funcional concuerda con el papel descrito para la familia AP-1 como regulador de una gran variedad de procesos celulares. Entre ellos, algunos procesos biológicos enriquecidos son específicos de cada línea celular como, por ejemplo, regulación de la activación de células T o activación de leucocitos mieloides para las células Karpas 299 y otros son comunes a ambas líneas celulares.

Debido a que muchos términos GO son redundantes el programa Panther ofrece un sistema de clasificación simplificado (Panther GO-Slim) que agrupa los términos GO relacionados entre sí para facilitar el análisis. Aplicando esta herramienta obtuvimos los términos GO enriquecidos para cada línea celular que se muestran en la Figura 54. Entre ellos aparece el ciclo celular, con 90 genes en el caso de las células U2OS y 76 genes en Karpas 299.

4. Identificación de dianas transcripcionales de JunB mediante ChIP-seq y análisis transcriptómico.

Con objeto de determinar si los genes diferencialmente expresados al silenciar genéticamente a JunB son dianas transcripcionales de JunB comparamos (i) la lista de los genes diferencialmente expresados al silenciar JunB con los dos siJunB y (ii) las listas de genes diferencialmente expresados con cada siJunB, con los datos de ChIP-seq en células U2OS.

(i) 12 genes que aparecen diferencialmente expresados al silenciar JunB con los dos siJunBs utilizados presentan región de unión de JunB (Tabla 11). En la Tabla se indica el cambio de expresión obtenido con cada uno de los dos siARNs dirigidos contra JunB y la posición del sitio de unión

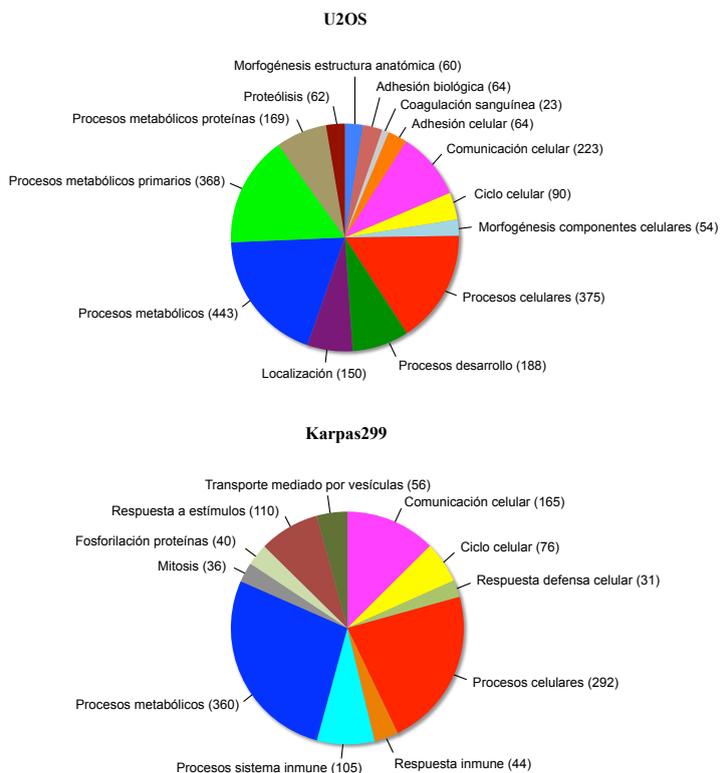


Figura 54: Análisis de términos GO enriquecidos entre las potenciales dianas transcripcionales de JunB. Los gráficos muestran los procesos biológicos en los que están implicados los genes para los que se ha detectado unión de JunB en células U2OS y Karpas 299 y que aparecen enriquecidos al hacer un análisis de términos GO con la herramienta Panther GO-Slim. Entre paréntesis se indica el número de genes asociados a cada proceso biológico enriquecido.

de JunB respecto al TSS del gen de interés. Haciendo uso de la herramienta FIMO del paquete MEME (Bailey et al., 2009; Grant et al., 2011) se analizó la presencia en las regiones inmunoprecipitadas de los motivos consenso AP-1/TRE o AP-1/CRE. Acorde con los resultados del análisis de enriquecimiento de motivos mostrado en la Tabla 10, el motivo TRE está presente en la mayoría de las regiones analizadas. En la Tabla 11 se muestra, además, el tipo de proteína codificada obtenido del sistema de clasificación Panther así como los términos de ontología génica asociados a cada gen. Cabe destacar la presencia de varios genes implicados en la regulación de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II y del ciclo celular.

Tabla 11: Genes con sitio de unión de JunB identificado mediante ChIP-seq y expresión diferencial al silenciar JunB con siJunB-792 y siJunB-848 en células U2OS.

Gen	Descripción	Tipo de proteína codificada (Panther)	Cambio expresión vs siCt	Cambio expresión siJB-792 vs siCt	Cambio expresión siJB-848 vs siCt	Posición sitio unión respecto al TSS	Motivo TRE	Motivo CRE	Términos GO de procesos biológicos asociados a cada gen (Panther GO-Slim)
<i>ADCK1</i>	AarF domain containing kinase 1	Hidrolasa, chaperona	-1,57	-1,52	-4257	SI	NO	NO	Fosforilación oxidativa, cadena de transporte de electrones
<i>ERCC2</i>	Excision repair cross-complementation group 2	Helicasa de ADN	-1,49	-1,37	-6123	NO	SI	SI	Reparación del ADN, transcripción mediada por la ARN polimerasa II, mitosis, segregación de cromosomas
<i>EVI2A</i>	Ectopic viral integration site 2A	Receptor	-1,60	-1,67	-6204	SI	SI	SI	-
<i>IFI16</i>	Interferon, gamma-inducible protein 16	Factor de transcripción	-1,35	-1,45	-9028	SI	NO	NO	Respuesta a interferón gamma, respuesta a estímulos, regulación de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II
<i>MICALCL</i>	MICAL C-terminal like	-	-1,87	-2,26	+751	SI	NO	NO	-
<i>RELL1</i>	RELT-like 1	-	-1,80	-1,60	-7065	SI	NO	NO	-
<i>SLC36A4</i>	Solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4	Transportador aminoácidos	-1,45	-1,60	+507	SI	NO	NO	Procesos celulares, transporte aniones, transporte aminoácidos
<i>WSB2</i>	WD repeat and SOCS box containing 2	-	-1,51	-1,69	+8461	SI	NO	NO	Comunicación celular, desarrollo mesodermo
<i>CITED2</i>	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich Ct domain, 2	Cofactor transcripcional	2,10	1,77	-4863	SI	NO	NO	Transcripción mediada por la ARN polimerasa II, regulación de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II
<i>GAS2L1</i>	Growth arrest-specific 2 like1	Proteína no motora de unión a actina	1,31	1,36	+4073	SI	NO	NO	Procesos celulares, desarrollo ectodermo, desarrollo mesodermo, morfogénesis estructura anatómica, desarrollo sistema nervioso.
<i>PKP2</i>	Plakophilin 2	Proteína unión filamentos intermedios	1,73	1,34	+4717	SI	SI	SI	Comunicación celular, adhesión celular
<i>RBPJ</i>	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	Factor de transcripción	1,57	1,33	-1736	SI	NO	NO	Recombinación del ADN, transcripción mediada por la ARN polimerasa II

(ii) De los genes diferencialmente expresados al silenciar JunB con siJunB-792, 113 muestran secuencias de unión a JunB, indicando que JunB actúa en su regulación de manera directa (Tabla A.13 del Anexo, CD adjunto). En el caso de los genes diferencialmente expresados al silenciar JunB con siJunB-848 el número de genes con zonas de unión a JunB es 88 (Tabla A.14 del Anexo, CD adjunto). Al analizar los términos GO asociados a estos genes con la herramienta Panther (Mi et al., 2013a; Mi et al., 2013b) se encontraron enriquecidos procesos biológicos relacionados, principalmente, con desarrollo y morfogénesis (Tablas A.15 y A.16 del Anexo, CD adjunto).

Entre todos los genes identificados como dianas transcripcionales de JunB seleccionamos mediante el sistema de clasificación Panther aquellos con un término GO asociado de ciclo celular. Obtuvimos 12 genes con sitio de unión de JunB y expresión alterada al silenciar con siJunB-792 y 8 genes al silenciar con siJunB-848. Los genes identificados se han dividido entre aquellos que presentan una expresión incrementada o reducida en respuesta al silenciamiento de JunB y se muestran en las Tablas 12 y 13, respectivamente, junto con la posición del sitio de unión de JunB respecto al TSS del gen de interés y la existencia o no de motivo consenso AP-1/TRE o AP-1/CRE en la región inmunoprecipitada.

En la lista de genes que disminuyen su expresión al silenciar JunB (Tabla 12) no aparece *CCNE1* al no observarse unión de JunB en los resultados del ChIP-seq, indicando que la reducción en sus niveles al silenciar JunB es, probablemente, un efecto transcripcional indirecto. El gen que sí presenta una región de unión de JunB y cuya expresión disminuye al silenciar con los dos siARNs dirigidos contra JunB, como confirmamos por RT-qPCR (Figura 53), es *ERCC2*.

JunB se une a una región situada a unas 6 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen *ERCC2*. Haciendo uso de la página web de UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent et al., 2002) visualizamos la región de unión de JunB junto con datos de ChIP-seq con anticuerpos contra modificaciones de histonas procedentes de la base de datos de ENCODE (Rosenbloom et al., 2013). La modificación H3K4me3 está asociada a transcripción activa y se localiza cerca de los sitios de inicio de la

Tabla 12: Genes de ciclo celular con sitio de unión de JunB que disminuyen su expresión al silenciar JunB.

Gen	Descripción	Tipo de proteína codificada (Panther)	Cambio expresión siJB-792 vs siCt	Cambio expresión siJB-848 vs siCt	Posición del sitio de unión de unión respecto al TSS	Motivo TRE	Motivo CRE
<i>CDK15</i>	Cyclin-dependent kinase 15	Proteína quinasa no receptora	-2.81		-8545	SI	SI
<i>BTG3</i>	BTG family, member 3	-	-2.47		+1304	SI	SI
<i>PTP4A2</i>	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	Proteína fosfatasa	-1.93		+6588	SI	NO
<i>MAPK6</i>	Mitogen-activated protein kinase 6	Proteína quinasa no receptora	-1.74		+2136	SI	NO
<i>SCMH1</i>	Sex comb on midleg homolog 1 (Drosophila)	Factor de transcripción	-1.54		+3481	SI	NO
<i>CDCA4</i>	Cell division cycle associated 4	Factor de transcripción	-1.52		-3990	SI	SI
<i>ABI3</i>	ABI family, member 3	Modulador proteína G	-1.50		-378	SI	SI
<i>ERCC2</i>	Excision repair cross-complementation group 2	Helicasa de ADN	-1.49	-1.37	-6123	NO	SI
<i>DNAL4</i>	Dynein, axonemal, light chain 4	Proteína citoesqueleto		-1.57	-8662	NO	SI
<i>MAST2</i>	Microtubule associated ser/thr kinase 2	Proteína quinasa no receptora		-1.45	-684	SI	NO
<i>ELF1</i>	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	Factor de transcripción		-1.35	+85	SI	NO

Tabla 13: Genes de ciclo celular con sitio de unión de JunB que aumentan su expresión al silenciar JunB.

Gen	Descripción	Tipo de proteína codificada (Panther)	Cambio expresión siJB-792 vs siCt	Cambio expresión siJB-848 vs siCt	Posición del sitio de unión de unión respecto al TSS	Motivo TRE	Motivo CRE
<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Inhibidor de quinasas	1.65		+4053	SI	NO
<i>E2F7</i>	E2F transcription factor 7	Factor de transcripción	1.56		+6070	SI	NO
<i>SFN</i>	Stratifin	Chaperona	1.33		+9442	NO	NO
<i>GAS2L1</i>	Growth arrest-specific 2 like 1	Proteína no motora de unión a actina	1.31	1.36	+4073	SI	NO
<i>MAF</i>	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	Factor de transcripción		1.82	-7085	SI	NO
<i>GADD45B</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	-		1.74	-1132 -6694	SI SI	NO SI
<i>S100A10</i>	S100 calcium binding protein A10	Molécula señalización		1.65	-932 +4892	SI SI	NO NO

Resultados

transcripción, la modificación H3K4me1 se encuentra normalmente en elementos potenciadores o *enhancers* y H3K27ac se asocia a elementos reguladores activos. Además, regiones que presentan sensibilidad al corte con nucleasas (*DNase clusters*) son indicativas de regiones accesibles de la cromatina que coinciden con zonas reguladoras (Bannister & Kouzarides, 2011; Kimura, 2013).

En la Figura 55 se observa que la región de unión de JunB a *ERCC2* coincide con una zona rica en las modificaciones de histonas H3K4me1 y H3K27ac y es sensible al corte con DNasas. Así, JunB participaría directamente en la activación transcripcional de *ERCC2* a través de su unión a esta zona reguladora.

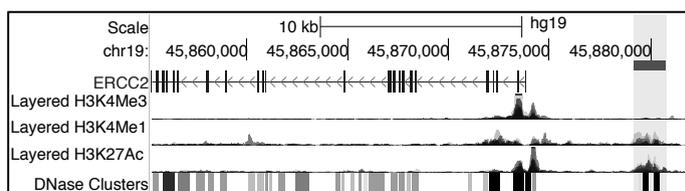


Figura 55: JunB se une a una región reguladora de *ERCC2*. El rectángulo situado a la derecha de la figura indica la región de unión de JunB cercana al TSS de *ERCC2* identificada en células U2OS. Se muestran también datos de modificaciones de histonas y regiones sensibles al corte con DNasa procedentes de la base de datos ENCODE. La posición de la región de unión de JunB se ha sombreado para resaltar su coincidencia con las modificaciones de histonas y las zonas sensibles al corte con DNasas. La imagen ha sido obtenida de <http://genome.ucsc.edu/>.

Al igual que sucede con *ERCC2*, las regiones de unión de JunB al resto de genes de la Tabla 12, potenciales dianas transcripcionales de JunB sobre las que ejercería un efecto activador, coinciden con zonas sensibles al corte con DNasas y ricas en las modificaciones de histonas H3K4me3, H3K4me1 y H3K27ac, indicando que son zonas reguladoras de la expresión génica (Figura 56).

Los genes de ciclo celular con sitio de unión de JunB que aumentan su expresión en respuesta al silenciamiento de JunB y sobre los que JunB, por tanto, actuaría como represor transcripcional se muestran en la Tabla 13. De los 7 genes identificados el único que da lugar a un aumento de expresión al silenciar JunB con los dos siARNs utilizados es *GAS2L1*. Este gen codifica para un miembro de la familia *GAS2* (*growth arrest-specific 2*) al que se le ha atribuido un papel de supresor tumoral ya que su sobreexpresión da lugar a

una parada del crecimiento celular (Gamper et al., 2009). Esto apunta a que los niveles elevados de *GAS2L1* observados tras silenciar JunB con ambos siJunB podrían contribuir a la parada de ciclo celular observada.

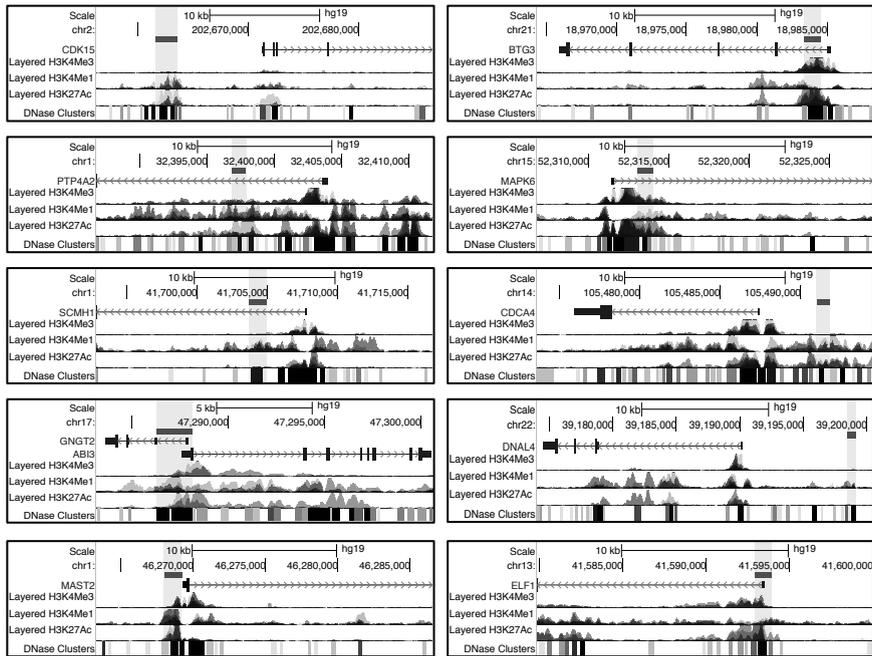


Figura 56: JunB se une a regiones reguladoras de los genes implicados en ciclo celular que disminuyen su expresión al silenciar JunB. Los rectángulos indican las regiones de unión de JunB identificadas para cada gen. Su posición se ha sombreado para mostrar su coincidencia con los datos de modificaciones de histonas y de zonas sensibles al corte con DNasas procedentes de la base de datos ENCODE. Las imágenes han sido obtenidas de <http://genome.ucsc.edu/>

Al visualizar la posición de la región de unión de JunB en UCSC Genome Browser se encontró que esta región situada a unas 4 kb del TSS de *GAS2L1* presenta sensibilidad al corte con DNasas, indicador de un estado accesible de la cromatina, y es rica en las modificaciones H3K4Me1 y H3K27Ac, asociadas a zonas potenciadoras activas (Figura 57). Esto indica que JunB se une a una zona reguladora a través de la cual ejerce su efecto represor sobre la transcripción de este gen.

Lo mismo se observa para el resto de genes de la Tabla 13 (Figura 58) entre los que se encuentra *CDKN1A*. Este gen codifica el inhibidor de

Resultados

quinasas dependientes de ciclina p21 cuya expresión incrementada estaría contribuyendo a la parada de ciclo celular observada al silenciar JunB.

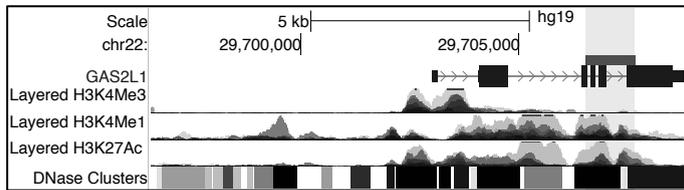


Figura 57: JunB se une a una región reguladora de *GAS2L1*. El rectángulo indica la región de unión de JunB al gen *GAS2L1* en células U2OS. Se muestran también datos procedentes de la base de datos ENCODE de modificaciones de histonas y regiones sensibles al corte con DNasa. La imagen se ha obtenido de <http://genome.ucsc.edu/>.

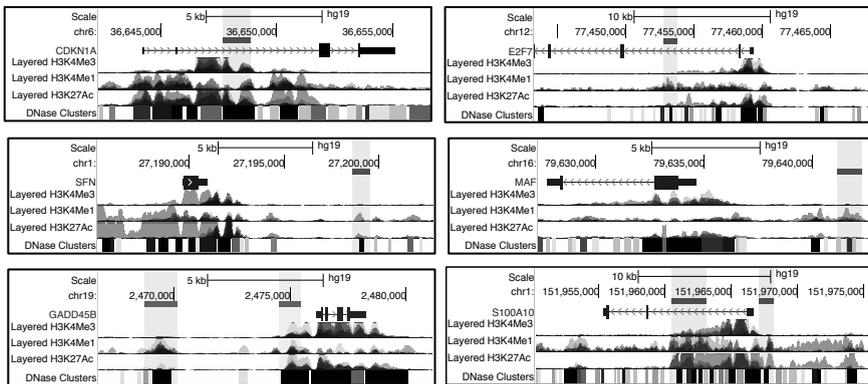


Figura 58: JunB se une a regiones reguladoras de los genes implicados en ciclo celular que aumentan su expresión al silenciar JunB. Los rectángulos indican las regiones de unión de JunB identificadas para cada gen. Su posición se ha sombreado para mostrar su coincidencia con los datos de modificaciones de histonas y de zonas sensibles al corte con DNasas procedentes de la base de datos ENCODE. Las imágenes han sido obtenidas de <http://genome.ucsc.edu/>.

Discusión

1. Regulación de la degradación de JunB en G2 por GSK3 β -SCF^{Fbxw7}

La expresión de JunB está regulada durante la progresión del ciclo celular. En células quiescentes los niveles de JunB son bajos pero aumentan rápidamente y de forma transitoria tras la estimulación con suero. Esta variación de JunB en la transición de G0 a G1 es necesaria para la adecuada progresión de las células durante la fase S (Andrecht et al., 2002; Kovary & Bravo, 1991; Lallemand et al., 1997). Tras mantener niveles intermedios durante las fases S y G2, JunB sufre una dramática disminución en la transición G2/M debido a su degradación proteasomal (Farras et al., 2008) lo que conduce a bajos niveles durante la mitosis. Si los niveles de JunB se mantienen elevados en este punto se produce una progresión ralentizada de la mitosis acompañada de la aparición de defectos mitóticos (Bakiri et al., 2000; Farras et al., 2008). Por lo tanto, asegurar que los niveles de JunB sean los adecuados en cada fase del ciclo celular resulta esencial para el correcto desarrollo del mismo.

El sistema ubiquitina-proteasoma es un mecanismo de control de la estabilidad proteica esencial en numerosos procesos celulares. Una degradación alterada de proteínas puede ser causa de proliferación descontrolada, inestabilidad genética y cáncer. La E3 ubiquitina ligasa Fbxw7 es uno de los componentes de este sistema que juega un papel central

en el control del ciclo celular. La mayoría de sus sustratos son oncogenes implicados en un gran número de neoplasias humanas por lo que se le atribuye un papel de supresor tumoral (Akhoondi et al., 2007; Tan et al., 2008). De hecho, se han descrito mutaciones en el gen que codifica Fbxw7 en un gran número de cánceres humanos incluyendo el de pecho, endometrio, ovario, páncreas, colangiocarcinomas y leucemia linfoblástica aguda de células T. Debido a la gran variedad de sustratos de Fbxw7 los mecanismos tumorigénicos asociados a su inactivación son muy variados y no están del todo caracterizados (Davis et al., 2014; Wang et al., 2012).

En este trabajo se ha identificado a JunB como un nuevo sustrato de Fbxw7. Mediante inmunoprecipitación de proteínas se ha demostrado la interacción específica de JunB con Fbxw7 y se ha observado un aumento de la vida media de JunB en presencia del mutante dominante negativo Fbxw7(R465A). Además, en la línea celular derivada de cáncer de colon DLD1^{FBXW7-/-} que contiene una delección somática para *FBXW7* JunB no se degrada y se acumula en células sincronizadas en mitosis a diferencia de lo que ocurre en la línea parental DLD1.

Se han identificado, además, los residuos fosforilables de JunB que determinan su estabilidad en G2/M. Estos residuos se encuentran en el motivo de reconocimiento conocido como fosfodegrón para la proteína Fbxw7 compuesto por la secuencia de aminoácidos: SRDATPPVSP. Tanto la interacción de JunB con Fbxw7 como su ubiquitinación dependen de la fosforilación de los residuos S251, T255 y S259 del fosfodegrón y su mutación a alaninas para evitar su fosforilación conduce a un notable incremento de la vida media de JunB. Gracias a la generación de poblaciones celulares estables que expresan el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB de forma condicional, hemos observado que en células sincronizadas este mutante no se degrada al final de G2 como ocurre con JunB salvaje sino que se acumula a medida que las células progresan por el ciclo celular y alcanzan la mitosis.

Como ocurre con otros sustratos de Fbxw7, la fosforilación de estos residuos depende, en parte, de GSK3 β . Hemos demostrado que esta quinasa fosforila la T255 y la S251 y para que estas fosforilaciones ocurran es

necesario que la S259 esté fosforilada, coincidiendo con lo descrito para otros sustratos de GSK3 β que han de ser previamente fosforilados por otra quinasa en la posición +4 (Cohen & Frame, 2001). Esto podría indicar una función reguladora de la S259 ya que su fosforilación determinaría la unión de GSK3 β y, por tanto, el inicio de la degradación de JunB. Sin embargo, la fosforilación en la S259 no está limitada al momento de la degradación de JunB. Al sincronizar células en la transición G1/S y dejarlas progresar por el ciclo hasta mitosis la fosforilación en la S259 se detecta desde el inicio y sus niveles varían siguiendo el mismo patrón que los niveles totales de JunB. Así pues, la fosforilación en la S259, aunque importante en la estabilidad de JunB, no es la que marca el inicio de su decaimiento.

La activación de la quinasa GSK3 β es lo que podría determinar el momento de la degradación de JunB. En este sentido, hemos observado que la actividad de GSK3 β aumenta durante la fase G2 del ciclo coincidiendo con la disminución de los niveles de JunB. GSK3 β está implicada en la regulación de la estabilidad de numerosas proteínas y juega un papel importante en la progresión del ciclo celular (Xu et al., 2009). Sobre todo se ha estudiado su papel en las fases iniciales del ciclo donde su actividad es inhibida por la vía PI3K/AKT en respuesta a señalización mitogénica. La inhibición de GSK3 β conduce a la estabilización de mediadores clave de la progresión del ciclo celular como Ciclina D1, Ciclina E y cMyc resultando esencial para la transición G1/S (Diehl et al., 1998; Welcker et al., 2004; Welcker et al., 2003). Sin embargo, el papel de GSK3 β en la transición G2/M está menos caracterizado. Se ha observado que el uso de inhibidores de GSK3 β conduce a retraso en mitosis, defectos en el alineamiento de los cromosomas y acumulación de micronúcleos (Tighe et al., 2007; Wakefield et al., 2003). Estos resultados sugieren que GSK3 β actúa sobre sustratos que juegan un papel importante en las fases G2 y M. En este trabajo hemos identificado a JunB como uno de los sustratos de GSK3 β en G2. De hecho, la acumulación de JunB en mitosis conduce a la aparición de defectos mitóticos similares a los descritos tras la inhibición de GSK3 β (Farras et al., 2008).

Recientemente se ha identificado a las quinasas ERK1/2 como las responsables de la fosforilación en la S259 de JunB (Courcelles et al., 2013).

Estas quinasas fosforilan residuos de serina o treonina que se encuentran en motivos consenso S/T-P acompañados normalmente de una prolina en posición -2 (Gonzalez et al., 1991), requisitos que cumple el residuo S259 de JunB. Se ha descrito que las quinasas ERKs están implicadas en la activación de los miembros AP-1 en respuesta a factores de crecimiento. Esta activación se produce tanto a nivel de la regulación de su expresión mediante la fosforilación y activación de otros factores implicados en ella como a nivel de su activación transcripcional mediante la fosforilación directa de varios miembros AP-1 (Shaulian & Karin, 2002). La fosforilación de JunB en la S259 mediada por ERK1/2 además de actuar como reclutador de la quinasas GSK3 β podría estar afectando a la actividad transcripcional de JunB, ya sea modulando su unión al ADN o afectando a la dimerización con otros miembros AP-1. Según el trabajo de Courcelles la actividad transcripcional del complejo JunB/cFos aumenta cuando el residuo S259 está fosforilado (Courcelles et al., 2013). Sería interesante analizar si este efecto es específico de la interacción de JunB con cFos o afecta a la formación y actividad de otros dímeros JunB/AP-1.

Además de la importancia de los residuos S251, T255 y S259 aquí demostrada, publicaciones previas apuntaban al papel de los residuos T150 y S186 en la estabilidad de JunB en G2/M (Bakiri et al., 2000; Farras et al., 2008). Sin embargo, aunque se ha descrito que la mutación de estos residuos conduce a una estabilización de JunB en mitosis, su degradación sigue produciéndose hacia final de G2 (Farras et al., 2008). Con objeto de averiguar si las fosforilaciones en la T150 y la S186 pueden afectar a las fosforilaciones de los residuos del fosfodegrón de JunB hemos analizado estas fosforilaciones en el mutante T₁₅₀A/S₁₈₆A-JunB. Aunque los resultados indican que las fosforilaciones en la T150 y la S186 no son necesarias para la fosforilación de los residuos del fosfodegrón de JunB, no puede descartarse que la mutación de estos residuos de lugar a una conformación tridimensional de la proteína menos óptima para su interacción con Fbxw7 o con los residuos de lisina que posteriormente serán ubicuitinados menos accesibles. Puede incluso que estos residuos constituyan puntos adicionales de interacción con la E3 ligasa que conduzcan a una degradación más eficiente de JunB. En este sentido, se han descrito sustratos de Fbxw7, como

la Ciclina E, que poseen además de su fosfodegrón principal, fosfodegrones auxiliares que contribuyen en menor medida a su degradación (Welcker et al., 2003). Tanto la T150 como la S186 de JunB van seguidas de una prolina de manera que al fosforilarse dan lugar a las secuencias pTP o pSP, secuencias definidas por (Nash et al., 2001) como el requisito mínimo para la unión de Fbxw7 a un sustrato y que establecerían los contactos electrostáticos esenciales con los residuos conservados de Fbxw7 (Orlicky et al., 2003). Al carecer de otros elementos como la carga positiva en la posición +4 que aumenta las interacciones establecidas con Fbxw7 (Hao et al., 2007), constituirían sitios de unión de baja afinidad de Fbxw7 que podrían contribuir a su degradación. Ensayos de coinmunoprecipitación y de ubiquitinación como los aquí descritos llevados a cabo con mutantes puntales o dobles en la T150 y la S186 serían necesarios para probar esta idea.

Por otro lado, hemos observado que las fosforilaciones en la T150 y la S186 no dependen de las fosforilaciones del fosfodegrón de JunB ya que también se detectan en el mutante S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB. En las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB sincronizadas se observa fosforilación en la S186 en cuanto empieza a acumularse la proteína exógena (Figura 35). En contraste, la fosforilación de la T150 parece restringida a células mitóticas. (Bakiri et al., 2000) sugirieron que la T150 está fosforilada por el complejo CDK2-Ciclina B1 basándose en resultados positivos de esta fosforilación *in vitro*. Ellos postularon que la degradación de JunB estaría iniciada por esta fosforilación. Sin embargo, (Farras et al., 2008) observaron que la degradación de JunB ocurre antes del momento de máxima actividad de CDK2-Ciclina B1 y, por tanto, otros residuos deberían ser los responsables de iniciar el proceso de degradación. Al contrario que la T255, cuya fosforilación es difícil de detectar debido probablemente a la rápida degradación que le sigue, la fosforilación de la T150 aumenta cuando los niveles de JunB disminuyen y coincide con el aumento de los niveles de Ciclina B1. Una hipótesis es que la fosforilación de JunB en este residuo disminuya su actividad transcripcional de manera que la fracción de JunB sin degradar se excluya de la cromatina durante la mitosis y deje de actuar

sobre sus dianas transcripcionales en esa fase del ciclo celular (Farras et al., 2008).

Como ocurre con JunB, las modificaciones postranscripcionales en otros miembros de la familia AP-1 juegan un papel muy importante en la regulación de su estabilidad (Shaulian, 2010). En el caso de cJun, las fosforilaciones en residuos de su extremo N terminal mediadas por la quinasa JNK evitan su ubiquitinación y degradación a la vez que aumentan su actividad transcripcional (Bakiri et al., 2000; Fuchs et al., 1996; Musti et al., 1997). Nosotros hemos observado que, aunque cJun también es sustrato de Fbxw7 (Wei et al., 2005), sus niveles se mantienen estables en células U2OS sincronizadas que avanzan desde G1/S a mitosis y que en este periodo el residuo S73 está fosforilado. Recientemente, Zhang y sus colaboradores han identificado un mecanismo por el que cJun escaparía de la degradación mediada por Fbxw7. cJun forma un complejo con la proteína adaptadora Rack1 y con Fbxw7 que conduce a su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. Sin embargo, cuando cJun está fosforilado en su extremo N terminal por JNK u otras quinasas se libera del complejo y no puede ser ubiquitinado por Fbxw7 (Zhang et al., 2012). Puesto que cJun está fosforilado en su extremo N terminal en G2/M, esto podría explicar por qué se mantiene estable en ese periodo del ciclo cuando GSK3 está activa y Fbxw7 es capaz de degradar a JunB. Además, niveles bajos de JunB en mitosis, puesto que es un antagonista de cJun, permiten que cJun induzca la transcripción de la Ciclina D1 estimulando la progresión del ciclo a la fase G1 (Bakiri et al., 2000). Esto pone de manifiesto la importancia de las modificaciones específicas de cada miembro de la familia Jun en la regulación de su expresión proteica durante la progresión por el ciclo celular.

2. Consecuencias de la acumulación de JunB en mitosis. Implicación en neoplasias humanas

Mediante el análisis de la expresión de genes reguladores de ciclo celular en células UTA6 que sobreexpresan JunB, hemos identificado a DDX11 como

una nueva diana transcripcional de JunB. DDX11 es una helicasa de ADN implicada en la cohesión de las cromátidas hermanas, la cual es fundamental en el mantenimiento de la fidelidad cromosómica durante la mitosis (Parish et al., 2006). Las cromátidas hermanas permanecen unidas desde su síntesis en fase S hasta su separación en anafase gracias a la acción del complejo cohesina. En prometafase, la maquinaria del huso mitótico las captura y durante la anafase son empujadas en direcciones opuestas de la célula para su correcta distribución en las dos células hijas. Sin una cohesión adecuada, las cromátidas hermanas se separan de forma prematura dando lugar a defectos en la segregación cromosómica e inestabilidad genética (Peters et al., 2008).

DDX11 se une a componentes del complejo cohesina y es necesaria para su asociación estable al ADN. Su silenciamiento génico en células humanas conduce a una pérdida de cohesión centromérica y de las cromátidas hermanas, fallo mitótico e inducción de aneuploidía (Farina et al., 2008; Inoue et al., 2007; Parish et al., 2006). En nuestro laboratorio hemos comprobado que en células donde la degradación de JunB es defectuosa, como son las células UTA6-S₂₅₁A/T₂₅₅A/S₂₅₉A-JunB que expresan el mutante no fosforilable de JunB o las células derivadas de cáncer de colon DLD1^{FBXW7^{-/-}}, la acumulación de JunB en G2/M conduce a un aumento de los niveles de Ciclina A2, una diana conocida de JunB cuya acumulación aberrante dificulta la adecuada progresión mitótica (den Elzen & Pines, 2001; Farras et al., 2008) y a una disminución de los niveles de DDX11. Al analizar células metafásicas al microscopio observamos defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas en las células que expresan el mutante JunB no fosforilable que se revierten al transfectar las células con DDX11. Estos datos demuestran que la expresión alta de JunB durante mitosis causa defectos en la cohesión de las cromátidas hermanas que pueden explicarse por la disminución en los niveles de DDX11.

En los últimos años se han descrito varios casos de pacientes en los que mutaciones en ambos alelos del gen *DDX11* han dado lugar al desarrollo de una cohesinopatía humana caracterizada por anomalías en la cohesión de las cromátidas hermanas e inestabilidad genética (Bailey et al., 2015; Capo-Chichi et al., 2013; van der Lelij et al., 2010). Parientes de uno

de los pacientes afectados portadores de una mutación en *DDX11* desarrollaron linfoma de Hodgkin y adenocarcinoma de endometrio (van der Lelij et al., 2010) resaltando el papel importante de *DDX11* en la prevención de la aneuploidía y el desarrollo tumoral (Inoue et al., 2007).

FBXW7 es un supresor tumoral que aparece frecuentemente mutado en un gran número de cánceres humanos. Su pérdida de función se ha asociado con inestabilidad cromosómica y con la aparición de defectos de cohesión de las cromátidas hermanas similares a los aquí descritos. Se ha propuesto que uno de los principales responsables de este fenotipo es la Ciclina E. Este sustrato de Fbxw7 regula la duplicación de los centrosomas y su acumulación conduce a inestabilidad cromosómica. Sin embargo, los defectos de cohesión observados en las células con *FBXW7* mutado no se explican por la acumulación de Ciclina E (Barber et al., 2008; Rajagopalan et al., 2004; Welcker & Clurman, 2008). Los resultados aquí presentados indican que JunB es otro sustrato de Fbxw7 que contribuye a la inestabilidad cromosómica asociada a su pérdida de función afectando a la cohesión de las cromátidas hermanas vía la regulación transcripcional de *DDX11*.

JunB está sobreexpresado en linfoma anaplásico de células grandes (LACG) ALK positivo (Mathas et al., 2002; Rassidakis et al., 2005). Según publicaciones previas, el incremento en la expresión de JunB en este tipo de linfomas se explica por, al menos, dos mecanismos: (a) la activación de la quinasa ERK1/2 por NPM-ALK que resulta en un aumento de la transcripción de JunB y (b) la activación de la vía mTOR por AKT inducida por NPM-ALK vía activación de PI3K que conduce a un aumento en la traducción de JunB. Además, la expresión de CD30 inducida por JunB contribuye al aumento de la transcripción de JunB mediante la activación de la ruta MEK/ERK (Staber et al., 2007; Watanabe et al., 2005) (Figura 59). Recientemente, también se ha observado que la amplificación de *JUNB* es frecuente en LACG ALK+ (Atsaves et al., 2014), sugiriendo que la amplificación génica es un mecanismo adicional para la sobreexpresión de JunB.

Al analizar la expresión de JunB en dos líneas celulares derivadas de LACG ALK+ (Karpas 299 y SU-DHL1) hemos confirmado que sus niveles

proteicos son muy elevados y que se mantienen así en células sincronizadas en G2/M. Mediante la inhibición farmacológica de PI3K hemos confirmado que el mecanismo de degradación de JunB está alterado en LACG ALK+ contribuyendo a su acumulación en mitosis. La activación de la ruta PI3K/AKT por NPM-ALK conduce a una actividad reducida de GSK3 β (Singh et al., 2009) y esto resulta en una degradación defectuosa de JunB en G2/M (Figura 59).

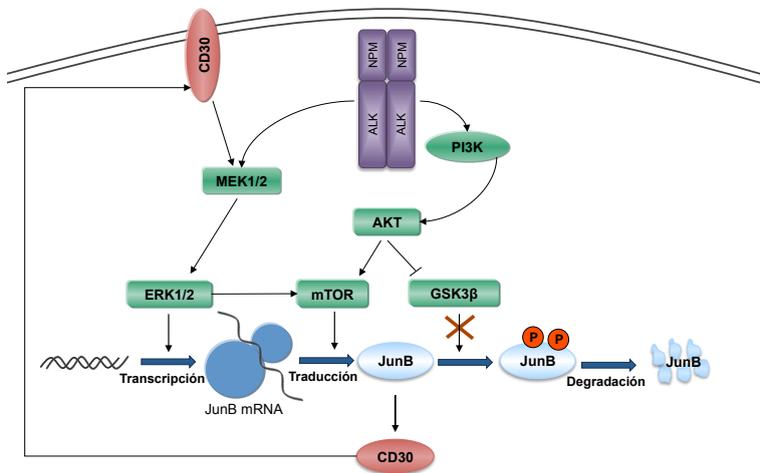


Figura 59: Mecanismos que contribuyen a la acumulación de JunB en LACG ALK+. La acumulación de JunB en LACG ALK+ se produce por el aumento de su transcripción y de su traducción y por fallos en su mecanismo de degradación, todo ello consecuencia de la activación de las rutas de señalización PI3K/AKT y MEK/ERK por la oncoproteína de fusión NPM-ALK. Los elevados niveles de CD30 inducidos por JunB también contribuyen al incremento de su transcripción a través de la activación de ERK1/2.

GSK3 β regula la degradación de muchas proteínas implicadas en una variedad de procesos celulares tales como proliferación celular o apoptosis (Xu et al., 2009). Su inhibición por NPM-ALK puede, por tanto, conducir a la estabilización de numerosas proteínas cuya degradación es dependiente de su actividad quinasa. En esta línea, se ha descrito que la inactivación de GSK3 β resulta en la acumulación de Cdc25A y Mcl-1 en LACG ALK+ lo que favorece el crecimiento celular y protege frente a la apoptosis contribuyendo a la capacidad proliferativa aumentada de estas células tumorales (McDonnell et al., 2011). Se han encontrado proteínas de fusión conteniendo ALK en otros tipos de cáncer tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumor miofibroblástico inflamatorio, linfoma B difuso de células

grandes o carcinoma de células renales, entre otros (Palmer et al., 2009; Pearson et al., 2012). Además, se han descrito amplificaciones génicas y mutaciones que producen ganancia de función de ALK en neuroblastoma (Caren et al., 2008; Mosse et al., 2008). Sería interesante analizar si en estos casos la actividad GSK3 β también se ve afectada por la activación constitutiva de ALK provocando la alteración del mecanismo de degradación de JunB y su acumulación en mitosis.

Acorde con el papel represor de JunB sobre DDX11 previamente identificado, los niveles de DDX11 en células derivadas de LACG disminuyen respecto a los observados en otras células derivadas de linfocitos T donde la expresión de JunB es normal. Además, los niveles de Ciclina A2 se mantienen elevados en mitosis en estas células. La disminución en los niveles proteicos de JunB gracias a su silenciamiento génico mediante siARN en células Karpas 299 sincronizadas en G2/M conduce a un aumento de los niveles de DDX11 y una disminución de Ciclina A2 indicando que su expresión se ve alterada en estas células por la acumulación de JunB en mitosis.

Finalmente, hemos observado que las células derivadas de LACG ALK⁺ tienen un alto porcentaje de defectos de cohesión en las cromátidas hermanas que puede ser causa de inestabilidad genética en estos tumores. Acorde con nuestros resultados, células LACG muestran a menudo anormalidades cromosómicas tanto estructurales, del tipo de deleciones o translocaciones, como numéricas (aneuploidía) (Fadlelmola et al., 2008; Mussolin et al., 2010; Salaverria et al., 2008). La anormal represión de DDX11 mediada por JunB en estas células constituye, por tanto, un mecanismo por el que JunB estaría contribuyendo al desarrollo neoplásico.

Los resultados obtenidos indican que los niveles de JunB han de ser controlados de forma precisa durante el ciclo celular para asegurar una correcta actividad transcripcional y una progresión adecuada de la mitosis. Si la degradación de JunB en G2 mediada por GSK3 β y Fbxw7 se ve alterada se producen defectos mitóticos que pueden contribuir al desarrollo tumoral (Figura 60). Dado que tanto la inactivación de Fbxw7 como la presencia de translocaciones cromosómicas que conducen a la activación constitutiva de

la quinasa ALK se han descrito en diversos tipos de tumores el mecanismo molecular aquí descrito por el que JunB contribuye a la transformación neoplásica en células LACG podría ser extensible a otros tipos de cánceres.

En conclusión, nuestros resultados destacan el papel oncogénico de JunB y su potencial como diana terapéutica en LACG ALK +.

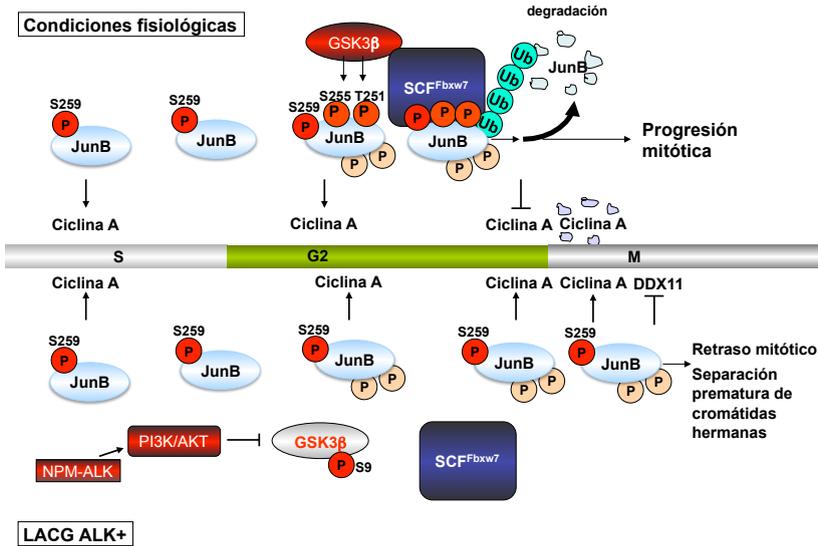


Figura 60: Modelo que explica el mecanismo de degradación de JunB en G2 y las consecuencias negativas de su pérdida de regulación en LACG ALK+. En circunstancias normales JunB es fosforilado por la quinasa GSK3β lo que permite su reconocimiento por la E3 ubiquitina ligasa Fbxw7 y su degradación en el proteasoma. En células de LACG ALK+ la actividad de GSK3β está inhibida debido a la activación de la ruta PI3K/AKT por la oncoproteína de fusión NPM-ALK. La alteración del mecanismo de degradación de JunB conduce a su acumulación en mitosis con la consecuente activación de Ciclina A y la represión de DDX11 dando lugar a la aparición de defectos mitóticos.

3. Identificación de nuevas dianas transcripcionales de JunB implicadas en el control del ciclo celular.

Con objeto de profundizar en la función del factor de transcripción JunB en el ciclo celular hemos analizado las consecuencias de la disminución de su expresión en la línea tumoral humana derivada de osteosarcoma U2OS. Hemos observado que el silenciamiento génico de JunB da lugar una

disminución del número de células en fase S y una parada del ciclo celular en G1. Estos resultados sugieren que la actividad de JunB es necesaria para la entrada en la fase S y que JunB podría estar regulando genes que no han sido todavía identificados como sus dianas transcripcionales durante el ciclo celular. Con el propósito de identificar nuevos genes diana de JunB se llevaron a cabo experimentos de CHIP-seq y de análisis transcriptómico.

Los experimentos de CHIP-seq se realizaron tanto en células U2OS como en células derivadas de LACG ALK+ Karpas 299 con un objetivo doble. Por un lado, la identificación de potenciales genes diana de JunB implicados en ciclo celular en células U2OS, con niveles fisiológicos de JunB que oscilan a lo largo del mismo, con el propósito de profundizar en el papel de este factor de transcripción en el ciclo celular y en la importancia de su correcta regulación durante el mismo. Por otro lado, la caracterización de los sitios de unión de JunB al genoma de las células Karpas 299, donde está sobreexpresado, y la comparación con los resultados obtenidos en las células U2OS para identificar genes que puedan estar regulados de manera anómala por JunB en células Karpas 299 y que, por tanto, puedan contribuir al papel oncogénico de este factor de transcripción en el linfoma anaplásico de células grandes ALK+.

Al comparar las regiones de unión de JunB al genoma identificadas mediante CHIP-seq en células U2OS y en células Karpas 299 obtuvimos una pequeña fracción de regiones comunes (aproximadamente un 15% del total de regiones para cada línea celular). Estos resultados indican que la función de JunB depende del contexto celular y que la presencia de otros factores específicos de cada línea celular puede estar afectando la unión de JunB a diferentes zonas reguladoras. Cabe destacar, además, que las células derivadas de LACG se caracterizan por tener desequilibrios cromosómicos (Piccaluga et al., 2010)

JunB, al igual que el conjunto de la familia AP-1 de factores de transcripción está implicado en multitud de procesos biológicos (Jochum et al., 2001). Al analizar los términos de ontología génica asociados a los genes a los que JunB se une y sobre los que, por tanto, podría estar ejerciendo un papel como regulador transcripcional, se han identificado una gran variedad

de procesos biológicos. Entre los genes identificados se han encontrado muchos específicos de una de las líneas celulares, como los que tienen que ver con la activación de linfocitos en células Karpas 299, por ejemplo, y muchos comunes a ambas líneas. Entre los grupos de genes identificados en ambas líneas, cabe destacar un enriquecimiento de genes implicados en el control del ciclo celular y la regulación de la proliferación celular.

Uno de los genes implicado en proliferación celular que presenta región de unión de JunB en las células Karpas 299 pero no en las U2OS, indicando una regulación diferente en ambas líneas celulares, es *TNFRSF8*. Este gen codifica la proteína CD30, un receptor transmembrana de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que está constitutivamente expresado en LACG (Stein et al., 2000). Se ha descrito la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva que conduce a elevados niveles de expresión de JunB y CD30. Por un lado, JunB se une al promotor de CD30 y activa su transcripción y, por el otro, CD30 induce la expresión de JunB a través de la ruta MEK/ERK (Hsu et al., 2006; Watanabe et al., 2005). Este mecanismo parece reproducirse en otros tipos de linfomas además de LACG ya que se ha observado que los niveles de JunB en linfomas de Hodgkin o linfoma B difuso de células grandes CD30 positivos son elevados mientras que apenas se detectan en estos mismos linfomas negativos para CD30 (Papoudou-Bai et al., 2015; Rassidakis et al., 2005). Aunque se ha atribuido un papel importante a CD30 en la mediación del efecto oncogénico descrito para JunB en LACG, los mecanismos exactos por los que actúa no están muy bien caracterizados (Pearson et al., 2012).

Acorde con nuestros resultados obtenidos en células U2OS, el silenciamiento de JunB en células derivadas de LACG ALK+ conduce a un arresto del ciclo celular y a una proliferación celular disminuida (Atsaves et al., 2014; Staber et al., 2007). Aunque apenas se han identificado genes diana de JunB en LACG ALK+, entre los reguladores de ciclo celular cuya expresión se ha descrito que varía al silenciar JunB en células Karpas 299 aparece *CCND2*, una ciclina involucrada en la progresión del ciclo celular cuya expresión disminuye al silenciar JunB (Atsaves et al., 2014). La presencia de una región de unión de JunB observada en nuestros experimentos de ChIP-seq en células Karpas 299 pero no en U2OS apunta a

una regulación transcripcional de Ciclina D2 por JunB específica de células Karpas 299.

Hemos identificado 76 genes implicados en ciclo celular a los que se une JunB en células Karpas 299. Sin embargo, la presencia de JunB en las zonas reguladoras de un determinado gen no implica necesariamente un papel activo en su regulación. De hecho, en el caso de las células U2OS solo un pequeño porcentaje de los genes para los que se ha identificado unión de JunB ve afectada su expresión al silenciar JunB (alrededor de un 10%). Sería necesario, por tanto, combinar los resultados del ChIP-seq con un análisis transcriptómico en células Karpas 299 bajo condiciones de desactivación de JunB, para poder extraer resultados más concluyentes sobre los genes diana de JunB implicados en mediar su papel oncogénico en LACG ALK+.

En las células U2OS realizamos el análisis transcriptómico a partir de mRNA aislado de células transfectadas con ARN pequeño de interferencia (siARN) para silenciar JunB. En este tipo de estudios es importante tener en cuenta que el silenciamiento génico puede ir acompañado de efectos inespecíficos (*off-targets*) resultado de la parcial complementariedad de secuencia entre el siARN y otros mARNs distintos al del gen diana provocando la inhibición de su traducción en una respuesta análoga a la desencadenada por los miARNs (Singh et al., 2011). Con objeto de descartar posibles efectos inespecíficos derivados del silenciamiento de JunB realizamos el análisis transcriptómico con dos siARNs diferentes dirigidos contra JunB. En respuesta al silenciamiento de JunB 1860 genes mostraron cambios significativos cuando silenciamos con siJunB-792 y 1507 genes cuando silenciamos con siJunB-848. De estos, sólo 246 genes muestran cambios significativos en los dos silenciamientos. Los distintos resultados obtenidos con cada uno de ellos podrían explicarse, por un lado, por la mayor eficiencia del oligonucleótido siJunB-792 respecto al siJunB-848 en la disminución de la expresión de JunB y, por otro, por los efectos sobre la expresión de otros miembros de las familias Jun y Fos observados al utilizar siJunB-848.

Los genes diferencialmente expresados al usar siJunB-792 pero no siJunB-848 podrían ser resultado del silenciamiento específico de JunB cuyo

efecto no se observe al silenciar con siJunB-848, bien por el menor nivel de silenciamiento de JunB obtenido en la transfección de las células o bien debido a que los diferentes miembros AP-1 estén ejerciendo un efecto positivo o negativo sobre la expresión de los genes identificados y la alteración en sus niveles esté compensando el efecto de la disminución de JunB. En esta línea, se han descrito genes implicados en el ciclo celular, como *CCND1* o *CDKN2D* (que codifica la proteína p19), cuya expresión se ve afectada de forma opuesta por diferentes miembros AP-1 (Verde et al., 2007). La utilización de otros siARNs contra JunB que no afecten al resto de miembros AP-1 podrá ayudar a validar los resultados del análisis transcriptómico obtenidos con siJunB-792.

Por otro lado, es difícil concluir que la expresión diferencial de los genes que observamos al usar siJunB-848 pero no siJunB-792 sea debida exclusivamente a la reducción de los niveles de JunB. Teniendo en cuenta las variaciones en la expresión de *JUND* y de *FOSL1* observadas al silenciar JunB con siJunB-848 los cambios de expresión de genes observados al utilizar este siARN podrían ser un efecto de la disminución de *JUND* y/o *FOSL1* y no ser atribuibles a JunB. Sin embargo, los genes cuya expresión se ve alterada también al silenciar con siJunB-792 sí podrían considerarse como resultado de la disminución de los niveles de JunB ya que en el caso de siJunB-792 ningún otro miembro de AP-1 se ve afectado.

En este estudio nos hemos centrado en los genes diferencialmente expresados al silenciar JunB con los dos siJunB y, concretamente, en aquellos que están implicados en ciclo celular. Uno de los genes identificados que resulta de especial interés por su papel central en el ciclo celular es *CCNE1*. Su actividad es fundamental en la transición G1/S (Hwang & Clurman, 2005) por lo que niveles reducidos de esta ciclina explicarían la disminución en el número de células en fase S observada al silenciar JunB.

En las regiones de unión de JunB al genoma identificadas mediante ChIP-seq no aparece ninguna situada a ± 10 kb del TSS del gen de *CCNE1*. Esto indicaría que el efecto de JunB sobre la expresión de la Ciclina E1 no es directo. JunB podría estar afectando la expresión de algún regulador transcripcional de *CCNE1* lo que conduciría a la reducción de sus niveles de

manera indirecta produciendo, así, la parada en el ciclo celular. No obstante, al analizar en detalle su secuencia hemos localizado un sitio AP-1/TRE a -6.6 kb de su TSS. Al examinar los datos procedentes de la inmunoprecipitación de cromatina con el programa IGV (Robinson et al., 2011; Thorvaldsdottir et al., 2013), que permite visualizar los fragmentos de ADN obtenidos de la secuenciación alineados sobre el genoma humano, hemos observado un enriquecimiento de secuencias inmunoprecipitadas en esa zona. Sin embargo, en la misma región hay también una ligera acumulación de secuencias en la muestra que contiene el extracto total. Como para la correcta asignación de zonas de unión de JunB al genoma se comparan las secuencias obtenidas en la muestra inmunoprecipitada respecto al extracto total, el enriquecimiento obtenido en este último impide la asignación de esa región como sitio de unión de JunB y explica el que no haya sido identificada por el programa MACS (Zhang et al., 2008). Un análisis específico de esa región mediante ChIP-qPCR sería conveniente para confirmar si JunB se une o no a ella.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el ChIP-seq fue realizado en células en crecimiento asincrónico donde eventos que suceden en momentos concretos del ciclo celular pueden pasar desapercibidos. Así, factores de transcripción implicados en la regulación de genes de ciclo celular que tienen su expresión muy limitada a un periodo del mismo, como ocurre con *CCNE1*, podrían unirse a las secuencias reguladoras sólo cuando se requiriera su actividad y sería necesario analizar su unión a dichas regiones en células sincronizadas en la fase de interés para obtener resultados concluyentes. En este sentido, tampoco se ha detectado unión de JunB en regiones reguladoras de los genes de *CCND1* y *CCNA2*, pese a su conocido papel como regulador transcripcional de estas dos ciclinas (Andrecht et al., 2002; Bakiri et al., 2000). Finalmente, no hay que excluir la posibilidad de que la disminución del número de células en fase S provocada por un mecanismo distinto sea la causa de la reducción en los niveles de *CCNE1* en lugar de su consecuencia.

Al comparar los resultados del ChIP-seq en células U2OS con los del análisis transcriptómico hemos identificado dos dianas transcripcionales directas de JunB implicadas en ciclo celular: *GAS2L1* y *ERCC2*. El papel de

GAS2L1 en el ciclo celular no está muy estudiado aunque se ha descrito que su sobreexpresión conduce al bloqueo del mismo (Gamper et al., 2009). JunB actúa como represor transcripcional de GAS2L1. Al silenciar su expresión se observa un incremento en la expresión de GAS2L1 que estaría, por tanto, contribuyendo a la parada del ciclo celular observada. GAS2L1 se asocia a componentes del citoesqueleto y parece implicado en mediar interacciones entre filamentos de actina y microtúbulos (Stroud et al., 2014). Tal vez un aumento anómalo de sus niveles da lugar a problemas en la organización del huso mitótico o en la segregación cromosómica que conducen a la activación del punto de control del huso mitótico y a la parada del ciclo celular.

ERCC2 es una helicasa de ADN que juega un importante papel en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER), en la transcripción basal mediada por la ARN polimerasa II y en el ciclo celular. Mutaciones en el gen *ERCC2* dan lugar a diferentes desórdenes genéticos conocidos como síndromes NER. Ante un daño en el ADN la célula pone en marcha diferentes mecanismos de reparación en función de la lesión para preservar la información genética. Uno de ellos es la reparación por escisión de nucleótidos en la que ERCC2 juega un importante papel en el reconocimiento de la lesión y en la apertura de la doble hélice de ADN para permitir el corte de la región dañada y la posterior síntesis del ADN. Para realizar esta función ERCC2 se encuentra formando parte del complejo TFIIH. Este complejo está formado por 5 subunidades que se asocian al complejo CAK (CDK7, Mat1 y CcnH) a través de ERCC2. Además de estar implicado en NER, TFIIH juega un importante papel en la regulación de la transcripción basal mediante la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la ARN Polimerasa II por la actividad quinasa del complejo CAK (CDK7) (Chen & Suter, 2003; Fuss & Tainer, 2011; Oksenysh & Coin, 2010). Debido al papel de ERCC2 en la transcripción basal, la disminución en sus niveles como consecuencia del silenciamiento de JunB podría estar afectando a la correcta progresión del ciclo celular para la que se requiere la transcripción activa de reguladores de ciclo.

El complejo CAK recibe su nombre de *CDK Activating Kinase* y cuando no forma parte del complejo TFIIH juega un importante papel en la

progresión del ciclo celular activando, mediante fosforilación, a las CDKs. Se ha propuesto que ERCC2 regula la progresión por el ciclo celular mediante la unión a CAK que resulta en la inhibición de su acción sobre las CDKs (Cameroni et al., 2010). En base a resultados obtenidos en *Drosophila* se ha descrito un mecanismo por el cual ERCC2 estaría regulando la progresión mitótica mediante el secuestro de CAK. Los niveles de ERCC2 son bajos al inicio de mitosis coincidiendo con el momento de mayor activación de CDK1. La disminución de ERCC2 podría contribuir al aumento de la actividad mitótica de CAK a la vez que serviría de mecanismo de silenciamiento de la transcripción basal durante la mitosis (Chen et al., 2003). JunB es un regulador positivo de la expresión de ERCC2 y, como hemos descrito en este trabajo, sus niveles se reducen al final de G2 para asegurar una correcta mitosis. Es tentador pensar que la disminución de los niveles de JunB es necesaria para la disminución de ERCC2 al principio de mitosis y la activación de CDK1 que permita una adecuada progresión mitótica, al mismo tiempo que se produce la disminución de la transcripción basal característica de mitosis. Sería interesante analizar si la regulación de ERCC2 durante el ciclo celular descrita en *Drosophila* se reproduce en células humanas y si la variación de JunB durante el ciclo celular está contribuyendo a la misma.

Además de *GAS2L1* y de *ERCC2* hemos identificado como potencial diana de JunB a *CITED2* (*CBP/p300 interacting coactivator with glutamic acid/aspartic acid-rich tail*) (Tabla 11). *CITED2* codifica una proteína bifuncional que pertenece a una familia de cofactores transcripcionales caracterizados por tener un dominio ED-rico conservado en el extremo C-terminal. Un motivo funcional (LPXL) dentro de este dominio es necesario y suficiente para la unión a la primera región rica en cisteína-histidina de CBP/p300. Inicialmente se describió como un corepresor del factor inducible por hipoxia 1α (HIF1 α) ya que compite por HIF1 α para unirse a CBP/p300 (Bhattacharya et al., 1999). *CITED2* también actúa como un coactivador de la proteína activadora 2 (AP-2) (Bhattacharya et al., 1999), proteína PPAR α y PPAR γ (Tien et al., 2004), y Lhx2 (Glenn & Maurer, 1999) mediante el reclutamiento de CBP/p300. Algunos estudios sugieren un papel de *CITED2* en tumorigénesis y muestran que la sobreexpresión de

CITED2 arresta el ciclo celular en células de cáncer de colon (Bai & Merchant, 2007) y en células de carcinoma hepatocelular (Cheung et al., 2013), aumentando la expresión del inhibidor de quinasas dependientes de ciclina p21 en ambos casos. Estos estudios irían de acuerdo con nuestros resultados puesto que el aumento de expresión de *CITED2* que observamos al silenciar JunB podría conllevar el arresto de ciclo celular en G1/S que observamos.

Hemos identificado también otras potenciales dianas transcripcionales de JunB cuya expresión varía sólo al utilizar siJunB-792 y que sería interesante validar. Entre ellas hay que destacar a *CDKN1A*, *E2F7*, *SFN* y *PTP4A2*. Estos cuatro genes están implicados en la parada del ciclo celular según distintos mecanismos que se explican a continuación por lo que sus cambios de expresión al silenciar JunB contribuirían a explicar el marcado fenotipo observado en la Figura 50C.

CDKN1A pertenece a la familia CIP/KIP de inhibidores de CDKs. Codifica la proteína p21 que está implicada en multitud de procesos celulares tales como reparación del ADN, senescencia, muerte celular y envejecimiento. Juega un papel central en la progresión del ciclo celular mediante la unión e inhibición de los complejos CDK-Ciclina que conduce a la parada del ciclo celular en diferentes fases. Su asociación al complejo CDK4/6-Ciclina D inhibe la fosforilación de pRb e induce arresto en G1; durante la fase S, su asociación con PCNA impide la formación del complejo replicativo lo que conduce a un bloqueo en la replicación del ADN y a un arresto de las células en fase S; se une, además, e inhibe a los complejos CDK1-Ciclina B1 y CDK1/2-Ciclina A provocando una parada en G2 (Jung et al., 2010; Warfel & El-Deiry, 2013). En los histogramas centrales de la Figura 50C (los obtenidos al silenciar JunB con siJunB-792) se observa parada en todas las fases del ciclo, incluso en S, ya que en la gráfica que muestra las células positivas para EdU aparecen células en la región central del histograma, correspondiente a fase S, que son negativas en EdU. Este resultado concuerda con la parada en la replicación del ADN causada por el aumento de p21.

CDKN1A es una potencial diana transcripcional de JunB muy interesante por su importante papel en el ciclo celular y en la proliferación

celular. p21 es un mediador central del efecto supresor de tumores de p53 y está regulado positivamente por este factor de transcripción como respuesta al daño en el ADN, asegurando que el ciclo celular no progrese hasta que el ADN se haya reparado correctamente (Gartel & Radhakrishnan, 2005). Se ha descrito que cJun podría estar implicado en la regulación transcripcional de p21 mediante la unión a sitios Sp1 en su promotor y a través de la regulación de p53 (Schreiber et al., 1999; Wang et al., 2000), aunque hasta la fecha no se ha implicado a JunB en la regulación transcripcional de este inhibidor de CDKs. La represión transcripcional de p21 por JunB otorgaría a este factor un importante papel oncogénico ya que estaría favoreciendo que tuviera lugar una división celular descontrolada contribuyendo así a la proliferación celular. De acuerdo con nuestros resultados, recientemente se ha descrito que el silenciamiento de JunB en células derivadas de LACG ALK+ induce la sobreexpresión de p21 (Atsaves et al., 2014), lo que parece reforzar nuestra hipótesis.

E2F7 es miembro de la familia de factores de transcripción E2F que juegan un papel importante regulando la expresión de genes implicados en ciclo celular, replicación del ADN, reparación del ADN y mitosis, entre otros procesos. Los factores E2F juegan un papel central en el control de la transición G1/S al regular de manera coordinada la expresión de genes implicados en este periodo del ciclo celular. A diferencia de la mayoría de los miembros de su familia, E2F7 actúa como represor transcripcional y su expresión ectópica tiene un efecto antiproliferativo, dando lugar a la supresión de genes diana de E2F y a la acumulación de células en G1. Entre sus dianas transcripcionales se encuentra la Ciclina E1 (de Bruin et al., 2003; Di Stefano et al., 2003; Westendorp et al., 2012). El aumento de su expresión al silenciar JunB con siJunB-792 estaría contribuyendo, por tanto, a la disminución de los niveles de Ciclina E1 y a la parada de las células en G1.

SFN codifica 14-3-3 σ , una proteína de la familia 14-3-3. Estas proteínas de andamiaje se unen de forma específica a residuos de serina o treonina fosforilados afectando la localización, estabilidad o actividad de las proteínas diana. Interaccionan con una gran variedad de proteínas y son reguladores clave de multitud de procesos celulares, entre ellos el ciclo celular donde juegan un importante papel coordinando la progresión de las

células durante las diferentes fases del mismo y regulando la respuesta al daño en el ADN. En el caso concreto de 14-3-3 σ , se le ha atribuido un papel de supresor tumoral ya que regula negativamente el ciclo celular mediante su unión a CDKs y su expresión disminuida se ha observado en numerosos cánceres de origen epitelial. Su expresión exógena conduce a una parada del ciclo celular en G2/M. Al igual que p21, 14-3-3 σ se induce por p53 en respuesta al daño en el ADN y su mayor expresión conduce a un arresto en G2 al secuestrar al complejo CDK1-Ciclina B en el citoplasma. También se ha descrito que se une a CDK2 y a CDK4 (Freeman & Morrison, 2011; Gardino & Yaffe, 2011; Hermeking & Benzinger, 2006; Jung et al., 2010). Su aumento de expresión al silenciar JunB estaría, pues, contribuyendo a la parada de las células en G2/M.

Entre los genes que disminuyen su expresión al silenciar JunB con siJunB-792 aparece *PTP4A2*. Este gen codifica una fosfatasa de tirosina asociada con la progresión tumoral que está sobreexpresada en diferentes tumores primarios y metastáticos. Se la considera una proteína oncogénica aunque su regulación y los mecanismos de señalización en los que está implicada durante el desarrollo tumoral no están muy caracterizados (Rios et al., 2013). Se ha descrito que *PTP4A2* juega un papel en el ciclo celular promoviendo la progresión por la transición G1/S a través de la disminución de los niveles de p21 (Werner et al., 2003). Su expresión ectópica disminuye la actividad del promotor de p21 a la vez que produce un aumento en la actividad AP-1 (Hwang et al., 2012). Teniendo en cuenta que p21 es una de las potenciales dianas transcripcionales de JunB identificadas en este estudio, estos datos sugieren que JunB podría contribuir a mediar el efecto oncogénico de *PTP4A2* a través de la represión de p21. Además, apuntan a la existencia de un mecanismo de regulación entre *PTP4A2* y JunB similar al descrito para CD30 y JunB en LACG. *PTP4A2* induciría la actividad de JunB a la vez que JunB activaría de manera directa su transcripción.

En este trabajo nos hemos centrado en los genes implicados en la regulación del ciclo celular por ser el objetivo de esta tesis doctoral. Sin embargo, JunB parece jugar un importante papel en otros procesos celulares a juzgar por la multitud de procesos biológicos enriquecidos que aparecen entre los genes identificados como potenciales dianas de JunB. De especial

Discusión

interés son los obtenidos para los genes que presentan unión de JunB según los resultados del ChIP-seq y expresión diferencial al silenciar JunB con cada uno de los dos siARNs utilizados, entre los que destacan procesos relacionados con desarrollo y morfogénesis. Su importancia en estos procesos coincide con la letalidad embrionaria observada en ratones JunB deficientes (Schorpp-Kistner et al., 1999).

Conclusiones

1. El complejo E3 ubiquitina ligasa SCF^{Fbxw7} es el responsable de la degradación de JunB en G2 tardía.
2. JunB posee residuos fosforilables clave para la unión de la E3 ligasa que se encuentran en un motivo de reconocimiento consenso para Fbxw7 llamado CPD (consensus phospho degron) y cuya fosforilación es mediada, en parte, por la quinasa GSK3 β .
3. En células derivadas de linfoma anaplásico de células grandes que expresan de forma constitutiva la quinasa ALK (LACG ALK+) la inactivación de GSK3 mediada por la ruta de señalización ALK/PI3K/AKT contribuye a la estabilización de JunB en G2/M.
4. La acumulación de JunB en mitosis conduce a elevados niveles de Ciclina A2 y niveles reprimidos de DDX11, una helicasa de ADN implicada en la cohesión de las cromátidas hermanas, dando lugar a la aparición de defectos mitóticos que pueden conducir a inestabilidad genética, contribuyendo de esta manera al desarrollo neoplásico.
5. JunB es esencial para una correcta progresión del ciclo celular. Su silenciamiento génico da lugar a una parada del ciclo celular con un menor número de células en fase S.

Conclusiones

6. Se han identificado 246 genes diferencialmente expresados al silenciar JunB con dos siARNs distintos en células U2OS. De ellos, 12 están implicados en la regulación del ciclo celular, entre los que se encuentra la Ciclina E1, regulador clave de la transición G1/S.
7. Mediante ChIP-seq se han identificado 798 genes con unión de JunB en células Karpas derivadas de LACG ALK+ implicados en una gran diversidad de procesos biológicos. Entre los que juegan un papel en ciclo celular y proliferación se encuentra el gen que codifica CD30, cuya expresión incrementada es característica del LACG, y la Ciclina D2.
8. En células U2OS se han identificado 975 genes con unión de JunB, de los que 12 aparecen diferencialmente expresados al silenciar JunB con los dos siARNs utilizados, apuntando a un papel directo de JunB en su regulación transcripcional.
9. Se han identificado tres nuevas dianas transcripcionales de JunB implicados en la regulación del ciclo celular en células U2OS: *GAS2L1* y *CITED2*, sobre las que ejerce un papel represor, y *ERCC2*, cuya expresión es activada por JunB.
10. Se han identificado otras potenciales dianas transcripcionales de JunB con un importante papel en el ciclo celular como son *CDKN1A*, *E2F7*, *SFN* y *PTP4A2* cuya pérdida de regulación dependiente de JunB podría contribuir al papel oncogénico de JunB.

Referencias

- Adams, J. M., and Cory, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current opinion in immunology* 19, 488-496.
- Akhoondi, S., Sun, D., von der Lehr, N., Apostolidou, S., Klotz, K., Maljukova, A., Cepeda, D., Fiegl, H., Dafou, D., Marth, C., *et al.* (2007). FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res* 67, 9006-9012.
- Amin, H. M., and Lai, R. (2007). Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 110, 2259-2267.
- Andrecht, S., Kolbus, A., Hartenstein, B., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2002). Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem* 277, 35961-35968.
- Aoki, M., Batista, O., Bellacosa, A., Tsihchlis, P., and Vogt, P. K. (1998). The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14950-14955.
- Artandi, S. E., and DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9-18.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., *et al.* (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40, W597-603.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., *et al.* (2000). Gene

Referencias

- ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
- Atsaves, V., Lekakis, L., Drakos, E., Leventaki, V., Ghaderi, M., Baltatzis, G. E., Chioureas, D., Jones, D., Feretzaki, M., Liakou, C., *et al.* (2014). The oncogenic JUNB/CD30 axis contributes to cell cycle deregulation in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol* 167, 514-523.
- Bai, L., and Merchant, J. L. (2007). A role for CITED2, a CBP/p300 interacting protein, in colon cancer cell invasion. *FEBS Lett* 581, 5904-5910.
- Bailey, C., Fryer, A. E., and Greenslade, M. (2015). Warsaw Breakage Syndrome - A further report, emphasising cutaneous findings. *European journal of medical genetics*.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., and Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37, W202-208.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., and Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 19, 2056-2068.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21, 381-395.
- Barber, T. D., McManus, K., Yuen, K. W., Reis, M., Parmigiani, G., Shen, D., Barrett, I., Nouhi, Y., Spencer, F., Markowitz, S., *et al.* (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3443-3448.
- Bassermann, F., Eichner, R., and Pagano, M. (2014). The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 150-162.
- Bhattacharya, S., Michels, C. L., Leung, M. K., Arany, Z. P., Kung, A. L., and Livingston, D. M. (1999). Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. *Genes Dev* 13, 64-75.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., and Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews Genetics* 6, 611-622.
- Bossy-Wetzel, E., Bravo, R., and Hanahan, D. (1992). Transcription factors junB and c-jun are selectively up-regulated and functionally implicated in fibrosarcoma development. *Genes Dev* 6, 2340-2351.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* 13, 1-27.
- Cameroni, E., Stettler, K., and Suter, B. (2010). On the traces of XPD: cell cycle matters - untangling the genotype-phenotype relationship of XPD mutations. *Cell division* 5, 24.
- Campbell, N. A., and Reece, J. B. (2001). *Biology*, 6th edn: Benjamin Cummings).
- Capo-Chichi, J. M., Bharti, S. K., Sommers, J. A., Yammine, T., Chouery, E., Patry, L., Rouleau, G. A., Samuels, M. E., Hamdan, F. F., Michaud, J. L., *et al.* (2013). Identification and biochemical characterization of a novel mutation in DDX11 causing Warsaw breakage syndrome. *Human mutation* 34, 103-107.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 739-751.
- Caren, H., Abel, F., Kogner, P., and Martinsson, T. (2008). High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J* 416, 153-159.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 *Suppl* 3, 4-10.
- Chen, J., Larochelle, S., Li, X., and Suter, B. (2003). Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 424, 228-232.
- Chen, J., and Suter, B. (2003). Xpd, a structural bridge and a functional link. *Cell Cycle* 2, 503-506.
- Chen, Z., Sui, J., Zhang, F., and Zhang, C. (2015). Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms. *Journal of Cancer* 6, 233-242.

Referencias

- Cheng, Y., and Li, G. (2012). Role of the ubiquitin ligase Fbw7 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31, 75-87.
- Cheung, K. F., Zhao, J., Hao, Y., Li, X., Lowe, A. W., Cheng, A. S., Sung, J. J., and Yu, J. (2013). CITED2 is a novel direct effector of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in suppressing hepatocellular carcinoma cell growth. *Cancer* 119, 1217-1226.
- Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., and Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 11-23.
- Chinenov, Y., and Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20, 2438-2452.
- Chinnam, M., and Goodrich, D. W. (2011). RB1, development, and cancer. *Current topics in developmental biology* 94, 129-169.
- Cohen, P., and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-776.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.
- Courcelles, M., Fremin, C., Voisin, L., Lemieux, S., Meloche, S., and Thibault, P. (2013). Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Molecular systems biology* 9, 669.
- Cunningham, F., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., *et al.* (2015). Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res* 43, D662-669.
- Davis, R. J., Welcker, M., and Clurman, B. E. (2014). Tumor suppression by the Fbw7 ubiquitin ligase: mechanisms and opportunities. *Cancer Cell* 26, 455-464.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., and Leone, G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 278, 42041-42049.
- de Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., and Hulo, N. (2006). ScanProsite:

- detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34, W362-365.
- de Leval, L., and Gaulard, P. (2010). CD30+ lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 95, 1627-1630.
- den Elzen, N., and Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153, 121-136.
- Di Stefano, L., Jensen, M. R., and Helin, K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J* 22, 6289-6298.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- Donate, L. E., and Blasco, M. A. (2011). Telomeres in cancer and ageing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 366, 76-84.
- Dorsam, S. T., Ferrell, C. M., Dorsam, G. P., Derynck, M. K., Vijapurkar, U., Khodabakhsh, D., Pau, B., Bernstein, H., Haqq, C. M., Largman, C., and Lawrence, H. J. (2004). The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. *Blood* 103, 1676-1684.
- Eferl, R., and Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859-868.
- Eichhorn, M. E., Kleespies, A., Angele, M. K., Jauch, K. W., and Bruns, C. J. (2007). Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 392, 371-379.
- Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G. G., Garvin, A. J., Rosner, M. R., and Haber, D. A. (1995). WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J* 14, 4662-4675.
- Fadlelmola, F. M., Zhou, M., de Leeuw, R. J., Dosanjh, N. S., Harmer, K., Huntsman, D., Lam, W. L., and Banerjee, D. (2008). Sub-megabase resolution tiling (SMRT) array-based comparative genomic

- hybridization profiling reveals novel gains and losses of chromosomal regions in Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma cell lines. *Mol Cancer* 7, 2.
- Farina, A., Shin, J. H., Kim, D. H., Bermudez, V. P., Kelman, Z., Seo, Y. S., and Hurwitz, J. (2008). Studies with the human cohesin establishment factor, ChlR1. Association of ChlR1 with Ctf18-RFC and Fen1. *J Biol Chem* 283, 20925-20936.
- Farras, R., Baldin, V., Gallach, S., Acquaviva, C., Bossis, G., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. (2008). JunB breakdown in mid-/late G2 is required for down-regulation of cyclin A2 levels and proper mitosis. *Mol Cell Biol* 28, 4173-4187.
- Farras, R., Bossis, G., Andermarcher, E., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. (2005). Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol* 54, 31-51.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* 78, 477-513.
- Folkman, J. (2004). Angiogenesis and c-Jun. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 644.
- Freeman, A. K., and Morrison, D. K. (2011). 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol* 22, 681-687.
- Frescas, D., and Pagano, M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 438-449.
- Fuchs, S. Y., Dolan, L., Davis, R. J., and Ronai, Z. (1996). Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* 13, 1531-1535.
- Fung, T. K., and Poon, R. Y. (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* 16, 335-342.
- Fuss, J. O., and Tainer, J. A. (2011). XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair (Amst)* 10, 697-713.

- Gamper, I., Koh, K. R., Ruau, D., Ullrich, K., Bartunkova, J., Piroth, D., Hacker, C., Bartunek, P., and Zenke, M. (2009). GAR22: a novel target gene of thyroid hormone receptor causes growth inhibition in human erythroid cells. *Experimental hematology* 37, 539-548 e534.
- Garaude, J., Farras, R., Bossis, G., Charni, S., Piechaczyk, M., Hipskind, R. A., and Villalba, M. (2008). SUMOylation regulates the transcriptional activity of JunB in T lymphocytes. *J Immunol* 180, 5983-5990.
- Gardino, A. K., and Yaffe, M. B. (2011). 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 22, 688-695.
- Gartel, A. L., and Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65, 3980-3985.
- Glenn, D. J., and Maurer, R. A. (1999). MRG1 binds to the LIM domain of Lhx2 and may function as a coactivator to stimulate glycoprotein hormone alpha-subunit gene expression. *J Biol Chem* 274, 36159-36167.
- Gonzalez, F. A., Raden, D. L., and Davis, R. J. (1991). Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem* 266, 22159-22163.
- Grant, C. E., Bailey, T. L., and Noble, W. S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27, 1017-1018.
- Gupta, G. P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M. E., Harper, J. W., and Pavletich, N. P. (2007). Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell* 26, 131-143.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry Biokhimiia* 62, 1180-1190.
- Hermeking, H., and Benzinger, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* 16, 183-192.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.

Referencias

- Hsu, F. Y., Johnston, P. B., Burke, K. A., and Zhao, Y. (2006). The expression of CD30 in anaplastic large cell lymphoma is regulated by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase-mediated JunB level in a cell type-specific manner. *Cancer Res* 66, 9002-9008.
- Hsu, P. P., and Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707.
- Hulsen, T., de Vlieg, J., and Alkema, W. (2008). BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC genomics* 9, 488.
- Hwang, H. C., and Clurman, B. E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24, 2776-2786.
- Hwang, J. J., Min, S. H., Sin, K. H., Heo, Y. S., Kim, K. D., Yoo, O. J., and Lee, S. H. (2012). Altered expression of phosphatase of regenerating liver gene family in non-small cell lung cancer. *Oncology reports* 27, 535-540.
- Inoue, A., Li, T., Roby, S. K., Valentine, M. B., Inoue, M., Boyd, K., Kidd, V. J., and Lahti, J. M. (2007). Loss of ChlR1 helicase in mouse causes lethality due to the accumulation of aneuploid cells generated by cohesion defects and placental malformation. *Cell Cycle* 6, 1646-1654.
- Jackman, J., and O'Connor, P. M. (2001). Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 8*, Unit 8 3.
- Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.
- Jochum, W., Passegue, E., and Wagner, E. F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20, 2401-2412.
- Jones, R. G., and Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.
- Jung, Y. S., Qian, Y., and Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal* 22, 1003-1012.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., and Karin, M. (1996). c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.

- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., and Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome research* 12, 996-1006.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.
- Kharman-Biz, A., Gao, H., Ghiasvand, R., Zhao, C., Zendejdel, K., and Dahlman-Wright, K. (2013). Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. *BMC cancer* 13, 441.
- Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of human genetics* 58, 439-445.
- Kovary, K., and Bravo, R. (1991). The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11, 4466-4472.
- Kunjappu, M. J., and Hochstrasser, M. (2014). Assembly of the 20S proteasome. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 2-12.
- Laderoute, K. R. (2005). The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors in response to low oxygen. *Semin Cell Dev Biol* 16, 502-513.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lallemant, D., Spyrou, G., Yaniv, M., and Pfarr, C. M. (1997). Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene* 14, 819-830.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lee, K. H., and Kim, J. R. (2012). Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF-kappaB, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. *Clinical & experimental metastasis* 29, 263-272.
- Lee, T. I., Johnstone, S. E., and Young, R. A. (2006). Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nature protocols* 1, 729-748.
- Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.

Referencias

- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J* 18, 420-432.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., and Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*, 5th edn: WHFreeman).
- Lopez-Bergami, P., Lau, E., and Ronai, Z. (2009). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 65-76.
- Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Machanick, P., and Bailey, T. L. (2011). MEME-ChIP: motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* 27, 1696-1697.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dorken, B., and Scheiderei, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J* 21, 4104-4113.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C. Y., Chou, A., Ienasescu, H., *et al.* (2014). JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 42, D142-147.
- McDonnell, S. R., Hwang, S. R., Basrur, V., Conlon, K. P., Fermin, D., Wey, E., Murga-Zamalloa, C., Zeng, Z., Zu, Y., Elenitoba-Johnson, K. S., and Lim, M. S. (2011). NPM-ALK signals through glycogen synthase kinase 3beta to promote oncogenesis. *Oncogene*.
- McLean, C. Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S. L., Schaar, B. T., Lowe, C. B., Wenger, A. M., and Bejerano, G. (2010). GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature biotechnology* 28, 495-501.

- McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O., and Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nature reviews Neuroscience* 2, 589-594.
- Mechta-Grigoriou, F., Gerald, D., and Yaniv, M. (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* 20, 2378-2389.
- Medeiros, L. J., and Elenitoba-Johnson, K. S. (2007). Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 127, 707-722.
- Metzger, M. B., Hristova, V. A., and Weissman, A. M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 125, 531-537.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., and Thomas, P. D. (2013a). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature protocols* 8, 1551-1566.
- Mi, H., Muruganujan, A., and Thomas, P. D. (2013b). PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res* 41, D377-386.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., and Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15, 117-134.
- Moore, C. H., Best, R.C. (2001). *Chromosome Preparation and Banding*. eLS.
- Morgan, D. O. (2007). *The cell cycle. Principles of control*: New Science Press).
- Moroy, T., and Geisen, C. (2004). Cyclin E. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1424-1439.
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., and Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263, 1281-1284.
- Mosse, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., *et al.* (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455, 930-935.

Referencias

- Mussolin, L., Pillon, M., Bonato, P., Leszl, A., Franceschetto, G., Di Meglio, A., d'Amore, E. S., Sainati, L., and Rosolen, A. (2010). Cytogenetic analysis of pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 55, 446-451.
- Musti, A. M., Treier, M., and Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 400-402.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* 16, 323-333.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-381.
- Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F. B., Mendenhall, M. D., Sicheri, F., Pawson, T., and Tyers, M. (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* 414, 514-521.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 220-228.
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.
- Oksenych, V., and Coin, F. (2010). The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 9, 90-96.
- Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M., and Sicheri, F. (2003). Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCF^{Cdc4} ubiquitin ligase. *Cell* 112, 243-256.
- Osterhage, J. L., and Friedman, K. L. (2009). Chromosome end maintenance by telomerase. *J Biol Chem* 284, 16061-16065.
- Palmer, R. H., Vernersson, E., Grabbe, C., and Hallberg, B. (2009). Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J* 420, 345-361.
- Papoudou-Bai, A., Goussia, A., Batistatou, A., Stefanou, D., Malamou-Mitsi, V., and Kanavaros, P. (2015). The expression levels of JunB, JunD and p-c-Jun are positively correlated with tumor cell proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia & lymphoma*, 1-8.

- Parish, J. L., Rosa, J., Wang, X., Lahti, J. M., Doxsey, S. J., and Androphy, E. J. (2006). The DNA helicase ChlR1 is required for sister chromatid cohesion in mammalian cells. *J Cell Sci* 119, 4857-4865.
- Park, Y. B., Park, M. J., Kimura, K., Shimizu, K., Lee, S. H., and Yokota, J. (2002). Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 133, 105-111.
- Passague, E., Jochum, W., Behrens, A., Ricci, R., and Wagner, E. F. (2002). JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet* 30, 158-166.
- Passague, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-Steinlein, U., and Wagner, E. F. (2001). Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* 104, 21-32.
- Passague, E., and Wagner, E. F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 19, 2969-2979.
- Passague, E., Wagner, E. F., and Weissman, I. L. (2004). JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell* 119, 431-443.
- Pearson, J. D., Lee, J. K., Bacani, J. T., Lai, R., and Ingham, R. J. (2011). NPM-ALK and the JunB transcription factor regulate the expression of cytotoxic molecules in ALK-positive, anaplastic large cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 124-133.
- Pearson, J. D., Lee, J. K., Bacani, J. T., Lai, R., and Ingham, R. J. (2012). NPM-ALK: The Prototypic Member of a Family of Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases. *J Signal Transduct* 2012, 123253.
- Perez-Benavente, B., Garcia, J. L., Rodriguez, M. S., Pineda-Lucena, A., Piechaczyk, M., Font de Mora, J., and Farras, R. (2013). GSK3-SCF(FBXW7) targets JunB for degradation in G2 to preserve chromatid cohesion before anaphase. *Oncogene* 32, 2189-2199.
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 644-656.
- Peters, J. M., Tedeschi, A., and Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* 22, 3089-3114.

Referencias

- Piccaluga, P. P., Gazzola, A., Mannu, C., Agostinelli, C., Bacci, F., Sabattini, E., Sagromoso, C., Piva, R., Roncolato, F., Inghirami, G., and Pileri, S. A. (2010). Pathobiology of anaplastic large cell lymphoma. *Adv Hematol*, 345053.
- Piechaczyk, M., and Farras, R. (2008). Regulation and function of JunB in cell proliferation. *Biochem Soc Trans* 36, 864-867.
- Polyak, K., and Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.
- Quinlan, A. R., and Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841-842.
- Rajagopalan, H., Jallepalli, P. V., Rago, C., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2004). Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 428, 77-81.
- Rajagopalan, H., and Lengauer, C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* 432, 338-341.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 23-36.
- Rassidakis, G. Z., Thomaidis, A., Atwell, C., Ford, R., Jones, D., Claret, F. X., and Medeiros, L. J. (2005). JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol* 18, 1365-1370.
- Rios, P., Li, X., and Kohn, M. (2013). Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *The FEBS journal* 280, 505-524.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., and Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology* 29, 24-26.
- Rosenbloom, K. R., Sloan, C. A., Malladi, V. S., Dreszer, T. R., Learned, K., Kirkup, V. M., Wong, M. C., Maddren, M., Fang, R., Heitner, S. G., *et al.* (2013). ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update. *Nucleic Acids Res* 41, D56-63.
- Salaverria, I., Bea, S., Lopez-Guillermo, A., Lespinet, V., Pinyol, M., Burkhardt, B., Lamant, L., Zettl, A., Horsman, D., Gascoyne, R., *et al.* (2008). Genomic profiling reveals different genetic aberrations in

- systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol* 140, 516-526.
- Schorpp-Kistner, M., Wang, Z. Q., Angel, P., and Wagner, E. F. (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J* 18, 934-948.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., and Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 13, 607-619.
- Schutte, J., Viallet, J., Nau, M., Segal, S., Fedorko, J., and Minna, J. (1989). jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and transactivating activities of c-jun. *Cell* 59, 987-997.
- Shaulian, E. (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 22, 894-899.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.
- Singh, R. R., Cho-Vega, J. H., Davuluri, Y., Ma, S., Kasbidi, F., Milito, C., Lennon, P. A., Drakos, E., Medeiros, L. J., Luthra, R., and Vega, F. (2009). Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* 69, 2550-2558.
- Singh, S., Narang, A. S., and Mahato, R. I. (2011). Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA. *Pharmaceutical research* 28, 2996-3015.
- Skaar, J. R., and Pagano, M. (2009). Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol* 21, 816-824.
- Slupianek, A., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Morrione, A., Majewski, M., Xue, L., Morris, S. W., Wasik, M. A., and Skorski, T. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res* 61, 2194-2199.
- Spivakov, M., and Fisher, A. G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature reviews Genetics* 8, 263-271.
- Staber, P. B., Vesely, P., Haq, N., Ott, R. G., Funato, K., Bambach, I., Fuchs, C., Schauer, S., Linkesch, W., Hrzenjak, A., *et al.* (2007). The

Referencias

- oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood* 110, 3374-3383.
- Steidl, U., Rosenbauer, F., Verhaak, R. G., Gu, X., Ebraldidze, A., Otu, H. H., Klippel, S., Steidl, C., Bruns, I., Costa, D. B., *et al.* (2006). Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells. *Nat Genet* 38, 1269-1277.
- Stein, H., Foss, H. D., Durkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K., Pileri, S., and Falini, B. (2000). CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 96, 3681-3695.
- Stroud, M. J., Nazgiewicz, A., McKenzie, E. A., Wang, Y., Kammerer, R. A., and Ballestrem, C. (2014). GAS2-like proteins mediate communication between microtubules and actin through interactions with end-binding proteins. *J Cell Sci* 127, 2672-2682.
- Tan, Y., Sangfelt, O., and Spruck, C. (2008). The Fbxw7/hCdc4 tumor suppressor in human cancer. *Cancer letters* 271, 1-12.
- Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T., and Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* 14, 178-192.
- Tien, E. S., Davis, J. W., and Vanden Heuvel, J. P. (2004). Identification of the CREB-binding protein/p300-interacting protein CITED2 as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha coregulator. *J Biol Chem* 279, 24053-24063.
- Tighe, A., Ray-Sinha, A., Staples, O. D., and Taylor, S. S. (2007). GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. *BMC Cell Biol* 8, 34.
- Treier, M., Staszewski, L. M., and Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78, 787-798.
- van Dam, H., and Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20, 2453-2464.
- van der Lelij, P., Chrzanowska, K. H., Godthelp, B. C., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Stumm, M., Zdzienicka, M. Z., Joenje, H., and de Winter, J. P. (2010). Warsaw breakage syndrome, a cohesinopathy associated

- with mutations in the XPD helicase family member DDX11/ChlR1. *Am J Hum Genet* 86, 262-266.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Verde, P., Casalino, L., Talotta, F., Yaniv, M., and Weitzman, J. B. (2007). Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-ternizing on target promoters. *Cell Cycle* 6, 2633-2639.
- Wakefield, J. G., Stephens, D. J., and Tavaré, J. M. (2003). A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J Cell Sci* 116, 637-646.
- Wang, C. H., Tsao, Y. P., Chen, H. J., Chen, H. L., Wang, H. W., and Chen, S. L. (2000). Transcriptional repression of p21((Waf1/Cip1/Sdi1)) gene by c-jun through Sp1 site. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 303-310.
- Wang, L., Ye, X., Liu, Y., Wei, W., and Wang, Z. (2014). Aberrant regulation of FBW7 in cancer. *Oncotarget* 5, 2000-2015.
- Wang, Z., Inuzuka, H., Zhong, J., Wan, L., Fukushima, H., Sarkar, F. H., and Wei, W. (2012). Tumor suppressor functions of FBW7 in cancer development and progression. *FEBS Lett* 586, 1409-1418.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Warfel, N. A., and El-Deiry, W. S. (2013). p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Current opinion in oncology* 25, 52-58.
- Watanabe, M., Itoh, K., Togano, T., Kadin, M. E., Watanabe, T., Higashihara, M., and Horie, R. (2012). Ets-1 activates overexpression of JunB and CD30 in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 180, 831-838.
- Watanabe, M., Sasaki, M., Itoh, K., Higashihara, M., Umezawa, K., Kadin, M. E., Abraham, L. J., Watanabe, T., and Horie, R. (2005). JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 65, 7628-7634.
- Wei, W., Jin, J., Schlisio, S., Harper, J. W., and Kaelin, W. G., Jr. (2005). The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent

Referencias

- recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 8, 25-33.
- Weinberg, R. A. (2014). *The biology of cancer*, 2nd edn: Garland Science).
- Welchman, R. L., Gordon, C., and Mayer, R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 599-609.
- Welcker, M., and Clurman, B. E. (2007). Fbw7/hCDC4 dimerization regulates its substrate interactions. *Cell division* 2, 7.
- Welcker, M., and Clurman, B. E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 8, 83-93.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J. E., Harper, J. W., Eisenman, R. N., and Clurman, B. E. (2004). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9085-9090.
- Welcker, M., Singer, J., Loeb, K. R., Grim, J., Bloecher, A., Gurien-West, M., Clurman, B. E., and Roberts, J. M. (2003). Multisite phosphorylation by CDK2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* 12, 381-392.
- Werner, S. R., Lee, P. A., DeCamp, M. W., Crowell, D. N., Randall, S. K., and Crowell, P. L. (2003). Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer letters* 202, 201-211.
- Wertz, I. E., and Dixit, V. M. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ* 17, 14-24.
- Westendorp, B., Mokry, M., Groot Koerkamp, M. J., Holstege, F. C., Cuppen, E., and de Bruin, A. (2012). E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res* 40, 3511-3523.
- Woodgett, J. R. (2005). Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 150-157.
- Xu, C., Kim, N. G., and Gumbiner, B. M. (2009). Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle* 8, 4032-4039.

- Yamasaki, L., and Pagano, M. (2004). Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 16, 623-628.
- Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell* 14, 818-829.
- Yang, M. Y., Liu, T. C., Chang, J. G., Lin, P. M., and Lin, S. F. (2003). JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood* 101, 3205-3211.
- Zhang, J., Zhu, F., Li, X., Dong, Z., Xu, Y., Peng, C., Li, S., Cho, Y. Y., Yao, K., Zykova, T. A., and Bode, A. M. (2012). Rack1 protects N-terminal phosphorylated c-Jun from Fbw7-mediated degradation. *Oncogene* 31, 1835-1844.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., and Liu, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137.
- Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews Immunology* 6, 715-727.

