



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA

**Identificación y caracterización funcional de
la interacción entre el proto-oncogen c-Fos y la
proteína centrosomal CEP2/C-NAP1**

TESIS DOCTORAL

Davinia Pla Ferrer

Valencia 2010

El Doctor **Vicente Andrés García**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) hasta el 30 de agosto del 2009 y actualmente Investigador Senior del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), y el Doctor **José María González Granado**, Investigador Post-doctoral del Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC,

CERTIFICAN:

Que Dña. **Davinia Pla Ferrer**, licenciada en Bioquímica por la Universidad de Valencia, España, ha realizado bajo su dirección, el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: **Identificación y caracterización funcional de la interacción entre el proto-oncogen c-Fos y la proteína centrosomal CEP2/C-NAP1**, en el laboratorio de Biología Vascular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente certificado en:

Valencia, a 13 de mayo de 2010

Fdo: Prof. Vicente Andrés García Fdo: Dr. José M^a González Granado

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.

Es un viaje, nunca una llegada”

Karl Popper

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, no sólo mediante sus expertas aportaciones científicas sino también a través de su apoyo y ánimo a lo largo del desarrollo de esta Tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a mi codirector Vicente Andrés, por introducirme en el mundo de la investigación, dándome primero la oportunidad de realizar prácticas en su laboratorio tras la carrera y seguidamente ofrecerme la oportunidad de realizar la presente Tesis Doctoral.

A mi otro codirector, José María ("CheMari"), que siempre ha estado ahí tanto en el ámbito profesional, con su apoyo y buenos consejos, como en el personal, con su amistad y gran sentido del humor, facilitando enormemente el trabajo del día a día. Mil gracias.

También agradecer al Prof. Andrew M Fry que me acogió en su laboratorio durante cuatro meses y a la Dra. Joelle Blot que tanto me enseñó.

A todos mis compañeros del laboratorio VA, los que quedan y los que ya no están. Sin su ayuda y consejo hubiera sido mucho más difícil llevar a cabo esta Tesis. Especialmente quiero agradecer a aquellas personas que fuera del laboratorio han sido además amigos, y me han dado tantas satisfacciones personales dentro y fuera del laboratorio: Ana, Carlos, Kiko, Mariló, Mariam, Marian, Patricia y Rosa.

A todo el personal del Instituto de Biomedicina de Valencia, tanto científico como no científico, que siempre han estado ahí para hacer más fácil el trabajo diario. Especialmente dar gracias a Ada por su gran ayuda y consejo, sobretodo en el último proceso de la Tesis.

Muy especialmente, agradezco a mi madre, Isabel, a mi padre, Jesús y a mis hermanas, Marina y Marisa, por su apoyo no sólo en el proceso de esta Tesis sino también en todos los ámbitos de mi vida personal y profesional.

Y a ti, Pedro, porque eres el que más ha tenido que aguantar mis “meetings” científicos, no sin cara de extrañeza, y porque siempre me has animado en los momentos bajos de esta profesión.

Muchas gracias a todos.

Davinia Pla

La autora ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha realizado gracias a las siguientes ayudas de los siguientes organismos: RETIC en Enfermedades Cardiovasculares (C03/01 y RD06/0014/0021), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2004-03057), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-62110) y Generalitat Valenciana (GVPRE/2008/163).

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
JUSTIFICACION DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	3
<i>CAPÍTULO I: Introducción.....</i>	5
1. Factores de transcripción de la familia AP-1	7
1.1. Generalidades	7
1.2. c-Fos.....	15
2. Regulación de la actividad AP-1	18
2.1. Regulación de la actividad AP-1 por interacciones proteína- proteína.....	23
3. El centrosoma.....	28
3.1. Generalidades	29
3.2. Componentes del conector centriolar	36
4. Centrosoma y moléculas reguladoras	42
<i>CAPÍTULO II: Materiales y Métodos</i>	55
1. Materiales y Métodos generales.....	57
1.1. Reactivos de biología molecular.....	57
1.2. Tampones de uso general.....	57
1.3. Líneas celulares y medios de cultivo	57
1.4. Anticuerpos y péptidos inmunogénicos	59
1.5. Plásmidos de uso general	60
1.6. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	61
1.7. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas.....	62
1.8. Transfección de células de mamífero.....	64
1.9. Transformación en cepas bacterias	65
1.10. Análisis estadísticos	66

2. Materiales y métodos específicos.....	66
2.1. Ensayo de doble híbrido en levaduras.....	66
2.2. Ensayo de arrastre por GST.....	71
2.3. Mutagénesis dirigida.....	74
2.4. Inmunoprecipitación en células HeLa.....	75
2.5. Inmunofluorescencia en células de mamífero y estudios de colocalización mediante microscopía confocal.....	76
2.6. Aislamiento de centrosomas.....	78
2.7. Estudios de movilidad electroforética retardada (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	81
CAPÍTULO III: Resultados.....	85
1. Búsqueda de nuevas interacciones de c-Fos con proteínas celulares por ensayo de doble híbrido en levaduras.....	87
1.1. Trabajos previos.....	87
1.2. Identificación del clon 17.1.....	87
2. Interacción entre c-Fos y CEP2.....	88
2.1. Objetivos.....	88
2.2. Interacción entre c-Fos y GST-CEP2Ct.....	88
2.3. Identificación de las regiones de CEP2Ct implicadas en la interacción con c-Fos.....	90
2.4. Mutagénesis de las leucinas del motivo en cremallera de leucinas de CEP2.....	96
3. Interacción entre c-Fos y C-NAP1.....	99
3.1. Objetivos.....	100
3.2. Interacción entre c-Fos y GST-C-NAP1Ct <i>in vitro</i>	101
3.3. Interacción entre c-Fos y C-NAP1Ct <i>in vivo</i>	103
4. Localización subcelular de c-Fos y C-NAP1.....	105
4.1. Objetivo.....	105
4.2. Ensayos de colocalización por inmunofluorescencia.....	105

4.3. Localización de c-Fos en centrosomas aislados.....	119
5. Implicaciones funcionales de la interacción c-Fos/C-NAP1	122
5.1. c-Fos regula la cantidad de C-NAP1 presente en el centrosoma..	122
5.2. C-NAP1 modula la unión de los factores AP-1 a ADN	125
CAPÍTULO IV: Discusión	129
CONCLUSIONES.....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Dominio b-ZIP de las proteínas AP-1.....	9
Figura I.2: La familia de factores de transcripción AP-1.....	12
Figura I.3: Dominios funcionales y estructurales de c-Fos.....	18
Figura I.4: Esquema del promotor de c-Fos y las rutas implicadas en su regulación.....	20
Figura I.5: Figura esquemática del ciclo del centrosoma en relación al ciclo celular.....	35
Figura I.6: Modelo esquemático de la localización y regulación del conector centriolar.....	42
Figura II.1: Representación esquemática del ensayo del doble híbrido en levadura.....	70
Figura II.2: Esquema de los pasos seguidos en el protocolo de aislamiento de centrosomas.....	80
Figura III.1: Expresión de c-Fos endógeno en células NIH-3T3.....	89
Figura III.2: Interacción de CEP2Ct y c-Fos <i>in vitro</i>	90
Figura III.3: Esquema representativo de los fragmentos del CEP2Ct.....	92

Figura III.4: Determinación de la región de CEP2Ct que interacciona con c-Fos por ensayo β -galactosidasa.....	94
Figura III.5: Determinación de la región de CEP2Ct que interacciona con c-Fos por ensayo de arrastre con GST.....	95
Figura III.6: Esquema de los resultados obtenidos en el mapeado de la interacción entre c-Fos y CEP2Ct.....	96
Figura III.7: La mutación de leucinas en la cremallera de leucinas de CEP2Ct elimina la interacción entre CEP2Ct y c-Fos en un ensayo β -galactosidasa en filtro.....	98
Figura III.8: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de CEP2 y C-NAP1.....	100
Figura III.9: La mutación de una de las leucinas de la cremallera de leucinas de C-NAP1Ct elimina la interacción <i>in vitro</i> entre C-NAP1Ct y HA-c-Fos.....	102
Figura III.10: La mutación de una de las leucinas de la cremallera de leucinas de C-NAP1Ct elimina la interacción <i>in vitro</i> entre C-NAP1Ct y c-Fos endógeno en células humanas.....	103
Figura III.11: HA-c-Fos y C-NAP1Ct, pero no HA-c-Fos y C-NAP1Ctm3, interaccionan <i>in vivo</i> en células humanas.....	105
Figura III.12: C-NAP1 se localiza en el centrosoma de células HeLa.....	107
Figura III.13: C-NAP1 se localiza en el centrosoma de células U2OS.....	108
Figura III.14: c-Fos (anticuerpo sc-52) se localiza en el centrosoma de fibroblastos murinos NIH-3T3.....	110
Figura III.15: c-Fos (anticuerpo Ab2) se localiza en el centrosoma de fibroblastos murinos NIH-3T3.....	112
Figura III.16: c-Fos (anticuerpo sc-52) se localiza en el centrosoma de células humanas U2OS.....	114
Figura III.17: c-Fos (anticuerpo Ab2) se localiza en el centrosoma de células humanas U2OS.....	115
Figura III.18: Colocalización de C-NAP1 y c-Fos en células HeLa.....	117

Figura III.19: Colocalización de C-NAP1 y c-Fos en células U2OS.....	118
Figura III.20: Aislamiento de centrosomas en gradiente de sacarosa de células humanas KE37.....	120
Figura III.21: c-Fos y C-NAP1 se localizan en fracciones donde se concentran los centrosomas.....	121
Figura III.22: La sobreexpresión de HA-c-Fos reduce la cantidad de C-NAP1 endógeno, pero no de γ -tubulina, presente en el centrosoma..	124
Figura III.23: Efecto en la unión de AP-1 a la sonda consenso AP-1 en extractos nucleares de células NIH-3T3 preincubados con GST o GST-CNAP1Ct.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Proteínas involucradas en el control del centrosoma.....	50
Tabla II.1: Anticuerpos utilizados.....	59
Tabla II.2: Péptidos inmunogénicos utilizados.....	60

ABREVIATURAS

aa: aminoácido

ADNc: ADN complementario

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

AP-1: "Activating protein 1"

ARNm: ARN mensajero

ATF: "Activating Transcription Factor"

BRCA1: "Breast cancer-associated gene 1"

BSA: albúmina de suero bovino ("bovine serum albumin")

b-ZIP: "basic-leucine zipper"

Cdk: "Cyclin-dependent kinase"

CEP2: "Centrosomal protein 2"

c-Fos: "Cellular FBJ osteo-sarcoma"

CKIs: "Cyclin-dependent kinase Inhibitors"

C-NAP1: "Centrosomal Nek2-associated protein 1"

CREB: "Cyclic AMP Response Element Binding protein"

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimetilsulfóxido ("Dimetilsulfoxid")

DO₆₀₀: densidad óptima a 600 nanómetros

DTT: ditionitrotol ("Dithiothreitol")

EDTA: "ethylenediaminetetraacetic acid"

EGTA: "ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid"

ERK: "Extracellular signal-Regulated Kinase"

FBS: suero bovino fetal ("fetal bovine serum")

FITC: "Fluorescein isothiocyanate"

GST: glutation-S-transferasa

γ -TuRC: " γ -Tubulin Ring Complex"

HA: "Human influenza virus haemagglutinin epitope"

HEPES: N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HR: recombinación homóloga "homologous recombination"
HRP: "Horseradish peroxidase"
IEG: "Immediately Early Genes"
IPTG: "Isopropil- β -tiogalactopiranosido"
JNK: "Jun N-terminal Kinase"
LacZ: gen que codifica para la β -galactosidasa
LZ: "Leucine Zipper"
MAF: "Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma"
MAPK: "Mitogen-activated protein kinase"
MEFs: "Mouse Embryonic Fibroblasts"
MTs: Microtúbulos
NBS: suero bovino de recién nacido ("New born serum")
Nek2: "NIMA related kinase 2"
NP-40: "Nonidet-P40"
PBS: "Phosphate Buffer Saline"
PCM: material pericentriolar ("Pericentriolar material")
PEG: polietilenglicol ("Polyethylene Glycol")
PIPES: "1,4-Piperazinediethanesulfonic acid, Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)"
Plk: "Polo-like kinase"
PP1: "Protein phosphatase 1"
pRB: proteína del retinoblastoma
SDS: dodecilsulfato sódico ("Sodium dodecyl sulphate")
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS ("SDS-polyacrilamide gel electrophoresis")
siARN: "small interference ARN"
UV: Ultravioleta
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

El factor de transcripción c-Fos está implicado en la regulación de genes involucrados en una amplia diversidad de procesos celulares, tales como la proliferación, migración y diferenciación celular, supervivencia, muerte, respuesta a estrés y transformación oncogénica.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la identificación de nuevas dianas de interacción de la proteína c-Fos. El abordaje experimental utilizado ha permitido identificar la interacción entre c-Fos y CEP2/C-NAP1, estableciendo de este modo los siguientes objetivos:

- Caracterización de la interacción c-Fos-CEP2/C-NAP1 e identificación de los dominios de heterodimerización de ambas proteínas.
- Estudio de la localización subcelular de c-Fos y CEP2/C-NAP1.
- Identificación de los efectos funcionales de esta interacción sobre la actividad y la regulación de c-Fos.

CAPÍTULO I

Introducción

1. Factores de transcripción de la familia AP-1

1.1. Generalidades

Los factores de transcripción son un conjunto de proteínas implicadas en la regulación y coordinación de la transcripción génica. En eucariotas, la transcripción es un proceso complejo que requiere la acción concertada de numerosas proteínas, incluyendo factores de transcripción y proteínas asociadas. Estos complejos multiproteicos son activados por señales externas y/o internas, transmitiendo esta señal por interacción con regiones específicas del ADN denominadas elementos en *cis*. Estos elementos se localizan en las regiones reguladoras de los genes, y la unión de factores de transcripción a los mismos modula la expresión génica (Herdegen and Leah, 1998; Lee et al., 1987a). Los mecanismos moleculares que dictan el ensamblaje ordenado de estos complejos multiproteicos y su regulación son todavía una incógnita.

La familia de factores de transcripción AP-1 ("Activating Protein 1") fue descrita por primera vez por el grupo de Robert Tjian en 1987 como una familia de factores de transcripción diméricos (Lee et al., 1987a; Lee et al., 1987b). Su descubrimiento se produjo cuando, estudiando los mecanismos reguladores de la transcripción en eucariotas, se aisló un complejo proteico que unía específicamente una secuencia de ADN de doble cadena que se encontraba en ciertos promotores, como el del gen de la metalotioneína humana IIa, o en elementos activadores del virus "simian virus 40" (Angel et al., 1987). En estos estudios se observó que los sitios de unión de AP-1 denominados elementos TRE ("TPA responsive elements"), mediaban la activación transcripcional en respuesta a agentes promotores de tumores (TPA, "Tumor Promoting Agents"). Estos hallazgos permitieron asignar a AP-1 un papel en el control de la transcripción, basal o inducible, de ciertos genes. Poco después, c-Jun y Fos se identificaron como componentes del

complejo AP-1 en una purificación en cromatografía de afinidad, usando el homólogo en *Drosophila* de AP-1 (Perkins et al., 1988).

Las proteínas AP-1 se unen a secuencias de ADN de doble cadena, siendo capaces tanto de activar como de reprimir la transcripción génica. Para este cometido, este grupo de proteínas tienen como requisito formar dímeros, tanto homo- como heterodímeros entre componentes de la familia AP-1 (Ver Apartado 2.1.1 en este Capítulo), aunque también heterodímeros entre AP-1 y proteínas de otras familias (Ver Apartado 2.1.2 en este Capítulo). Esta capacidad de formar heterodímeros entre proteínas con diferente especificidad de unión a ADN, incrementa enormemente el abanico de secuencias de ADN que pueden ser diana de las proteínas AP-1. Las principales regiones de unión a ADN de los diferentes dímeros AP-1 son los elementos de respuesta TRE (5'-TGAG/CTCA-3') y CRE ("cAMP Response Element", 5'-TGACGTCA-3'). La dimerización también permite el establecimiento de complejos reguladores más grandes, que pueden interactuar con otras proteínas requeridas para la transcripción (Martin et al., 1996) (Ver Apartado 2.1.3 en este Capítulo).

Estructura

Los factores de transcripción de la familia AP-1 presentan, como característica común, un dominio denominado **b-ZIP** (Glover and Harrison, 1995). Otros factores de transcripción con dominio b-ZIP son: CNC ("cap'n'collar"), C/EBP ("CCAAT-Enhancer Binding Protein") y PAR ("proline- and acidic-rich region") (Cowell, 2002; Motohashi et al., 2002; Zahnow, 2002), etc.

El dominio b-ZIP consta de una región básica de unión a ADN ("basic domain") y un motivo hidrofóbico responsable de la

dimerización, denominado cremallera de leucinas (“leucine zipper”=LZ). El motivo LZ consiste en dos α -hélices constituidas por repeticiones de residuos de leucina cada 7 aminoácidos, formando una banda hidrofóbica rica en leucinas en la cara interna de la hélice y aminoácidos cargados (principalmente ácido glutámico, glutamina, lisina y arginina) en la cara externa (Rasmussen et al., 1991; Vinson et al., 2002). Las α -hélices anfipáticas de la cremallera de leucinas se enrollan una alrededor de la otra, con 3.5 residuos por vuelta, donde las leucinas de una hélice interaccionan con las leucinas de la otra hélice, de manera que el patrón se repite íntegramente cada 7 residuos (Landschulz et al., 1988) (ver Fig. I.1).

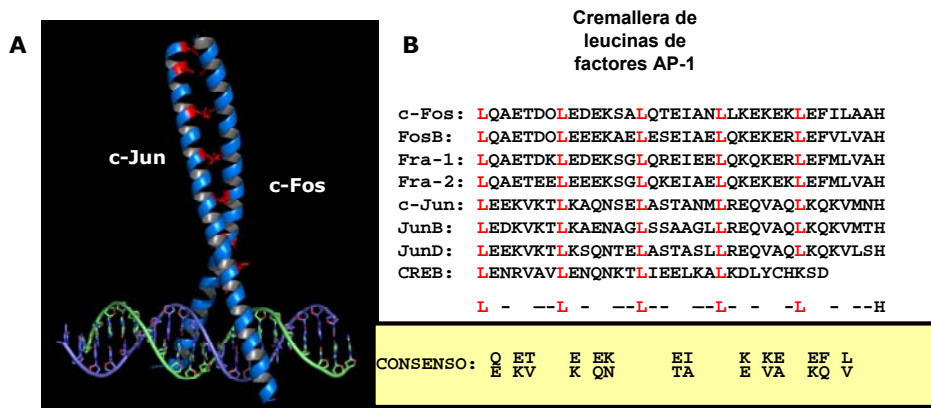


Figura I.1: Dominio b-ZIP de las proteínas AP-1. A) Dominio b-ZIP de los miembros Jun y Fos, que comprende una región hidrofóbica de interacción entre las proteínas, motivo denominado cremallera de leucinas, con los residuos de leucina coloreados en rojo y una región básica que interacciona con el surco mayor de la molécula de ADN (en verde y morado). **B)** Alineamiento de los motivos en cremallera de leucinas de algunos de los miembros de la familia AP-1. En rojo se resaltan las leucinas del motivo cremallera de leucinas. En el recuadro se muestran los aminoácidos consenso comunes dentro del motivo.

Las α -hélices que forman el b-ZIP se organizan en forma de superhélice formando un motivo estructural llamado “coiled-coil” (hélices super enrolladas) (Rasmussen et al., 1991). El motivo tipo

“coiled-coil” se describió por primera vez en 1953 como un elemento estructural de proteínas fibrosas, tales como la queratina, miosina y fibrinógeno (revisado en (Lupas, 1996)), y también de filamentos intermedios. Este motivo puede contener hasta siete hélices (Liu et al., 2006b), aunque los dímeros y los trímeros son lo más comunes. Está ampliamente descrito que el motivo “coiled-coil” es un elemento implicado en la oligomerización de múltiples proteínas y es altamente versátil permitiendo una selectividad de unión, donde pequeños cambios en la secuencia producen grandes cambios en la estructura (Burkhard et al., 2001). Así, a pesar de la alta homología de secuencia de los dominios b-ZIPs, existe gran versatilidad y afinidad por proteínas concretas (Grigoryan and Keating, 2008; Newman and Keating, 2003). El ejemplo más claro lo constituyen los factores de transcripción con motivo b-ZIP, ya descritos anteriormente, y bHLH/ZIP, que incluye a c-Myc y Max, cuya dimerización es altamente selectiva y está mediada exclusivamente por uniones tipo “coiled-coil” (Lavigne et al., 1998).

Miembros de la familia AP-1

La familia AP-1 se divide en dos subfamilias denominadas Fos y Jun (Milde-Langosch, 2005), aunque algunos autores también incluyen a las subfamilias Maf y ATF (Eferl and Wagner, 2003; Shaulian and Karin, 2002). Los criterios de clasificación actuales se basan en las diferentes propiedades de unión a ADN y de dimerización de las cuatro subfamilias que se describen a continuación:

1) Familia Fos: incluye las proteínas c-Fos, FosB, sus variantes más cortas FosB2 y deltaFosB, Fra1 y Fra2 (“Fos-related antigen”) y la variante viral oncogénica v-Fos. FosB y c-Fos presentan un dominio de transactivación en C-terminal, pero Fra-1, Fra-2, FosB2 y deltaFosB carecen de esta región (Milde-Langosch, 2005). Las proteínas Fos no

forman homodímeros estables, pero se pueden unir al ADN formando heterodímeros con proteínas de la subfamilia Jun y con proteínas de otras subfamilias AP-1.

2) Familia Jun: incluye las proteínas c-Jun, JunB, JunD y la variante viral oncogénica v-Jun. El oncogen *v-jun* se identificó en 1987 por Y.Maki en un retrovirus aislado de sarcoma de pollo ("avian sarcoma virus 17") (Maki et al., 1987). Poco después se describió su homólogo celular *c-jun* (Bohmann et al., 1987). En contraste a los miembros de la familia Fos, las proteínas Jun pueden formar homodímeros estables entre sí, además de heterodímeros con otros miembros AP-1 o con otras proteínas.

3) Familia Maf ("Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma"): ya que esta familia presenta variabilidad en algunos aminoácidos de b-ZIP, que están altamente conservados en todas las proteínas AP-1, algunos autores no la incluyen dentro de la familia AP-1 (Dlakic et al., 2001). Sin embargo, otros autores sí la incluyen dentro de la familia AP-1 (Eferl and Wagner, 2003). Las proteínas Maf se dividen en la subfamilia Maf grandes (c-Maf, MafB, MafA), y la subfamilia Maf pequeñas, que a diferencia de las grandes, carecen del dominio de activación N-terminal (MafG/F/K y NRL, "Neural Retina Leucine-zipper") (Motohashi et al., 1998). Estas proteínas pueden heterodimerizar con miembros de la familia Fos y Jun (Kerppola and Curran, 1994) y algunos de sus miembros son capaces de homodimerizar.

4) Familia ATF/CREB ("Activating Transcription Factor/ Cyclic AMP Response element Binding protein"): incluye a las proteínas ATF1 (también conocida como TREB36), CREB/CREM, CREB314 (también conocida como Aibzip o Atce1), CREB-H, ATF2 (también denominada CRE-BP1), ATF3, ATF4, ATF6, ATF7, B-ATF y ATFX (también conocida como ATF5) (Hai and Hartman, 2001). Pueden formar homodímeros y

heterodímeros (Hai and Curran, 1991). Se unen preferentemente a la secuencia CRE (sitio de respuesta a AMPc).

Función

Los factores de transcripción de la familia AP-1 están implicados en multitud de procesos celulares debido a la capacidad de unirse a promotores de un amplio espectro de genes, de un modo dependiente de la secuencia. La función general de los factores de transcripción de la familia AP-1 es la regulación de la transcripción de genes diana en respuesta a diferentes estímulos, entre los que se incluyen factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, radiación ultravioleta (UV) y una amplia variedad de factores físicos y químicos que producen estrés (revisado en (Shaulian and Karin, 2002)).

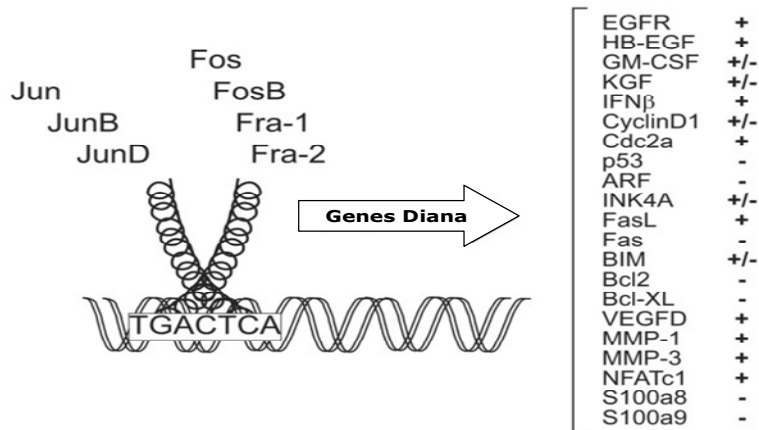


Figura I.2: La familia de factores de transcripción AP-1. Familia de factores de transcripción AP-1 compuesta por las subfamilias Fos y Jun. Las proteínas Jun forman homodímeros y heterodímeros con las proteínas Fos. Las diferentes combinaciones de los dímeros reconocen secuencias diferentes en los promotores de los genes diana. En la figura se muestra la secuencia consenso TGACTCA del elemento de respuesta TPA. Entre los genes diana de AP-1 se encuentran reguladores importantes de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Los genes pueden ser regulados positivamente (+), regulados negativamente (-) y regulados positiva y negativamente (+/-), dependiendo de la composición del dímero.

Las proteínas AP-1, debido a la amplia gama de estímulos a los que responden y a su versatilidad de unión al ADN, son capaces de regular multitud de procesos celulares, tales como la proliferación, migración y diferenciación celular, supervivencia, muerte, respuesta a estrés y transformación oncogénica (Eferl and Wagner, 2003; Vesely et al., 2009) (Fig. I.2).

La implicación de las proteínas AP-1 en procesos de proliferación y muerte celular es debida, en parte, a su capacidad de modular la expresión y función de reguladores clave de estos procesos, tales como ciclina D1, p53, p21, p19 y p16 (Ameyar et al., 2003; Shaulian and Karin, 2002). c-Jun es un regulador positivo de la proliferación celular mientras que JunB parece tener una acción dual en el ciclo celular, ya que por una parte es un inhibidor de la proliferación celular, inductor de la senescencia y supresor tumoral, y por otro lado también es promotor de la división celular vía estimulación de la expresión de la ciclina A2 en fase S (Deng and Karin, 1993; Piechaczyk and Farras, 2008).

El papel de los miembros AP-1 en la apoptosis es dual, ya que pueden promover o inhibir la apoptosis de forma dependiente de tejido y de estadio de desarrollo (Shaulian and Karin, 2002). Esta dualidad puede explicarse por la composición diferente de los dímeros AP-1, modificaciones post-traduccionales e interacciones con otros factores, por lo que no es de extrañar que presente funciones opuestas según el ambiente celular. Algunos ejemplos que documentan el papel proapoptótico y antiapoptótico de AP-1 son:

Proapoptótico: experimentos realizados en neuronas del hipocampo que son tratadas con ácido kaínico, presentan una expresión continua de c-Fos, lo que provoca la entrada de estas células en apoptosis (Smeyne et al., 1993). También se ha observado un papel proapoptótico de las proteínas Jun en respuesta a diferentes condiciones de estrés,

como puede ser la exposición de las células a agentes alquilantes o a radiación UV. La sobreexpresión de c-Jun es suficiente para desencadenar apoptosis en fibroblastos de ratón (células NIH-3T3), que resulta ser dependiente de los dominios b-ZIP y de la transactivación de c-Jun (Bossy-Wetzel et al., 1997). Del mismo modo, varios trabajos han implicado a c-Jun en muerte neuronal inducida por privación del NGF ("Nerve Growth Factor") (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Palmada et al., 2002). Estos ejemplos muestran que la activación de Jun puede llevar a la activación de genes proapoptóticos en ciertas condiciones.

Antiapoptótico: embriones deficientes en el gen *c-jun* mueren durante la gestación presentando defectos en la hepatogénesis. Además, la inactivación de *c-jun* en hígado adulto afecta a la progresión del ciclo celular de los hepatocitos, sugiriendo que c-Jun puede regular la respuesta a supervivencia ligada al estado de diferenciación de la célula (Ameyar et al., 2003). En la misma línea, trabajos realizados en un modelo de desarrollo inducido de tumores en hígado han demostrado que c-Jun previene la apoptosis contrarrestando la actividad proapoptótica de p53 (Eferl and Wagner, 2003).

Por otro lado, las proteínas MafA, MafB, c-Maf, y NRL actúan como reguladores clave en la diferenciación terminal de tejidos como hueso, cerebro, riñón, páncreas, retina y sangre (Yang and Cvekl, 2007).

La función de los componentes de AP-1 en la progresión de múltiples procesos oncogénicos está ampliamente descrita. Se podría explicar por su papel en la regulación de genes implicados en la proliferación celular (ciclinas e inhibidores del ciclo celular, p53, etc.), cuya desregulación promueve la aparición de cánceres. No obstante, la capacidad de AP-1 para promover la apoptosis en un tipo celular e inhibir la apoptosis en otro, podría explicar que juegue un papel tanto

oncogénico como antioncogénico dependiendo del tipo celular, estadio de diferenciación, estadio del tumor y de su fondo genético. Así, los miembros de la familia Fos han sido implicados en multitud de cánceres (cáncer de mama, osteosarcomas, cáncer de ovario, de pulmón, melanomas, etc.), estando frecuentemente sobreexpresados en células tumorales. Por ejemplo, Fra-1 parece estar implicado en cáncer, ya que su sobreexpresión aumenta la motilidad e invasión de las células malignas de cáncer de mama y colorrectal, mientras que, por otro lado, inhibe la tumorigenicidad en células de carcinoma cervical (revisado en (Milde-Langosch, 2005)).

1.2. c-Fos

Un proto-oncogen es un gen cuyo producto regula positivamente el ciclo celular promoviendo el crecimiento y la división celular. Ejemplos de proto-oncogenes incluyen la familia Ras, c-myc, ciclinas (D,A,E,B), etc. (Prober and Edgar, 2001). Si se produce la mutación o expresión errónea de un proto-oncogen y este promueve el desarrollo de un cáncer, esta proteína pasa a denominarse oncogen. Los oncogenes confieren un fenotipo canceroso dominante.

El descubrimiento del gen *fos* se produjo en 1982, cuando el gen viral *fos* (*v-fos*) fue aislado como un oncogen de osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins (su nombre deriva de FBJ osteo-sarcoma) (Curran and Teich, 1982). Un año después, fue descrita su variante celular, *c-fos* (Curran et al., 1983). En 1984, Curran y colaboradores caracterizaron a las proteínas Fos como proteínas nucleares con capacidad de unión a ADN y con capacidad de activación génica (Curran et al., 1984; Sambucetti and Curran, 1986; Setoyama et al., 1986). Posteriormente se elucidaron las relaciones funcionales entre c-Fos y c-Jun/AP-1 (Rauscher et al., 1988a;

Rauscher et al., 1988b; Rauscher et al., 1988c). El ADNc completo de *c-fos* de rata se aisló en 1987 y mostró una elevada homología con los genes de humano y de ratón (Cohen and Curran, 1989; Curran et al., 1987; Van Beveren et al., 1987).

El gen humano de *c-fos* se encuentra localizado en el cromosoma 14q21-q31 (Barker et al., 1984), con una estructura de 4 exones y 3 intrones, muy conservada entre especies. El gen abarca alrededor de 9 Kb y codifica una proteína de 380 aminoácidos cuyo tamaño oscila entre 55-62 KDa (Herdegen and Leah, 1998). El gen de *c-fos* se expresa constitutivamente en diferentes tejidos embrionarios y adultos. En la mayoría de tipos celulares los niveles de expresión de *fos* son apenas detectables, sin embargo, en ciertos tejidos, su expresión es constitutivamente alta (células amnióticas, saco vitelino, hígado fetal (semi-gestación), médula ósea postnatal y piel humana) (Ferrara et al., 2003). También se encuentra expresado en un gran número de células tumorales entre las que se incluyen algunos osteosarcomas (Herdegen and Waetzig, 2001), linfomas de células B (Kanaitzuka et al., 1987), gliomas (Rubio et al., 1996), etc.

El ratón deficiente en el gen *c-fos*, aunque es viable, presenta retraso en el crecimiento, desarrolla osteopetrosis con deficiencias en la remodelación de la médula ósea y en la aparición de la dentición, tiene alterada la sensibilidad a la apoptosis en los fibroblastos y tiene incrementada la excitabilidad y la muerte neuronal (Herdegen and Leah, 1998; Johnson et al., 1992; Wang et al., 1992).

Los genes *Fos* y *Jun* son genes de respuesta temprana (IEGs, "Immediately Early Genes"). Este término era originalmente exclusivo de genes virales pero con el descubrimiento de los homólogos eucarióticos de los oncogenes retrovirales, estos se denominaron IEGs celulares (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, etc). Los IEGs se activan en respuesta a cascadas de

señalización intracelular (múltiples estímulos fisiopatológicos), activándose de forma rápida y transitoria (Herdegen and Leah, 1998; Sng et al., 2004). Generalmente, la cinética de respuesta de Fos a un estímulo agudo es transitoria, con un pico del ARNm de *c-fos* aproximadamente a los 30 min y de la proteína c-Fos entre 90-120 min. Los niveles proteicos decrecen rápidamente, ya que la proteína es altamente inestable y se degrada por proteasoma (Kovacs, 2008). La expresión de *c-fos* no está regulada por el ciclo celular, sino que se expresa constitutivamente, con unos niveles apenas detectables a lo largo del ciclo celular. Puede ser inducido por factores de crecimiento en cualquier fase del ciclo, exceptuando la mitosis, así como en células en quiescencia (Bravo et al., 1986).

En la Figura I.3 se esquematizan los dominios estructurales y funcionales de la proteína c-Fos, que incluyen:

- a) Un dominio **b-ZIP**, responsable de la unión a ADN y heterodimerización.
- b) Cinco **módulos de activación** denominados **FAM** (FAM1-FAM5, "Fos Activating Modules").
- c) Tres regiones **HOB** ("HOmology Box") (Sutherland et al., 1992), **HOB1Nt**, **HOB1Ct** y **HOB2**, que actúan cooperativamente para estimular la transcripción de genes diana. HOB1 no existe en FosB y Fra-1, y esto podría explicar las diferencias en los potenciales de transactivación entre proteínas de la misma familia (Bannister et al., 1994).
- d) **Dominio inhibidor (ID1)** en la región N-terminal, entre las posiciones 124 y 128, conservado también en FosB. ID1 inhibe a HOB1Nt (Brown et al., 1995).

- e) Tres motivos **PEST** (PEST1, PEST2, y PEST3), dominios desestabilizadores implicados en la degradación. Son regiones ricas en prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina y treonina.

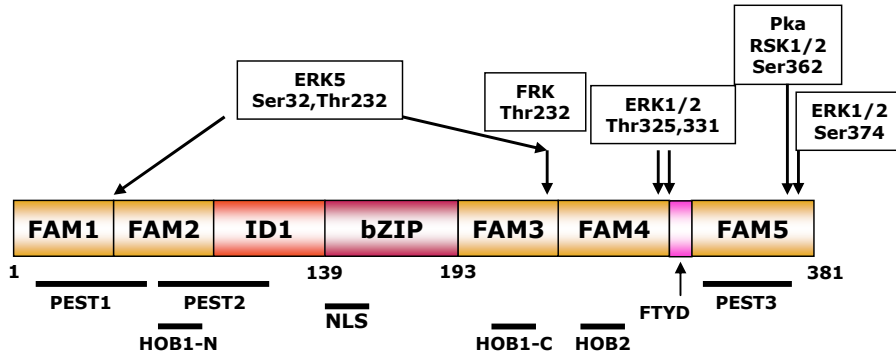


Figura I.3: Dominios funcionales y estructurales de c-Fos. En el esquema se representan los dominios presentes en la proteína de c-Fos: PEST, motivos determinantes de inestabilidad; FAM y HOB, módulos de activación; b-ZIP, región básica de unión a ADN+motivo cremallera de leucinas de dimerización; ID1, dominio inhibidor que regula los dominios de activación que presentan el motivo HOB1; FTYD, sitio de unión de ERK. Además, se indican residuos diana de algunas quinasas. NLS: secuencia de localización nuclear.

2. Regulación de la actividad AP-1

La regulación de la actividad AP-1 es compleja y crítica para el destino de la célula. Esta regulación se produce a varios niveles (Eferl and Wagner, 2003):

a) Regulación transcripcional: El promotor de *c-fos* está gobernado por multitud de elementos *cis* en los que convergen múltiples rutas de señalización en respuesta a estímulos externos, por lo que su regulación transcripcional está finamente estructurada. Un estímulo extracelular no sólo induce la expresión del gen mediante un solo elemento *cis*, sino que produce una cascada de transducción de señal actuando en diferentes

sitios del promotor. Por ejemplo, NGF (“Nerve Growth Factor”) activa los sitios CRE, FAP y SRE en células PC12 (Ginty et al., 1994). Del mismo modo, en respuesta a AMPc, se activan al menos cuatro sitios consenso del promotor de *c-fos* (Fisch et al., 1989). Los elementos responsables de la regulación transcripcional de *c-fos* se encuentran situados en la región 5’, no traducida del gen. Los más importantes son, desde 5’ a 3’ (He and Ping, 2009) (Fig I.4):

- 1) **Elemento SIE (“Sis-Inducible Element”)**: estimulado por señales extracelulares como los factores de crecimiento PDGF (“Platelet-Derived Growth Factor”) y CSF-1 (“Colony Stimulating Factor”). Estos factores transducen la señal a través de la ruta JAKs-STAT, donde STAT (“Signal Transducer and Activator of Transcription”) es fosforilado y activado por JAK (“Janus Kinase”), causando la transcripción del gen *c-fos*.
- 2) **Elemento SRE (“Serum Response Element”)**: media la inducción de *c-fos* por ésteres de forbol, factores de crecimiento (EGF, PDGF e insulina) y radiación UV de manera dependiente e independiente de PKC (“Protein Kinase C”). Este elemento es a su vez responsable de los niveles basales de expresión en células no estimuladas. Presenta una secuencia conocida como caja CArG a la cual se puede unir c-Fos, independientemente de la dimerización Fos:Jun y de la unión a ADN, reprimiendo la transcripción.
- 3) **Elemento FAP1 (“Fos AP-1-site”)**: presenta un sitio homólogo a AP-1, también llamado TRE (“TPA Response Element”). Pueden unirse miembros de AP-1 y CREB. Los dímeros Jun-Jun y Fos-Jun tienen tendencia a unirse al sitio FAP-1, participando en la regulación negativa de *c-fos* (“feedback”).
- 4) **Elemento CRE (“cAMP-Responsive Element”)**: su inducción responde a la presencia de neurotransmisores y hormonas

polipeptídicas que señalizan por la vía del AMPc. Es reconocido principalmente por la proteína CREB y por heterodímeros tipo ATF/Jun y Fos/Jun (aunque estos últimos tienen mayor afinidad por el sitio consenso AP-1).

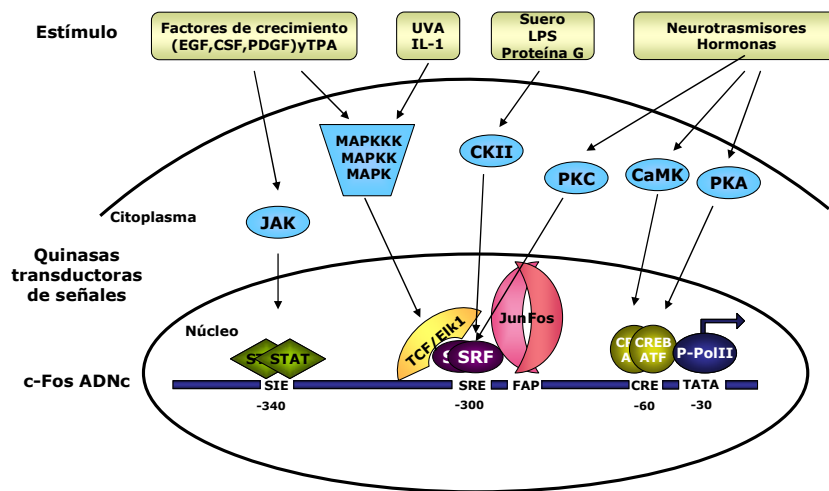


Figura I.4: Esquema del promotor de c-Fos y las rutas implicadas en su regulación. Estímulos externos promueven cascadas de señalización que actúan en el núcleo sobre el promotor de c-Fos. El heterodímero c-Fos:c-Jun participa en su propia regulación transcripcional.

Además de la regulación de la síntesis de su ARNm, existe una regulación de la estabilidad y de la localización del mismo. Existe una región en 3'-UTR ("untranslated") encargada de la localización del transcrito de *c-fos* en los polisomas unidos al citoesqueleto y en el citoplasma perinuclear, asegurando la importación eficiente al núcleo de la proteína sintetizada. Aunque en 3'-UTR también se encuentra la región rica en AU implicada en la estabilidad del mensajero, ambas regiones actúan independientemente (Dalglish et al., 2001).

Un mecanismo adicional de regulación del ARNm de *c-fos* es la regulación por micro-ARN. Un micro-ARN es un ARN pequeño,

endógeno, no codificante, que reprime la función del ARNm diana en animales. Lee y colaboradores observaron que, en condiciones de estrés salino en hipocampo murino, se producía una sobreexpresión del microARN miR-7b, que interacciona con la región 3'-UTR del ARNm de *c-fos*, inhibiendo su traducción *in vitro*. Aunque no observan un efecto en los niveles del ARNm, si observan disminución de la proteína c-Fos (Lee et al., 2006)

b) Regulación post-traduccional: se refiere al control de los niveles de proteína activa, ya sean eventos reversibles como la fosforilación o irreversibles, como por ejemplo la degradación por proteasoma.

1) Modificaciones post-traduccionales: la fosforilación de las proteínas AP-1 en respuesta a estímulos extracelulares es la modificación más común e implica una activación rápida e independiente de la síntesis *de novo*. c-Fos puede ser fosforilado por diversas quinasas: por MAPK ("Mitogen-activated protein (MAP) kinases") como ERK1/2 ("extracellular signal-regulated kinase 1/2"), JNKs, p38, ERK7, ERK5, FRKs ("Fos related kinase") (Abe et al., 1999; Deng and Karin, 1994; Monje et al., 2003; Musti et al., 1997; Tanos et al., 2005; Terasawa et al., 2003); quinasas C y A; Cdc2 (Abate et al., 1991); entre otras. Por ejemplo, en respuesta a factores de crecimiento, c-Fos es fosforilado en la región C-terminal en el residuo de serina Ser362 por RSK1/2 y en la Ser374 por ERK1/2, estabilizando la proteína (Okazaki and Sagata, 1995). Esto promueve la unión de ERK1/2 al dominio DEF (FTYP), fosforilando las treoninas 325 y 331 de c-Fos, llevando a su activación transcripcional (Murphy et al., 2002). ERK5 fosforila a c-Fos en su treonina 232 inhibiendo la exportación al núcleo de c-Fos,

y además lo fosforila en la serina 32 rompiendo la unión de c-Fos con UBR1 (“ubiquitin protein ligase E3 component recognin 1”), la cual ubiquitina a c-Fos para su degradación acelerada (Sasaki et al., 2006). Otra modificación que se ha descrito en los últimos años es la SUMOilación de c-Fos por parte de SUMO1, SUMO2 y SUMO3 y la des-SUMOilación por SENP2. La SUMOilación se produce preferentemente cuando c-Fos forma un heterodímero con c-Jun, el cual a su vez es también SUMOilado, inhibiendo la actividad transcripcional de AP-1, lo cual parece debido a una distribución intranuclear específica de c-Fos. La SUMOilación aumenta por estímulos mitóticos y es inhibida por fosforilación de c-Fos en la Thr232 (Bossis et al., 2005; Jakobs et al., 2007).

2) Degradación proteasomal: c-Fos es una proteína inestable que es degradada por el proteasoma (Acquaviva et al., 2001; Basbous et al., 2008; Ferrara et al., 2003; Salvat et al., 1998). La gran mayoría de c-Fos es degradado por el proteasoma independientemente de ubiquitinación, tanto para c-Fos inducido durante la fase G0/G1 como c-Fos constitutivamente expresado en células creciendo asincrónicamente (Gomard et al., 2008; Jariel-Encontre et al., 2008). Sin embargo, también existe una degradación por proteasoma que requiere ubiquitinación (Sasaki et al., 2006).

c) Interacción con otras proteínas: la actividad AP-1 está modulada por la expresión diferencial de sus componentes individuales, lo cual determina la composición de los dímeros. El número de proteínas complementarias que interactúan con componentes AP-1 y que regulan su actividad transcripcional es enorme y está continuamente creciendo.

2.1. Regulación de la actividad AP-1 por interacciones proteína-proteína

La dimerización dentro de la familia AP-1 es un requisito indispensable para su unión con el ADN. Las diferentes estructuras de las cremalleras de leucina y regiones flanqueantes permiten la formación de unos y no otros dímeros y la unión a unas regiones u otras del ADN. Así, la formación de dímeros implica propiedades diferentes respecto a su capacidad de unión a ADN, estabilidad y potencial de transactivación. Solo la unión de las proteínas de la familia Fos y Jun produce hasta 18 homo y heterodímeros diferentes, que presentan diferente especificidad de unión a ADN y localización tisular (Chinenov and Kerppola, 2001). Por ejemplo, los heterodímeros c-Fos:c-Jun son más estables y tienen una capacidad de unión a ADN mayor que los homodímeros c-Jun:c-Jun. Además, los homodímeros c-Jun tienen una alta afinidad por el sitio CRE, mientras que el heterodímero c-Jun:c-Fos se une preferentemente al sitio AP-1 (Halazonetis et al., 1988; Ryseck and Bravo, 1991).

Las interacciones entre proteínas dentro de la célula están determinadas, entre otros aspectos, por la especificidad derivada de la complementariedad, del plegamiento y de la química que determina la energía libre de unión, aunque la localización subcelular también juega un papel importante (Nooren and Thornton, 2003). Así, por ejemplo, los monómeros de c-Fos pueden sufrir un transporte activo entre el núcleo y el citoplasma pero la interacción c-Jun:c-Fos produce una retención de c-Fos en el núcleo debida a la asociación física vía el LZ (Malnou et al., 2007). Este fenómeno también se ha descrito para ATF2, cuya retención en el núcleo es debida a su interacción con c-Jun (Liu et al., 2006a).

A continuación analizaremos con más detalle las interacciones que implican directamente a las proteínas AP-1.

2.1.1. Interacciones entre proteínas AP-1

El tipo y número de dímeros Fos:Jun presentes en la célula varía tanto en función del tipo celular como de la fase del ciclo celular en que se encuentre. La diversidad en la formación de complejos homo y heterodiméricos entre miembros de las familias AP-1 afecta a la expresión de genes de respuesta temprana y tardía, dependiendo del tipo celular y de la activación por diferentes estímulos. Algunos ejemplos son:

a) En osteoblastos no diferenciados encontramos expresados todos los miembros de las familias Fos y Jun, pero durante la diferenciación, las proteínas predominantes son JunD, Fra1 y Fra2 (Chinenov and Kerppola, 2001).

b) En fibroblastos quiescentes se encuentran principalmente complejos entre c-Jun y JunD, mientras que cuando son estimulados con suero las especies mayoritarias son heterodímeros formados por miembros de la familia Fos (c-Fos, FosB y Fra1) con c-Jun y JunB (Chinenov and Kerppola, 2001).

c) Durante la diferenciación de queratinocitos tienen lugar una sucesión de complejos diferentes de forma muy regulada (Chinenov and Kerppola, 2001).

La heterodimerización entre los miembros AP-1 es altamente selectiva. Así, por ejemplo, c-Fos no es capaz de asociarse con CREB, CREM o ATF-1, pero sí es capaz de interactuar con ATF4 y ATF2 (Newman and Keating, 2003). La formación de unos heterodímeros

determinados afecta a la afinidad de estos dímeros por determinadas secuencias de ADN. Por ejemplo, la formación de heterodímeros entre ATF y las proteínas Fos-Jun dirige estos complejos hacia sitios tipo CRE, ya que ATF2 y ATF3 unen preferentemente al sitio CRE. Por otro lado, c-Jun es capaz de dimerizar con JunD, pero esta dimerización disminuye sustancialmente la capacidad de unión al sitio AP-1. Otro ejemplo es el de los heterodímeros Maf y miembros de Fos:Jun, los cuales son capaces de unir sitios AP-1 y sitios TGCTgaC, mientras que los homodímeros Maf sólo se unen a los sitios MARE I/II. Puesto que Fos, Jun y ATF se activan por diferentes familias de protein-quinasas (JNK y p38 SAPK), esta heterodimerización permite integrar las señales provenientes de diferentes rutas (van Dam and Castellazzi, 2001).

2.1.2. Heterodímeros entre miembros de AP-1 y otras proteínas

La interacción entre miembros de la familia AP-1 con otros factores de transcripción u otras proteínas, amplía en gran medida el rango de actuación en la regulación de la célula, además de potenciar el efecto biológico y diversificar la especificidad de unión.

Por ejemplo, miembros de la familia Jun:Fos interactúan con varios miembros de las familias C/EBP y CNC (Chinenov and Kerppola, 2001). Estas interacciones pueden tener efectos muy diferentes.

Por un lado, pueden presentar un efecto represor sobre la actividad AP-1, como es el caso de la interacción, descrita por nuestro grupo, de c-Fos con la lamina A/C, un filamento intermedio del tipo V componente de la envoltura nuclear. La lamina A/C secuestra a c-Fos en el anillo perinuclear, disminuyendo la actividad AP-1 y la proliferación celular (Ivorra et al., 2006). La interacción entre c-Fos y la lamina A/C es un proceso reversible controlado por estímulos mitogénicos a través de la señalización dependiente de ERK1/2 (Gonzalez et al., 2008; Ivorra et al.,

2006). Otro ejemplo es el del supresor de tumores, menina, el cual interacciona con el dominio de activación de la transcripción de JunD inhibiendo la actividad transcripcional de este (Gobl et al., 1999).

Por otro lado, interacciones proteína-proteína pueden activar la transcripción de los miembros AP-1. Así, GLI, el mayor activador de la transcripción de la señalización por HH (“Hedgehog”), interacciona con c-Jun fosforilado activando la transcripción de este (Laner-Plamberger et al., 2009).

La unión de AP-1 con factores de transcripción de las familias NFAT, Ets, Smad y las bHLH (hélice-lazo-hélice) puede activar o reprimir la transcripción. Su unión a los promotores, en conjunción con las proteínas de las familias Fos-Jun, permite la unión a elementos reguladores adyacentes a los sitios AP-1 (Chinenov and Kerppola, 2001).

Hay interacciones que pueden jugar un papel inhibitor sobre otros genes. Por ejemplo, c-Jun interacciona con el factor de diferenciación muscular MyoD e inhibe la transactivación del promotor de MyoD, provocando la supresión de la miogénesis. El efecto inhibitor de AP-1 sobre MyoD puede sufrir a su vez inhibición, de modo que la unión del receptor de estrógenos a c-Fos inhibe la regulación negativa de AP-1 sobre MyoD en músculo esquelético murino (Pedraza-Alva et al., 2009).

En otros casos, la interacción afecta a una tercera proteína, como es el caso de la interacción entre c-Jun y p53, que estimula la activación de enzimas reparadores MSH2 en respuesta a UV (Scherer et al., 2000), o la interacción de STAT-1 y c-Fos, cuya interacción es inducida por el Interferon-gamma (IFN-gamma) para la inducción del gen humano de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) en el epitelio de pulmón. Este complejo se une al sitio GAS (“gamma-activated site”) situado cerca del sitio AP-1, activando la transcripción del gen NOS2 (Xu et al., 2003).

c-Fos también es capaz de asociarse con miembros de otras familias de factores de transcripción, como es el caso de p65-Rel y NFATp (Kerppola, 1997), que regulan el promotor de la interleuquina 2 (IL-2). Además, la asociación de JunD con el factor de transcripción Oct-1 conlleva al reconocimiento y unión del elemento ARRE al promotor de IL-2 (Chinenov and Kerppola, 2001).

2.1.3. Complejos multiméricos

Finalmente, se pueden formar complejos de orden superior en los que se ven involucrados otros factores de transcripción, proteínas implicadas en la maquinaria transcripcional basal o incluso hormonas y vitaminas.

El dímero c-Fos:c-Jun forma un complejo ternario con el factor de transcripción SAF-1, actuando sinérgicamente en la regulación del gen MMP-1. El complejo ternario de c-Fos:c-Jun:SAF-1 presenta una actividad de unión a ADN mucho mayor que los homodímeros de SAF-1 y los heterodímeros c-Fos:c-Jun (Kumar et al., 2009).

Dentro de la maquinaria replicativa se pueden establecer uniones cooperativas entre las proteínas reguladoras de la transcripción y los elementos que unen al ADN (polimerasa, coactivadores, etc), como mecanismo de regulación génica. Estos complejos producen curvaturas en el ADN necesarias para la coordinación de diferentes factores de transcripción que unen regiones separadas. Por ejemplo, se ha descrito que Fra-1, a pesar de no poseer un dominio de transactivación, actúa como un activador positivo de la actividad del promotor de hINV (involucrina) en queratinocitos. El heterodímero Fra-1/JunB interacciona con las proteínas p300 y P/CAF, proteínas involucradas en la acetilación de histonas y de otras proteínas, además de servir como puente durante

el ensamblaje del complejo de transcripción, uniéndose a la región del promotor AP1-5/Sp-1. El heterodímero Fra-1/JunB, p300 y P/CAF formarían parte de un complejo multiproteico, donde podrían estar implicadas otras proteínas como junB, junD y Sp1, en la regulación de la expresión interaccionando con el elemento DRR ("Distal Regulatory Region") de AP1-5/Sp1 (Crish and Eckert, 2008). Otros coactivadores que interaccionan con c-Fos:c-Jun son CBP ("CREB-binding protein"), JAB1 ("Jun-Activation domain-Binding protein 1"), y α -NAC ("Nascent polypeptide associated complex And Coactivator alpha") (St-Arnaud and Quelo, 1998).

También encontramos descritas en la literatura uniones a hormonas. Por ejemplo los heterodímeros c-Fos:c-Jun pueden unir hormonas esteroideas (Marino et al., 2006), hormonas tiroideas y vitaminas A y D (Kuroki et al., 1995). En la mayoría de los casos, esta interacción impide la asociación tanto del complejo ligando-receptor como de AP-1 a su elemento diana. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides (GCR) interacciona directamente con c-Jun:c-Fos inhibiendo la actividad AP-1. Por otro lado, tanto c-Jun como c-Fos son represores potentes de la actividad del GCR por interacción proteína-proteína (Yang-Yen et al., 1990).

3. El centrosoma

Han pasado más de 120 años desde el descubrimiento del centrosoma (Flemming, 1875; Van Beveren, 1876). Fue Theodor Boveri quien acuñó el nombre de centrosoma y lo definió en 1887 como un orgánulo especializado en la división celular (Boveri, 1887). El centrosoma se encuentra yuxtapuesto al núcleo durante la interfase. En la transición G2/M, sufre una reorganización para convertirse en el

centro organizador del huso mitótico en los polos de la célula (Meraldi and Nigg, 2002).

El centrosoma es una estructura flexible que sufre cambios en su composición proteica dependiendo de las diferentes fases del ciclo celular. Continuamente aumenta el número de proteínas multifuncionales localizadas en el centrosoma, además de la lista de enfermedades, tales como cáncer, desórdenes neurológicos, etc. (Nigg and Raff, 2009), en las que proteínas centrosomales disfuncionales juegan un papel importante. A pesar de la importancia de este orgánulo para la biología celular, muchos aspectos importantes de su función, estructura y composición, están todavía por descubrir.

3.1. Generalidades

Estructura

El centrosoma es un orgánulo sin membrana, de 1 μm de diámetro, constituido por dos centriolos y el material pericentriolar (PCM). El PCM es una matriz electro-densa compuesta por más de 100 proteínas diferentes, como las proteínas tipo "coiled-coil" pericentrina y la familia de quinasas de anclaje 450 (AKAP450). Los centriolos tienen forma de cilindros compuestos por tripletes de nueve microtúbulos de $\sim 0.5 \mu\text{m}$ de longitud y $\sim 0.2 \mu\text{m}$ de diámetro (Bornens, 2002; Paintrand et al., 1992), polarizados a lo largo del eje proximo-distal. Los dos centriolos están dispuestos en ángulo recto, unidos por su zona proximal mediante proteínas tipo "coiled-coil" como Rootletin y C-NAP1 (Fry et al., 1998b; Yang et al., 2005). Recientemente, otras proteínas han sido también implicadas en la cohesión/separación del centrosoma, como CEP135 (Kim et al., 2008b), β -Catenina y CEP68 (Bahmanyar et al., 2008; Graser et al., 2007). El centrosoma post-mitótico presenta un centriolo maduro y un centriolo inmaduro, denominados centriolo madre e hijo,

respectivamente. El centriolo madre contiene uniones distales y subdistales, formadas por proteínas como la nineína, centriolina, EB1 y dinactina (Bornens, 2002; Doxsey, 2001; Mogensen et al., 2000; Yan et al., 2006), mientras que el centriolo hijo, formado durante el ciclo anterior, además de no presentar estas uniones, es más pequeño, aproximadamente el 80% de la longitud del centriolo madre (Chretien et al., 1997; Piel et al., 2000). Las características centriolares determinan la mayor parte de propiedades del centrosoma, como la estabilidad, la capacidad para dividirse y la polaridad, de ahí que la pérdida de los centriolos generalmente conduzca a la dispersión del PCM (Basto et al., 2006; Bettencourt-Dias et al., 2005; Bobinnec et al., 1998).

Los microtúbulos (MTs) están compuestos por dímeros de tubulina (alfa y beta) (Mitchison and Kirschner, 1984) y son nucleados (crecimiento del MT por adición de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina) por el complejo γ -TuRC (“ γ -tubulin ring complex”), el cual se sitúa en el PCM, cerca de las paredes proximales de los centriolos (Bornens, 2002). Al no presentar una membrana delimitante, la arquitectura del centrosoma se mantiene por uniones proteína-proteína, por lo que los MTs están anclados al centrosoma, y probablemente también al PCM, por las uniones subdistales del centriolo madre, con sus polos negativos localizados en el centrosoma y sus polos positivos extendiéndose hacia la periferia de la célula (Bornens, 2002). Los satélites pericentriolares, gránulos de proteínas PCM1, cuya localización pericentrosomal es dependiente de los MTs, y las proteínas dineína/dinactina, son esenciales para la capacidad de anclaje del centrosoma (Dammermann and Merdes, 2002; Kubo et al., 1999).

Función

El centrosoma es el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) de la célula, jugando un papel importante en diversas funciones

de la célula, incluyendo la formación del citoesqueleto, organización y formación del huso mitótico y citoquinesis. Además, también regula varios eventos importantes del ciclo celular como son la entrada en mitosis, inicio de la anafase, transición G1/S y respuesta a daño en el ADN. Recientemente, el centrosoma ha sido reconocido como una estación de anclaje, donde enzimas reguladoras, incluyendo quinasas y fosfatasa, así como muchos otros reguladores del ciclo celular, utilizan como plataforma para coordinar múltiples funciones específicas del ciclo celular (Nigg, 2002; Schatten, 2008). Más concretamente:

1) El centrosoma actúa como **centro organizador de MTs** de la célula animal (el citoesqueleto) (Bornens, 2002; Doxsey, 2001; Lange, 2002). El citoesqueleto tiene importancia para la forma, adherencia y motilidad de la célula, transporte intracelular, colocación de los orgánulos y polaridad celular (Doxsey, 2001).

2) Durante la mitosis, el centrosoma juega un papel importante en la **formación del huso bipolar mitótico**, vital para la correcta segregación de los cromosomas. Sin embargo, los centriolos no parecen ser esenciales para la mitosis (Abumuslimov et al., 1994; Berns and Richardson, 1977; Debec et al., 1977; Dietz, 1966; Khodjakov et al., 2000), ya que existen otros mecanismos independientes del centrosoma, como los observados en los huevos de algunas especies de animales y en plantas más complejas (Basto et al., 2006; Heald et al., 1996; Schmit, 2002). Por otro lado, se ha descrito que los centriolos son importantes para una correcta segregación cromosómica, donde los centriolos actuarían como un núcleo robusto, para que el PCM que es más débil se estructure, permitiendo que el huso mitótico resista las fuerzas producidas durante la mitosis (Abal et al., 2005).

3) Al centrosoma también se le ha involucrado en la **citoquinesis**, no sólo porque algunas proteínas centrosomales, tales como BBS6, Cep55, CP110 y centriolina, están directamente implicadas en procesos

citoquinéticos, sino también porque en células donde el centrosoma se ha eliminado por láser, el 50% de las células son incapaces de terminar la citoquinesis (Fabbro et al., 2005; Gromley et al., 2005; Khodjakov and Rieder, 2001; Kim et al., 2005; Tsang et al., 2006).

4) En células ciliadas, el centrosoma también actúa como **cuerpo básico de crecimiento de cilios y flagelos** (Tucker et al., 1979).

5) En los últimos años se le ha dado al centrosoma un papel de **plataforma donde se anclarían diversas proteínas reguladoras** (componentes de cascadas de señalización y actividades celulares). En este punto nos detendremos un poco más adelante por las implicaciones que tiene para esta Tesis Doctoral (Apartado 4 de este Capítulo).

El ciclo del centrosoma

Las células en interfase poseen un único centrosoma integrado por dos centriolos, los cuales se duplican una vez antes de la mitosis. Durante todas las fases del ciclo celular, la estructura y el número de centrosomas está finamente regulado (Doxsey, 2001; Hinchcliffe and Sluder, 2001; Meraldi et al., 2002). Esta regulación se produce mediante fosforilaciones reversibles, ya que se han encontrado en el centrosoma múltiples quinasas y fosfatasas con esta función, y proteólisis. Por ejemplo, la desregulación de la fosfatasa Cdc14A, la cual interacciona con los centrosomas en interfase, interrumpe su separación y la segregación cromosómica (Mailand et al., 2002; Meraldi et al., 2002). El ciclo del centrosoma incluye una serie de fases discretas: desacoplamiento o desorientación de los centriolos, duplicación, maduración y separación del centrosoma.

1. Desorientación de los centriolos: durante la anafase y antes de finalizar la citoquinesis, los centriolos sufren un proceso denominado desorientación que consiste en la pérdida de la

asociación ortogonal entre el centriolo madre e hijo (Piel et al., 2001). Este acontecimiento es independiente de la ciclina E/Cdk2 ("Cyclin dependent kinase 2") y de la salida de la mitosis, pero requiere al complejo promotor de la anafase (APC) y a la proteína separasa (Tsou and Stearns, 2006; Uhlmann et al., 2000).

2. Duplicación del centrosoma: la duplicación del centrosoma ocurre durante la fase S en centriolos desorientados, de manera dependiente de la ciclina E/Cdk2 o ciclina A (Hinchcliffe et al., 1999; Meraldi et al., 1999). Cada procentriolo crece ortogonalmente respecto a los pre-existentes, de manera conservativa (Kochanski and Borisy, 1990). La iniciación de la duplicación, tanto duplicación del ADN como del centrosoma, están acopladas a la fase tardía de G1, por activación del complejo ciclina E/Cdk2 (Hinchcliffe et al., 1999; Lacey et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Tarapore et al., 2002). El complejo ciclina E/Cdk2 está relacionado con la duplicación del centrosoma debido a sus potenciales dianas centrosomales nucleofosmina, la quinasa Mps1 y CP110 (Chen et al., 2002; Fisk and Winey, 2001; Okuda et al., 2000). Concretamente, la fosforilación de nucleofosmina por parte de ciclina E/Cdk2, produce su disociación de los centriolos, siendo el primer paso para la duplicación del centrosoma (Shimada and Komatsu, 2009). Hay que destacar que la ciclina E contiene un dominio de unión al centrosoma esencial para promover la entrada en fase S independientemente de Cdk2 (Matsumoto and Maller, 2004). Además, otras proteínas relacionadas con el ciclo celular también están implicadas en la duplicación del centrosoma, como son p53 y p21^{WAF1/CIP1}, un potente inhibidor de la ciclina E/Cdk2 (Harper, 1997; Minella et al., 2002; Mussman et al., 2000). También han sido implicadas en la duplicación del centrosoma proteínas como SAS-6

(Rodrigues-Martins et al., 2007), centrobina (Zou et al., 2005) y la quinasa Plk4 ("Polo like Kinase 4", también llamada Sak) (Bettencourt-Dias et al., 2005; Habedanck et al., 2005).

3. Maduración del centrosoma: esta fase ocurre poco antes de la mitosis. Durante este proceso, el PCM recluta proteínas adicionales (Palazzo et al., 2000), sobre todo γ -tubulina (Khodjakov and Rieder, 1999) y además aumenta la capacidad de nucleación del complejo γ -TuRCs. El centriolo inmaduro adquiere marcadores de maduración, como nineína y nenexin/Odf2 (Lange and Gull, 1995; Nakagawa et al., 2001; Piel et al., 2000). Los procentriolos maduran completamente tras dos mitosis sucesivas, cuando adquieren las uniones distales y sub-distales. Esta maduración está controlada por fosforilación de una quinasa del tipo "Polo like kinases" (Plks), por la Aurora quinasa tipo A (Blagden and Glover, 2003; Hannak et al., 2001; Lane and Nigg, 1996; Sunkel and Glover, 1988) y Nek2 ("NIMA related kinase 2"), un miembro de la familia de quinasas Nek/NIMA (Fry et al., 2000; Uto and Sagata, 2000). La ubiquitinación también podría desempeñar un papel importante en la maduración del centrosoma en mamíferos, ya que la proteína BRCA1 es capaz de ubiquitinar γ -tubulina *in vitro*, inhibiendo la capacidad de nucleación de MTs por el centrosoma (Sankaran et al., 2006). En el inicio de la mitosis, quinasas y fosfatasas también cooperan en la separación durante la transición entre la duplicación del centrosoma (Meraldi and Nigg, 2001) y su maduración (Nigg, 2001).

4. Segregación de los centrosomas: esta fase ocurre en el inicio de la mitosis (profase) y comprende dos pasos. En primer lugar, los dos centrosomas, cada uno conteniendo un par de centriolos,

pierden su cohesión, de manera independiente de los MTs. En segundo lugar, los centrosomas se separan hacia los polos opuestos de la célula por la acción de las proteínas motoras (de manera MT-dependiente), participando en la formación del huso mitótico y orientación (la bipolaridad) (Heald et al., 1996). Para la correcta separación de los centrosomas, se produce un desamblaje del conector fibroso existente entre los centriolos, formado por las proteínas C-NAP1, Rootletin, CEP68, CEP135 y β -Catenina (Bahmanyar et al., 2008; Fry et al., 1998a; Graser et al., 2007; Kim et al., 2008b; Yang et al., 2002). Estas proteínas actúan como un pegamento que mantiene los centriolos unidos, postulándose que podrían servir como anclaje de otras proteínas que también podrían estar implicadas en la cohesión del centrosoma (Kim et al., 2008b).

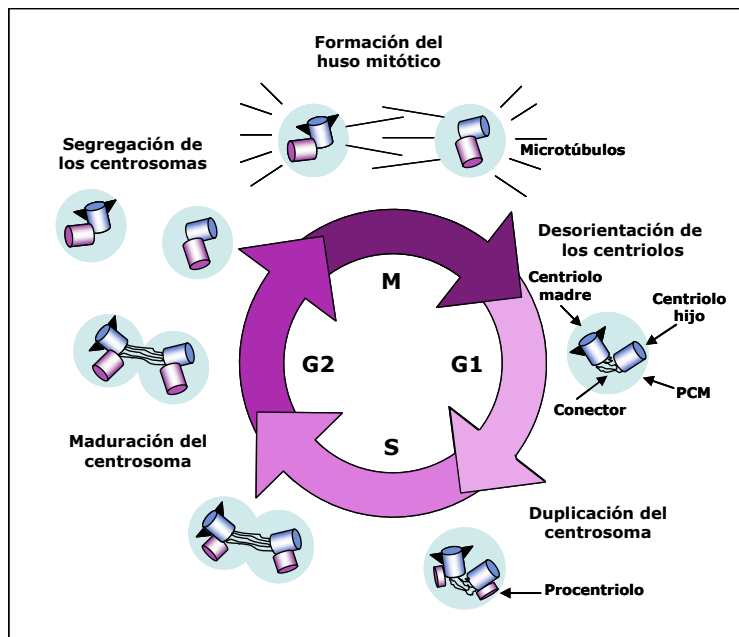


Figura I.5: Figura esquemática del ciclo del centrosoma en relación al ciclo celular.

3.2. Componentes del conector centriolar

3.2.1. CEP2/C-NAP1

CEP2, también denominada CEP250 (“Centrosomal Protein 250”), se describió por primera vez en 1998 como una proteína centrosomal en un estudio de caracterización de suero autoinmune humano con reactividad centrosomal. Mack y colaboradores realizaron un rastreo en una librería de ADNc de células HeLa usando autoanticuerpos de suero autoinmune reactivo de centrosoma de pacientes (la mayoría con artritis), en el que obtuvieron varios clones que producían una secuencia incompleta por el extremo 3’ (84% de la proteína), que codificaba una proteína centrosomal con una masa molecular de 250KDa (Mack et al., 1998). Ese mismo año, Fry y colaboradores, denominaron a esta proteína C-NAP1 (Centrosomal Nek2-Associated Protein 1) al capturarla en un rastreo por doble híbrido, usando como cebo la quinasa reguladora del ciclo celular serina/treonina quinasa Nek2. La secuencia completa de C-NAP1 de 7328 pb codifica una proteína de 2442 aminoácidos (281 KDa). Esta proteína está enriquecida en dominios teóricos “coiled-coil” y presenta en la zona central, en N-terminal y C-terminal, residuos de prolina intercaladas en las hélices que formaban los dominios “coiled-coil”.

C-NAP1 se localiza en la zona proximal de ambos centriolos mediando la cohesión centriolo-centriolo de manera dinámica. Su función es dependiente del ciclo celular, ya que C-NAP1 se encuentra asociada a la zona proximal de los centriolos durante la interfase, pero se disocia del centrosoma y se traslada al citoplasma en mitosis por fosforilación de Nek2 (Fry et al., 1998a). Parte de C-NAP1 queda retenida en los centriolos, por lo que parece que la fosforilación por Nek2 no es suficiente para la disociación completa de C-NAP1 del centrosoma, y por

otro lado, C-NAP1 parece no ser la única causa de separación de los centriolos (Faragher and Fry, 2003).

La inactivación de la proteína C-NAP1 con anticuerpos o mediante la expresión de mutantes truncados que bloquean la función de la proteína endógena, así como la interferencia de su ARNm por ARN de interferencia pequeño ("siARN"), produce una disociación de los centriolos en cualquier fase del ciclo celular, aunque esto no previene la progresión del ciclo celular (Mayor et al., 2000). La sobreexpresión de la proteína produce unos agregados en el centrosoma y en el citoplasma, para lo que son necesarios los dominios N-terminal y los dos "coiled-coil" centrales. Estos agregados dañan la nucleación de los microtúbulos pero en ningún caso interrumpen la entrada en mitosis, como cabría esperar al encontrarse los centrosomas embebidos en una red de C-NAP1. Mayor y colaboradores han observado que los agregados de C-NAP1 se disgregan de los centrosomas en mitosis, lo que explica que estos agregados no interrumpen la entrada en mitosis. Estos autores postulan que tal vez se produzca la disgregación de C-NAP1 por fosforilación de C-NAP1 dependiente de Nek2, ya que también se ha encontrado asociada a estos agregados (Mayor et al., 2002).

C-NAP1 es capaz de interactuar con Nek2 tanto en su región N- como C-terminal, aunque la interacción con la zona C-terminal es más fuerte. En esta región, Nek2 presenta un dominio no catalítico, el cual contiene una cremallera de leucinas, implicado en la homodimerización de Nek2 (Fry et al., 1999). La delección de este dominio no disminuye la fuerza de la interacción entre estas dos proteínas, indicando que este motivo no es por sí solo responsable de la interacción entre C-NAP1 y Nek2 (Fry et al., 1998a).

La función de C-NAP1 en la cohesión centriolar está mediada por su propio estado de fosforilación/desfosforilación, el cual depende del balance entre Nek2 y la serina/treonina fosfatasa PP1 ("Protein

Phosphatase 1"). Se ha observado que C-NAP1 puede formar complejos Nek2-PP1-C-NAP1, donde C-NAP1 es sustrato de ambas proteínas. Nek2 es inhibida por PP1 y a su vez Nek2 es capaz de fosforilar el residuo Thr320 de PP1, reduciendo su actividad fosfatasa. Las isoformas de PP1, PP1 α y PP1 γ , interaccionan con Nek2 en su motivo no catalítico KVKF, aunque sólo PP1 α es capaz de desfosforilarla, inhibiendo así su actividad quinasa (Mi et al., 2007). Además, la familia de proteínas I-2, las cuales inhiben diversas quinasas como GSK3, ERK, o ciclina B1/Cdc2, inhiben también a PP1 uniéndose en un sitio diferente al necesario para la interacción Nek2-PP1 (Li et al., 2007).

Helps y colaboradores postulan que, en mitosis, C-NAP1 es fosforilada por Nek2 y se desplaza del centrosoma, y vuelve a formar parte de la estructura que une a los centriolos por defosforilación dependiente de PP1 al final de la mitosis (Helps et al., 2000).

3.2.2. Otros componentes del conector centriolar

En los últimos años se han descrito otras proteínas involucradas en la cohesión de los centriolos.

Rootletin

Rootletin es una proteína conocida por formar parte del "rootlet" ciliado, citoesqueleto originado de los cuerpos basales de las células ciliadas (Andersen et al., 2003; Yang et al., 2002), pero en los últimos años también se ha caracterizado como una proteína centrosomal asociada a la zona proximal de los centriolos y capaz de interaccionar con C-NAP1. La inhibición de la traducción de Rootletin por siARN produce una disociación de los centriolos, al igual que ocurría con C-NAP1. La eliminación por siARN de Rootletin no influye en la asociación de C-NAP1 con el centrosoma, pero el siARN dirigido contra C-NAP1

produce la disociación de Rootletin del centrosoma. La sobreexpresión de Rootletin produce largas fibras asociadas al centrosoma, por lo que se postula un modelo de cohesión del centrosoma basado en filamentos enredados más que polímeros continuos (Bahe et al., 2005).

Rootletin, al igual que C-NAP1, es fosforilada por Nek2 al inicio de la mitosis, promoviendo su disociación del centrosoma. Bahe y colaboradores proponen el siguiente modelo: como C-NAP1 no es capaz de formar largas fibras, C-NAP1 actuaría como un anclaje en los centriolos al cual se une Rootletin para unir los centriolos durante la interfase. En mitosis, C-NAP1 y Rootletin se fosforilarían por Nek2 y ambas se separarían de los centriolos dejándolos libres para crear el huso mitótico. Al final de la mitosis, C-NAP1 se asociaría de nuevo a los centriolos tras su desfosforilación por PP1 (Yang et al., 2006).

CEP68

CEP68 fue originalmente descrita en una caracterización proteómica del centrosoma como una proteína integrante del centrosoma pero sin función conocida (Andersen et al., 2003). Graser y colaboradores han involucrado a CEP68 en la separación de los centriolos. CEP68 se encuentra en la zona proximal de los centriolos y, al igual que Rootletin, forma fibras. La disminución de proteína de CEP68 por siARN produce una separación prematura de los centriolos, con un desplazamiento de Rootletin del centrosoma pero no de C-NAP1. Sin embargo, la disminución de proteína por siARN de C-NAP1 produce en su mayoría el desplazamiento de CEP68 y Rootletin de los centriolos, mostrando las tres proteínas una asociación común al centrosoma (Graser et al., 2007).

CEP135

CEP135, junto a CPAP (“Centrosomal P4.1-Associated Protein”), forman parte de una estructura central en el lumen proximal de los

centriolos que es requerida durante la biogénesis de los centriolos (Kleylein-Sohn et al., 2007). Recientemente, CEP135 se ha caracterizado como parte integrante del conector que une a los centriolos, además de ser capaz de interactuar con C-NAP1 en su zona C-terminal. Los ratones deficientes en el gen de CEP135 presentan una separación temprana de los centriolos y además una disminución de C-NAP1 en el centrosoma, por lo que Kim y colaboradores postulan que CEP135 actuaría como proteína anclaje de C-NAP1 con la parte proximal de los centriolos (Kim et al., 2008b).

β-Catenina

La proteína β-Catenina es conocida como una proteína integrante de la cascada de transducción de señales de Wnt. Wnt son glicoproteínas secretadas que regulan diferentes aspectos de la diferenciación celular a través del control de la actividad de β-Catenina. En ausencia de Wnt, β-Catenina se encuentra en el citoplasma. Tras la señalización por Wnt, β-Catenina se dirige al núcleo y actúa como cofactor del factor TCF/LEF ("T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor"), activando la expresión de sus genes diana (Clevers, 2006). Recientemente, se ha descrito a β-Catenina como otro componente del conector centriolar. Así, β-Catenina interactúa con Rootletin y ambas colocalizan parcialmente con C-NAP1. C-NAP1 es requerida para la adecuada localización y organización de Rootletin y β-Catenina en la región de unión intercentriolar. En base a estos resultados, se ha postulado que C-NAP1 reclutaría a Rootletin en el centrosoma, el cual a su vez promovería sitios de unión para β-Catenina, formando el conector intercentrosomal en interfase. En mitosis, β-Catenina permanece en el centrosoma, indicando que contiene sitios de unión al centrosoma independientes de C-NAP1-Rootletin. β-Catenina interactúa con y es sustrato de Nek2, además de que su localización en el centrosoma durante la mitosis es Nek2

dependiente, puesto que cuando en mitosis la actividad de Nek2 aumenta, se produce un aumento de la concentración de β -Catenina en los sitios C-NAP1-Rootletin independiente (Bahmanyar et al., 2008).

A las proteínas Nek2 y β -Catenina se les ha dado un papel de reguladores negativos de la cohesión del centrosoma, puesto que la sobreexpresión de Nek2 o la estabilización de β -Catenina, producen mayor separación del centrosoma. Por otra parte, C-NAP1, Rootletin, CEP68 y CEP135 tienen un papel de reguladores positivos de la cohesión del centrosoma, ya que su inhibición provoca la separación anormal del centrosoma.

Aunque quedan muchos enigmas sobre cómo se produce la separación de los centriolos/centrosoma, en la siguiente figura se ha representado un modelo que intenta explicar lo descrito hasta el momento.

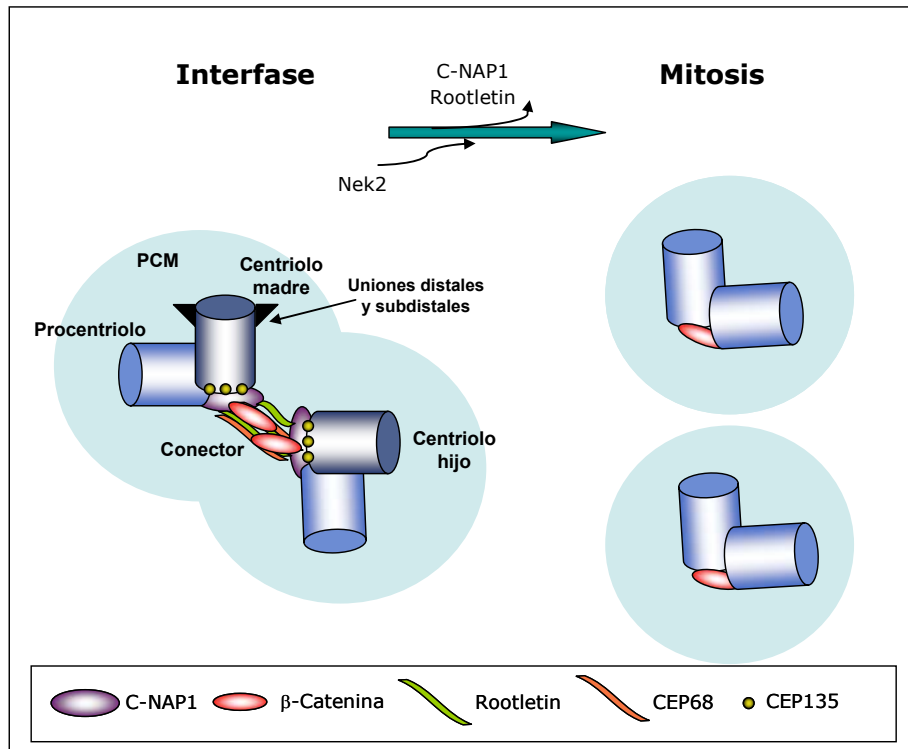


Figura I.6: Modelo esquemático de la localización y regulación del conector centriolar. Durante la interfase, los centriolos permanecen unidos gracias a las proteínas componentes del conector. En mitosis la actividad de Nek2 desplaza a C-NAP1 y Rootletin del centrosoma mientras que β-Catenina queda unida a zonas Rootletin-independientes.

4. Centrosoma y moléculas reguladoras

El ciclo del centrosoma se encuentra íntimamente ligado al ciclo celular, no sólo como consecuencia de la formación del huso mitótico necesario para la segregación de los cromosomas, sino también debido a la asociación al centrosoma de infinidad de proteínas reguladoras de diferentes eventos del ciclo celular, tales como Orc2 (Prasanth et al.,

2004), Orc6 (Prasanth et al., 2002), RAD51 (Daboussi et al., 2005) y MAPK (Gould and Stephano, 1999; Stephano and Gould, 2000; Sun et al., 2002).

Existe un aumento progresivo de proteínas reguladoras, quinasas y fosfatasa, como la proteína quinasa A (Diviani and Scott, 2001), que se encuentran ancladas a proteínas centrosomales de gran masa molecular (200-450 kDa) con dominios tipo "coiled-coil", como la familia de proteínas AKAP450 ("A-kinase Anchoring Proteins") y pericentrina (Delattre et al., 2006; Leidel et al., 2005; Pelletier et al., 2006), sugiriendo que el centrosoma actúa como una plataforma para un vasto número de proteínas reguladoras del ciclo celular u otras (Andersen et al., 2003).

Asimismo, existen proteínas centrosomales, que además de estar en el centrosoma, pueden tener una función o localizarse en el núcleo, como por ejemplo la centrina (Araki et al., 2001), sugiriendo una coordinación potencial entre el ciclo centrosomal, nuclear y celular. En este contexto, el centrosoma se ha visto implicado en la transición entre diversas fases del ciclo celular (Doxsey et al., 2005) y en la inhibición del ciclo celular en respuesta a daño en el ADN.

A continuación se describen algunos ejemplos de proteínas centrosomales que desempeñan un papel fuera del centrosoma:

La proteína centrosomal CPAP fue descrita por primera vez por su interacción con la proteína del citoesqueleto 4.1 R-135. CPAP colocaliza con la proteína centrosomal γ -tubulina y su función se ha relacionado con diferentes aspectos de la función del centrosoma, como por ejemplo, estabilidad de los MTs, duplicación, ensamblaje y longitud del centriolo, además de implicarse en la cohesión del centrosoma (Basto et al., 2006; Hung et al., 2004; Hung et al., 2000; Kirkham et al., 2003; Leidel and Gonczy, 2003; Zhao et al., 2009). Por otro lado, CPAP también se ha localizado en el citoplasma, donde colocaliza con el factor de

transcripción Stat5. La familia de factores de transcripción Stat son activados en respuesta a un amplio número de citoquinas, factores de crecimiento y hormonas. CPAP se describió como un coactivador de Stat5 vía respuesta a PRL (Prolactina). Así, en respuesta a la activación por PRL, Stat5 y CPAP son translocados desde el citoplasma al núcleo. Los mecanismos por los que CPAP aumenta la transcripción mediada por Stat5 y los genes diana sobre los que influyen, están todavía por determinar (Peng et al., 2002). Las proteínas de la familia Stat pueden asociarse a diversas proteínas, incluyendo factores de transcripción como p48, c-Jun, Sp1, y el receptor de glucocorticoides y la quinasa ERK1/2 (Shuai, 2000).

Más recientemente, se ha descrito una nueva interacción de CPAP con la subunidad RelA de NF- κ B (Factor Nuclear kappaB). NF- κ B es un factor de transcripción implicado en múltiples procesos celulares incluyendo proliferación, apoptosis, inflamación y respuesta inmune. Koyanagi y colaboradores han sugerido que CPAP podría actuar como un coactivador de la transcripción mediada por NF- κ B, ya que la sobreexpresión de CPAP aumenta la actividad transcripcional de NF- κ B dependiente de la inducción por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). De acuerdo con esto, la reducción de CPAP endógeno por ARN de interferencia causa la inhibición de la activación de NF- κ B dependiente de TNF α . CPAP también es capaz de interactuar con el coactivador p300/CBP, provocando la activación de la transcripción mediada por NF- κ B, por lo que P300/CBP podría estar incluido en la actividad transcripcional de NF- κ B dependiente de CPAP (Koyanagi et al., 2005).

CEP290 (también conocida como NPHP6) es una proteína centrosomal que tiene como función promover la ciliogénesis (formación de cilios a partir del cuerpo basal, estructura similar al centrosoma) y que se ha visto involucrada en ciliopatías humanas (Tsang et al., 2008). Esta

proteína se localiza tanto en el centrosoma como en el citosol y en el núcleo. En el centrosoma interacciona con PCM-1 (“Pericentriolar Material”) y se localiza en los satélites centriolares de manera dependiente de PCM-1 y MTs (Kim et al., 2008a), colocaliza con γ -tubulina de manera independiente de MTs y dineína, y se redistribuye al citosol al comienzo de la prometáfase. CEP290 interacciona y modula la actividad del factor de transcripción ATF4, el cual está implicado en la formación del quiste renal dependiente de AMPc. Si bien se ha demostrado que CEP290 activa la transcripción mediada por ATF4, se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes por los cuales esto ocurre (Sayer et al., 2006).

Por otro lado existen proteínas no centrosomales que se localizan en el centrosoma de forma dependiente de la fase del ciclo celular. Dentro de estas encontramos: Cdk1, la quinasa Plk1, las fosfatasas PP1 α y PP2A (“Protein Phosphatase 2A”), los supresores tumorales p53 y BRCA, las quinasas mitóticas Aurora A y Nek2, NuMA (“Nuclear Mitotic apparatus protein”) (Wilkinson et al., 2004), etc.

p53 es un supresor de tumores que regula la transcripción de varios genes implicados en el crecimiento de la célula y apoptosis (Ko and Prives, 1996; Mowat et al., 1998), y se encuentra mutado en más del 50% de los cánceres humanos (Hollstein et al., 1991; Lane and Beach, 1990; Levine et al., 1991). La localización de p53 en el centrosoma está extensamente documentada (Brown et al., 1994; Ciciarello et al., 2001; Morris et al., 2000) y depende de su fosforilación en la serina315 (Tarapore and Fukasawa, 2002). Además, mortalina, un miembro de la familia HSP70, une y promueve la disociación de p53 de los centrosomas (Ma et al., 2006; Wadhwa et al., 1998).

Diversas evidencias ponen de manifiesto la implicación de p53 en la iniciación de duplicación del centrosoma así como en la supresión de la re-duplicación. Por ejemplo, mutantes de p53 para el sitio de unión a mortalina permanecen en el centrosoma y suprimen su duplicación (Kaul et al., 2001; Ma et al., 2006). Además, la pérdida o mutación del gen p53 produce amplificación del centrosoma (presentan 3 o más centrosomas), que a su vez conduce a defectos en la mitosis e inestabilidad cromosómica (Fukasawa et al., 1996; Tarapore and Fukasawa, 2002). Del mismo modo, la introducción de MDM2, un regulador negativo de p53 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997) o de un mutante de p53, el cual secuestra e inactiva la forma silvestre de p53, conducen rápidamente a la hiperamplificación del centrosoma (Carroll et al., 1999; Murphy et al., 2000). Para el control de la duplicación del centrosoma por parte de p53 son importantes tanto su función de transactivación como su asociación física al centrosoma (Tarapore and Fukasawa, 2002). Así, en células deficientes en p53 que presentaban re-duplicación del centrosoma, además de desacoplamiento de la duplicación del centrosoma y del ADN, se consigue restaurar la situación normal sobreexpresando un mutante de p53 en su dominio de transactivación (Tarapore and Fukasawa, 2002).

También se ha descrito que varias proteínas dianas de p53 producen amplificación del centrosoma, incluyendo supresores del ciclo celular de la familia de inhibidores de Cdk (CKIs: p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} (p21), p16^{INK4A} y p27^{Kip1} (p27)) y GADD45, un producto “downstream” implicado en la reparación de daño en el ADN y la activación del punto de control G2/M (Harper and Elledge, 1996; Hollander et al., 1999).

p21 es un importante mediador de la parada del ciclo celular inducido por estrés (Di Leonardo et al., 1994; Waga et al., 1994; Xiong et al., 1993). p21 detiene el ciclo celular en G1/S debido a la inhibición de los complejos ciclina/Cdk2 y a su capacidad de unirse a PCNA bloqueando

la síntesis del ADN (Waga et al., 1994; Xiong et al., 1993). También está involucrado en el ensamblaje de los complejos ciclina D/Cdk (LaBaer et al., 1997). Además, p21 se ha implicado en el control de la duplicación del centrosoma. Así, la iniciación de la duplicación del centrosoma en MEFs ("Mouse Embryonic Fibroblasts") deficientes en p21, se produce de manera desacoplada a la duplicación del ADN (es más temprana) (Mussman et al., 2000; Tarapore et al., 2001), y este efecto es rescatado por la sobreexpresión de p21 (Tarapore and Fukasawa, 2002). De ahí que la función de p21 en el centrosoma podría ser evitar la activación prematura de ciclinaE/Cdk2, asegurando la iniciación coordinada de la duplicación del ADN y del centrosoma. Es interesante destacar que la expresión ectópica de p21 en células p53^{-/-}, no restaura completamente la situación normal, como sí ocurre con la sobreexpresión de p53. Esto apoya la idea de que p53 no sólo controla la duplicación del centrosoma dependiente de su función transactivadora, sino que también actúa por otros mecanismos diferentes como la unión directa al centrosoma (Tarapore et al., 2001).

El inhibidor de Cdk, **p16^{INK4A}**, es un regulador "upstream" de la actividad Cdk2. El silenciamiento de p16^{INK4A} induce la disfunción del centrosoma (separación prematura de los centriolos) debido a la mayor disponibilidad de p21 de forma independiente de pRB (McDermott et al., 2006).

La proteína reguladora del ciclo celular **p27** también se ha relacionado con la amplificación del centrosoma. p27 es un inhibidor Cdk (CKIs) que directamente se une tanto a los complejos ciclina E/Cdk2 como a complejos ciclina A, que principalmente controlan la duplicación del centrosoma (Bloom and Pagano, 2003; Hinchcliffe et al., 1999; Meraldi et al., 1999). En respuesta a daño en el ADN, los puntos de control a daño del ADN se activan causando la parada del ciclo celular (Motoyama and Naka, 2004). En estas condiciones, los niveles de p27

aumentan de forma independiente de la ruta ATM/p53, interaccionando p27 con la ciclina E/Cdk2 y evitando la duplicación del centrosoma (Sugihara et al., 2006). Efectivamente, MEFs p27 +/- o p27-/- y células humanas con p27 silenciado presentan un aumento en el número de centrosomas (Sugihara et al., 2006).

BRCA1 está implicada en el crecimiento celular, reparación del ADN por recombinación homóloga (HR) (Deng and Wang, 2003), regulación transcriptional (Welsh et al., 2002), remodelado de cromatina, ligación de ubiquitina (Baer and Ludwig, 2002) e inactivación del cromosoma X (Starita and Parvin, 2003; Venkitaraman, 2002). BRCA1 se encuentra mutado en casos de cáncer de mama y ovario hereditario (Miki et al., 1994). BRCA1 también se ha encontrado en el centrosoma durante todas las fases del ciclo celular, pero sobretodo en mitosis (Hsu and White, 1998). BRCA1 es capaz de unirse, preferentemente en su forma hipofosforilada, a γ -tubulina, componente esencial en la nucleación de MTs (Hsu and White, 1998). Su mutación o pérdida están implicadas en la amplificación centrosomal (Xu et al., 1999). Por ejemplo, en la primera etapa del cáncer de mama, donde BRCA1 se encuentra mutado, se observa amplificación del centrosoma (Lingle et al., 2002; Pihan et al., 2003). Este hecho podría estar relacionado con la actividad E3 ubiquitín ligasa que BRCA1 adquiere cuando se une a su compañero obligatorio BARD1 ("BRCA1-associated RING domain 1") (Hashizume et al., 2001; Mallery et al., 2002). La actividad E3 ubiquitín de BRCA1 está aumentada durante las fases G1 y S debido a la activación por fosfatasa PP1 e inhibida por Aurora quinasas durante la fase M, que también inhibe PP1 (Sankaran et al., 2007). Se ha observado que la actividad E3 ubiquitín ligasa de BRCA1 es capaz de monoubiquitinar γ -tubulina *in vitro* en los residuos lisina48 y lisina344, y si se sobreexpresa γ -tubulina mutada en el residuo K48R, inhibiendo su ubiquitinización, se produce

amplificación del centrosoma (Starita et al., 2004). Esto podría explicar que la expresión de un mutante de BRCA1, que no presenta la actividad E3 ubiquitín ligasa, cause amplificación del centrosoma, además de centrosomas hiperactivos (Sankaran et al., 2006).

La proteína **RB** se une a los factores de transcripción E2F y reprime su capacidad de transactivar genes implicados en la transición G1/S, como por ejemplo ciclina A y E (Sun et al., 2007). pRB se ha localizado en el huso mitótico interactuando con β -tubulina y en los centros de nucleación de los MTs durante la mitosis en queratinocitos humanos (Thomas et al., 1996). Células pRB -/- tratadas con nocodazol, un agente tóxico que interfiere con la nucleación de los microtúbulos, tienen la capacidad de comenzar un nuevo ciclo celular causando la reduplicación del ADN y del centrosoma (Borel et al., 2002; Khan and Wahl, 1998). Se ha demostrado que RB necesita estar hiperfosforilada para la correcta regulación de la duplicación del centrosoma y del ADN (Meraldi et al., 1999) (Balsitis et al., 2003; Iovino et al., 2006).

NuMa es una proteína de la matriz nuclear implicada en replicación y transcripción durante la interfase. En mitosis, cuando el núcleo se disgrega, NuMa se dispersa por el citoplasma y se transloca al centrosoma gracias a su asociación con los microtúbulos a través de las proteínas dineína y dinactina. En el centrosoma, NuMa se convierte en una proteína mitótica centrosomal esencial que se encarga de facilitar el entrecruzamiento de los MTs del huso mitótico, ayudando a la organización y estabilidad del huso mitótico desde el inicio de la mitosis hasta la anafase (Merdes and Cleveland, 1998; Sun and Schatten, 2006). Otros reguladores importantes de la mitosis, como las quinasas Polo y Aurora A (Barr and Gergely, 2007) y el complejo ciclina B/Cdc2 (Jackman et al., 2003), también se concentran en el centrosoma durante la mitosis.

La tabla I.1 muestra algunas proteínas reguladoras involucradas en el número e integridad del centrosoma, así como en la duplicación y función del centrosoma (adaptada de (Fukasawa, 2007)):

Tabla I.1: Proteínas involucradas en el control del centrosoma. En la tabla se muestran algunas proteínas que están implicadas en la regulación del centrosoma. Se indica si se han localizado en el centrosoma como: se localiza (+), no se localiza (-), no está descrito (ND).

Proteínas del ciclo celular	Localización en el centrosoma	Función en el centrosoma
Cdk1-cyclin B	+	Regula la separación del centrosoma en G2 y la función del centrosoma en mitosis controlando a PP1 y Eg5
Cdk4/6-cyclin D	ND	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
Cdk2-cyclin E	+	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
Cdk2-cyclin A	CyclinA ND	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
CDC25A, B, C	CDC25B: + CDC25A,C: -	Regula la duplicación y función del centrosoma controlando los complejos ciclina/Cdk
ROCK I	+	Regula el comportamiento y posicionamiento del centrosoma
ROCK II	+	Regula el momento oportuno de duplicación del centrosoma
p53	+	Suprime la duplicación del centrosoma controlando la actividad Cdk2 y uniéndose directamente a los centrosomas
p21Waf1-Cip1	+	Suprime la duplicación del centrosoma controlando la actividad Cdk2

p16(Ink4a)	ND	Suprime la duplicación del centrosoma controlando la actividad ciclina E/Cdk2
p27kip1	+	Suprime la duplicación del centrosoma controlando la actividad ciclina E/Cdk2
E2F1	-	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
E2F3	-	Suprime la duplicación del centrosoma controlando la actividad ciclina E
RB	-	Suprime la duplicación del centrosoma controlando la actividad E2F
NEK2A	+	Regula la separación del centrosoma en G2 y maduración por asociación a PLK1
Aurora A	+	Regula la duplicación, maduración y separación en G2 del centrosoma y su función en mitosis
PAK	+	Regula la maduración del centrosoma actuando sobre AuroraA
PLK1	+	Regula la duplicación, función y separación del centrosoma
PLK2	+	Regula la iniciación de la duplicación del centrosoma
Plk3	+	Regula la función de centrosoma y dinamismo de los MTs
Plk4	+	Regula la iniciación de la duplicación del centrosoma
PKA	+	Regulador de la función del centrosoma y ensamblaje del huso mitótico junto a pericentrina
CK2	+	Regulador del dinamismo de los centrosomas
MPS1	+	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
CaMKII	+	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
PP1	+	Regula la separación del centrosoma actuando sobre Nek2A y Aurora A

PP2A	+	Regulador de la duplicación, maduración y función del centrosoma
PP4	+	Regula la maduración del centrosoma, recluta γ -tubulina y PLK1
Cyclin G2	+	Regula la función del centrosoma asociándose a PP2A
MYC	-	Fomento de la duplicación del centrosoma controlando MDM2 y p27kip1
Chaperonas	Localización en el centrosoma	Función en el centrosoma
Nucleo-phosmin	+	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma junto a ROCK1. Regulador negativo del inicio de la duplicación del centrosoma por emparejamiento de los centriolos
Mortalin	+	Regulador positivo del inicio de la duplicación del centrosoma
HSP70	+	ND
HSP90	+	Regula la función del centrosoma estabilizando a Plk1
E3 ubiquitín ligasas	Localización en el centrosoma	Función en el centrosoma
Mdm2	-	Regulador positivo de la duplicación del centrosoma al promover la degradación de p53
BRCA1-BARD1	+	Regulador negativo de la duplicación del centrosoma, ensamblaje del huso mitótico y de la función de nucleación
SKP1	+	Regulador del inicio de la duplicación del centrosoma como parte de SCF
SKP2	-	Como parte de SCF y produciendo la degradación de la ciclina E, suprime la duplicación del centrosoma

Proteínas "check-point" y reparación ADN	Localización en el centrosoma	Función en el centrosoma
ATM,ATR	+	Desencadenan el punto de control de G2/M en respuesta a daño en ADN, evitando la re-duplicación del centrosoma
CHK1, CHK2	+	Establecen el punto de control de G2/M en respuesta a daño en ADN, evitando la re-duplicación del centrosoma
Rad51,51B,C, D	-	Supresión de la amplificación del centrosoma
XRCC1	+	ND
XRCC2	ND	Supresión de la amplificación del centrosoma
XRCC3	ND	Supresión de la amplificación del centrosoma
GADD45a	ND	Regula la integridad numérica de centrosomas controlando a AuroraA
BRCA2	ND	Supresión de la amplificación del centrosoma
MSH2	ND	Regula la integridad numérica de centrosomas
PARP-1	+	Regula la duplicación del centrosoma
PARP-23	+	ND
Tankyrase	+	Regula el ensamblaje del huso mitótico

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

1. Materiales y Métodos generales

Materiales

1.1. Reactivos de biología molecular

Todos los reactivos de Biología molecular fueron proporcionados por Roche, Sigma, New England Biolabs, Fluka, Invitrogen y Merck.

1.2. Tampones de uso general

Tampón de carga Laemmli 2X: β -mercaptoetanol 10%, SDS 6%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.2 mg/ml.

PBS: 150 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 y 8 mM Na_2HPO_4 pH 7.4.

TEN: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 40 mM Tris-HCl pH 7.4.

RIPA: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 2mM ortovanadato sódico y un cóctel completo de inhibidores de proteasas (Complete® (Roche)).

LSB: 0.25% NP-40, 10mM HEPES pH 7.6, 250 mM NaCl, 5mM EDTA y Complete®.

SOB: 2% triptona, 2 g extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl_2 y 10 mM MgSO_4 .

TB: 2.4 g PIPES, 44 ml agua milli-Q® a pH 6.7. Se añadió 300 ml de agua milli-Q®, 8 ml CaCl_2 1M, 28 ml de KCl 3M, 20 ml de MnCl_2 1M (previamente esterilizado).

1.3. Líneas celulares y medios de cultivo

Todos los tipos celulares de mamíferos utilizados en esta Tesis Doctoral se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO_2 .

Medios de cultivo

Las líneas celulares utilizadas para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, crecieron de manera adherente en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), con alta concentración de glucosa (4.5 g/l) y 2 mM de glutamina, a excepción de las células KE37 las cuales crecieron en suspensión en un medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) con una concentración de glucosa de 2 g/l y 2 mM de glutamina.

El medio era suplementado con suero fetal bovino (FBS), o con suero de ternero recién nacido (NBS) para el cultivo de las células NIH-3T3, al 0.5% (condición de ayuno) o al 10% (condiciones normales de crecimiento) además de penicilina/estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente).

Los medios, antibióticos y suplementos usados para el cultivo de las células fueron adquiridos de Lonza-CAMBREX e Invitrogen-GibcoBRL.

Todo el trabajo con los cultivos celulares de mamíferos se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel IIA.

Líneas celulares

Las líneas celulares que se han usado durante esta Tesis Doctoral provienen de "American Type Culture Collection".

NIH-3T3: línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón.

HeLa: células derivadas de un adenocarcinoma epitelial de cervix de una mujer de 31 años de raza negra.

U2OS: células derivadas de osteosarcoma de una mujer de 15 años, establecida en 1964.

KE37: línea celular de linfocitos T humanos. Este tipo celular crece en suspensión.

1.4. Anticuerpos y péptidos inmunogénicos

Tabla II.1: Anticuerpos utilizados. En la tabla se indica la procedencia, dilución, referencia y casa comercial del anticuerpo. WB: Western Blot; IF: Inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Procedencia	Dilución	Referencia	Casa comercial
c-Fos	policlonal de conejo	1:200 WB e IF	sc-52	Santa Cruz Biotechnology, Inc
c-Fos	policlonal de conejo	1:500	Ab2	Calbiochem
c-Fos	monoclonal de ratón	1:100	sc-8047	Santa Cruz Biotechnology, Inc
c-Fos	monoclonal de ratón	1:200	sc-413	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
c-myc-tag	monoclonal de ratón	1:1000 WB e IF	sc-40	Santa Cruz Biotechnology, Inc
C-NAP1	policlonal de conejo	1:1000		Cedido por Dr A.M.Fry
C-NAP1	policlonal de pollo	1:1000	pab-01156	Orbigen
GST	monoclonal de ratón	1:30000	sc-138	Santa Cruz Biotechnology
HA	monoclonal de ratón	1:500	H9658	Sigma Aldrich
HA	monoclonal de ratón	1:500	262K#2362	Cell Signalling Technology
HA-HRP	monoclonal de ratón	1:1000	H6533	Sigma Aldrich
Lamina B	policlonal de cabra	1:200	sc-6217	Santa Cruz Biotechnology, Inc

LDH-HRP	policlonal de cabra	1:1000	ab7639	Abcam
p27	monoclonal de ratón	1:500	610242	BD Biosciences
γ -tubulina	monoclonal de ratón	1:1000 WB e IF	T5326	Sigma Aldrich
γ -tubulina	policlonal de conejo	1:1000 WB e IF	T5192	Sigma Aldrich

Tabla II.2: Péptidos inmunogénicos utilizados. En la tabla se especifica la concentración utilizada en el bloqueo respecto a la concentración del anticuerpo correspondiente, la referencia y la casa comercial de los péptidos.

Péptido	Concentración de bloqueo	Referencia	Casa comercial
c-Fos sc-52	10X	sc-052P	Santa Cruz Biotechnology
c-Fos Ab2	10X	PP10	Calbiochem

En todos los ensayos western-blot donde se ha utilizado un anticuerpo anti-c-Fos, se ha usado el anticuerpo con referencia sc-52.

Los anticuerpos secundarios HRP (peroxidasa de rábano picante) se utilizaron a una dilución 1:3000 y son de "Santa Cruz Biotechnology, Inc", excepto anti-pollo-HRP que corresponde a "Jackson ImmunoResearch".

Los anticuerpos biotinilados, estreptavidinas y conjugados a fluoróforo se utilizaron a una dilución 1:400 (Invitrogen).

1.5. Plásmidos de uso general

pRcCMV-c-myc-C-NAP1Ct: contiene la zona C-terminal de C-NAP1 (aa 1978-2442). Cedido por el Dr. A.M.Fry.

pRcCMV-c-myc-C-NAP1Ctm1: plásmido derivado de **pRcCMV-c-myc-C-NAP1Ct** por mutagénesis dirigida en una de las leucinas del motivo en cremallera de leucinas (L2282Q).

pRcCMV-c-myc-C-NAP1Ctm3: plásmido derivado de **pRcCMV-c-myc-C-NAP1Ct** por mutagénesis dirigida de tres de las leucinas del motivo en cremallera de leucinas (L2275Q,L2282Q y L2289Q).

pCMV-HA-c-Fos: plásmido que contiene la secuencia completa de c-Fos humano amplificada por PCR de una librería de ADNc de músculo liso (Clontech). Se clonó como fusión en fase a la etiqueta HA de pCMV en los sitios de restricción *NotI-XhoI*. Cedido por el Dr. José María González.

pCMV-HA-JNK: plásmido que contiene la "Jun N-terminal Kinase" (JNK). Cedido por el Dr. A.M.Fry.

Métodos

1.6. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

Obtención de ADN:

ADN plasmídico de *E.coli*: la obtención del ADN plasmídico, para verificar las diferentes construcciones, se realizó con el "GenELute™ Plasmid Miniprep Kit" (Sigma) y se analizó en un gel de agarosa del 1-2% tras haber digerido con las mismas enzimas de restricción que se emplearon para su clonación. La obtención de ADN plasmídico para las transfecciones en células eucariota se realizó por lisis alcalina utilizando el kit de extracción "Genopure Plasmid Maxi Kit" (Roche).

Tratamiento enzimático de ADN: el ADN se sometió a digestión con endonucleasas de restricción, defosforilación y ligación siguiendo las recomendaciones de las compañías suministradoras de las enzimas (New England Biolabs).

1.7. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas

1.7.1. Obtención de extractos proteicos a partir de células de mamífero

Las células de mamífero crecidas en placas de cultivo se lavaron 2 veces con PBS 1X y se recogieron por raspado en 1 ml de tampón TEN. Después se centrifugaron y resuspendieron en tampón de lisis RIPA o LSB para la extracción de las proteínas. Para la rotura celular se aplicaron tres ciclos de: congelación con nitrógeno líquido, descongelación en baño a 37°C y agitación en vortex durante 30 seg. Estos homogenizados celulares se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min, recogiendo el sobrenadante que constituía el extracto crudo de proteínas. En todo momento del proceso los extractos se mantuvieron a 4°C.

1.7.2. Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford

Se midió la concentración proteica de los extractos celulares utilizando el método colorimétrico de Bradford (BioRad) basado en el protocolo de Bradford (Bradford, 1976). Se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras problema y se interpolaron en una recta patrón para conocer su concentración. Se utilizaron concentraciones crecientes de γ -globulina (1-25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como estándar para la cuantificación.

1.7.3. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)

Los extractos de proteínas se separaron en condiciones desnaturizantes mediante geles SDS-PAGE al 12% ó al 7% de acrilamida siguiendo el método Laemmli. Para la realización de las electroforesis se empleó el sistema Miniprotean (BioRad).

1.7.4. Análisis de proteínas

Tinción con azul de Coomassie

Para la detección y cuantificación de proteínas se utilizó la tinción de azul Coomassie. Se incubaron los geles con la solución Coomassie durante 1h a temperatura ambiente y seguidamente se dejaron incubando con dH₂O toda la noche a temperatura ambiente para eliminar el exceso de colorante. Se utilizaron diversas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la cuantificación.

Solución Coomassie: 80 mg de Coomassie Brilliant Blue (CBB R 250) y 35 mM HCl en 1 litro de dH₂O y se agitó al menos 3 horas. Se guardó en oscuridad hasta su uso.

Técnica de western-blot

Transferencia de proteínas a membrana: la transferencia de proteínas a membrana de PVDF (Millipore) se realizó por transferencia húmeda durante 90 min a 100V. Tras la transferencia, la membrana se incubó con 4% leche desnatada (p/v) en tampón PBS-Tween 20 (0.5%) durante 1 hora a temperatura ambiente para bloquear los epítomos inespecíficos.

Inmunodetección de proteínas: la detección de las proteínas se realizó incubando la membrana de PVDF con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en PBS-Tween 20 (0,5%) a 4°C durante toda la noche. Tras tres lavados de 10 min en tampón PBS-Tween (0.5%), se incubó la membrana con un anticuerpo secundario (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) acoplado a HRP durante 45 min a temperatura ambiente. Para la detección se utilizó el sustrato quimioluminiscente ECL Plus (Amersham) y se obtuvieron las imágenes en un "Fujifilm LAS3000".

1.8. Transfección de células de mamífero

Se usaron dos métodos diferentes:

Fosfato Cálculo

Esta técnica está basada en la formación de un precipitado que contiene el fosfato cálcico y el ADN, el cual se adhiere a la membrana celular, siendo internalizado (Gorman et al., 1983).

Reactivos

HBS 2X: 1.64 g NaCl, 21 μg Na_2HPO_4 , 1.19 g HEPES, pH 7.05.

Las transfecciones se realizaron en células adheridas crecidas en placas de 10 cm con una confluencia del 80%. Cuatro horas previamente a la transfección, se les cambió el medio a las células. Para la transfección de placas de 10 cm se incubaron: 510 μl de agua milli-Q®, 600 μl de HBS 2X, 60 μl de CaCl_2 2 M y 5 μg de ADN durante mínimo 20 min y se distribuyó por toda la placa. Transcurridas 16 horas de la transfección se les cambió el medio y se recogieron a las 24 horas post-transfección.

Lipofección

Este método se basa en la utilización de lípidos catiónicos, que englobando el ADN en su interior, son capaces de fusionarse con la membrana plasmática y permitir el paso del ADN de interés dentro de la célula. Se ha usado Fugene HD Transfection Reagent (Roche) por su alta eficacia de transfección y por su capacidad de transfectar células al mismo tiempo de ser sembradas.

Las células se sembraban a una confluencia del 80-90%. Seguidamente se les añadía la mezcla de ADN+Fugene, siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial. Pasadas 12 horas se cambió el medio y se recogieron a las 24 horas post-transfección.

1.9. Transformación en cepas bacterias

Cepas:

E.coli DH5 α : cepa utilizada para la obtención de ADN plasmídico.

E.coli Rosetta™ 2(DE3) Singles™: cepa de células competentes derivada de la cepa BL21, utilizada para la expresión de proteínas por su capacidad de codificar codones de mamíferos que no se encuentran en *E.coli*. Su genotipo es F⁻ *ompT hsdS_B(rB⁻ mB⁻) gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R). Posee la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Se llevaron a cabo dos **métodos** diferentes de transformación:

Electroporación

Para este método se necesitaron células electrocompetentes. Se prepararon previamente a la electroporación, siguiendo un protocolo que consistió en una serie de lavados con 10% de glicerol para eliminar cualquier resto de medio de cultivo. Se prepararon alícuotas de 50 μ l que se guardaron a -80°C hasta su uso.

Este método de transformación de *E.coli* consiste en someter a las células a una diferencia de potencial que perfora temporalmente la pared celular, permitiendo la internalización del ADN. Para ello se utilizó cubetas de 1 mm de ancho (Eppendorf) y un electroporador Eppendorf modelo 2510 para células procariotas.

Transformación por choque térmico

Este método precisa de células competentes para choque térmico. Estas fueron preparadas previamente a la transformación utilizando un protocolo que se resume brevemente a continuación. Se crecen las bacterias en SOB hasta una OD₆₀₀=0.4 - 0.6 y se lavan varias veces con TB

frío. Seguidamente se les añadió 7.5% DMSO y se dividieron en alícuotas de 50 µl que se guardaron a -80°C hasta su uso.

El protocolo de transformación por choque térmico consiste en un tratamiento químico (bacterias tratadas con calcio) que produce la formación de microporos en la célula, permitiendo el paso del ADN de interés cuando se les somete a choque térmico. Brevemente, se incubó una alícuota de células competentes con 25 ng del plásmido de interés en hielo durante 15 min, después se incubó 45 seg a 42°C y 5 min más en hielo. Las células transformadas se incubaron en LB durante 30 min a 37°C permitiendo que sintetizaran la resistencia al antibiótico de selección y se sembraron en placas LB-agar con su correspondiente antibiótico de selección.

1.10. Análisis estadísticos

Los datos se representan como media ± error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre grupos experimentales fueron evaluadas mediante análisis estadístico test *t-student* no pareado de dos colas. La significatividad estadística se delimitó en p-valor<0.05. El programa informático utilizado para el análisis de los datos fue SPSS 15.0 y 17.0.

2. Materiales y métodos específicos

2.1. Ensayo de doble híbrido en levaduras

Cepa

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada ha sido TAT7 (*MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 LYS2::lexAop-HIS3 URA3::lexAop-lacZ*) (cedida por el Dr. Pascual Sanz IBV-CSIC, Valencia). Esta cepa contiene dos genes marcadores integrados en el genoma de la levadura, *lexAop-lacZ* y *lexAop-HIS3*.

Medios y tampones para levaduras

Los **medios** utilizados para el cultivo de la levadura fueron los siguientes: **YPD**, es un medio rico que se compone de extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v) y glucosa 2% (p/v). **Medio sintético completo (SC)**, el cual se compone de medio mínimo de levadura ("Yeast Nitrogen Base" + 0,67%, mezcla de aminoácidos al 0,095% esenciales para la levadura) en ausencia de los suplementos adecuados para mantener la selección de los plásmidos, suplementado con glucosa (2%) como fuente de carbono. Para los medios sólidos se incluía agar al 2%.

Solución de detección de actividad β -galactosidasa: solución con sustrato X-Gal (Roche) a una concentración final de 1mg/ml en tampón Z con β -mercaptoetanol al 0.27% (v/v).

Tampón Z: Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1mM, ajustado a pH 7.0.

Tampón SB 2X: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.2 mM DTT, 0.0025% azul de bromofenol.

Tampón TE-LiAc: 0.1M acetato de litio, 1mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mM EDTA pH 8.0.

Plásmidos

pBTM116-bZIP-c-Fos (123-230): el ADNc correspondiente a los aminoácidos 123-230 (b-ZIP) de c-Fos de rata se insertó en el sitio de multiclonaje del plásmido pBTM116. Este plásmido contiene la secuencia completa del dominio de unión a ADN del represor LexA de *E.coli* (aa 1-202) bajo el control del promotor ADH1 (Alcohol deshidrogenasa 1) de levadura, seguido de un sitio de multiclonaje. Contiene el gen TRP1 como marcador de selección en *Sacharomyces cerevisiae*, un origen de replicación de levadura y de bacteria, y el gen de β -lactamasa que

confiere resistencia a ampicilina en *E.coli* (cedido por Dra.Carmen Ivorra).

pACTII-HA-con fragmentos de CEP2: los fragmentos de la proteína CEP2 (2080-2192, 2194-2232, 2233-2293, 2239-2267 y 2294-2341, la numeración indica los aminoácidos de la proteína CEP2 que contiene cada construcción) fueron obtenidos por PCR utilizando como molde el plásmido pGEX-4T-1-CEP2Ct (ver Apartado 2.2 Materiales y Métodos) y los oligos para cada fragmento que se indican en el apartado siguiente. Se subclonaron los diferentes fragmentos en los sitios *Bam*HI-*Xho*I del vector pACTII. El plásmido pACTII contiene el dominio de activación de GAL4, resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E.coli* y codifica para el gen LEU2 como marcador de selección en *S.cerevisiae*.

Oligonucleótidos utilizados

Los nuevos sitios de restricción están subrayados. Los codones de parada están en negrita.

pACTII-fragmentos CEP2	
Nombre	Secuencia
CEP2(2080-2192)	F: 5´-CAGGATCCTCAGCCTAAAGGAGCTGCAGC-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTAGCTGAGTACCAACTCCT-3´
CEP2(2194-2232)	F: 5´-CAGGATCCTCCAAGCTCTGGAAGAGCAGCAG-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTATCCGGGACTAGGCTCAG-3´
CEP2(2233-2293)	F: 5´-CAGGATCCTCGTGGAGGAGAAGGAACGGTTG-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTATGATCCTGCCCGGGATG-3´
CEP2(2239-2267)	F: 5´-CAGGATCCTCTTGACACAGAGGCTTGAACG-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTACAGCTGCGCATTGTGGC-3´
CEP2(2294-2341)	F: 5´-CAGGATCCTCCTGGAGGCCAGAGAACTATG-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTACTTTCGCTCCAAGGCCAG-3´

Trasformación en levadura

Se utilizó el protocolo de transformación por acetato de litio (Gietz et al., 1995) con las modificaciones siguientes. La cepa utilizada para el

ensayo es TAT7, que contiene dos genes reportero, *lexAop-HIS3* y *lexAop-lacZ*. Esta cepa fue transformada con el plásmido pBTM116-bZIP-c-Fos (123-230) y con los plásmidos pACTII-(2080-2192) ó (2194-2232) ó (2233-2293) ó (2239-2267) ó (2294-2341). Para ello la cepa TAT7 fue crecida en medio rico YPD hasta alcanzar una O.D_{600nm} (densidad óptica) de 0.3-0.5. Las levaduras se recogieron por centrifugación y se lavaron con tampón TE-LiAc. Se resuspendieron en 1 ml de tampón TE-LiAc, al que se añadieron 50 µg de ADN de esperma de salmón como ADN "carrier" y 1 µgr de cada ADN a transformar. Se añadió PEG (Polietilenglicol) al 40% y se incubaron durante 1 hora a 30°C. Seguidamente se realizó la transformación por choque térmico a 42°C durante 5 min en presencia de 10% DMSO. Las células se recuperaron en medio YPD durante 2 horas a 30°C y se sembraron en placa en medio selectivo SC suplementado con todos los aminoácidos esenciales para la levadura, excepto leucina y triptófano (SC-Leu-Trp). Las células se incubaron en una estufa a 30°C durante 3 días.

Ensayo β-galactosidasa en filtro

El rastreo de la actividad se realizó por un ensayo sobre filtro según se describe en Yang 1992 (Yang et al., 1992). Para identificar la interacción entre proteínas, los transformantes fueron seleccionados en placas SC-Leu-Trp. Estas colonias se replicaron a discos de nitrocelulosa y se congelaron durante 1 hora a -80°C para permeabilizarlas cuando se descongelan. Para los ensayos β-galactosidasa los filtros se incubaron a 30°C en la solución de detección (Yang et al., 1992).

Obtención de proteína total de levadura

Se recogieron por centrifugación las células equivalentes a DO_{600nm}=1, de un cultivo de levaduras creciendo exponencialmente en

medio líquido SC-Leu-Tyr. Las células se resuspendieron en 50µl de tampón SB 2X y se hirvieron durante 3 min. Seguidamente se le añadió perlas de vidrio (0.3 g, 425-600 micrones de diámetro, Sigma) y se agitaron en un vortex durante 30 seg. Se repitió dos veces más el ciclo de hervir y agitar, para después centrifugar 1 minuto a 14000 rpm. Las proteínas del sobrenadante se analizaron por electroforesis SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida. Después se realizó un western-blot anti-HA (H9658), epítipo de reconocimiento de los fragmentos de CEP2.

MEDIO POBRE (SC-Leu-Trp)

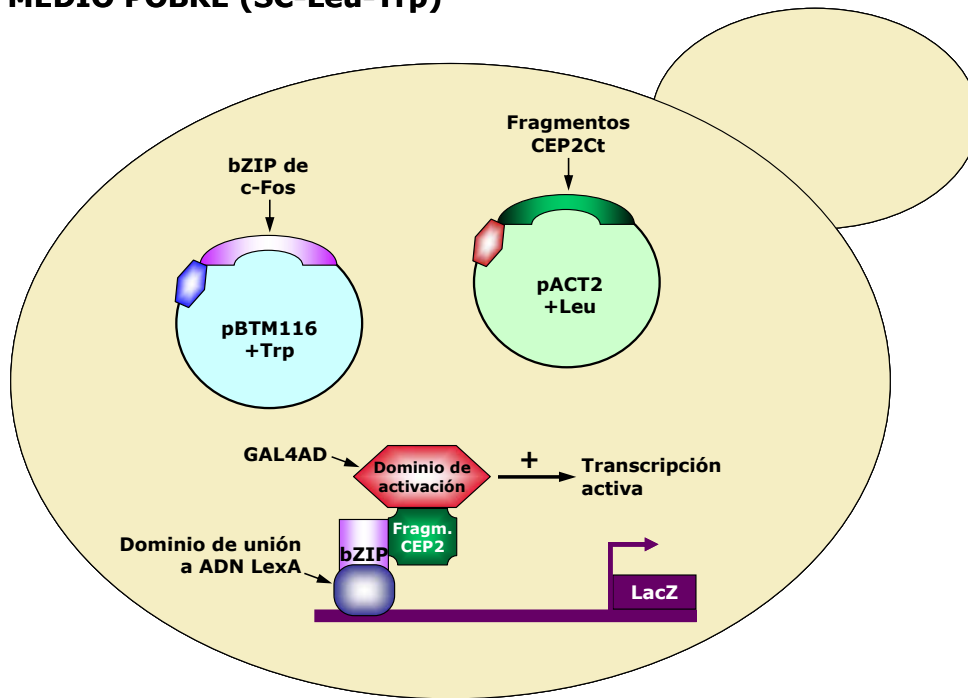


Figura II.1: Representación esquemática del ensayo del doble híbrido en levadura. Se generan dos proteínas híbridas: una proteína cebo, en la figura el dominio b-ZIP de c-Fos, que se une al dominio de unión a ADN (factor de transcripción LexA) y una proteína presa, en la figura los diferentes fragmentos de CEP2, que se une al dominio de activación (GAL4). Cuando se produce la interacción de la proteína cebo y presa se reconstituye un activador transcripcional funcional que activa el gen testigo LacZ, confiriendo a las levaduras actividad β-galactosidasa.

2.2. Ensayo de arrastre por GST

Plásmidos

pGEX-4T-1-CEP2Ct: el ADNc de CEP2 (correspondiente al clon positivo 17.1 obtenido en el ensayo de doble híbrido) fue subclonado en los sitios *EcoRI-XhoI* del vector pGEX-4T-1. Plásmido cedido por la Dra. Carmen Ivorra.

pGEX-4T-1-fragmentos de CEP2 (aa 2080-2192, 2233-2293, 2239-2267 y 2294-2341): las secuencias de los diferentes fragmentos se obtuvieron por PCR a partir del plásmido pGEX-4T-1-CEP2Ct, utilizando los oligos para cada fragmento indicados en el apartado siguiente. Se subclonaron en los sitios *BamHI-XhoI* del vector pGEX-4T-1.

pGEX-4T-1-C-NAP1Ct: contiene la zona C-terminal de C-NAP1 (aa 1978-2442) cedido por el Dr. A.M.Fry.

pGEX-4T-1-C-NAP1Ctm1: plásmido derivado de **pGEX-4T-1-C-NAP1Ct** por mutagénesis dirigida de una de las leucinas del motivo en cremallera de leucinas (L2282Q).

El plásmido pGEX-4T-1 codifica para la proteína glutathion S transferasa (GST).

Oligonucleótidos utilizados

Los nuevos sitios de restricción están subrayados. Los codones de parada están en negrita.

pGEX-4T-1-fragmentos CEP2	
Nombre	Secuencia
CEP2(2080-2192)	F: 5´-CAGGATCCCTCGAGAGCCTAAAGGAGCTGCAGC-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATT CTAG CTGAGTACCAACTCCT-3´
CEP2(2194-2232)	F: 5´-CAGGATCCCTCGAGCAAGCTCTGGAAGAGCAGCAG-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATT CTAT CCGGGACTAGGCTCAG-3´
CEP2(2233-2293)	F: 5´-CAGGATCCCTCGAGGTGGAGGAGAAGGAACGGTTG-3´ R: 5´-CACTCGAGGAATT CTAT GATCCTGCCCGGGATG-3´

CEP2(2239-2267)	F: 5´-CAGGATCCCTCGAGTTGACACAGAGGCTTGAACG -3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTACAGCTGCGCATTGTGGC-3´
CEP2(2294-2341)	F: 5´-CAGGATCCCTCGAGCTGGAGGCCAGAGAACTATG -3´ R: 5´-CACTCGAGGAATTCCTACTTTCGCTCCAAGGCCAG-3´

Expresión y purificación de proteínas recombinantes unidas a GST

Los polipéptidos de fusión a GST se expresaron en células *E.coli* (Roxetta™) previamente transformadas con el plásmido pGEX-4T-1 adecuado. La inducción se realizó cuando el cultivo estaba a una OD₆₀₀=0.4 - 0.6 con 0.1 mM de IPTG toda la noche a 25°C (GST-CEP2Ct y GST-fragmentos de CEP2) ó 4 horas a 37°C (GST-C-NAP1Ct y GST-C-NAP1Ctm1). Las proteínas fusionadas a GST se purificaron a partir de los lisados de las bacterias usando una matriz de glutation-sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech) por el método descrito por el fabricante. Para la elución se empleó tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) suplementado con 10 mM glutation reducido.

La cantidad y pureza de las proteínas obtenidas se determinó en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie usando distintas concentraciones de BSA como estándar para la cuantificación.

Ensayo de arrastre

Dependiendo del ensayo de arrastre realizado, se utilizaron extractos proteicos procedentes de cultivos diferentes, como se indica a continuación:

- En los experimentos donde se utilizaron las proteínas quiméricas GST-CEP2Ct (Fig. III.2) y GST-fragmentos CEP2 (Fig. III.5), se usó extracto total proteico de células NIH-3T3 estimuladas 90 min con 10% NBS después de 48 horas de ayuno, para conseguir un inducción de la expresión de la proteína c-Fos.

- En los experimentos donde se utilizaron las proteínas quiméricas GST-C-NAP1Ct y GST-C-NAP1Ctm1, se usaron dos extractos diferentes: extracto total proteico de células HeLa transfectadas con el plásmido pCMV-HA-c-Fos (Fig. III.9) o extracto total proteico de células HeLa estimuladas 90 min con 10% FBS después de 48 horas de ayuno, para conseguir una inducción de la expresión de la proteína c-Fos (Fig. III.10).

La extracción proteica a partir de los cultivos celulares se realizó con el tampón LSB según se indica en el Apartado 1.7.1. Materiales y Métodos. El protocolo utilizado en todos los ensayos de arrastre con GST consistió en: se incubaron 250 µg de la proteína total obtenida de los extractos (como se indica anteriormente, el extracto variaba dependiendo del ensayo), con 3 µg de las proteínas quiméricas GST o GST sola (como control negativo). Se completó el volumen total con tampón LSB hasta 500 µl, para facilitar la mezcla de los componentes y se incubó a 4°C durante 2 horas en una noria. A continuación se centrifugaron las muestras y se realizaron 4 lavados con tampón LSB. Se eliminó el sobrenadante aspirando con una aguja de tamaño 25 GA²⁸. Posteriormente se añadió tampón Laemmli 2X, se hirvió durante 5 min y las proteínas retenidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%. Seguidamente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Esta membrana se incubó con un anticuerpo anti-c-Fos policlonal (sc-52) a una dilución 1:200 para los extractos que sobreexpresaban c-Fos endógeno o anti-HA (262K#2362) a una dilución 1:1000 para aquellos extractos transfectados con HA-c-Fos. A continuación tras tres lavados con TPBS, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a una dilución 1:3000. Los anticuerpos se diluyeron con TPBS (PBS+0.5% Tween20) suplementado con leche desnatada al 4%. Las bandas proteicas se detectaron con el

sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Después se procedió a denudar la membrana y se realizó una inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-GST (sc-138) a una dilución 1:30000.

2.3. Mutagénesis dirigida

Cebadores utilizados en la mutagénesis

Se indica en negrita y subrayado el nucleótido mutado.

Cebadores del plásmido pACTII-CEP2(aa2233-2293)	
Nombre	Secuencia
CEP2(L2239S)	5´-GGAGAAGGAACGGT <u>C</u> GACACAGAGGCTTG-3´
CEP2(L2253Q)	5´-GCAAGCGGTGGCAGAGC <u>A</u> GGAAGTTGACCG -3´
CEP2(L2267Q)	5´-CCACAATGCGCAGC <u>A</u> GCGGACCGCCTTGG-3´
Cebadores del plásmido pGEX-4T-1-C-NAP1Ct	
Nombre	Secuencia
C-NAP1(L2282Q)	5´-CTGCAGCAAGCAGTGGCCCGGC <u>A</u> GGAGATTGACAG-3´ 5´-GCCGGGCCACTGCTTGCTGCAGGTGTTCAAGC-3´
Cebadores del plásmido pRcCMV-c-myc-C-NAP1Ct	
Nombre	Secuencia
C-NAP1(L2275Q)	5´-GGCTTGAACACC <u>A</u> GCAGCAAGCAGTGGCC -3´
C-NAP1(L2282Q)	5´-GCAGTGGCCCGGC <u>A</u> GGAGATTGACAGGAG -3´
C-NAP1(L2289Q)	5´-GACAGGAGCAGGC <u>A</u> GCAGCGCCACAATGTC -3´

La mutagénesis dirigida de las leucinas se realizó usando un Kit de Stratagene (QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit) para los plásmidos pGEX-4T-1-CEP2(2233-2293) y pCMV-C-NAP1Ct y un Kit de Invitrogen (Gene Tailor™ Site-Directed mutagenesis system) para el plásmido pGEX-4T-1-C-NAP1Ct.

En ambos Kits se siguieron los pasos indicados por los fabricantes, que se basaban en los mismos principios. Brevemente, se diseñaron los cebadores basándose en la secuencia nucleotídica de CEP2 (NM008383) o C-NAP1 (AF049105) (obtenida a partir de la base de datos

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) y se sustituyó una base de las leucinas que queríamos modificar. Con estos cebadores se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como molde los plásmidos correspondientes. Seguidamente se digirieron los plásmidos molde, que no tienen incorporada la mutación, añadiendo a la mezcla de reacción 1 μ l de endonucleasa DpnI (10U/ μ l), la cual reconoce específicamente las zonas metiladas y hemimetiladas presentes sólo en los plásmidos molde, durante 1 h a 37°C. Finalmente, se transformó una cepa de bacterias ultracompetentes y se crecieron en placas LB-agar ampicilina (50 μ g/ml) (antibiótico de selección) durante toda una noche.

La correcta sustitución de las bases se comprobó por secuenciación del ADN.

2.4. Inmunoprecipitación en células HeLa

Tampón específico

Citrato-Fosfato (pH 5.0): 48.5 ml de una solución 0.1 M de ácido cítrico y 51.5 ml de una solución 0.2 M de Na₂HPO₄. Se añadió 0.1 % Tween-20 para evitar la agregación de las bolas magnéticas.

Se transfectaron células HeLa crecidas asincrónicamente con los plásmidos de expresión pCMV-myc-C-NAP1Ct o pCMV-c-myc-C-NAP1Ctm3 y pCMV-HA-c-Fos. Se lavaron las placas dos veces con PBS 1X y se recogieron por raspado en tampón TEN. Se centrifugaron y se resuspendieron en el tampón de lisis LSB y se obtuvo la proteína según se describe en el Apartado 1.7.1 de este Capítulo. En el ensayo de inmunoprecipitación se incubaron 3 μ g del anticuerpo anti-c-myc con 20 μ l de bolas magnéticas (Dynabeads® Protein G, Invitrogen) por condición durante 1h a 4°C en una noria. Las bolas magnéticas se habían lavado previamente tres veces con tampón citrato-fosfato. Tras la

incubación se lavaron dos veces más con tampón citrato-fosfato y dos veces con el tampón LSB. Seguidamente se incubaron con 5 mg del extracto proteico toda la noche a 4°C en una noria. Las bolas magnéticas se lavaron tres veces con PBS 1X frío y se les añadió 20 µl de Laemmli 2X. Estas muestras se analizaron por western-blot, usando 8 µl para detectar c-myc-C-NAP1Ct o c-myc-C-NAP1Ctm3 con un anticuerpo anti-c-myc y los 12 µl restantes en para detectar HA-c-Fos con un anticuerpo anti-HA-HRP (H6533).

2.5. Inmunofluorescencia en células de mamífero y estudios de colocalización mediante microscopía confocal

Células NIH-3T3, U2OS y HeLa se sembraron sobre cubreobjetos y se crecieron en asincronía hasta que alcanzaron un 70-80% de confluencia. Después de 3 lavados con PBS se fijaron durante 15 min con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron durante 20 min con Tween 20 al 0.5% y se bloquearon durante 45 min con suero de caballo (HS) al 5% en PBS. Se realizó un segundo bloqueo de Avidina/Biotina de 15 min cada uno, según instrucciones del fabricante (Vector Laboratories), en los experimentos que precisaban estreptavidinas. Los cubreobjetos se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en 5% HS. Seguidamente se incubaron con un anticuerpo secundario diluido 1:400 en 5% HS. Se usaron dos anticuerpos secundarios diferentes: anticuerpos secundarios unidos directamente a la molécula fluorescente o anticuerpos secundarios con sistema biotina-estreptavidina-fluorocromo. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando un medio de montaje "SlowFade® Gold antifade reagent".

Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Leica TCS/SP2, con un objetivo de aceite de 63 aumentos (apertura numérica

1.4). En todos los experimentos de inmunofluorescencia se muestran imágenes representativas. Para cada estudio de colocación se realizaron al menos 3 experimentos independientes, estudiando en cada uno de ellos del orden de n=30 células.

Las longitudes de onda de excitación y emisión para los diferentes fluoróforos utilizados fueron:

Fluorocromo	Longitud de onda de excitación	ventana PMT (rango de longitud de onda)
FITC	488 nm	500-531 nm
Alexa 488	488 nm	500-531 nm
Alexa 633	633 nm	650-750 nm

En todos los ensayos de doble inmunofluorescencia (IF) se realizaron los siguientes controles:

- 1) El anticuerpo primario de la IF1 se incubó con el secundario de la IF1 y de la IF2 para detectar posibles uniones inespecíficas; y viceversa. A este control se le denominará control de inespecificidad de los anticuerpos (apartado A de las Fig. III.12,13,14,15,16,17,18 y 19).
- 2) Simple inmunofluorescencias por separado para poder determinar que la fluorescencia recogida en el canal correspondiente al anticuerpo de la IF1, no sea visible en el canal de recogida de la fluorescencia del anticuerpo de la IF2; y viceversa. De este modo se evita el solapamiento entre el ancho de banda de la longitud de onda emitida por cada uno de los fluoróforos.
- 3) En las doble inmunofluorescencias de las células NIH-3T3, los anticuerpos de c-Fos, sc-52 y Ab2, además se pre-incubaron con

su respectivo péptido inmunogénico, con el fin mostrar la especificidad del anticuerpo (Fig. III.14 y 15,B). A este control se le denominará control de especificidad del anticuerpo de c-Fos.

Todas las imágenes se tomaron por debajo del punto de saturación de los fluoróforos con el fin de evitar falsos positivos.

2.6. Aislamiento de centrosomas

Tampones específicos

TBS: 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl. Guardar a 4°C.

TBS 0.1M-0.8% sacarosa: se preparó en fresco. 0.1 M de TBS, 80 g de sacarosa y agua milli-Q® hasta un volumen final de 1 litro.

Tampón de lisis: 1 mM HEPES pH 7.2, 0.5% NP-40, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% beta-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 1X de un cóctel de proteasas. Se preparó en fresco.

Tampón de gradiente: 10 mM K.PIPES pH 7.2, 0.1% Triton X-100, 0.1% beta-mercaptoetanol.

Aislamiento de centrosomas en gradiente de sacarosa

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Moudjou y Bornens (Moudjou and Bornens, 1994) con las modificaciones que se detallan a continuación. Se crecieron células KE37 o HeLa hasta una densidad de 2×10^6 células/ml. Para el ensayo se usaron un total de 2×10^8 células. Se ayunaron durante 48 horas con 0,1% FBS y se estimularon 90 min con 10% FBS. Una hora previa a recoger las células se añadió nocodazole a una concentración final de 60 ng/ml.

Las células se centrifugaron 5 min a 1200 g. En el caso de las células HeLa, previamente se había tripsinizado. Se lavaron en TBS 1 M con la mitad del volumen de partida y otro lavado en TBS 0.1M-0.8% sacarosa

con un cuarto del volumen de partida. Se resuspendieron en 10 ml de TBS 0.1M-0.8% sacarosa y se añadió 40 ml de tampón de lisis (volumen necesario para conseguir una concentración final de 1×10^7 células/ml). El extracto se incubó durante 5 min en hielo. Tras la incubación se centrifugó 10 min a 4500 rpm a 4°C y se filtró a través de una gasa hidrófila médica.

Al lisado obtenido se le añadió HEPES pH 7.2 a una concentración final de 10 mM y DNAsa I a una concentración final de 2 U/ml. Se incubó en hielo durante 30 min y seguidamente se transfirió a 2 tubos de polialómero de 38.5 ml en los que previamente se había añadido a cada uno 5 ml de sacarosa al 50%. Se centrifugó en una ultracentrífuga a 11000 rpm durante 20 min a 4°C. Por otro lado se preparó un gradiente de sacarosa usando soluciones del 40%, 50% y 70% de sacarosa que se añadieron en un tubo de polialómero de abajo a arriba: 5 ml del 70%, 3 ml del 50% y 3 ml del 40%. Tras la centrifugación se descartó la fracción superior de los tubos hasta dejar un volumen de 15 ml en cada tubo. Se mezclaron ambas fracciones y se depositaron en la parte superior del gradiente de sacarosa. Se centrifugó a 25000 rpm durante 75 min a 4°C. Tras centrifugar se perforó el tubo en su parte inferior con una aguja de tamaño 25 GA ^{2/8} y se recogieron fracciones de 1 ml. Estas fracciones se analizaron posteriormente por western-blot.

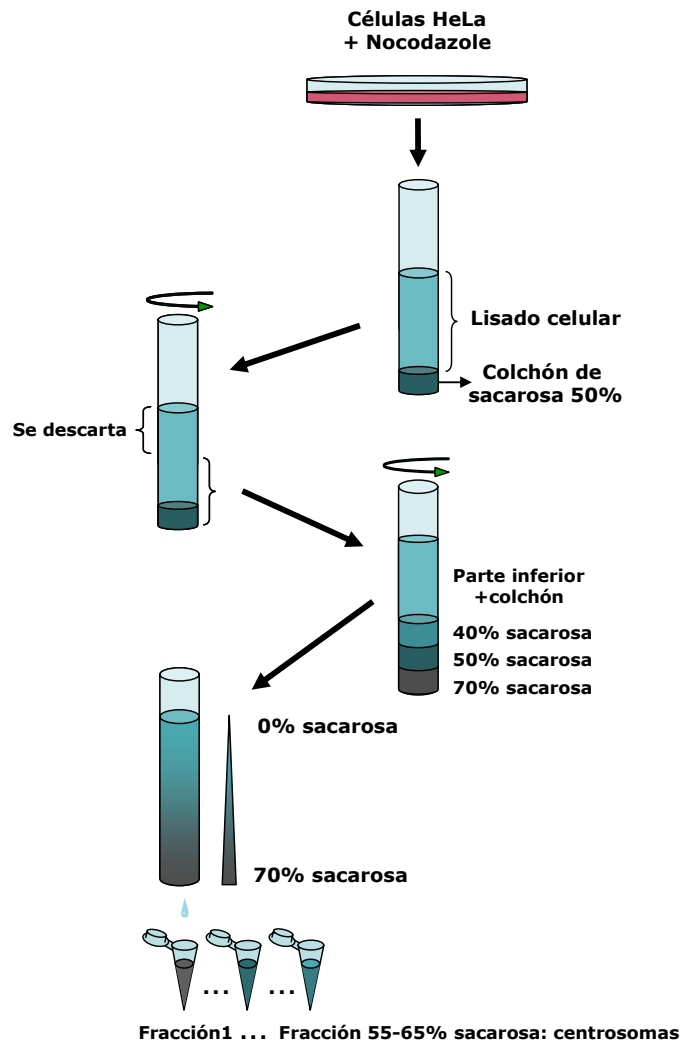


Figura II.2: Esquema de los pasos seguidos en el protocolo de aislamiento de centrosomas.

Inmunofluorescencia de las fracciones obtenidas en el aislamiento de centrosomas

Para realizar la inmunofluorescencia de las fracciones obtenidas en el aislamiento de centrosomas se utilizaron cubreobjetos de 12 mm

guardados en etanol a los cuales se les eliminó el etanol sumergiéndolos en dH₂O previamente a su uso. Las fracciones se diluyeron en 5 ml de 10 mM K.PIPES pH 7.2 y se mezclaron por inversión. Seguidamente se transfirieron a tubos Corex con adaptadores donde se ponían los cubreobjetos. Estos se centrifugaron en un rotor HB4 durante 15 min 4°C 12000 rpm. Tras la centrifugación, los cubreobjetos se fijaron con metanol a -20°C durante 10 min. Después se lavaron 3 veces con PBS 1X y se bloquearon durante 15 min con BSA al 1% en PBS. Se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS 1X para eliminar el exceso de BSA y se incubaron con el anticuerpo primario anti-C-NAP1 diluido en 5% BSA durante 1 h. Tras tres lavados con PBS 1X se incubaron con un anticuerpo secundario Alexa 633 diluido 1:1000 en 5% BSA durante 1 h.

Las imágenes se capturaron con un microscopio invertido (Nikon,UK) usando una cámara ORCA ER CCD (Hamamatsu, Japan) y un software Openlab 5 (Improvision, UK).

2.7. Estudios de movilidad electroforética retardada (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay)

2.7.1. Obtención de extractos nucleares a partir de células de mamífero

Tampones especiales

Tampón A: 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT y 1X de Complete®.

Tampón C: 20 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 1X de Complete®.

Para la obtención de extractos nucleares se siguió el protocolo descrito en Schreiber 1989 (Schreiber et al., 1989) con algunas

modificaciones como se detalla a continuación. Las células NIH-3T3 ayunadas o ayunadas+estimuladas 90 min con 10% NBS, se lavaron 2 veces con PBS frío 1X y se recogieron por raspado en 1 ml de tampón TEN. Tras centrifugar se resuspendieron en 400 µl de tampón A y se incubaron 15 min en hielo. Después se añadió 25 µl de una solución al 10% de NP-40 y se agitaron con vortex durante 10 seg. El homogeneizado se centrifugó 1 min a 14000 rpm a 4°C obteniéndose un precipitado de núcleos. Los núcleos fueron lavados 2 veces con tampón A y seguidamente se resuspendieron en 50 µl de tampón C. Se agitaron en un vortex durante 45 min en una cámara fría. Tras la incubación, el extracto nuclear se centrifugó obteniéndose un sobrenadante y un precipitado que correspondían a la fracción nuclear soluble y a la fracción de membranas nucleares respectivamente. En este ensayo se utilizó la fracción nuclear soluble.

2.7.2. Marcaje radioactivo de la sonda

El material radiactivo empleado en este ensayo fue [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP.

Sonda doble cadena AP-1: 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'
3'-GCGAACTACTCAGTCGGCCTT-5'

Se incubó en un tubo con tapa de rosca 1 µl de 1 pmol/µl de oligonucleótido de doble cadena, 1 µl tampón de la polinucleótido quinasa 10X (PNK) y 6.5 µl dH₂O a 65°C durante 5 min para desestabilizar las estructuras secundarias. Seguidamente se enfrió en hielo y se añadió 1 µl de PNK y 1 µl [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP (10µCi/µl) y se incubó a 37°C durante 45 min para la reacción de marcaje. La reacción se detuvo en hielo y se completó el volumen hasta 100 µl con agua milli-Q®. La sonda se purificó en una columna de Sephadex G-50 y se procedió al conteo en un contador de centelleo.

2.7.3. Ensayo EMSA

Gel separativo en condiciones nativas

Se trabajó con un gel al 5% de poliacrilamida (80:1, acrilamida:bisacrilamida) con TBE 0.5X en condiciones nativas.

Tampones específicos

TBE 5X: 445 mM Tris, 445 mM ácido bórico, 12.5 mM EDTA pH 8.0

Tampón de unión 5X: 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 y 20% glicerol.

Tampón de carga 5X: 36 mg de xilencianol, 1.8 ml de tampón de EMSA 5X (Tris pH 7.5 50 mM, KCl 100 mM, DTT 2 mM, NP-40 al 0.1%, glicerol al 4% y MgCl₂ 1 mM y 50 µg/ml de poli(d(I-C)) en 10 ml finales.

Se incubaron 2.5 µg del extracto nuclear soluble junto con 0.8 µg de GST o GST-C-NAP1Ct (Apartado 2.2 de este Capítulo) durante 45 min a 4°C. Seguidamente se añadió 4 µl de tampón de unión 5X, 1 µl de poli(d(I-C)) (1 mg/ml) y se añadió agua milli-Q® hasta un volumen final de 18 µl, incubándose en hielo durante 10 min para bloquear uniones inespecíficas. A continuación se añadió 1 µl de sonda marcada (50.000-100.000 cpm/reacción) y se incubó durante 30 min en hielo. Finalmente se añadió 1 µl de tampón de carga a cada tubo y se separaron las muestras mediante electroforesis nativa en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón TBE 0.5% durante 2 horas a 180 mV. Tras la electroforesis, se procedió al secado en vacío de los geles y su análisis por autoradiografía. Los controles que se realizaron fueron: mezcla de reacción sin extracto y ensayo de competición incubando la mezcla de reacción con un exceso de 1:50 de sonda fría (sonda radiactiva:sonda fría) durante 10 min en hielo previamente a la adición de la sonda radiactiva.

CAPÍTULO III

Resultados

1. Búsqueda de nuevas interacciones de c-Fos con proteínas celulares por ensayo de doble híbrido en levaduras

1.1. Trabajos previos

Con la finalidad de buscar nuevas interacciones del factor de transcripción c-Fos con otras proteínas y conocer mejor los mecanismos que intervienen en la regulación de este factor de transcripción, se llevó a cabo en el laboratorio del Prof. Vicente Andrés un escrutinio genético de doble híbrido en levaduras. Este tipo de ensayo permite identificar proteínas que se asocian físicamente en un sistema *in vivo* y está basado en la activación transcripcional de genes reportero, integrados en el genoma de la levadura modificada. Para ello se usó como cebo el proto-oncogen c-Fos y como presa una librería de expresión de ADNc de timocito de ratón. Debido a que c-Fos es un factor de transcripción, se ensayaron diferentes fragmentos de c-Fos y se escogió aquella región que no autoactivaba el sistema del doble híbrido *per se*. Este fragmento correspondía a los aminoácidos 123-230 de c-Fos, el cual contenía el dominio b-ZIP. Estos estudios dieron lugar a la identificación de dos interacciones no descritas previamente: c-Fos-lamina A/C (Tesis Doctoral realizada por Carmen Ivorra (Ivorra et al., 2006)) y un clon denominado inicialmente 17.1, que se subclonó en el plásmido pGEX-4T-1 (ver Apartado 2.2 Materiales y Métodos). La caracterización de la interacción entre c-Fos y el clon 17.1 ha sido el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

1.2. Identificación del clon 17.1

En primer lugar se procedió a la identificación del clon 17.1 mediante secuenciación y comparación de la secuencia nucleotídica con las bases de datos del NCBI utilizando la aplicación informática *BLAST*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. En esta búsqueda se encontraron

varias secuencias con una homología elevada con el clon 17.1, destacando una identidad del 99% con la región C-terminal de las secuencias NM_008383 y DQ148475.1, correspondientes a la proteína murina CEP2. También se encontró una identidad alta (78%) con la secuencia AAC07988 correspondiente a la proteína ortóloga en humanos de CEP2, denominada CEP2 o C-NAP1.

Se concluye por tanto que el clon 17.1 se corresponde con un fragmento del extremo C-terminal (aa 2080-2414) de la proteína centrosomal murina CEP2 (CEP2Ct).

2. Interacción entre c-Fos y CEP2

2.1. Objetivos

- 1) Comprobar que la interacción entre c-Fos y CEP2Ct observada en el sistema de doble híbrido, se produce también en células de mamífero.
- 2) Identificar las regiones responsables de la interacción entre c-Fos y CEP2Ct.

2.2. Interacción entre c-Fos y GST-CEP2Ct

Para verificar la interacción entre c-Fos y CEP2Ct observada en levaduras, se realizó un ensayo de arrastre con GST utilizando la proteína de fusión GST-CEP2Ct y GST frente a un lisado de células de mamífero (NIH-3T3) que presentaban c-Fos inducido. En la figura III.1 se muestra un western-blot anti-c-Fos de lisados totales de células NIH-3T3 crecidas en asincronía, ayunadas 48 h y ayunadas+estimuladas 90 min con 10% NBS. Se observa que en condiciones de asincronía o ayuno los niveles de c-Fos son indetectables por esta técnica. Por lo tanto, para la obtención de unos niveles altos de expresión de la proteína c-Fos en el lisado celular, se utilizaron células NIH-3T3 ayunadas durante 48 horas

y estimuladas 90 min con 10% de NBS antes de su recogida (Greenberg and Ziff, 1984). El lisado de las células NIH-3T3 se obtuvo como se indica en el Apartado 1.7.1 Materiales y Métodos.

Para la obtención de GST y la proteína recombinante GST-CEP2Ct se procedió a la expresión en bacterias de pGEX-4T-1 vacío o pGEX-4T-1-CEP2Ct (Apartado 2.2 Materiales y Métodos).

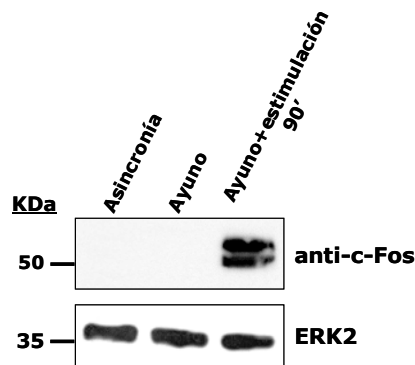


Figura III.1: Expresión de c-Fos endógeno en células NIH-3T3. Western-blot anti-c-Fos y anti-ERK2, como control de carga, de lisados proteicos de células NIH-3T3 crecidas asincrónicamente, ayunadas 48 horas con 0.1% NBS y ayunadas 48 horas + estimuladas 90 minutos con 10% NBS.

Las proteínas retenidas en el ensayo de arrastre por GST se analizaron por western-blot como se muestra en la figura III.2, donde se observa que GST-CEP2Ct, pero no GST, es capaz de arrastrar c-Fos endógeno del lisado de células NIH-3T3, poniendo de manifiesto la interacción entre c-Fos y CEP2Ct *in vitro*. En el western-blot anti-c-Fos del extracto crudo se observa que la misma cantidad de c-Fos fue incubada con ambas proteínas recombinantes. También se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-GST con el fin de mostrar la presencia de las proteínas recombinantes GST y GST-CEP2Ct.

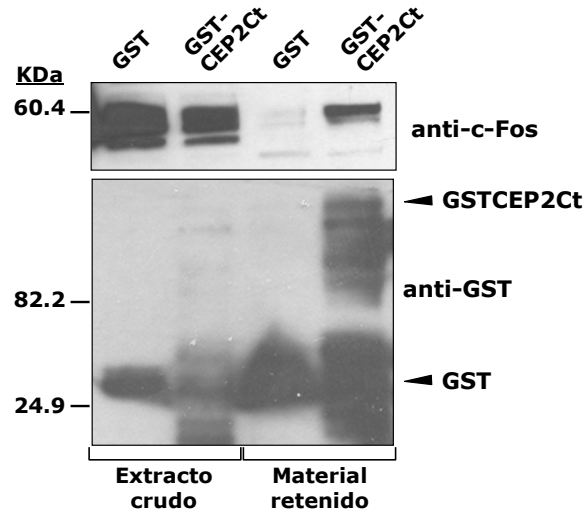


Figura III.2: Interacción de CEP2Ct y c-Fos *in vitro*. Ensayo de arrastre con GST-CEP2Ct (2080-2414) o GST utilizando un lisado de células NIH-3T3 ayunadas 48 horas y estimuladas 90 min con 10 % NBS (para inducir la expresión de c-Fos). 3µg de GST-CEP2Ct ó 3µg de GST (control negativo) fueron incubados con 250µg de extractos celulares. El extracto crudo y el material retenido se analizó por SDS-PAGE y la presencia de c-Fos fue comprobada por medio de western-blot utilizando un anticuerpo anti-c-Fos. En el panel inferior se muestra la presencia de GST y GST-CEP2Ct utilizando un anticuerpo anti-GST. En el caso del extracto crudo se cargó 1/15 de la mezcla inicial.

Este resultado obtenido en el ensayo de arrastre con GST-CEP2Ct confirma la interacción observada en el doble híbrido y demuestra que CEP2Ct es capaz de interactuar con c-Fos endógeno de células NIH-3T3 murinas.

2.3. Identificación de las regiones de CEP2Ct implicadas en la interacción con c-Fos

La proteína CEP2 murina no ha sido estudiada hasta el momento ni a nivel estructural ni a nivel funcional. Sólo se conoce su posible función a través de su homología con CEP2 humana (Fry et al., 1998a). CEP2 humana se denomina también C-NAP1, de modo que para facilitar

la comprensión de este texto se utilizará la denominación de CEP2 cuando se haga referencia a la proteína murina y C-NAP1 para la proteína humana.

Una vez confirmada la interacción utilizando extractos totales de células de mamífero se procedió a la caracterización de los dominios de CEP2Ct implicados en la interacción con c-Fos. Para ello se utilizaron dos métodos diferentes: un ensayo de doble híbrido en levaduras y un experimento de arrastre con GST en extractos de células de mamífero.

Con este fin se analizó la estructura secundaria de CEP2 utilizando un programa informático que, basándose en estructuras secundarias conocidas, compara y predice la estructura secundaria teórica de CEP2 (**PredictProtein** (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>)). Este programa dio como resultado una estructura secundaria teórica para CEP2 que comprendía una serie de dominios “coiled-coil”.

La división de la secuencia nucleotídica que codificaba para la proteína CEP2Ct, se realizó en base a la estructura secundaria predicha para la proteína, teniendo también presente la localización del motivo cremallera de leucinas, el cual está ampliamente descrito como motivo de dimerización entre proteínas (ver Apartado 1.1 Estructura, Introducción). Así, se dividió el clon CEP2Ct (aa 2080-2414) en cinco fragmentos que comprendían los aminoácidos siguientes (ver Fig. III.3):

- Fragmento aa 2080-2192: región inicial que comprendía aminoácidos pertenecientes a un “coiled-coil” teórico.
- Fragmento aa 2194-2232: región previa al motivo cremallera de leucinas que contenía los aminoácidos comprendidos entre dos “coiled-coil” teóricos.
- Fragmento aa 2233-2293: región que comprendía un segundo “coiled-coil”, el cual contenía el motivo cremallera de leucinas.
- Fragmento aa 2239-2267: región que comprendía exclusivamente el motivo cremallera de leucinas.

- Fragmento aa 2294-2341.

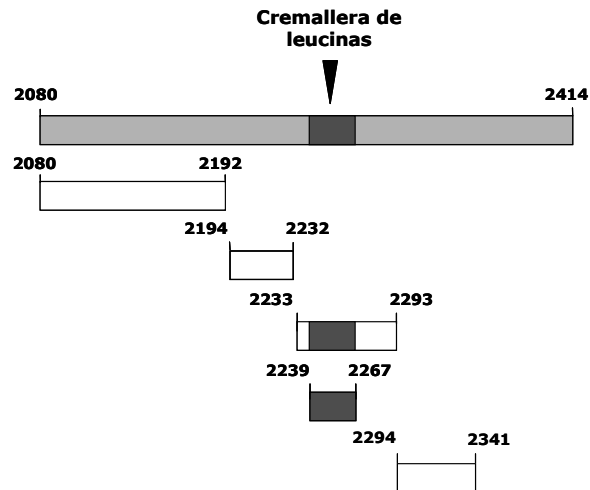


Figura III.3: Esquema representativo de los fragmentos de CEP2Ct.

2.3.1. Mapeo por doble híbrido en levaduras

En experimentos previos realizados en el laboratorio del Prof. Vicente Andrés se determinó el fragmento polipeptídico de c-Fos, que comprendía los aa 123-230, como la única región de c-Fos que no era capaz de autoactivar el sistema del doble híbrido en levaduras *per se*. Esta región comprende un dominio b-ZIP (dominio básico + cremallera de leucinas). Por ello, se cotransformó la cepa TAT7 de *S. cerevisiae* con los plásmidos pBTM116-bZIP-c-Fos (123-230) y pACTII-HA- con los diferentes fragmentos de CEP2Ct descritos anteriormente (Apartado 2.1 Materiales y Métodos). Las células se sembraron en placas de medio SC-Leu-Trp y se incubaron a 30°C durante 3 días (ver Apartado 2.1 Materiales y Métodos).

Como se indica en la figura III.4, A, las colonias donde las dos proteínas quiméricas habían interactuado y se había producido la transcripción del gen reportero LacZ, mostraban un color azul al añadir al medio el sustrato de la β -galactosidasa. Los resultados del ensayo fueron cualitativos, diferenciando entre las colonias positivas que presentaban color azul y las colonias negativas que no presentaban color azul.

Se comprobó la correcta expresión de los fragmentos de CEP2 por western-blot del extracto total de levaduras usando un anticuerpo anti-HA (epítipo de etiquetado de los vectores pACTII-HA-CEP2). Todas las construcciones se expresaron correctamente, mostrando un tamaño similar al esperado, salvo la construcción que correspondía a los aa 2080-2192 de CEP2, que no se consiguió expresar (Fig. III.4,B).

El resultado de este experimento, figura III.4, A, mostró que la interacción entre CEP2Ct y c-Fos requiere un fragmento que comprendía los aminoácidos 2233-2293 de CEP2, el cual incluía un motivo en cremallera de leucinas. Sin embargo, la interacción no se producía con un fragmento restringido exclusivamente a este motivo proteico (aa 2239-2267), sugiriendo que la cremallera de leucinas de CEP2 es necesaria pero no suficiente para que se produzca la interacción con c-Fos.

Como control positivo se utilizó una interacción, pACTII-SNX6/pBTM-p27, ya descrita anteriormente en resultados obtenidos durante el desarrollo de la Tesis Doctoral de Mariló Edo (Edo, 2006).

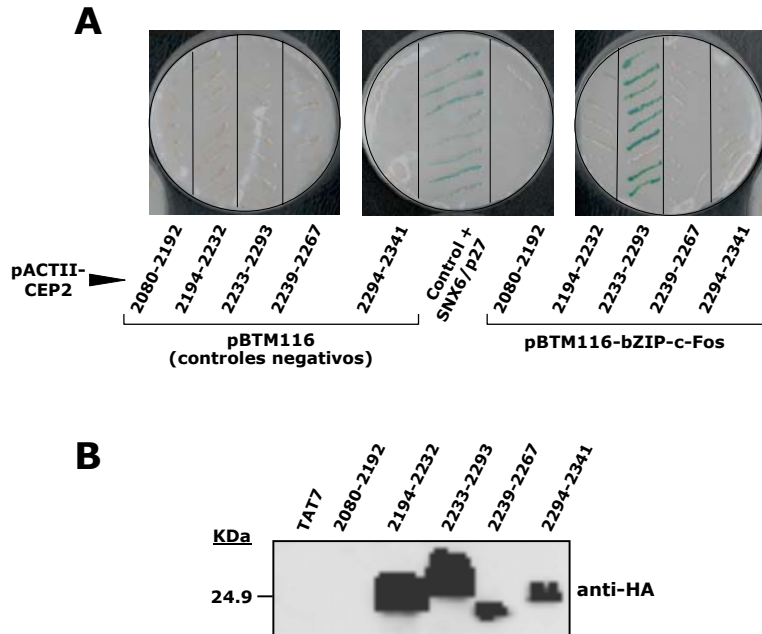


Figura III.4: Determinación de la región de CEP2Ct que interacciona con c-Fos por ensayo β-galactosidasa. El fragmento 123-230 de c-Fos, que contiene el dominio b-ZIP, interacciona con el fragmento 2233-2293 de CEP2, que contiene también un motivo cremallera de leucinas. **A)** Ensayo de actividad β-galactosidasa en filtro. La cepa de levadura TAT7 se cotransformó con los plásmidos pBTM116-bZIP-c-Fos (123-230) y cada una de las siguientes construcciones de CEP2: pACTII-HA-CEP2 (2080-2192), (2194-2232), (2233-2293), (2239-2267) y (2294-2341). Como controles negativos se transformó TAT7 con pACTII-HA-CEP2 (los diferentes fragmentos) y pBTM116 vacío. Como control positivo se utilizó la interacción entre SNX6/p27 (Tesis de Mariló Edo). **B)** Western-blot anti-HA del extracto proteico de las levaduras transformadas utilizadas en el ensayo β-galactosidasa.

2.3.2. Mapeo *in vitro* por arrastre con proteínas GST

Una vez se había observado por doble híbrido en levaduras que la región de CEP2Ct implicada en la interacción con c-Fos comprendía los aminoácidos 2233-2293 de CEP2, se procedió a la verificación de este resultado mediante la técnica de arrastre por GST y posterior western-blot. Para ello, se expresaron en bacterias las proteínas de fusión GST-

con los correspondientes fragmentos de CEP2 testados anteriormente en el ensayo de doble híbrido. Se procedió a realizar el ensayo de arrastre con estas proteínas quiméricas frente a un lisado de células de mamífero (NIH-3T3) ayunadas y estimuladas 90 min con NBS (Apartado 2.2 de Materiales y Métodos). El material retenido se analizó por western-blot con un anticuerpo anti-c-Fos. En la figura III.5 se observa que el fragmento GST-CEP2 (2233-2293) es el único capaz de interactuar con c-Fos endógeno de células de mamífero. Para comprobar la expresión de las proteínas quiméricas, se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-GST. La construcción correspondiente a los aa 2194-2232 no se testó.

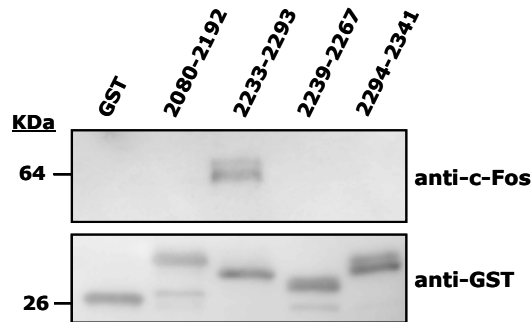


Figura III.5: Determinación de la región de CEP2Ct que interactúa con c-Fos por ensayo de arrastre con GST. Ensayo de arrastre con los diferentes fragmentos GST-CEP2 (2080-2192), (2233-2293), (2239-2267) y (2294-2341) frente a un lisado de células NIH-3T3 ayunadas 48 horas y estimuladas 90 minutos con 10% NBS para la obtención de un pico de la expresión de c-Fos. La presencia de c-Fos fue comprobada por medio de western-blot con un anticuerpo anti-c-Fos y la de GST y fragmentos GST-CEP2 utilizando un anticuerpo anti-GST.

Los resultados del ensayo de arrastre con GST corroboran los resultados obtenidos por doble híbrido. Considerando conjuntamente los resultados hasta ahora presentados, se puede afirmar que la interacción entre CEP2 y c-Fos se produce a través de la región que comprende los aa 2233-2293 de CEP2. Cabe destacar que el fragmento de CEP2, aa 2080-

2192, que no se expresó en levaduras, se expresaba en bacterias por lo que se testó en el ensayo de arrastre con GST, y a su vez, el fragmento de CEP2 aa 2194-2232 que no se testó en el ensayo de arrastre con GST, sí se testó en el doble híbrido, dando ambos fragmentos un resultado negativo.

Estos resultados se muestran en su conjunto en el siguiente esquema.

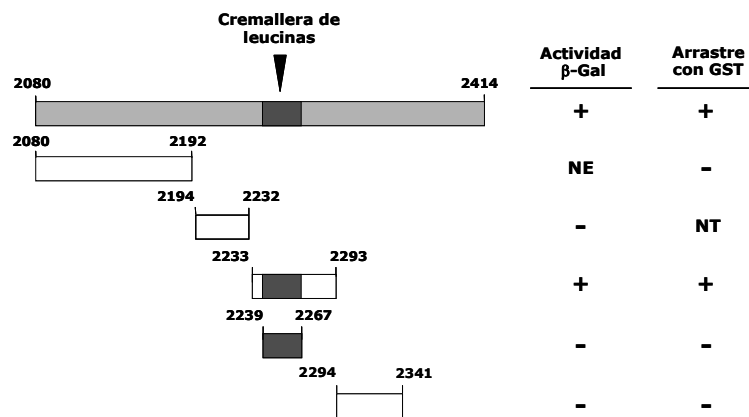


Figura III.6: Esquema de los resultados obtenidos en el mapeo de la interacción entre c-Fos y CEP2Ct. Resultados obtenidos en ensayos β-Gal y ensayos de arrastre con GST. NE: no expresado; NT: no testado

2.4. Mutagénesis de las leucinas del motivo en cremallera de leucinas de CEP2

Como se había observado en el apartado 2.3, la región de CEP2 que interaccionaba con c-Fos presentaba un motivo cremallera de leucinas, al igual que el fragmento de c-Fos que se había testado en el doble híbrido. Este motivo está descrito como región de unión entre factores de

transcripción (Glover and Harrison, 1995), y esta unión es debida a fuerzas hidrofóbicas entre las leucinas (Rasmussen et al., 1991). En este contexto se quiso evaluar la importancia de las leucinas del motivo cremallera de leucinas de CEP2 en la interacción con c-Fos. Para ello se realizó una mutagénesis dirigida frente a una, dos o tres leucinas de la cremallera de leucinas de CEP2, obteniendo tres mutantes diferentes: L2253Q, L2239S-L2267Q y L2239S-L2253Q-L2267Q.

Seguidamente, se analizaron los mutantes generados mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras, donde se cotransformó la cepa TAT7 de *S. cerevisiae* con pBTM116-bZIP-c-Fos (123-230) y pACTII-CEP2 (2233-2293) o con los mutantes L2253Q, L2239S-L2267Q y L2239S-L2253Q-L2267Q según el protocolo descrito en Apartado 2.1 Materiales y Métodos. Las células se sembraron en placas de medio SC-Leu-Trp y se incubaron a 30°C durante 3 días. Como se muestra en la figura III.7, A, cuando se ensayaba la proteína mutada de CEP2 en una, dos o tres leucinas no se producía la interacción con c-Fos. Así, aunque la cremallera de leucinas de CEP2 no es suficiente, si que es necesaria para que se dé la interacción con c-Fos.

Se comprobó la correcta expresión de las proteínas quiméricas por western-blot anti-HA del extracto total de las levaduras utilizadas en el ensayo β -galactosidasa (Fig. III.7,B).

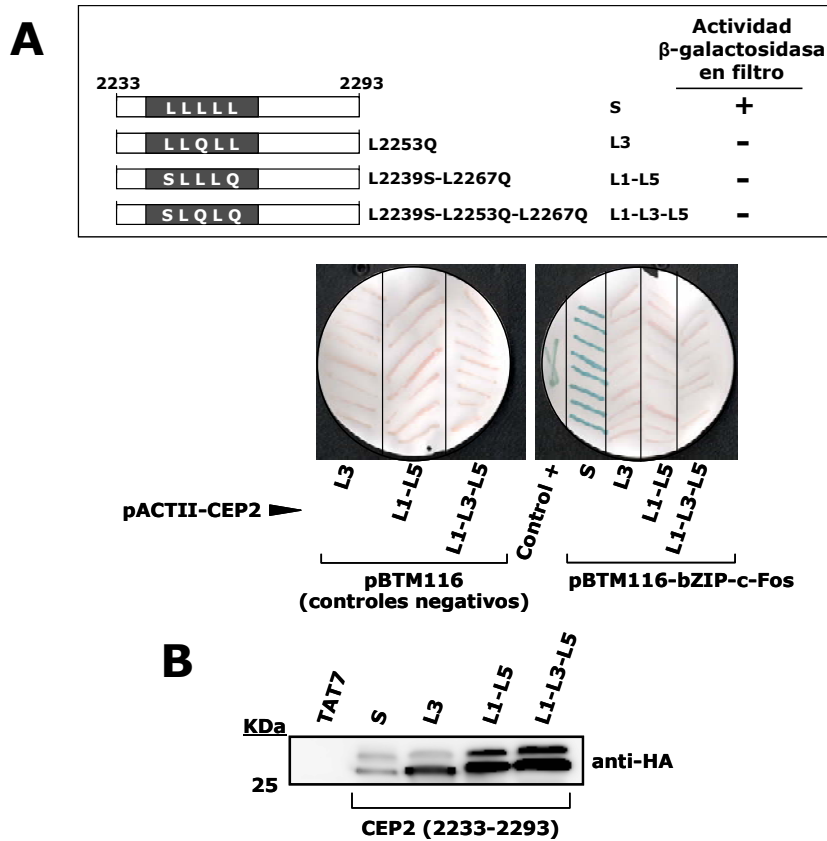


Figura III.7: La mutación de leucinas en la cremallera de leucinas de CEP2Ct elimina la interacción entre CEP2Ct y c-Fos en un ensayo β -galactosidasa en filtro. Usando un kit de mutagenesis dirigida (QuickChange Multi Site-Direct Mutagenesis Kit) se mutaron una, dos o tres leucinas de la cremallera de leucinas del fragmento 2233-2293 de CEP2Ct (S: Silvestre) obteniéndose los siguientes mutantes: L2253Q (L1), L2239S-L2267Q (L1-L2) y L2239S-L2253Q-L2267Q (L1-L2-L3). **A)** Se realizó un ensayo de actividad β -galactosidasa en filtro cotransformando TAT7 con la construcción silvestre de CEP2Ct (fragmento 2233-2293) o cada una de sus versiones mutadas y c-Fos (123-230). **B)** Western-blot anti-HA del extracto total de las levaduras utilizadas en el ensayo β -galactosidasa.

En resumen, los resultados de los experimentos *in vitro* sugieren que las proteínas CEP2 y c-Fos interactúan a través de sendos motivos en cremallera de leucinas.

3. Interacción entre c-Fos y C-NAP1

Una vez realizados los experimentos de interacción entre c-Fos y CEP2 murinos, se decidió analizar la interacción entre las proteínas humanas c-Fos y C-NAP1. C-NAP1 presenta una identidad del 80% con su ortóloga murina, pero cabe destacar que C-NAP1 presenta también un dominio en cremallera de leucinas, pero de sólo cuatro leucinas, en lugar de las cinco de CEP2 (Fig. III.8). En la siguiente figura se muestra el alineamiento de las secuencias C-terminal de CEP2 y C-NAP1. En verde se destacan los residuos de leucinas pertenecientes al motivo cremallera de leucinas.

3.2. Interacción entre c-Fos y GST-C-NAP1Ct *in vitro*

Los resultados obtenidos con la proteína murina CEP2, ponían de manifiesto que la interacción con c-Fos se producía a través de la región que comprendía un motivo en cremallera de leucinas. En este contexto, se decidió evaluar si esta interacción se producía también entre las proteínas humanas a pesar de la disminución de cinco a cuatro leucinas en la cremallera de leucinas de C-NAP1. Para ello se decidió realizar ensayos de arrastre con GST.

C-NAP1 tiene un tamaño aproximadamente de 250KDa lo que podría explicar que no se consiguiese sobreexpresar la proteína completa en células humanas. Por este motivo, se utilizó para los experimentos la zona C-terminal (aa 1978-2442) de C-NAP1 (C-NAP1Ct) que contiene el motivo cremallera de leucinas. Además, también se testó la importancia de las leucinas del motivo cremallera de leucinas, mutando la leucina ortóloga a la que es suficiente para eliminar la interacción entre c-Fos y CEP2. A partir del plásmido pGEX-4T-1-C-NAP1Ct cedido por el Dr. A.M. Fry se obtuvo el mutante que se denominó C-NAP1Ctm1(L2282Q) por mutagénesis dirigida de la leucina (L) 2282 a glutamina (Q) (Apartado 2.3 Materiales y Métodos). En un primer experimento se sobreexpresó c-Fos transfectando células HeLa con el plásmido p-CMV-HA-c-Fos (Apartado 1.5 Materiales y Métodos) y se obtuvo un lisado celular que se incubó con GST (como control negativo), GST-C-NAP1Ct o GST-C-NAP1Ctm1(L2282Q). En la figura III.9 se muestra un western-blot anti-HA, donde se observa que la forma mutante de GST-C-NAP1Ctm1(L2282Q) presenta mucha menos interacción con c-Fos comparado con el fragmento silvestre GST-C-NAP1Ct. Con el fin de comprobar que las cantidades de las proteínas GST utilizadas eran similares, se realizó seguidamente una inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-GST.

Estos resultados confirmaban los resultados obtenidos en los experimentos realizados con las proteínas murinas.

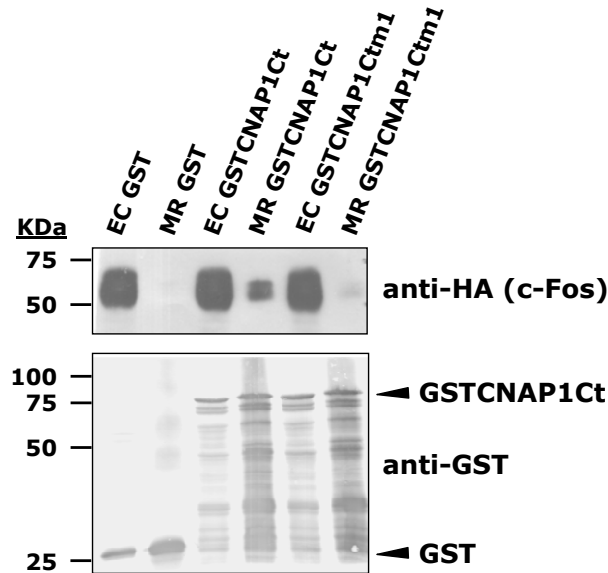


Figura III.9: La mutación de una de las leucinas de la cremallera de leucinas de C-NAP1Ct elimina la interacción *in vitro* entre C-NAP1Ct y HA-c-Fos. Ensayo de arrastre de GST-C-NAP1Ct (1978-2442), GST-C-NAP1Ctm1(L2282Q) y HA-c-Fos. Se incubaron 3 μ g de las proteínas GST recombinantes ó 3 μ g de GST (control negativo) con 250 μ g de extractos celulares de células HeLa transfectadas con HA-c-Fos. La presencia de c-Fos fue comprobada por medio de western-blot utilizando un anticuerpo anti-HA. En el panel inferior se muestra la presencia de las proteínas GST utilizando un anticuerpo anti-GST. En el caso del extracto crudo (EC) se cargó 1/15 de la mezcla inicial. Material retenido (MR).

El siguiente paso fue comprobar la interacción utilizando c-Fos endógeno. Para ello se indujo la sobreexpresión de c-Fos endógeno sometiendo a las células humanas HeLa a un ayuno de 48h y estimulación de 90 min con 10% FBS. El lisado total de estas células se incubó con GST (como control negativo), GST-C-NAP1Ct o GST-C-NAP1Ctm1(L2282Q). Los resultados de la figura III.10 muestran que la proteína quimérica GST- C-NAP1Ct, pero no GST, es capaz de unir c-Fos

endógeno humano, y que esta interacción disminuye cuando el extracto se incubaba con la forma mutada C-NAP1Ctm1(L2282Q).

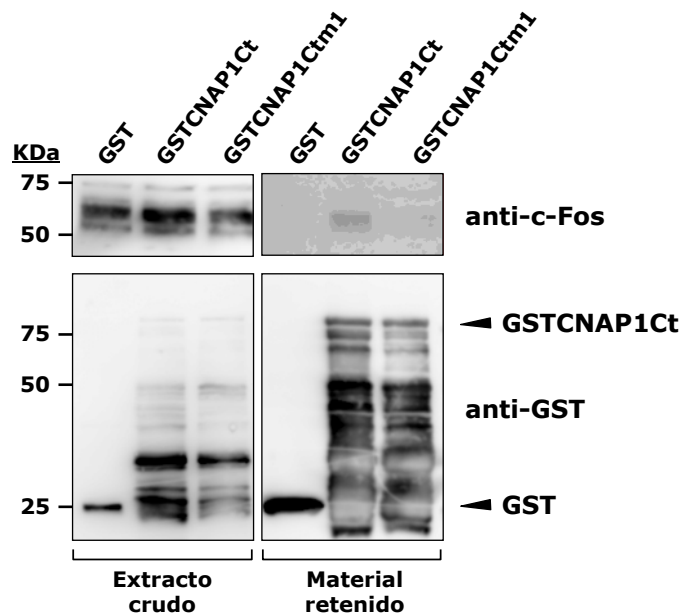


Figura III.10: La mutación de una de las leucinas de la cremallera de leucinas de C-NAP1Ct elimina la interacción *in vitro* entre C-NAP1Ct y c-Fos endógeno de células humanas. Ensayo de arrastre con GST-C-NAP1Ct (1978-2442) y GST-C-NAP1Ctm1(L2282Q) frente a un lisado de células HeLa ayunadas 48 horas y estimuladas 90 minutos con 10% FBS que contenía c-Fos. La presencia de c-Fos fue comprobada por medio de western-blot utilizando un anticuerpo anti-c-Fos. En el panel inferior se muestra la presencia de las proteínas GST utilizando un anticuerpo anti-GST. En el caso del extracto crudo se cargó 1/15 de la mezcla de interacción inicial.

3.3. Interacción entre c-Fos y C-NAP1Ct *in vivo*

Una vez demostrado *in vitro* que también se producía la interacción entre las proteínas humanas c-Fos y C-NAP1, se decidió examinar a continuación la interacción entre ambas proteínas humanas *in vivo*. Con este fin se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación y análisis

mediante western-blot, según el protocolo que se detalla en el Apartado 2.4 Materiales y Métodos.

En la figura III.11 se muestra un ensayo de coimmunoprecipitación con extractos obtenidos de células humanas HeLa crecidas asincrónicamente en presencia de suero y transfectadas con los plásmidos pCMV-HA-c-Fos y pRcCMV-myc-C-NAP1Ct o la forma mutante en tres leucinas pRcCMV-myc-C-NAP1Ctm3 (L2275Q,L2282Q y L2289Q). Una vez obtenidos los lisados totales de las células HeLa (Apartado 1.7 Materiales y Métodos), los extractos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-c-myc y el material inmunoprecipitado se analizó por western-blot. El panel superior corresponde a un 1/50 del extracto crudo de células HeLa sin transfectar o transfectadas como se indica para cada carril, mostrándose que los extractos expresaban las proteínas transfectadas c-myc-C-NAP1Ct o c-myc-C-NAP1Ctm3 y HA-c-Fos con un western-blot anti-c-myc o anti-HA, respectivamente. En el panel inferior se analizó por western-blot el material inmunoprecipitado: con un anticuerpo anti-c-myc para comprobar la inmunoprecipitación de c-myc-C-NAP1Ct y c-myc-C-NAP1Ctm3 y con un anticuerpo anti-HA para detectar la coimmunoprecipitación de HA-c-Fos. Se observa que sólo se detecta HA-c-Fos en el carril 5, donde se encontraban sobreexpresados conjuntamente c-myc-C-NAP1Ct silvestre y HA-c-Fos. Como controles negativos se usaron células sin transfectar o transfectadas individualmente con HA-c-Fos, c-myc-C-NAP1Ct o c-myc-C-NAP1Ctm3.

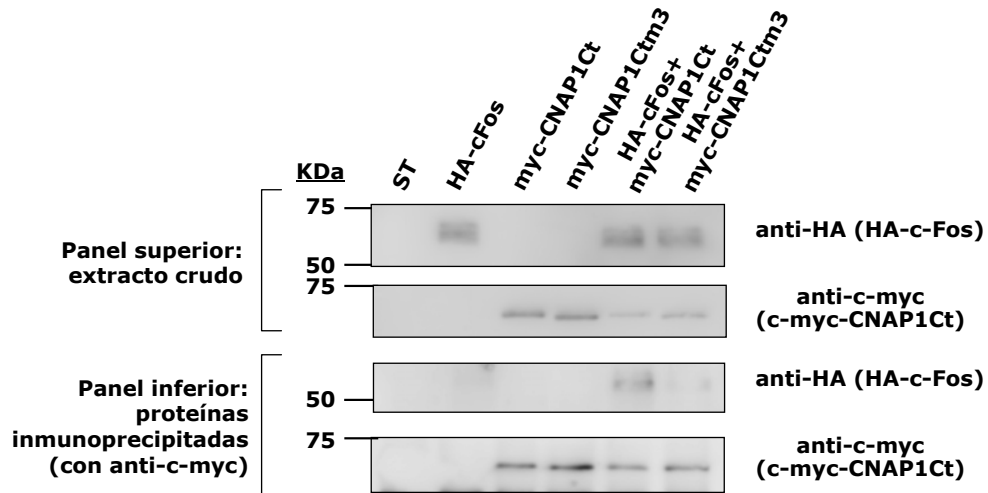


Figura III.11: HA-c-Fos y C-NAP1Ct, pero no HA-c-Fos y C-NAP1Ctm3, interaccionan *in vivo* en células humanas. Inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-c-myc de extractos totales de células HeLa asincrónicas transfectadas con c-myc-C-NAP1Ct o c-myc-C-NAP1Ctm3 y HA-c-Fos. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por SDS-PAGE y western-blot utilizando los anticuerpos anti-c-myc o anti-HA. En el panel superior se muestran 1/50 de los extractos totales (5 mg) de células HeLa sin transfectar (ST) o transfectadas como se indica y en el panel inferior se muestran las proteínas inmunoprecipitadas.

4. Localización subcelular de c-Fos y C-NAP1

4.1. Objetivo

- 1) Estudiar la localización subcelular de c-Fos/C-NAP1.

4.2. Ensayos de colocalización por inmunofluorescencia

Como se ha descrito en la Introducción, C-NAP1 se localiza en la zona proximal de los centriolos del centrosoma. El primer paso fue comprobar que C-NAP1 se localizaba en los centrosomas de las líneas

celulares utilizadas en los ensayos de doble híbrido y arrastre con GST, además de en U2OS, otra línea celular humana. Para ello se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia para detectar simultáneamente C-NAP1 y un marcador centrosomal ampliamente descrito como es la proteína γ -tubulina (ver Apartado 2.5 Materiales y Métodos).

Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-C-NAP1 y anti- γ -tubulina en dos líneas celulares humanas diferentes: HeLa y U2OS. Para ello se utilizó una combinación de anticuerpos secundarios fluorescentes que permitiese detectar las dos proteínas en una misma preparación. En el caso de células HeLa se optimizó la inmunofluorescencia usando un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado, para γ -tubulina, seguido de una incubación con estreptavidina-Alexa633 y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a FITC para detectar C-NAP1. Para células U2OS se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado, para detectar C-NAP1, seguido de una incubación con estreptavidina-Alexa 633 y un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC para detectar γ -tubulina. En ambas inmunofluorescencias se realizó un control de inespecificidad de los anticuerpos (ver Apartado 2.5 Materiales y Métodos). Este consistió en la incubación de las células con el anticuerpo primario anti-C-NAP1 y los dos anticuerpos secundarios o la incubación con el anticuerpo primario de γ -tubulina y los dos anticuerpos secundarios. Como se observa en las figuras III.12 y 13 A, sólo se detecta señal del anticuerpo primario utilizado en cada caso. Como se muestran en las siguientes figuras, C-NAP1 colocaliza con γ -tubulina tanto en células HeLa (Fig. III.12,C) como en células U2OS (Fig. III.13,C). En las gráficas se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de emisión del fluorocromo Alexa633 (en rojo) y FITC (en verde), a lo largo de la línea blanca presente en el recuadro ampliado de la imagen combinada. En las gráficas se observa la similitud de los perfiles de C-NAP1 y γ -tubulina.

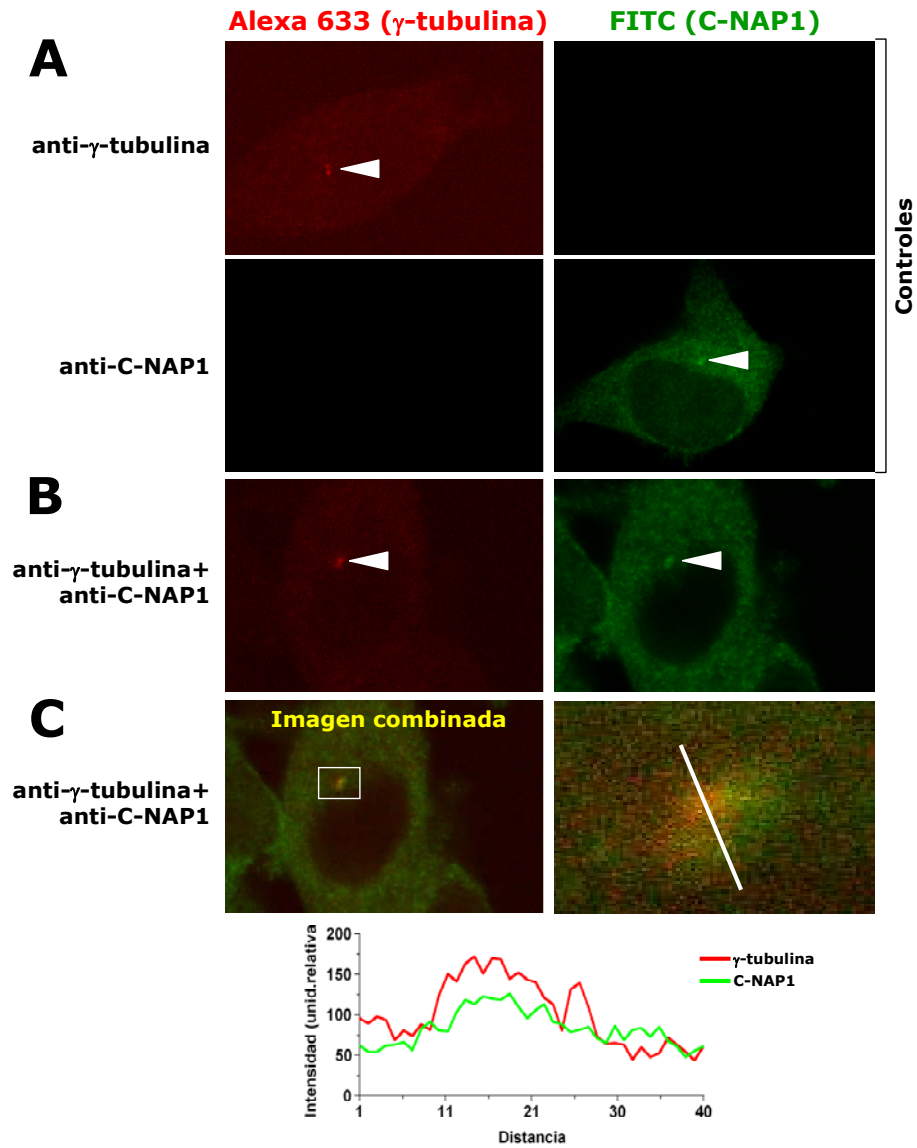


Figura III.12: C-NAP1 se localiza en el centrosoma de células HeLa.

Imágenes de microscopía confocal de células asincrónicas humanas tras doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1/anti- γ -tubulina. La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia γ -tubulina/C-NAP1. **C)** Imagen combinada de las imágenes de B y zona ampliada correspondiente al recuadro mostrado en la imagen combinada. La gráfica representa en rojo y verde la intensidad de los píxeles de γ -tubulina y C-NAP1, respectivamente, a lo largo de la línea del recuadro ampliado.

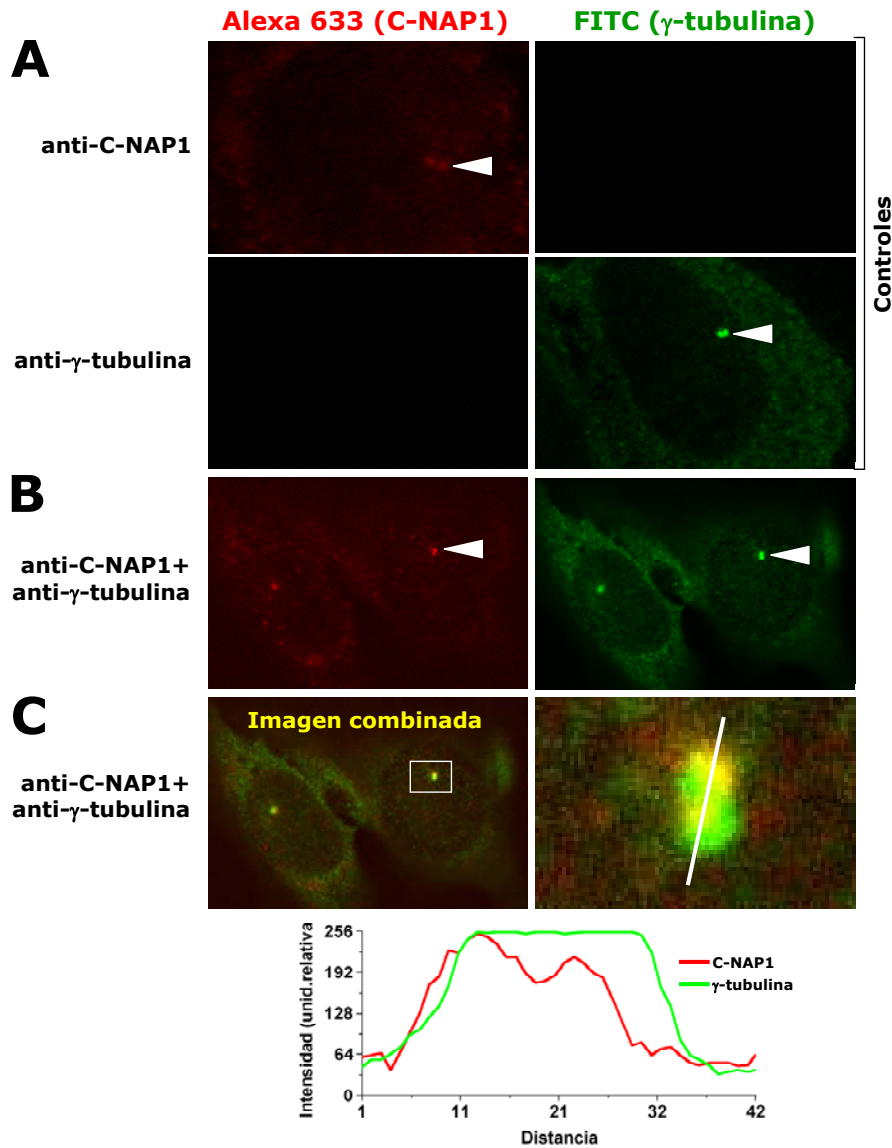


Figura III.13: C-NAP1 se localiza en el centrosoma de células U2OS.

Imágenes de microscopía confocal de células asincrónicas humanas tras doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1/anti- γ -tubulina. La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia γ -tubulina/C-NAP1. **C)** Imagen combinada de las imágenes de B y zona ampliada correspondiente al recuadro mostrado en la imagen combinada. La gráfica representa en rojo y verde la intensidad de los píxeles de C-NAP1 y γ -tubulina, respectivamente, a lo largo de la línea del recuadro ampliado.

El siguiente paso fue comprobar si c-Fos se localizaba en el centrosoma. Para ello se realizó una inmunocolocalización de c-Fos con el marcador centrosomal γ -tubulina tanto en células murinas NIH-3T3 como células humanas U2OS. En la figura III.14 y 15 A se muestran los controles de inespecificidad de los anticuerpos (Apartado 2.5 Materiales y Métodos).

El centrosoma es fácilmente reconocible por su patrón de localización y distribución tras marcaje de sus proteínas específicas. Tras marcar con γ -tubulina aparecen típicamente 1 ó 2 puntos cercanos al núcleo (Moudjou and Bornens, 1994). En el caso de c-Fos, se realizaron dos controles adicionales, indicados en el Apartado 2.5 Materiales y Métodos, para comprobar que la señal obtenida correspondía a c-Fos y no a uniones inespecíficas del anticuerpo. Como primer control se utilizaron dos anticuerpos diferentes de c-Fos (sc-52 y Ab2; los dos obtenidos en conejo) y como segundo control, que sólo se realizó en células NIH-3T3, bloqueo de ambos anticuerpos de c-Fos con sus correspondientes péptidos inmunogénicos antes de la incubación con la muestra, observando que no se obtenía señal de fluorescencia de los anticuerpos de c-Fos (Fig. III.14B, 15,B).

En células NIH-3T3 se optimizó la doble inmunofluorescencia usando un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC, para detectar γ -tubulina y un anticuerpo anti-conejo biotinilado seguido de una incubación con estreptavidina-Alexa 633, para los dos anticuerpos de c-Fos. Como se muestra en las figuras III.14 (Ac sc-52) y 15 (Ac Ab2) D, existe colocalización (señal en amarillo) de c-Fos con el centrosoma. En las gráficas se muestran los perfiles de intensidad fluorescente de los dos canales (perfil rojo para c-Fos, perfil verde para C-NAP1) a lo largo de la línea blanca presente en el recuadro ampliado de la imagen combinada, donde se observa la similitud de los perfiles.

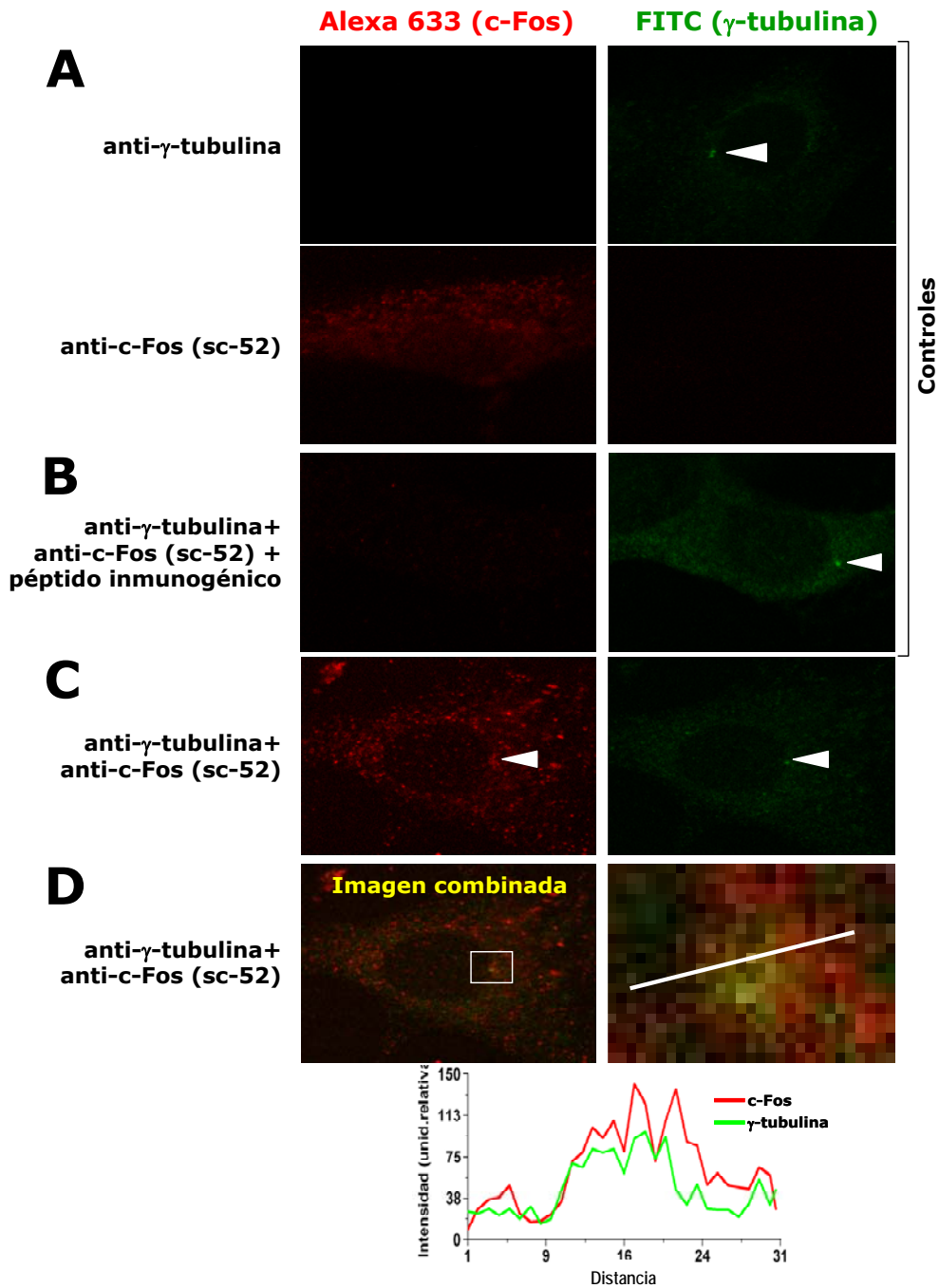


Figura III.14: c-Fos (anticuerpo sc-52) se localiza en el centrosoma de fibroblastos murinos NIH-3T3. Imágenes de microscopía confocal de células creciendo asincrónicamente tras una doble inmunofluorescencia usando γ -tubulina como marcador centrosomal y anti c-Fos (sc-52). La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Control de especificidad del anticuerpo de c-Fos, pre-incubando el anticuerpo anti-c-Fos (sc-52) con un exceso de su péptido inmunogénico. **C)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia anti- γ -tubulina/anti-c-Fos (sc-52). **D)** Imagen combinada de las imágenes de C, donde se ha ampliado el recuadro de la imagen combinada. La gráfica representa en verde y rojo la intensidad de los píxeles de γ -tubulina y c-Fos, respectivamente, a lo largo de la línea blanca del recuadro ampliado.

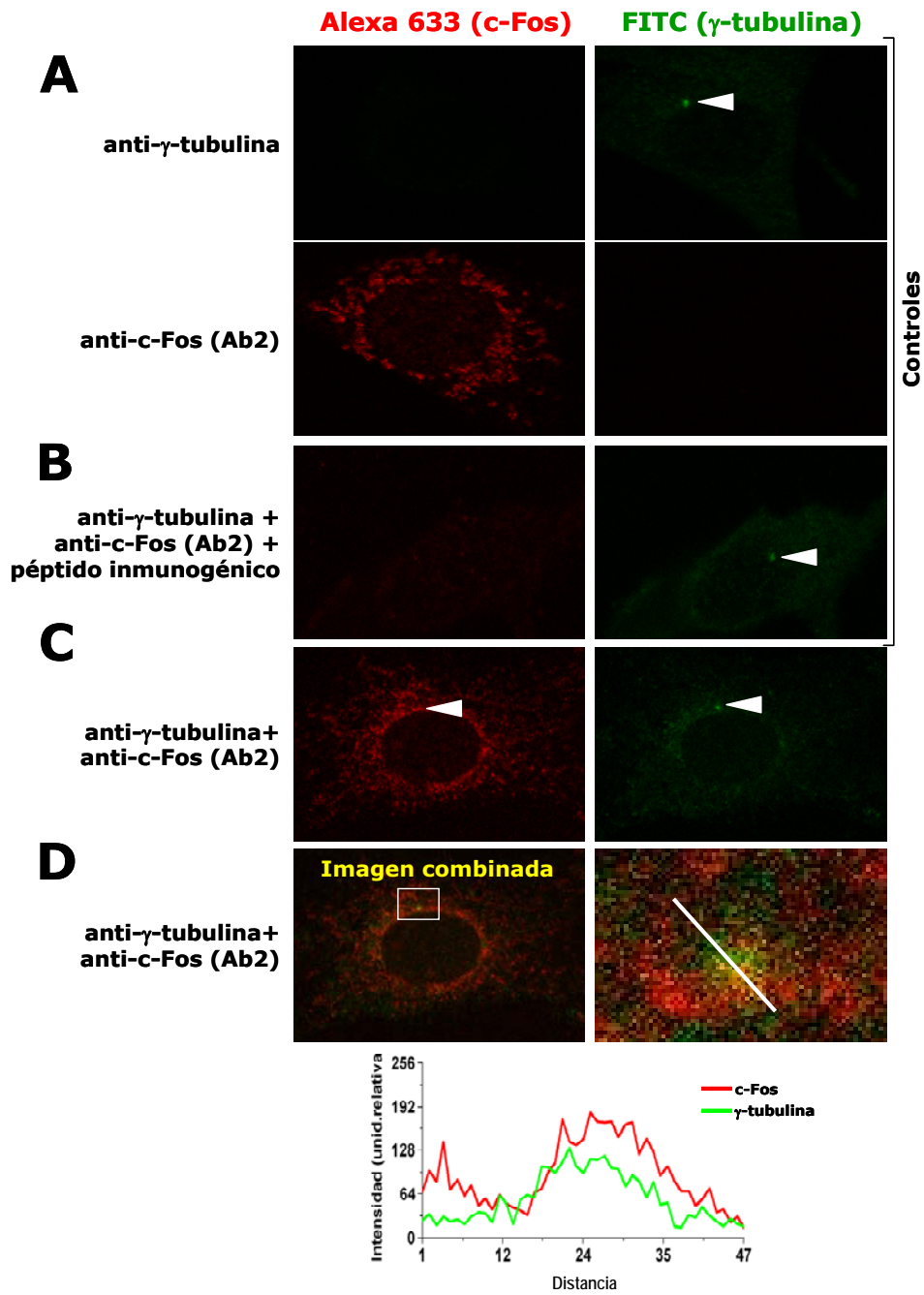


Figura III.15: c-Fos (anticuerpo Ab2) se localiza en el centrosoma de fibroblastos murinos NIH-3T3. Imágenes de microscopía confocal de células creciendo asincrónicamente tras una doble inmunofluorescencia usando γ -tubulina como marcador centrosomal y anti c-Fos (Ab2). La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Control de especificidad del anticuerpo de c-Fos preincubando el anticuerpo anti-c-Fos (Ab2) con un exceso de su péptido inmunogénico. **C)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia anti- γ -tubulina/anti-c-Fos (Ab2). **D)** Imagen combinada de las imágenes de C, donde se ha ampliado el recuadro de la imagen combinada. La gráfica representa en verde y rojo la intensidad de los píxeles de γ -tubulina y c-Fos, respectivamente, a lo largo de la línea blanca del recuadro ampliado.

En células U2OS se optimizó la doble inmunofluorescencia usando un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa 488, para detectar γ -tubulina y un anticuerpo anti-conejo biotinilado seguido de una incubación con estreptavidina-Alexa 633, para los dos anticuerpos de c-Fos. En la figura III.16 y 17 A se muestran los controles de inespecificidad de los anticuerpos (Apartado 2.5 Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura III.16,C con el anticuerpo sc-52 y en la figura III.17,C con el anticuerpo Ab-2, existe también localización de c-Fos con el centrosoma. En las gráficas se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de los dos canales (perfil rojo para c-Fos, perfil verde para C-NAP1) a lo largo de la línea blanca presente en el recuadro ampliado de la imagen combinada, donde se observa la similitud de los perfiles.

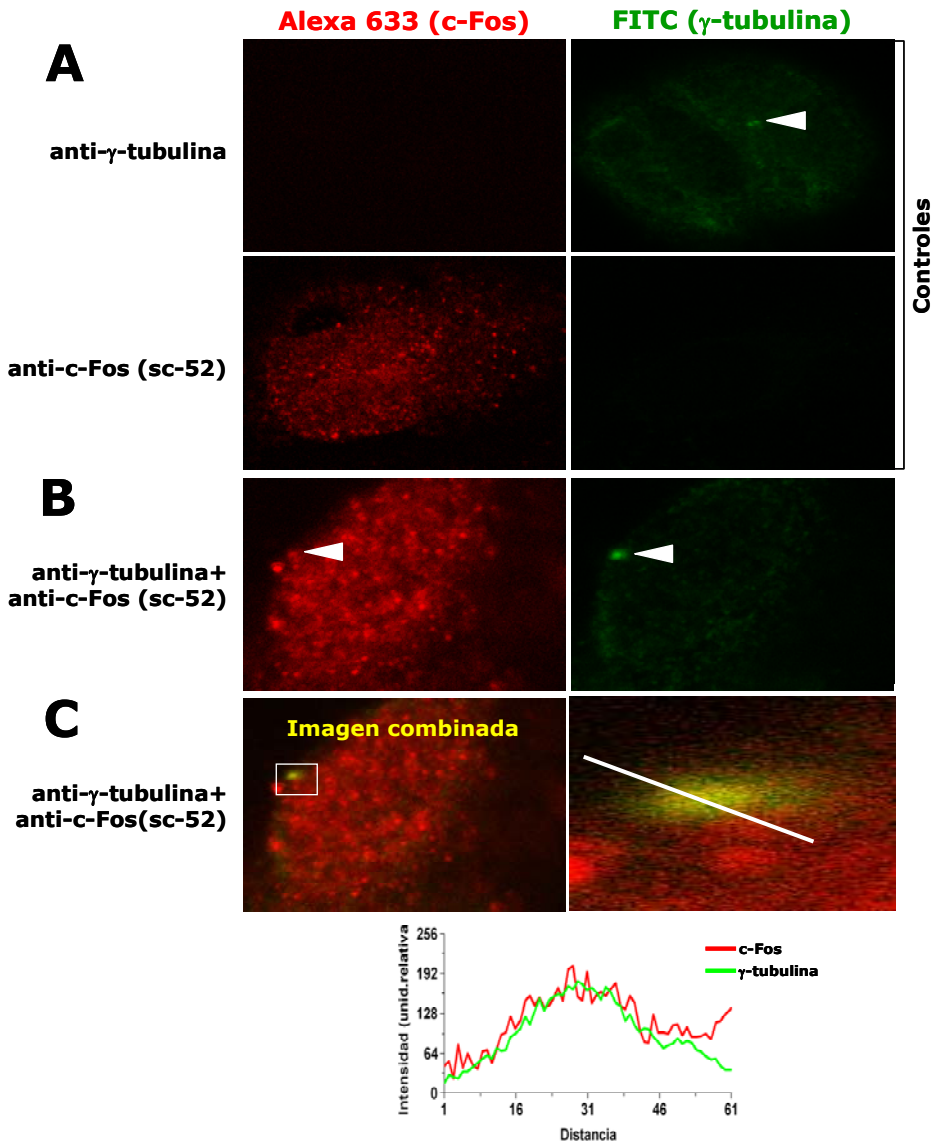


Figura III.16: c-Fos (anticuerpo sc-52) se localiza en el centrosoma de células humanas U2OS. Imágenes de microscopía confocal de células creciendo asincrónicamente tras una doble inmunofluorescencia usando γ -tubulina como marcador centrosomal y anti c-Fos (sc-52). La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia anti- γ -tubulina/anti-c-Fos (sc-52). **C)** Imagen combinada de las imágenes de B y zona ampliada correspondiente al recuadro mostrado en la imagen combinada. La gráfica representa en verde y rojo la intensidad de los píxeles de γ -tubulina y c-Fos, respectivamente, a lo largo de la línea blanca del recuadro ampliado.

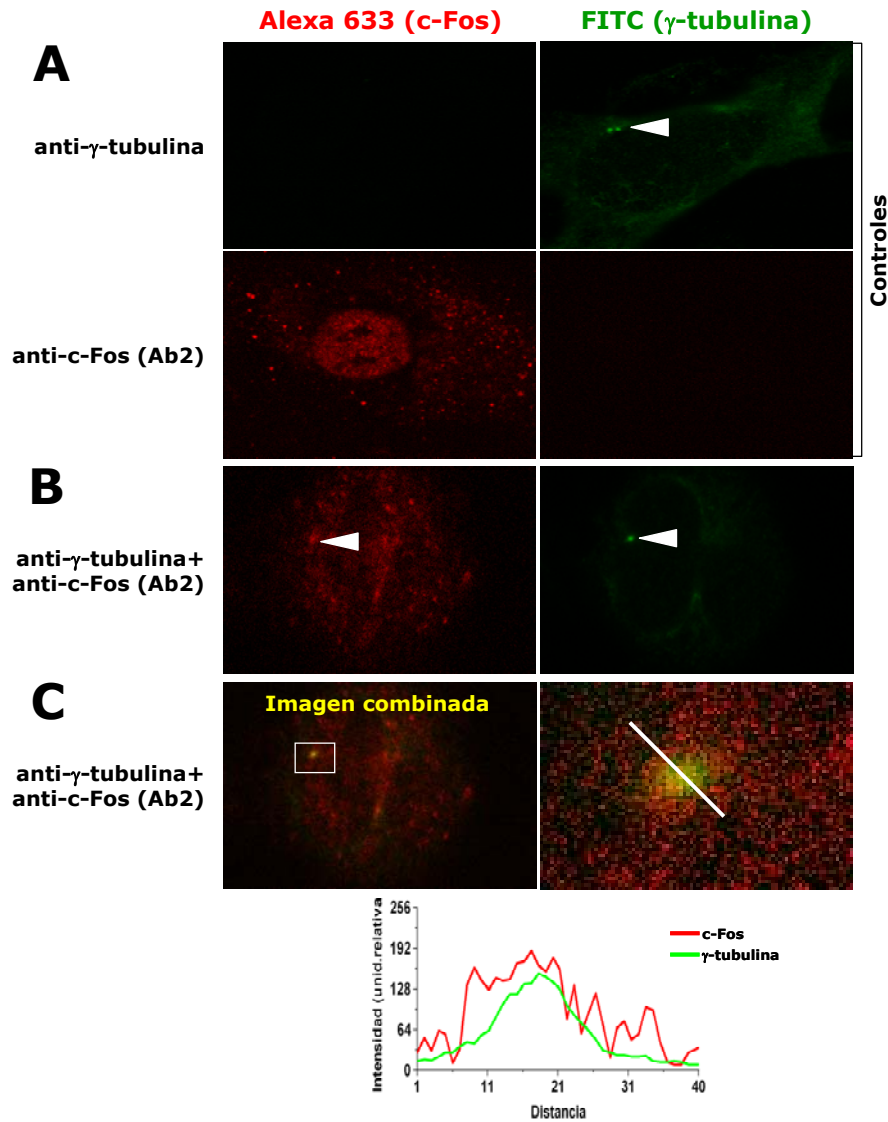


Figura III.17: c-Fos (anticuerpo Ab2) se localiza en el centrosoma de células humanas U2OS. Imágenes de microscopía confocal de células creciendo asincrónicamente tras una doble inmunofluorescencia usando γ -tubulina como marcador centrosomal y anti c-Fos (Ab2). La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia anti- γ -tubulina/anti-c-Fos (Ab2). **C)** Imagen combinada de las imágenes de B y zona ampliada correspondiente al recuadro mostrado en la imagen combinada. La gráfica representa en verde y rojo la intensidad de los píxeles de γ -tubulina y c-Fos, respectivamente, a lo largo de la línea blanca del recuadro ampliado.

Una vez se comprobó independientemente que c-Fos y C-NAP1 se localizaban en el centrosoma, se estudió si ambas proteínas colocalizaban *in vivo*. Para ello se realizó dobles inmunofluorescencias C-NAP1/c-Fos en células humanas HeLa y U2OS. El anticuerpo para la detección de C-NAP1, cedido por el Dr. Andrew M. Fry, había sido generado en conejo, lo cual lo hacía incompatible con los anticuerpos anti-c-Fos (sc-52 y Ab2) de conejo, utilizados hasta el momento. Para solventar este problema se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-Fos (sc-8047). Los anticuerpos secundarios que se utilizaron en las células HeLa fueron: anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 633, para detectar C-NAP1 y anticuerpo anti-ratón biotinilado seguido de una incubación con estreptavidina-FITC, para detectar c-Fos. Para las células U2OS los anticuerpos óptimos fueron: anticuerpo anti-ratón biotinilado para detectar C-NAP1 seguido de una incubación con estreptavidina-FITC y anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 633, para detectar c-Fos. En la figura III.18 y 19 A se muestran los controles de inespecificidad de los anticuerpos (Apartado 2.5 Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura III.18,C en células HeLa y en la figura III.19,C en U2OS, c-Fos colocaliza parcialmente con C-NAP1. En las gráficas que se muestran en las figuras, se representan los perfiles de intensidad fluorescente de los dos canales (perfil rojo para C-NAP1, perfil verde para c-Fos) a lo largo de la línea blanca presente en el recuadro ampliado de la imagen combinada, donde se observa la similitud de los perfiles.

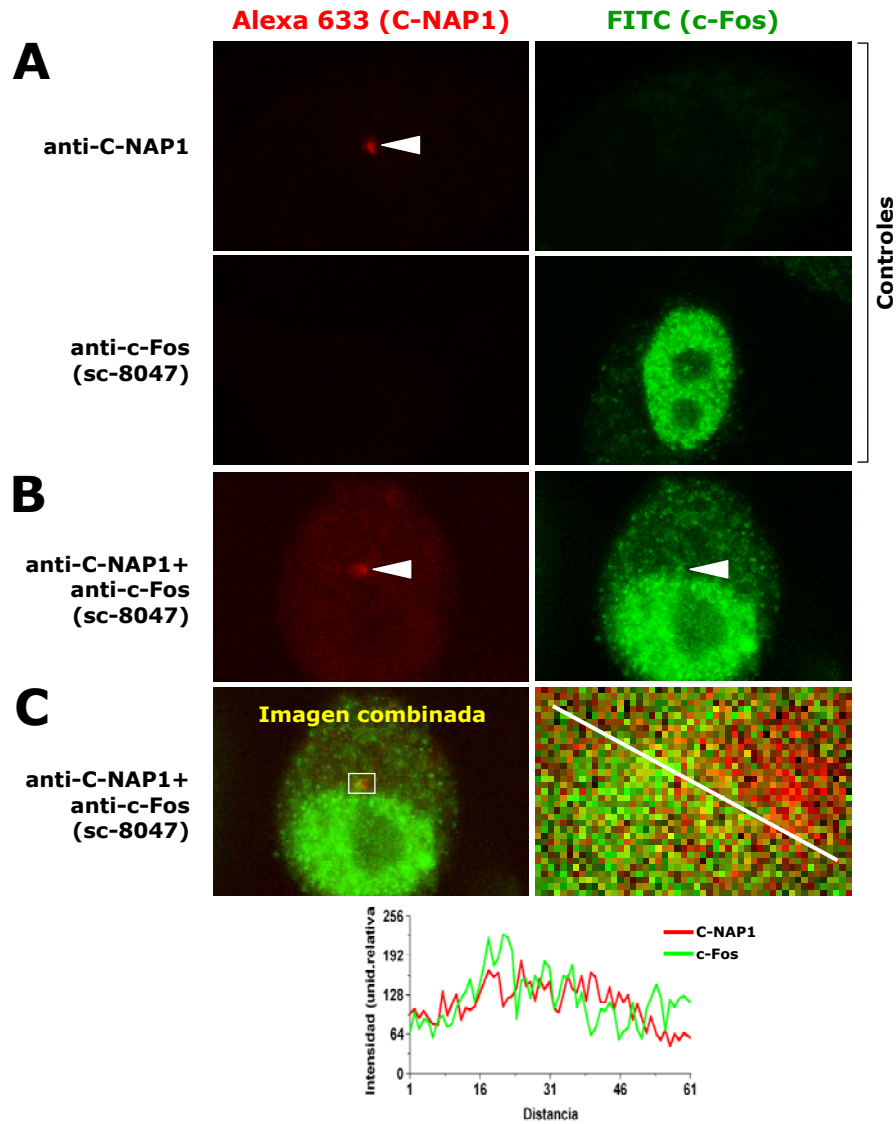


Figura III.18: Colocalización de C-NAP1 y c-Fos en células HeLa. Imágenes de microscopía confocal de células creciendo asincrónicamente tras doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1/anti-c-Fos. La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1/anti-c-Fos. **C)** Imagen combinada de las imágenes de B y zona ampliada correspondiente al recuadro mostrado en la imagen combinada. La gráfica representa en rojo y verde la intensidad de los píxeles de C-NAP1 y c-Fos, respectivamente, a lo largo de la línea blanca del recuadro ampliado.

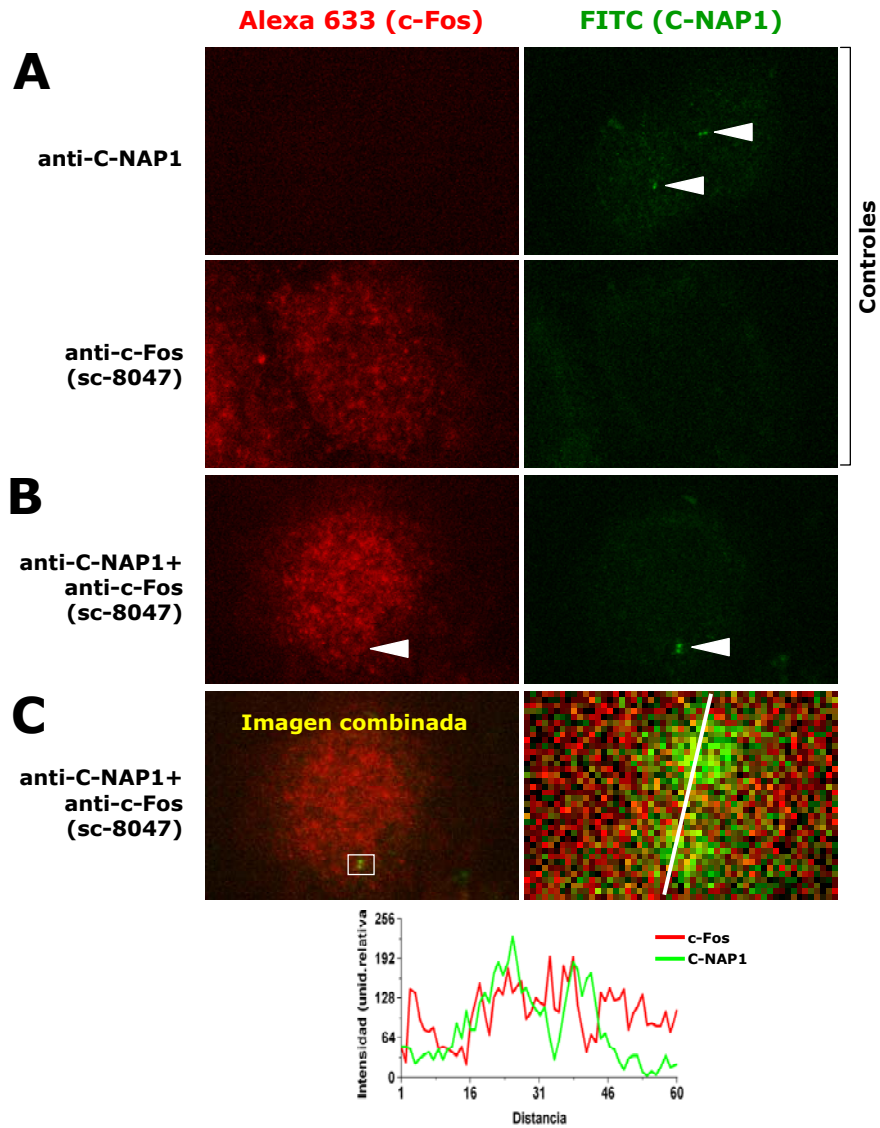


Figura III.19: Colocalización de C-NAP1 y c-Fos en células U2OS.

Imágenes de microscopía confocal de células creciendo asincrónicamente tras doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1/anti-c-Fos. La flecha blanca señala donde se encuentra el centrosoma. **A)** Controles de inespecificidad de los anticuerpos. **B)** Imágenes individuales de la doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1/anti-c-Fos. **C)** Imagen combinada de las imágenes de B y zona ampliada correspondiente al recuadro mostrado en la imagen combinada. La gráfica representa en verde y rojo la intensidad de los píxeles de C-NAP1 y c-Fos, respectivamente, a lo largo de la línea blanca del recuadro ampliado.

En resumen, los resultados de las inmunofluorescencias sugieren que c-Fos se encuentra en el centrosoma y colocaliza con C-NAP1, que se sitúa uniendo a los centriolos (Fry et al., 1998a).

4.3. Localización de c-Fos en centrosomas aislados

Con el objetivo de completar los resultados obtenidos por inmunofluorescencia, se decidió realizar un aislamiento de centrosomas y corroborar la localización de c-Fos en los centrosomas de células humanas HeLa mediante western-blot. Para ello en primer lugar se realizó el aislamiento de centrosomas (Fig. III.20), utilizando células KE37, según el protocolo de Moudjou y colaboradores (Moudjou and Bornens, 1994) y adaptado por el Dr. Andrew M. Fry en Leicester (Inglaterra). En este ensayo los centrosomas se sitúan en la concentración de sacarosa entre el 55-65%. Para comprobar que las fracciones obtenidas estaban enriquecidas en centrosomas se realizó un western-blot anti- γ -tubulina, observando que los centrosomas se localizaban en las fracciones de la 8 a la 12 (Fig. 20,A). También se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-C-NAP1 de un acervo que contenía las fracciones 8 y 9, enriquecidas en centrosomas, para corroborar los resultados obtenidos por western-blot. La imagen obtenida era consistente a la descrita en Moudjou y Bornens (Moudjou and Bornens, 1994), ya que se observaba pares de centriolos en su configuración original y del tamaño esperado (1 μ m).

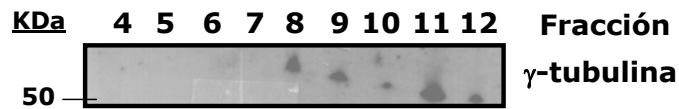
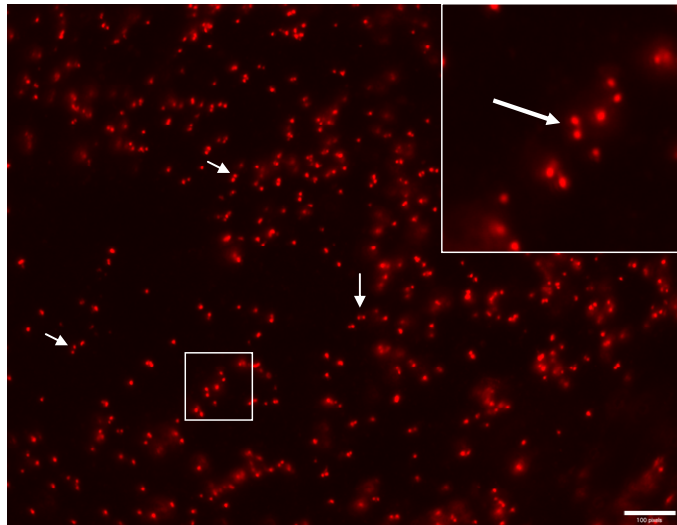
A**B**

Figura III.20: Aislamiento de centrosomas en gradiente de sacarosa de células humanas KE37. A) Western-blot anti- γ -tubulina de las fracciones 4 a 12. **B)** Inmunofluorescencia anti-C-NAP1 del acervo que contenía las fracciones 8 y 9. Las flechas blancas señalan algunos de los pares de centriolos que han permanecido en su configuración original. Arriba a la derecha de la imagen se muestra la zona ampliada correspondiente al recuadro blanco. La barra blanca situada en la zona inferior a la derecha de la imagen corresponde a 10 μ m.

Una vez se había comprobado que las fracciones obtenidas enriquecidas en centrosomas mostraban el patrón descrito por Moudjou y Bornens se pasó a analizar la presencia de C-NAP1 y c-Fos en el centrosoma de células HeLa, utilizadas en las inmunofluorescencias anteriores. Para ello las células HeLa se ayunaron 48 horas y se estimularon 90 min con 10% FBS. En la figura III.21 se muestra que c-Fos

se detecta en las fracciones 4 y 5, enriquecidas en centrosomas (identificados mediante la presencia de γ -tubulina), especialmente en la fracción 4 donde también se detecta C-NAP1.

Para verificar que el aislamiento había sido correcto y no se había producido contaminación de proteínas procedentes de otros compartimentos celulares, se utilizó la técnica de western-blot utilizando anticuerpos que reconociesen proteínas de otras fracciones celulares (Fig. III.21): anti-LDH (Lactato DesHidrogenasa) como control de la fracción citoplasmática; anti-p27 como control de la fracción citoplasmática y nuclear soluble; anti-laminB como control de la fracción nuclear insoluble. Se comprobó que ninguna de estas proteínas se encontraba en las fracciones 4 y 5 donde se concentraban los centrosomas.

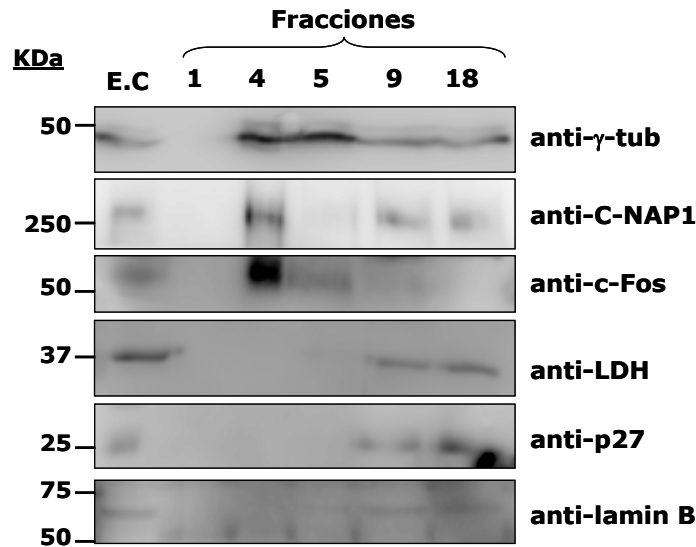


Figura III.21: c-Fos y C-NAP1 se localizan en fracciones donde se concentran los centrosomas. Western-blot anti- γ -tubulina, anti-C-NAP1, anti-c-Fos de las fracciones obtenidas a partir de un aislamiento de centrosomas de células HeLa. Como controles negativos se examinó la expresión de proteínas que se encuentran en otras fracciones de la célula mediante western-blot: anti-LDH (citoplasmática), anti-p27 (citoplasmática y nuclear soluble) y anti-laminB (nuclear insoluble). E.C.: extracto crudo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis por inmunofluorescencia y nos permiten afirmar que hay una fracción de c-Fos que se encuentra asociada al centrosoma, donde también se encuentra C-NAP1.

5. Implicaciones funcionales de la interacción c-Fos/C-NAP1

A continuación se realizaron ensayos con el objetivo de determinar las implicaciones funcionales de la interacción entre c-Fos y C-NAP1.

5.1. c-Fos regula la cantidad de C-NAP1 presente en el centrosoma

En colaboración con el laboratorio del Dr. A.M. Fry se quiso evaluar el posible efecto de la sobreexpresión de c-Fos sobre la localización de C-NAP1 endógeno en los centrosomas. Para ello se transfectaron células HeLa creciendo asincrónicamente con el plásmido pCMV-HA-c-Fos y se realizó una doble inmunofluorescencia (ver Apartado 2.5 Materiales y Métodos), anti-C-NAP1 con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 633 y anti-HA (262K#2362) con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC. La cantidad de C-NAP1 endógeno presente en el centrosoma se estudió cuantificando la intensidad de fluorescencia de emisión del fluorocromo Alexa 633, tanto en células transfectadas con pCMV-HA-c-Fos como en células sin transfectar, en imágenes obtenidas en un microscopio de fluorescencia. Los valores de fluorescencia se normalizaron, dando un valor de 100% a la media de la intensidad de fluorescencia de C-NAP1 de las células sin transfectar. Se tomaron medidas de n=100 células por condición. Las células se clasificaron en dos grupos: células en interfase, cuando la distancia entre los centrosomas era menor que el diámetro de ambos

centrosomas, y células en mitosis, cuando la distancia entre los centrosomas era mayor que el diámetro de ambos centrosomas.

La figura III.22 muestra que las células que sobreexpresan HA-c-Fos presentan una intensidad de fluorescencia de C-NAP1 endógeno significativamente menor que las células que no sobreexpresaban HA-c-Fos.

En este ensayo se realizaron dos controles negativos diferentes: en el primer control se transfectaron las células con el plásmido pCMV-HA-c-Fos y se realizó una doble inmunofluorescencia anti- γ -tubulina con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 633 y anti-HA (262K#2362) con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC. Se cuantificó la fluorescencia de γ -tubulina tanto en células transfectadas con pCMV-HA-c-Fos como sin transfectar, no observándose diferencias significativas entre ambas condiciones. El segundo control negativo consistió en la transfección de las células con el plásmido pCMV-HA-JNK, realizando una doble inmunofluorescencia anti-C-NAP1 con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 633 y anti-HA (262K#2362) con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a FITC. Al cuantificar la fluorescencia de C-NAP1 en las células transfectadas y sin transfectar no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones.

Las imágenes se capturaron en un microscopio invertido (Nikon,UK), usando una cámara ORCA ER CCD (Hamamatsu, Japan) y el software Openlab 5 (Improvision, UK). Las imágenes se analizaron y cuantificaron con el programa PhotoShop. Además de las fotografías de los centrosomas, se tomaron imágenes de las regiones inmediatamente adyacentes a estos. Para cada imagen, el valor de la fluorescencia se calculó restando al valor de intensidad de fluorescencia del centrosoma el valor de intensidad de fluorescencia de la región adyacente (intensidad de fluorescencia basal o “background”).

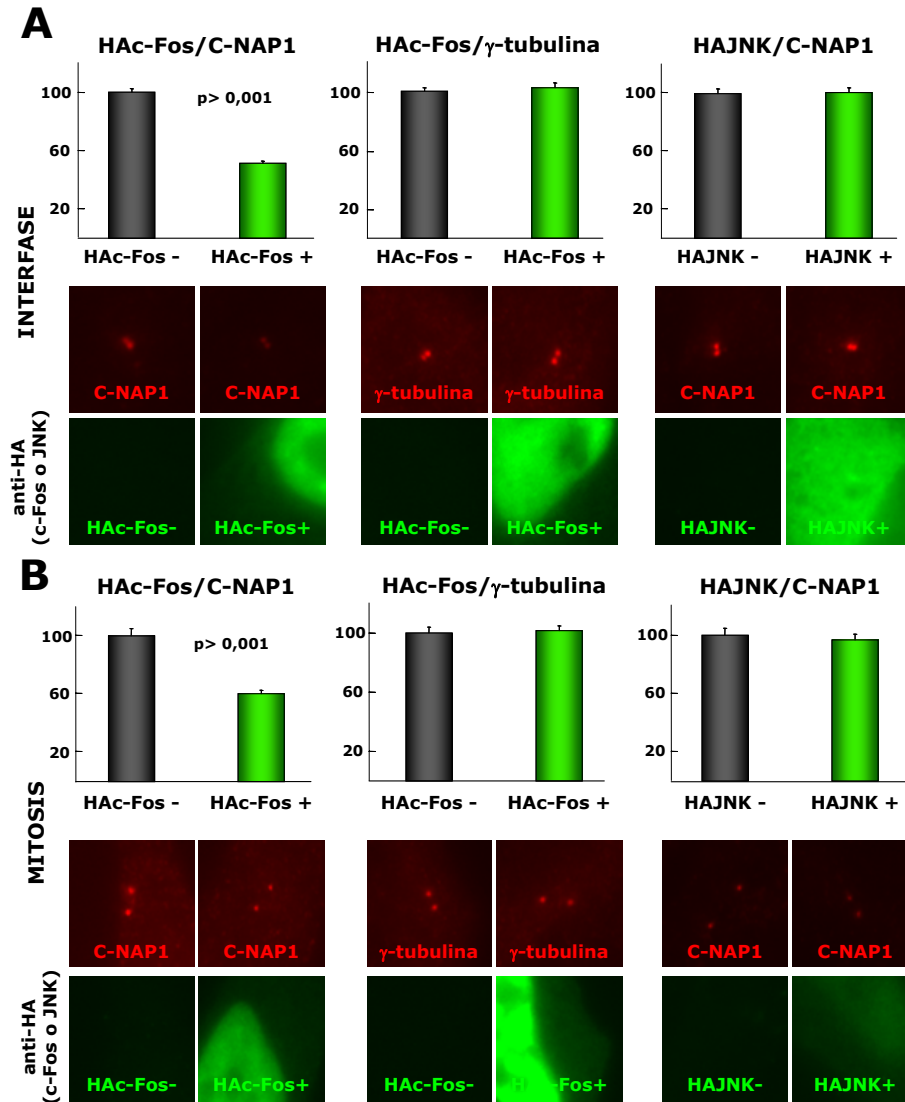


Figura III.22: La sobreexpresión de HA-c-Fos reduce la cantidad de C-NAP1 endógeno, pero no de γ -tubulina, presente en el centrosoma. A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa en interfase que muestran la cantidad de C-NAP1 detectada en los centrosomas por inmunofluorescencia anti-C-NAP1 de células transfectadas con HA-c-Fos o HA-JNK. Las gráficas muestran la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de C-NAP1 calculada en porcentaje, donde 100% corresponde a la media de la intensidad de fluorescencia de C-NAP1 en células sin transfectar (n=100 células por condición). Como controles se midió la intensidad de fluorescencia de la proteína centrosomal γ -tubulina, detectada en una inmunofluorescencia anti- γ -tubulina, en presencia o ausencia de HA-c-Fos y la inmunofluorescencia de C-NAP1 en presencia o ausencia de HA-JNK. **B)** Células HeLa en mitosis donde se realizó el mismo estudio que en el apartado anterior.

5.2. C-NAP1 modula la unión de los factores AP-1 a ADN

Una forma de evaluar las consecuencias funcionales de la interacción entre C-NAP1 y c-Fos era analizando su efecto sobre la unión a ADN de los factores de transcripción AP-1. Para ello se realizó un ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA).

El ensayo se llevó a cabo usando como sonda un oligonucleótido de doble cadena correspondiente a una secuencia consenso de reconocimiento de los factores AP-1 marcado radioactivamente ($[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP) (descrito en el Apartado 2.7 Materiales y Métodos). Previamente a la incubación de la sonda con los extractos, se realizó una pre-incubación de 45 min de 2.5 μg de los extractos nucleares de células murinas NIH-3T3 ayunadas o ayunadas+estimuladas 90 min con 10% NBS con 5 μg de GST o GST-C-NAP1Ct. Seguidamente, los extractos se incubaron 30 min con la sonda marcada. En la figura III.23,A se muestra un western-blot anti-c-Fos y anti-ERK2, como control de carga, de los extractos nucleares utilizados en el EMSA del apartado C, donde observamos una clara inducción de c-Fos a 90 min tras ayuno. Además, en la figura III.23,B, se muestra un gel teñido con azul Coomassie donde se observa que la cantidad de proteínas GST y GST-CNAP1Ct utilizadas en los EMSAs eran similares. En la figura III.23,C se muestra la autoradiografía del EMSA 3.4 (Fig. III.23,D), resultante de la separación de las muestras en un gel al 5% de acrilamida, donde se observa que se utilizó sonda radiactiva en exceso. Para el ensayo de retardo en gel se utilizaron extractos nucleares que procedían de tres experimentos independientes. En cada experimento se realizaron réplicas de la siguiente manera: en el primer experimento n=1 (1); en el segundo n=2 (2.1 y 2.2); y en el tercero n=4 (3.1, 3.2, 3.3 y 3.4) según se indica en la figura III.23,D. La cuantificación de la unión de los factores AP-1 a ADN se realizó midiendo por densitometría las bandas de los EMSAs. Se muestra la

relación entre el valor obtenido para los extractos nucleares ayunados+estimulados pre-incubados con GST-C-NAP1 respecto a los pre-incubados con GST. Se halló la media de los valores de las réplicas para cada experimento y con las tres medias se calculó la media total \pm SEM. Los EMSAs muestran que los extractos de células ayunadas+estimuladas 90 min presentaban mayor unión de AP-1 a ADN cuando eran pre-incubados con GST-C-NAP1Ct que cuando eran pre-incubados con el control GST (de media 5 ± 2 veces más).

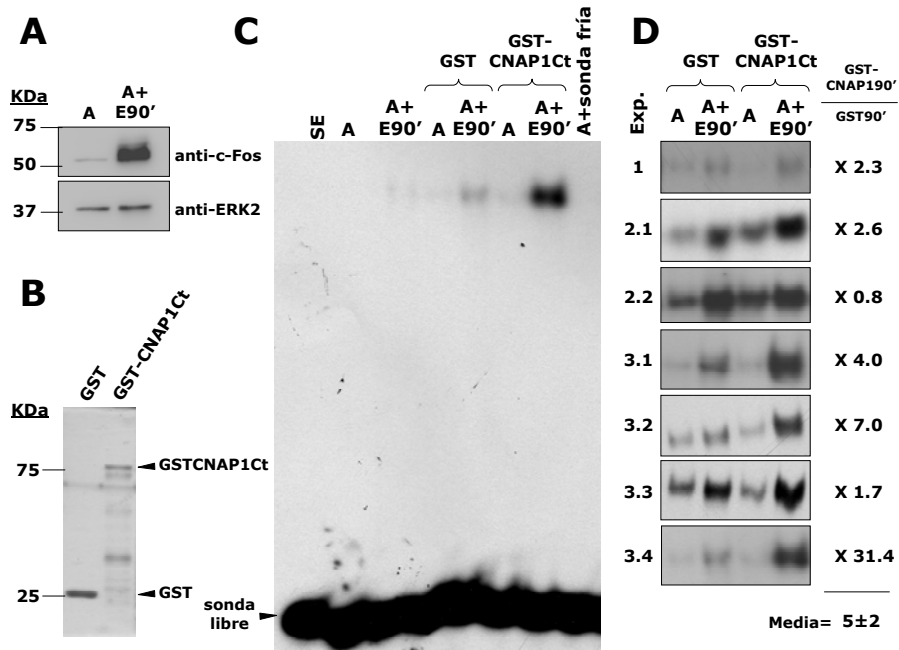


Figura III.23: Efecto en la unión de AP-1 a la sonda consenso AP-1 en extractos nucleares de células NIH-3T3 preincubados con GST o GST-CNAP1Ct. Células NIH-3T3 se ayunaron (A) o se ayunaron y estimularon 90 min con 10% de NBS (A+E90') y se obtuvo la fracción nuclear soluble. Las fracciones nucleares de células NIH-3T3 ayunadas o ayunadas y estimuladas 90 min se sometieron a un EMSA con una sonda radiactiva que contiene la diana AP-1 consenso. Los extractos se incubaron 45 min con 0.8 g de GST o GST-CNAP1Ct previamente a la incubación con la sonda AP-1. **A)** Western blot anti-c-Fos y anti-ERK2, como control de carga, de las fracciones nucleares solubles ensayadas en el apartado C. **B)** Gel de acrilamida teñido con azul Coomassie de las proteínas GST y GST-C-NAP1Ct ensayadas en el apartado C. **C)** Autoradiografía del EMSA que corresponde al ensayo 3.4. SE: carril sin extracto; sonda fría: corresponde a la incubación con 50 veces la sonda fría respecto a la sonda radioactiva. **D)** Autoradiografías de los EMSAs de los tres experimentos independientes y sus réplicas (1., 2. y 3. y sus réplicas) cuantificando el incremento de la unión de AP-1 a ADN en extractos ayunados+estimulados pre-incubados con GST-CNAP1Ct respecto a GST. Se muestra la media de las medias de los 3 experimentos (\pm SEM).

CAPÍTULO IV

Discusión

Los factores de transcripción de la familia AP-1 regulan multitud de genes implicados en diversos procesos celulares importantes para el destino de la célula, en respuesta a una amplia amalgama de estímulos, tales como factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, radiación ultravioleta (UV) y variedad de factores físicos y químicos que producen estrés (Shaulian and Karin, 2002). Para desempeñar este papel tan complejo, los factores de transcripción AP-1 se regulan finamente a diferentes niveles. En concreto, un nivel de regulación importante es mediante modificaciones post-traduccionales, destacando la fosforilación como uno de los fundamentales. De hecho, la fosforilación de los miembros de la familia AP-1 es un proceso muy común, que implica la activación rápida e independiente de síntesis *de novo* (Piechaczyk and Blanchard, 1994). Existen numerosas quinasas capaces de fosforilar a c-Fos, entre las que se incluyen miembros de la familia de las MAP quinasas (MAPK), como ERK, que es capaz de fosforilar a c-Fos en múltiples sitios, resultando en una inducción de su actividad transcripcional (Monje et al., 2003). También fosforilan a c-Fos otras proteínas quinasas como la proteína quinasa A (PKA), que inhibe la actividad transformante de c-Fos (Tratner et al., 1992), y la ribosoma S6 quinasa (RSK) que regula la unión a ADN de c-Fos y su potencial de transactivación (Chen et al., 1993). c-Fos también puede sufrir otras modificaciones post-traduccionales como SUMOilación, sobretodo cuando se encuentra formando dímeros con c-Jun, inhibiéndose así la actividad AP-1 (Bossis et al., 2005; Jakobs et al., 2007).

Además de por modificaciones post-traduccionales, la actividad de c-Fos puede ser regulada por otros mecanismos, como es la regulación mediante interacciones proteína-proteína. Estas interacciones pueden ser inhibitoras o activadoras de su función. Por ejemplo, la interacción de c-Fos con c-Jun, además de ser un requisito necesario para su unión al ADN, también es un mecanismo que retiene a c-Fos en el núcleo,

impidiendo que sea exportado al citoplasma (Malnou et al., 2007). Este mecanismo es común en la familia de factores AP-1 ya que c-Jun también inhibe la exportación de ATF2 al citoplasma (Liu et al., 2006a). La diversidad de interacciones de los factores AP-1 que se pueden encontrar dentro de la célula, tanto formando homo- como hetero-dímeros, entre ellos mismos o con otras proteínas, ilustra la infinidad de posibilidades que se pueden producir.

En este contexto, el **objetivo** de la presente **Tesis Doctoral** ha sido profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la actividad de c-Fos que implican interacción con otras proteínas.

c-Fos interactúa con CEP2/C-NAP1, una proteína centrosomal implicada en la cohesión entre los centriolos

En ensayos de doble híbrido en levadura realizados por Carmen Ivorra en su Tesis Doctoral (Ivorra et al., 2006), se obtuvo un clon que interactuaba con c-Fos por esta técnica. La secuenciación de este clon permitió determinar que correspondía al extremo C-terminal de CEP2.

CEP2 es una proteína centrosomal murina de 250 KDa rica en dominios "coiled-coil", de la cual no se ha descrito nada hasta el momento. CEP2 presenta un ortólogo en humanos, también denominado CEP2 o C-NAP1. Aunque existe muy poca literatura referente a C-NAP1, diversos artículos han implicado a esta proteína con una función de cohesión de los centriolos durante la interfase (Fry et al., 1998a). Concretamente se ha descrito que, durante la mitosis, C-NAP1 es fosforilada por la quinasa Nek2, lo que provoca que C-NAP1 se desplace de los centriolos, permitiendo así que los centrosomas se dirijan a los polos de la célula y se forme el huso mitótico (Faragher and Fry, 2003; Mayor et al., 2002). Una vez terminada la mitosis, C-NAP1 es

desfosforilada, posiblemente por PP1, ocupando nuevamente su lugar entre los centriolos (Mi et al., 2007).

Los experimentos de doble híbrido mostraron una interacción entre c-Fos y CEP2. Se decidió entonces confirmar esta interacción utilizando un método alternativo. Un ensayo de arrastre por GST (Fig. III.2) confirmó la interacción entre c-Fos y CEP2Ct, además de demostrar que la proteína completa de c-Fos era también capaz de interactuar con CEP2Ct.

Una vez confirmada la interacción en otro sistema, se procedió a la identificación de los dominios proteicos de c-Fos y C-NAP1 que participaban en esta interacción (Apartado 2.3 de Resultados). Por el método del doble híbrido se puso de manifiesto que la región b-ZIP de c-Fos era suficiente para interactuar con CEP2Ct, por lo que se pasó a determinar las regiones de CEP2 implicadas en la interacción.

CEP2 es una proteína que presenta múltiples dominios “coiled-coil” en su zona C-terminal, al igual que se han descrito en la zona C-terminal de C-NAP1 (Fry et al., 1998a). Los dominios “coiled-coil” constituyen un elemento importante en la formación de dímeros, además de ser un sistema altamente versátil que permite una alta selectividad de unión (Burkhard et al., 2001). Los dominios “coiled-coil” son estructuras que se encuentran en proteínas fibrosas, filamentos intermedios y en los factores de transcripción con cremalleras de leucinas (Lupas, 1996). De hecho, la región que se había descrito en la lamina A/C que interactúa con c-Fos, era una región rica en dominios “coiled-coil” (Ivorra et al., 2006). CEP2 y C-NAP1 también presentan un motivo en cremallera de leucinas en su zona C-terminal (CEP2: aa 2239-2267 y C-NAP1 aa 2275-2296), que podría participar en la interacción con c-Fos.

Con estos conocimientos previos, se procedió a analizar la implicación de estas estructuras de CEP2 en su interacción con c-Fos. Para ello se dividió la proteína CEP2Ct en diferentes fragmentos en base a sus dominios "coiled-coil" (Apartado 2.3 Resultados), teniendo también presente los aminoácidos de la cremallera de leucinas. El mapeo de las diferentes regiones de CEP2Ct se abordó utilizando dos aproximaciones diferentes: un ensayo de actividad β -galactosidasa en levaduras (Fig. III.4) y un ensayo de arrastre con GST (Fig. III.5). Estos dos abordajes permitieron identificar la región de CEP2Ct aa 2233-2293, región que incluye un motivo de tipo cremallera de leucinas, como la región implicada en la interacción con c-Fos. Sin embargo, no se producía interacción con un fragmento restringido exclusivamente a la cremallera de leucinas (aa 2239-2267), sugiriendo que la cremallera de leucinas de CEP2 es necesaria pero no suficiente para que se produzca la interacción con c-Fos.

La importancia de las leucinas de CEP2 de esta región se estudió mediante un ensayo de mutagénesis dirigida, donde se ensayó la proteína mutada de CEP2 en la que se había realizado la mutagénesis de una o varias leucinas de dicho motivo. En estos experimentos se observó que la mutagénesis de una, dos o tres leucinas eliminaba la interacción con c-Fos (Fig. III.7). Así, aunque la cremallera de leucinas de CEP2 no era suficiente, la integridad de dicho dominio parecía esencial para su interacción con c-Fos.

La genoteca utilizada en el ensayo de doble híbrido pertenecía a timocitos de ratón, por lo que se había trabajado hasta el momento con las proteínas murinas c-Fos y CEP2. Para determinar si entre los ortólogos en humanos también tenía lugar dicha interacción, se realizaron ensayos de arrastre por GST utilizando la proteína silvestre

GST-C-NAP1Ct. Además se quiso confirmar la relevancia de las leucinas de C-NAP1 en la interacción utilizando la forma mutada GST-C-NAP1Ctm1, que presentaba mutada la leucina ortóloga a la que era suficiente para eliminar la interacción entre CEP2 y c-Fos. Estos ensayos mostraron que la interacción también se producía entre proteínas humanas, tanto con c-Fos endógeno (Fig. III.9) como con HA-c-Fos sobreexpresado (Fig. III.10), además de corroborar la importancia de las leucinas, del motivo cremallera de leucinas de C-NAP1, en la interacción entre c-Fos y C-NAP1.

Para completar los ensayos *in vitro* realizados, se llevó a cabo un experimento de coimmunoprecipitación (Fig. III.11). En estos ensayos, cabe destacar que debido a los bajos niveles de expresión de C-NAP1 en la célula y a la imposibilidad de sobreexpresar la proteína completa, tal vez debido a su gran tamaño (250 KDa), se decidió sobreexpresar la región C-terminal de C-NAP1. Además, se sobreexpresó c-Fos utilizando un plásmido con una etiqueta HA que permitía detectar c-Fos con un anticuerpo primario anti-HA unido a HRP. Así, se evitaba la detección de las cadenas pesadas del anticuerpo que por su tamaño coincidían con c-Fos en un análisis por western-blot, interfiriendo en su detección. Aunque este ensayo no se realizó con las proteínas endógenas, ya que se sobreexpresaron ambas proteínas, se observó que c-Fos y C-NAP1Ct eran capaces de interactuar *in vivo* en células humanas.

c-Fos y C-NAP1 colocalizan en el centrosoma

El siguiente objetivo que se abordó fue el estudio de la localización subcelular de c-Fos y C-NAP1. Con este propósito, en primer lugar se realizaron dobles inmunofluorescencias que se analizaron en un microscopio confocal.

Para la detección de c-Fos se utilizaron dos anticuerpos comerciales diferentes, sc-52 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y Ab2 (Calbiochem), con los que se obtuvo el mismo resultado.

Está ampliamente descrito que C-NAP1 se localiza en la zona proximal de los centriolos en los centrosomas (Fry et al., 1998a). Se quiso reproducir este resultado utilizando la proteína γ -tubulina (componente principal del PCM (Stearns and Kirschner, 1994)) como marcador centrosomal y para ello se realizaron dobles inmunofluorescencias C-NAP1/ γ -tubulina (Fig. III.12 y 13). Las imágenes de confocal obtenidas confirmaron que C-NAP1 colocalizaba mayoritariamente con el marcador centrosomal γ -tubulina.

El siguiente paso fue determinar si c-Fos se localizaba en el centrosoma. Para ello se realizaron dobles inmunofluorescencias c-Fos/ γ -tubulina, que sugieren una localización parcial de c-Fos en el centrosoma de diversos tipos celulares de mamíferos (Fig. III.14,15,16 y 17). Además, en células NIH-3T3, se realizó un control adicional, consistente en una pre-incubación de los anticuerpos de c-Fos con su péptido inmunogénico correspondiente, previamente a la incubación con la muestra. Las imágenes obtenidas no presentaban señal de fluorescencia, con lo que se confirmó la afinidad de los anticuerpos por su epítipo inmunogénico (Fig. III.14 y 15 B).

Está ampliamente descrito que c-Fos actúa como factor de transcripción, encontrándose en su mayoría en el núcleo (Verma et al., 1986). Las inmunofluorescencias presentadas en este estudio muestran que c-Fos se localizaba principalmente en el núcleo, pero se puede observar que también se localiza en el citoplasma, hecho que también ha sido descrito por otros autores (Malnou et al., 2007; Roux et al., 1990; Vríz et al., 1992).

Por último, se realizaron experimentos de doble inmunofluorescencia c-Fos/C-NAP1 en diferentes tipos celulares (Fig.

III.18 y 19). Las imágenes obtenidas sugieren que ambas proteínas colocalizan en el centrosoma de diferentes tipos celulares.

Además de los ensayos de inmunofluorescencia, se realizaron ensayos de aislamiento de centrosomas. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos estudios en los que se intenta demostrar que una proteína se localiza en el centrosoma (por citar algún ejemplo (Fry et al., 1998a; Graser et al., 2007)). En esta técnica se emplea un tampón de lisis de fuerza iónica baja para separar los centrosomas del núcleo después del desensamblaje del citoesqueleto por adición de nocodazole. De este modo, en la realización del ensayo se comprobó que las fracciones que se obtenían, además de estar enriquecidas en centrosoma, no presentasen proteínas pertenecientes a otros compartimentos celulares, como por ejemplo el núcleo (Fig III.21).

Los ensayos de aislamiento de centrosomas mostraron que una fracción de c-Fos se encontraba asociada a las fracciones donde se concentraban proteínas centrosomales (Fig. III.21), aunque por limitaciones de la propia técnica no se puede concluir que c-Fos se encuentre en el centrosoma interaccionando con C-NAP1. La aparición de los centrosomas en diferentes fracciones de los dos aislamientos mostrados (Fig. III.20 y 21) se podría explicar porque en el experimento de la figura III.20 se utilizaron células KE37, linfocitos humanos crecidos en suspensión (permiten la obtención de una gran masa celular necesaria para este experimento), mientras que en el experimento de la figura III.21 se utilizaron células HeLa, las cuales crecen adheridas a la placa. Además, al utilizar células adheridas, se modificó el paso de centrifugación de las células en suspensión por un paso de tripsinizado de la placa para obtener las células HeLa, basándonos en el protocolo de Kahn y colaboradores (Zhou et al., 2006).

Los resultados de localización de c-Fos en el centrosoma ponen de manifiesto esta nueva localización para este factor de transcripción no descrita previamente. Como además se ha demostrado que c-Fos es capaz de interactuar con C-NAP1, se podría postular que C-NAP1 estaría ejerciendo de plataforma donde proteínas reguladoras, como c-Fos, se pudiesen anclar y desempeñar un papel en el centrosoma. Diversos estudios en la literatura muestran a otras proteínas centrosomales ricas en dominios "coiled-coil" (Ej. AKAP450 y pericentrina) como proteínas de anclaje para las más de 100 moléculas reguladoras que se localizan en el centrosoma (Doxsey et al., 2005). Dichas proteínas reguladoras están involucradas en diferentes niveles de regulación del centrosoma y tal vez c-Fos pudiese estar ejerciendo alguna de estas funciones. Entre los ejemplos de proteínas reguladoras del ciclo celular que se localizan en el centrosoma se encuentra el factor de transcripción p53 (Fukasawa et al., 1996), cuya función es regular el ciclo celular y la apoptosis modulando la expresión de sus genes diana. p53 es además un supresor de tumores encargado de parar el ciclo en G1/S en respuesta a daño en el ADN, de reparar el ADN, y si es irreparable, inducir apoptosis, evitando que la célula dañada se divida. Su función en el centrosoma también está relacionada con este control del ciclo celular, puesto que tanto de manera directa, uniéndose al centrosoma, como de manera indirecta, por acción de su efector p21 (Tarapore and Fukasawa, 2002; Tarapore et al., 2001), regula la duplicación del centrosoma.

Otro ejemplo de proteína reguladora con localización centrosomal es NuMa. NuMa es una proteína de la matriz nuclear implicada en replicación y transcripción durante la interfase, pero que, cuando el núcleo se disgrega en la mitosis, se dispersa por el citoplasma y se transloca al centrosoma gracias a su asociación con los MTs por un mecanismo dependiente de las proteínas dineína y dinactina. En el

centrosoma, NuMa se convierte en una proteína mitótica centrosomal esencial, que se encarga de facilitar el entrecruzamiento de los MTs del huso mitótico, ayudando así a la organización y estabilidad de este desde el inicio de la mitosis hasta la anafase (Merdes and Cleveland, 1998; Sun and Schatten, 2006).

Continuamente aparecen nuevas proteínas con localización centrosomal, como es el caso del factor de transcripción Kaiso, el cual se ha localizado recientemente en el centrosoma de varios tipos celulares de mamíferos, aunque se desconoce qué función pueda desempeñar (Kantidze et al., 2009). Kaiso presenta múltiples residuos serina/treonina cuya fosforilación regula su localización subcelular e interacción con otras proteínas. Kaiso se une a promotores de proteínas como ciclina D1, “metastasin” y otras (Daniel, 2007) y generalmente tiene una localización nuclear difusa o asociada a estructuras puntuales en el núcleo. Recientemente, se ha descrito que, durante la interfase, Kaiso no sólo se localiza en el núcleo sino que también se localiza en el centrosoma. Además, en metafase se localiza en el centrosoma y en el huso mitótico y en telofase se acumula en el cuerpo medio (estructura formada por MTs situada en la zona intermedia durante la anafase) (Soubry et al.). Kaiso se localiza en el centrosoma junto a Catenina p120, una de las principales proteínas que interaccionan con Kaiso y que regula la unión a ADN y actividad transcripcional de Kaiso (Kantidze et al., 2009).

Estos son sólo algunos ejemplos de proteínas reguladoras localizadas en el centrosoma, cuyo número aumenta cada año, poniendo de manifiesto el desconocimiento que se posee de este diminuto orgánulo.

Con estos precedentes es posible que c-Fos tenga una nueva función fuera del núcleo, diferente a su función como factor de

transcripción. Ya otros autores han caracterizado una función de c-Fos fuera del núcleo. c-Fos puede actuar como un activador citosólico de la biosíntesis de fosfolípidos gracias a su capacidad de unión al retículo endoplasmático (RE), activando enzimas relacionadas con la síntesis de fosfolípidos requeridos para la biogénesis de membrana durante el crecimiento celular y la formación de las neuritas (Bussolino et al., 1998; Bussolino et al., 2001; Gil et al., 2004; Guido et al., 1996). La asociación de c-Fos al RE es necesaria para su capacidad de activación de la síntesis de fosfolípidos, y esta unión al RE es dependiente de la desfosforilación de c-Fos en residuos de tirosina (Portal et al., 2007). Las células en proceso de proliferación o extensión de membranas promueven una masiva biogénesis de membrana, a diferencia de aquellas que no están dividiéndose o no están creciendo activamente. En células T98G quiescentes, c-Fos se expresa en niveles muy bajos y se encuentra fosforilado en sus tirosinas 10 y 30 y disociado del RE. La inducción de la proliferación celular, además de promover la inducción de la síntesis de c-Fos, produce que el c-Fos pre-existente sea desfosforilado en sus tirosinas 10 y 30 y que se asocie al ER, activando la síntesis de fosfolípidos (Portal et al., 2007). En este contexto, c-Fos también se ha implicado en la síntesis de otro componente ubicuo de la membrana, los glicolípidos, debido a su asociación directa con la glucosilceramida sintasa (GlcCerS) (Crespo et al., 2008). Esta interacción provoca la activación de la GlcCerS y la inducción de la síntesis de glucosilceramida (GlcCer), primer glicosilado de la ruta de síntesis de glicolípidos (Crespo et al., 2008). La síntesis de GlcCer por GlcCerS es catalizada en el ER y en Golgi (Coste et al., 1986; Futerman and Pagano, 1991; Halter et al., 2007; Kohyama-Koganeya et al., 2004).

Estos experimentos ponen de manifiesto la existencia de proteínas finamente reguladas, capaces de dirigir diversos aspectos del proceso de división celular en diferentes compartimentos celulares. La acción de

proteínas con diferentes funciones en diferentes compartimentos celulares permite la coordinación de los diversos eventos que se producen durante la división celular y tal vez c-Fos forme parte de este mecanismo, regulando el ciclo celular a nivel transcripcional y a través de la cohesión del centrosoma por su interacción con C-NAP1.

Una segunda posibilidad que podría explicar la presencia de c-Fos en el centrosoma consiste en que C-NAP1 estuviese reteniendo a c-Fos en el centrosoma, facilitando su interacción con otras proteínas. En este contexto, la concentración en un compartimento de los componentes implicados en un proceso celular, sobre todo proteínas nucleares durante la disgregación del núcleo, puede preservar la integridad de los complejos ensamblados. Esta posibilidad fue sugerida por Levchenko y colaboradores, quienes describieron un modelo matemático que indicaba que el acoplamiento físico de moléculas pertenecientes a una misma red mejoraba el control temporal y espacial, limitando las interacciones no específicas (Levchenko et al., 2000). Además, estos autores propusieron que este acoplamiento intra-red aumentaba la eficiencia de rutas señaladoras de quinasas (por ejemplo en la cascada de las MAPK).

La sobreexpresión de c-Fos disminuye la cantidad de C-NAP1 endógeno en el centrosoma

Una vez se había caracterizado la interacción de c-Fos-CEP2/C-NAP1, el siguiente objetivo que se abordó fue estudiar las consecuencias fisiológicas que derivan de su interacción. En primer lugar, existía la posibilidad de que c-Fos tuviese un efecto sobre la función o localización de C-NAP1. Para comprobar esta posibilidad se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, donde se observó que al sobreexpresar c-Fos en

células humanas, la concentración de C-NAP1 endógeno en el centrosoma disminuía significativamente, tanto en células en interfase (Fig. III.22, A), como en mitosis (B). Este efecto de la sobreexpresión de c-Fos parece ser específico sobre C-NAP1, ya que la sobreexpresión de c-Fos no disminuía la cantidad de otra proteína centrosomal como es la γ -tubulina. Además, la sobreexpresión de JNK no tenía ningún efecto sobre la localización centrosomal de C-NAP1, mostrando la especificidad del efecto entre c-Fos y C-NAP1.

El efecto de c-Fos sobre C-NAP1 se podría explicar como un arrastre de C-NAP1 por c-Fos, hacia el citoplasma o al núcleo, sugiriendo un nuevo mecanismo de regulación de la cohesión del centrosoma, como se ha postulado anteriormente.

C-NAP1 provoca un aumento de la unión de AP-1 a ADN

El siguiente paso que se planteó fue estudiar si la interacción entre c-Fos y C-NAP1 podría implicar un mecanismo por el cual C-NAP1 modulase la unión de los factores AP-1 a ADN.

Como se ha comentado en la Introducción, la unión a ADN de los factores AP-1 se ve afectada por uniones proteína-proteína. En base a resultados previos de la Dra. Carmen Ivorra que mostraban que el secuestro de c-Fos por la lamina A/C en la envoltura nuclear inhibía la actividad transcripcional de AP-1 (Ivorra et al., 2006), se estudió el posible efecto de C-NAP1 sobre la unión a ADN de los factores AP-1 mediante ensayos EMSA. Se utilizaron extractos nucleares solubles, procedentes de células NIH-3T3 ayunadas o ayunadas+estimuladas, incubados con GST-C-NAP1Ct o GST. Los resultados mostraron un incremento de la unión de AP-1 a ADN en los extractos ayunados+estimulados incubados con GST-C-NAP1Ct en comparación con la incubación de estos extractos con el control GST (Fig. III.23).

En este contexto, tal vez se haya descubierto una nueva función para C-NAP1, no descrita previamente, que concuerda con la regulación precisa de c-Fos a través de su interacción con otras proteínas. Podría ser que C-NAP1 fuese capaz de entrar en el núcleo junto con c-Fos y actuar como coactivador de la transcripción mediada por AP-1, y esto podría explicar los resultados observados en el apartado anterior. Se han descrito diversos ejemplos en la literatura, donde proteínas centrosomales interactúan con factores de transcripción modificando su actividad. Por ejemplo, la proteína centrosomal CEP290 es capaz de modular la actividad del factor de transcripción ATF4 en el núcleo (Sayer et al., 2006) y la proteína centrosomal CPAP es capaz de actuar como coactivador de la actividad transcripcional de los factores de transcripción Stat5 y NF- κ B (Koyanagi et al., 2005; Peng et al., 2002) (ver Apartado 4 Introducción). Se desconocen los mecanismos por los cuales CEP290 y CPAP se translocan del centrosoma al núcleo y regulan la transcripción génica.

Otra posibilidad podría ser que, frente a un estímulo determinado, C-NAP1 ayudase a la activación de c-Fos, por ejemplo, promoviendo su fosforilación.

En lo referente a esta posibilidad, ya existen en la literatura múltiples ejemplos de este método de regulación de c-Fos. Así, la lamina A/C retiene a c-Fos en el anillo perinuclear inhibiendo su actividad transcripcional (Ivorra et al., 2006), pero además facilita la fosforilación de c-Fos por parte de ERK1/2 cuando existe un estímulo mitogénico (Gonzalez et al., 2008). La fosforilación de c-Fos permite su liberación de la unión a lamina A/C y una rápida activación transcripcional de los genes diana de AP-1 (Gonzalez et al., 2008). Este mecanismo permite a la célula tener una cierta cantidad de c-Fos inactivo que, frente a un

estímulo mitogénico, se activa rápida e independientemente de la síntesis *de novo*.

Como hemos comentado anteriormente, la regulación de c-Fos a nivel de modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación es uno de los mecanismos más estudiados. Bravo y colaboradores observaron que c-Fos podía ser inducido por factores de crecimiento en cualquier fase del ciclo, exceptuando durante la mitosis (Bravo et al., 1986), pudiendo postularse entonces que durante la mitosis las modificaciones post-traduccionales jugarían un papel muy importante en la regulación de su actividad. El papel que juega el estado de fosforilación de c-Fos durante la mitosis se encuentra todavía poco descrito. En este contexto, Yu y colaboradores, observaron que la proteína Aurora A, una serina/treonina quinasa mitótica, era capaz de fosforilar c-Fos durante la mitosis, lo cual no afectaba a la estabilidad de la proteína o a la capacidad de transactivación de c-Fos, pero sí a su capacidad de dimerizar (Yu et al., 2008). Aurora A está implicada en la progresión del ciclo celular, maduración de los centrosomas, punto de control mitótico, etc. La sobreexpresión de Aurora A puede transformar células en cultivo e *in vivo*, además de producir un bloqueo de la citoquinesis y un aumento en el número de centrosomas. Aurora A se localiza en el centrosoma de células mitóticas, tanto en el PCM como en los centriolos. Mientras su localización durante la mitosis está universalmente aceptada, existe diversidad de opiniones en cuanto a su localización durante la interfase, tal vez debido a su estudio en diferentes líneas celulares, modelos animales y anticuerpos (Kimura et al., 1997; Zhou et al., 1998). Lukasiewicz y colaboradores observaron la localización de Aurora A en el centrosoma durante todas las fases del ciclo celular, con concentraciones mínimas durante la interfase, pero concentraciones altas durante la mitosis (Lukasiewicz and Lingle, 2009). En este sentido, la localización de c-Fos en el centrosoma de células mitóticas podría estar

regulada por la fosforilación de la quinasa mitótica Aurora A, de modo que c-Fos viese inhibida su capacidad de unirse a proteínas necesarias para su actividad. Sería interesante pues, investigar el estado de fosforilación de la fracción de c-Fos que se localiza en el centrosoma, un tema no abordado en esta Tesis Doctoral. Por ejemplo, se podría investigar si la posible fosforilación de c-Fos por Aurora A pudiese producir algún efecto que explicase el desplazamiento de C-NAP1 del centrosoma, discutido en el apartado anterior.

En resumen, los resultados presentados sugieren una posible función centrosomal de c-Fos, ya que se localiza en el centrosoma de diversos tipos celulares y además su sobreexpresión ejerce un efecto sobre C-NAP1, desplazándolo del centrosoma, y tal vez afectando a la cohesión centriolar. Por otro lado, los resultados también apuntan a una posible función de C-NAP1 activando la transcripción de genes regulados por AP-1, ya que se ha observado que promueve la unión a ADN de los factores de transcripción AP-1. Los mecanismos por los cuales realiza esta función se desconocen, pero basándonos en la literatura se han postulado dos posibles hipótesis: que C-NAP1 actúe como coactivador de c-Fos en el núcleo, lo cual también explicaría el desplazamiento de C-NAP1 del centrosoma al sobreexpresar c-Fos, o que C-NAP1 facilitase la activación de c-Fos induciendo su fosforilación.

En cualquier caso la función de c-Fos sobre el centrosoma o el mecanismo por el cual C-NAP1 afecta a c-Fos está todavía por determinar. ¿Están c-Fos y C-NAP1 implicados en una regulación dual del ciclo celular? Futuros experimentos deberán responder a esta y a otras numerosas cuestiones al respecto.

¿La interacción entre c-Fos y C-NAP1 podría tener una implicación en cáncer?

Tanto c-Fos como el centrosoma están implicados en cáncer, una patología producida por la transformación maligna de una célula. Dicha transformación se debe frecuentemente a la mutación de genes implicados en la regulación de la proliferación y muerte celular, llevando a la proliferación descontrolada de las células anormales, con capacidad de invasión a otros tejidos.

Los genes diana de AP-1 incluyen reguladores clave de la proliferación, diferenciación, apoptosis, invasión y metástasis (Shaulian and Karin, 2001; Tulchinsky, 2000; van Dam and Castellazzi, 2001). Poco después de su descubrimiento, ya se implicó a la familia Fos en la progresión de tumores (Miller et al., 1984). Desde su primera relación con osteosarcomas y osteoblastomas, la familia Fos se ha implicado también en cáncer de mama, ovario, pulmón, piel, colon, páncreas, etc. (Milde-Langosch, 2005).

El centrosoma se ha relacionado con diversas patologías. Por ejemplo, se han descrito centrosomas disfuncionales en cáncer, en el síndrome de Alstrom (enfermedad hereditaria poco común que cursa con diabetes, cardiopatías, sordera, ceguera, etc), y en diversos desórdenes neurológicos, entre otros (Schatten, 2008).

En cuanto a la implicación del centrosoma en procesos tumorales, se ha caracterizado que las células cancerosas presentan con frecuencia centrosomas amplificados, una causa importante de inestabilidad cromosómica (Brinkley, 2001; D'Assoro et al., 2002; Fukasawa, 2005; Lingle and Salisbury, 2000; Pihan and Doxsey, 1999), además de la

pérdida de función del punto de control mitótico y una función defectuosa del quinetócoro. Una función alterada en la nucleación u organización de los MTs por parte del centrosoma podría implicar la pérdida de la arquitectura de la célula y del tejido, proceso observado en muchos cánceres (anaplasia). Los centrosomas amplificadas son un rasgo común en modelos tumorales de humanos y animales, incluyendo cáncer de próstata, neuroblastoma, glioma y carcinoma del timo (Friedlander, 1982; Gustafson et al., 2000; Kaneko et al., 1980; Kuo et al., 2000; Pihan et al., 2001; Sharp et al., 1982), tumores sólidos en el cerebro (Pihan et al., 1998), en mama (Lingle et al., 1998), conducto biliar (Kuo et al., 2000), colon (Ghadimi et al., 2000), carcinoma de cabeza y cuello (Gustafson et al., 2000) y cáncer de páncreas (Sato et al., 2001).

Las aberraciones del centrosoma encontradas en cánceres no sólo están constituidas por aberraciones numéricas, sino también estructurales, como son: un aumento en el tamaño del centrosoma, la formación de cuerpos acentriolares (Casenghi et al., 2003; Fry et al., 1998a) (debido a que las proteínas “coiled-coil” centrosomales son propensas a formar ensamblajes intracelulares (Lingle et al., 2002)) y alteraciones en el estado de fosforilación de los componentes del PCM. Aunque también se han encontrado alteraciones como un PCM anormalmente grande, centriolos con orientación anormal, y la posición del centrosoma con polaridad invertida en carcinomas humanos de mama (Lingle and Salisbury, 1999) y en un modelo de cáncer de próstata murino (Schatten et al., 2000).

Aunque no se han establecido los mecanismos moleculares subyacentes, se han propuesto diversas teorías, no mutuamente excluyentes, para intentar explicar la aparición de centrosomas amplificadas en cánceres (Nigg, 2002; Nigg, 2006; Tarapore and Fukasawa, 2002):

1) La reduplicación de los centrosomas: este proceso requiere una interfase prolongada, que se puede dar *in vivo* en respuesta a daño en el ADN (Dodson et al., 2004). Algunas onco-proteínas pueden provocar una reduplicación del centrosoma, como Plk4, la cual puede también producir el crecimiento de múltiples pro-centriolos a partir de un solo parental (Habedanck et al., 2005).

2) Fallo en la citoquinesis, causando una reduplicación del genoma y del centrosoma: estos dos resultados pueden favorecer la supervivencia de células genéticamente inestables y potencialmente dañinas (Nigg, 2002; Storchova and Pellman, 2004). El fallo de la citoquinesis se puede producir por varias causas, entre ellas la persistencia del daño en el ADN, desregulación de los procesos que llevan a la progresión de la mitosis o citoquinesis, etc. Un ejemplo de la división que lleva a la amplificación del centrosoma es la sobreexpresión de la quinasa Aurora A, con frecuencia sobreexpresada en tumores humanos (Anand et al., 2003; Meraldi et al., 2002; Meraldi et al., 2004).

3) Una separación incorrecta de los centriolos, lo que puede provocar que cada centriolo por separado forme un centrosoma diferente (Forgues et al., 2003; Hut et al., 2003).

4) Formación *de novo* de centrosomas acentriolares: recientemente se ha descrito que no sólo los epitelios multiciliados especializados son capaces de formar centriolos *de novo*, sino también células somáticas de vertebrados cuyos centriolos han sido eliminados por ablación con láser o microcirugía (Dodson et al., 2004; Schatten et al., 2000).

5) Fusión de la célula (Hollander et al., 1999; Jallepalli and Lengauer, 2001).

Muchas de las proteínas que se encuentran desreguladas en tumores participan en la regulación de la duplicación e integridad de los centrosomas, como son: p53 (Fukasawa, 2005), Aurora A (Meraldi et al.,

2004), Plk1 (Strebhardt and Ullrich, 2006) y Nek2 (Hayward et al., 2004), entre otras. Estas proteínas pertenecen a uno de estos tres grupos: reguladores del ciclo celular, proteínas de respuesta a daño en el ADN o transporte núcleo-citoplasmático. Mutaciones que activan o inhiben estas proteínas llevan a la formación de múltiples centrosomas, lo que a su vez conduce a un aumento de los defectos mitóticos y errores en la segregación cromosómica, facilitando la progresión tumoral. En general, los reguladores positivos de la duplicación del centrosoma son oncogenes y los reguladores negativos son supresores de tumores (Fukasawa, 2007). Resumiendo, el centrosoma podría ser una de las causas de interrupción de la fidelidad y estabilidad genómica, no sólo por cambios mecánicos, como la organización del huso mitótico y citoquinesis, sino también por su potencial para modular el ciclo de celular mediante el reclutamiento de proteínas reguladoras de este proceso.

Puesto que la inactivación de C-NAP1 por diferentes técnicas, produce la separación de los centriolos (ver Apartado 3.2 Introducción) y esto podría ser una de las causas de la aparición de centrosomas amplificados en cánceres, como se ha comentado anteriormente, puede postularse una relación entre centrosomas amplificados, cáncer y desregulación de la expresión de c-Fos. Por ejemplo, en la mayoría de carcinomas pancreáticos humanos, tanto el ARNm como la proteína de c-Fos se encuentran sobreexpresados (Lee and Charalambous, 1994; Wakita et al., 1992). La línea celular de carcinoma pancreático de hámster tiene incrementada la movilidad celular debido a la sobreexpresión de c-Fos (Akagi et al., 1997). Además, en líneas celulares humanas de cáncer de páncreas se han descrito centrosomas anormales por su tamaño, forma y número, existiendo correlación positiva entre el nivel de

defectos centrosomales y el nivel de desequilibrios cromosomales (Sato et al., 2001).

Un ejemplo interesante es el observado en adenocarcinomas, donde se ha descrito que existe una sobreexpresión de Fra-1 (otro miembro de la familia de factores de transcripción AP-1) y ciclina D, resultado de una sobreexpresión anormal de β -Catenina en el núcleo, la cual ha sido descrita recientemente en el centrosoma (ver Apartado 3.2 Introducción) (Wang et al., 2002).

Consideraciones finales

En esta Tesis Doctoral se ha descrito una nueva interacción entre el factor de transcripción c-Fos, perteneciente a la familia AP-1, y la proteína centrosomal CEP2/C-NAP1, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los resultados demuestran que la interacción se produce mediante el dominio b-ZIP de c-Fos y una región de CEP2 que también contiene un motivo en cremallera de leucinas (aa 2233-2293). La mutación de una o más leucinas de la cremallera de leucinas de CEP2/C-NAP1 produce la eliminación de la interacción con c-Fos. Así, aunque la cremallera de leucinas de CEP2/C-NAP1 no es suficiente para la interacción con c-Fos, la integridad de dicho dominio parece esencial. La colocalización de C-NAP1 y c-Fos en el centrosoma se demostró en experimentos de doble inmunofluorescencia y mediante un aislamiento de centrosomas y western-blot. Por otro lado, la sobreexpresión de c-Fos parece afectar a la localización subcelular de C-NAP1, ya que disminuye su localización en el centrosoma tanto en mitosis como en interfase. En cuanto a las consecuencias funcionales de la interacción, nuestros resultados sugieren que C-NAP1 promueve la unión a ADN de factores AP-1.

En su conjunto, estos resultados ilustran una nueva función para la proteína CEP2/C-NAP1 en la regulación de la actividad transcripcional

de c-Fos, mecanismo descrito para diferentes proteínas centrosomales con otros factores de transcripción. Esta regulación podría ser directa, actuando C-NAP1 como coactivador de c-Fos, aumentando la transcripción de los genes diana regulados por los factores AP-1. Por otro lado, podría ser una activación indirecta de c-Fos, de modo que C-NAP1 ayudase a la activación de c-Fos, por ejemplo promoviendo su fosforilación o su localización en el centrosoma, donde podría interactuar con otras proteínas.

Nuestros hallazgos también sugieren una nueva posible función de c-Fos en el centrosoma, desplazando a C-NAP1 fuera de este orgánulo. Esta función se podría explicar por la estrecha relación existente entre el ciclo del centrosoma y el ciclo celular, no sólo debido a su implicación en la formación del huso mitótico y citoquinesis, sino también por la función del centrosoma como “estación de anclaje” de moléculas reguladoras del ciclo celular. Así, el centrosoma juega un papel crítico en la regulación del ciclo celular, tanto en mitosis como en interfase, proveyendo de una plataforma central donde, por medio de la integración, regulación y amplificación de las rutas de señalización, se desencadenarán las siguientes fases del ciclo celular.

Finalmente, tanto el centrosoma como c-Fos están involucrados en el desarrollo de procesos cancerosos, por lo que sería interesante investigar si la relación entre c-Fos y C-NAP1 tiene alguna implicación en este proceso patológico.

Estudios futuros deberán abordar muchas preguntas, todavía sin respuesta, en cuanto a las implicaciones funcionales de la interacción entre c-Fos y C-NAP1.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) En un sistema de doble híbrido en levadura, el dominio b-ZIP de c-Fos interactúa con la zona C-terminal de la proteína centrosomal CEP2 (CEP2Ct). Esta interacción se observa también entre la proteína recombinante CEP2Ct y c-Fos endógeno presente en células de mamífero.
- 2) El motivo en cremallera de leucinas de CEP2 (aa 2233-2293) es necesario, pero no suficiente, para la interacción con c-Fos.
- 3) *In vitro*, la proteína recombinante C-NAP1Ct humana interactúa tanto con c-Fos endógeno de células humanas HeLa como con c-Fos sobreexpresado. También en este caso la cremallera de leucinas de C-NAP1 (aa 2275-2296) es necesaria para la interacción con c-Fos.
- 4) Experimentos de coimmunoprecipitación y western-blot en células HeLa, demuestran que la interacción entre las proteínas sobreexpresadas C-NAP1Ct y c-Fos ocurre *in vivo*. La mutación de las leucinas 2275, 2282 y 2289 de C-NAP1 disminuye la interacción con c-Fos como ocurría con las proteínas murinas.
- 5) Experimentos de doble inmunofluorescencia confocal sugieren que C-NAP1 colocaliza en el centrosoma con γ -tubulina (marcador de este orgánulo) y c-Fos en diversos tipos celulares (HeLa, NIH-3T3 y U2OS).
- 6) c-Fos y C-NAP1 co-purifican en fracciones celulares enriquecidas con centrosomas.
- 7) La sobreexpresión de c-Fos en células humanas HeLa provoca una disminución de la cantidad de C-NAP1 presente en el centrosoma, tanto en células en interfase como en mitosis.

Conclusiones _____

- 8) *In vitro*, la incubación de extractos nucleares de células NIH-3T3 con GST-C-NAP1Ct aumenta la unión a ADN de AP-1 inducida por mitogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

Abal, M., Keryer, G. and Bornens, M. (2005). Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition. *Biol Cell* **97**, 425-34.

Abate, C., Marshak, D. R. and Curran, T. (1991). Fos is phosphorylated by p34cdc2, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* **6**, 2179-85.

Abe, M. K., Kuo, W. L., Hershenson, M. B. and Rosner, M. R. (1999). Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol* **19**, 1301-12.

Abumuslimov, S. S., Nadezhdina, E. S. and Chentsov Iu, S. (1994). [An electron microscopic study of centriole and centrosome morphogenesis in the early development of the mouse]. *Tsitologiya* **36**, 1054-61.

Acquaviva, C., Brockly, F., Ferrara, P., Bossis, G., Salvat, C., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2001). Identification of a C-terminal tripeptide motif involved in the control of rapid proteasomal degradation of c-Fos proto-oncoprotein during the G(0)-to-S phase transition. *Oncogene* **20**, 7563-72.

Akagi, J., Egami, H., Kurizaki, T., Ohmachi, H. and Ogawa, M. (1997). Signal transduction pathway of the induction of cell motility in hamster pancreatic ductal adenocarcinoma cell. *Invasion Metastasis* **17**, 16-25.

Ameyar, M., Wisniewska, M. and Weitzman, J. B. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* **85**, 747-52.

Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. and Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**, 51-62.

Andersen, J. S., Wilkinson, C. J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E. A. and Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-4.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-39.

Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2001). Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* **276**, 18665-72.

Baer, R. and Ludwig, T. (2002). The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 86-91.

Bahe, S., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J., Leiss, F. and Nigg, E. A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J Cell Biol* **171**, 27-33.

Bahmanyar, S., Kaplan, D. D., Deluca, J. G., Giddings, T. H., Jr., O'Toole, E. T., Winey, M., Salmon, E. D., Casey, P. J., Nelson, W. J. and Barth, A. I. (2008). beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev* **22**, 91-105.

Balsitis, S. J., Sage, J., Duensing, S., Munger, K., Jacks, T. and Lambert, P. F. (2003). Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol Cell Biol* **23**, 9094-103.

Bannister, A. J., Brown, H. J., Sutherland, J. A. and Kouzarides, T. (1994). Phosphorylation of the c-Fos and c-Jun HOB1 motif stimulates its activation capacity. *Nucleic Acids Res* **22**, 5173-6.

Barker, P. E., Rabin, M., Watson, M., Breg, W. R., Ruddle, F. H. and Verma, I. M. (1984). Human c-fos oncogene mapped within chromosomal region 14q21---q31. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5826-30.

Barr, A. R. and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* **120**, 2987-96.

Basbous, J., Jariel-Encontre, I., Gomard, T., Bossis, G. and Piechaczyk, M. (2008). Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: is there a unique answer? *Biochimie* **90**, 296-305.

Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A. and Raff, J. W. (2006). Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375-86.

Berns, M. W. and Richardson, S. M. (1977). Continuation of mitosis after selective laser microbeam destruction of the centriolar region. *J Cell Biol* **75**, 977-82.

Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M. K., Carmo, N., Balloux, F., Callaini, G. and Glover, D. M. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol* **15**, 2199-207.

Blagden, S. P. and Glover, D. M. (2003). Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. *Nat Cell Biol* **5**, 505-11.

Bloom, J. and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* **13**, 41-7.

Bobinnec, Y., Khodjakov, A., Mir, L. M., Rieder, C. L., Ede, B. and Bornens, M. (1998). Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol* **143**, 1575-89.

Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. and Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA

binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**, 1386-92.

Borel, F., Lohez, O. D., Lacroix, F. B. and Margolis, R. L. (2002). Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9819-24.

Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 25-34.

Bossis, G., Malnou, C. E., Farras, R., Andermarcher, E., Hipkind, R., Rodriguez, M., Schmidt, D., Muller, S., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2005). Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* **25**, 6964-79.

Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L. and Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J* **16**, 1695-709.

Boveri, T. (1887). Über die Befruchtung der Eier von *Ascaris megalocephala*. *Sitz-Ber. Ges. Morph. Phys. München* **3**, 71-80.

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**, 248-54.

Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. and Muller, R. (1986). Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle. *Embo J* **5**, 695-700.

Brinkley, B. R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol* **11**, 18-21.

Brown, C. R., Doxsey, S. J., White, E. and Welch, W. J. (1994). Both viral (adenovirus E1B) and cellular (hsp 70, p53) components interact with centrosomes. *J Cell Physiol* **160**, 47-60.

Brown, H. J., Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1995). An inhibitor domain in c-Fos regulates activation domains containing the HOB1 motif. *Embo J* **14**, 124-31.

Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**, 82-8.

Bussolino, D. F., de Arriba Zerpa, G. A., Grabois, V. R., Conde, C. B., Guido, M. E. and Caputto, B. L. (1998). Light affects c-fos expression and phospholipid synthesis in both retinal ganglion cells and photoreceptor cells in an opposite way for each cell type. *Brain Res Mol Brain Res* **58**, 10-5.

Bussolino, D. F., Guido, M. E., Gil, G. A., Borioli, G. A., Renner, M. L., Grabois, V. R., Conde, C. B. and Caputto, B. L. (2001). c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism. *FASEB J* **15**, 556-8.

Carroll, P. E., Okuda, M., Horn, H. F., Biddinger, P., Stambrook, P. J., Gleich, L. L., Li, Y. Q., Tarapore, P. and Fukasawa, K. (1999). Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* **18**, 1935-44.

Casenghi, M., Meraldi, P., Weinhart, U., Duncan, P. I., Korner, R. and Nigg, E. A. (2003). Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell* **5**, 113-25.

Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Casenghi, M., Zaira Limongi, M., D'Angelo, M., Soddu, S., Lavia, P. and Cundari, E. (2001). p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* **276**, 19205-13.

Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-80.

Cohen, D. R. and Curran, T. (1989). The structure and function of the fos proto-oncogene. *Crit Rev Oncog* **1**, 65-88.

Coste, H., Martel, M. B. and Got, R. (1986). Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochim Biophys Acta* **858**, 6-12.

Cowell, I. G. (2002). E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *Bioessays* **24**, 1023-9.

Crespo, P. M., Silvestre, D. C., Gil, G. A., Maccioni, H. J., Daniotti, J. L. and Caputto, B. L. (2008). c-Fos activates glucosylceramide synthase and glycolipid synthesis in PC12 cells. *J Biol Chem* **283**, 31163-71.

Crish, J. F. and Eckert, R. L. (2008). Synergistic activation of human involucrin gene expression by Fra-1 and p300--evidence for the presence of a multiprotein complex. *J Invest Dermatol* **128**, 530-41.

Curran, T., Gordon, M. B., Rubino, K. L. and Sambucetti, L. C. (1987). Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* **2**, 79-84.

Curran, T., MacConnell, W. P., van Straaten, F. and Verma, I. M. (1983). Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol* **3**, 914-21.

Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. and Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* **36**, 259-68.

Curran, T. and Teich, N. M. (1982). Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology* **116**, 221-35.

Chen, R. H., Abate, C. and Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10952-6.

Chen, Z., Indjeian, V. B., McManus, M., Wang, L. and Dynlacht, B. D. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. *Dev Cell* **3**, 339-50.

Chinenov, Y. and Kerppola, T. K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* **20**, 2438-52.

Chretien, D., Buendia, B., Fuller, S. D. and Karsenti, E. (1997). Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J Struct Biol* **120**, 117-33.

D'Assoro, A. B., Lingle, W. L. and Salisbury, J. L. (2002). Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* **21**, 6146-53.

Daboussi, F., Thacker, J. and Lopez, B. S. (2005). Genetic interactions between RAD51 and its paralogues for centrosome fragmentation and ploidy control, independently of the sensitivity to genotoxic stresses. *Oncogene* **24**, 3691-6.

Dagleish, G., Veyrone, J. L., Blanchard, J. M. and Hesketh, J. (2001). mRNA localization by a 145-nucleotide region of the c-fos 3'-untranslated region. Links to translation but not stability. *J Biol Chem* **276**, 13593-9.

Dammermann, A. and Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol* **159**, 255-66.

Daniel, J. M. (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 59-68.

Debec, A., Szollosi, A. and Szollosi, D. (1977). A *Drosophila melanogaster* cell line lacking centriole. *Biology of the cell under the auspices of the European Cell Biology Organization* **44**, 133-138.

Delattre, M., Canard, C. and Gonczy, P. (2006). Sequential protein recruitment in *C. elegans* centriole formation. *Curr Biol* **16**, 1844-9.

Deng, C. X. and Wang, R. H. (2003). Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R113-23.

Deng, T. and Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* **7**, 479-90.

Deng, T. and Karin, M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* **371**, 171-5.

Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. and Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**, 2540-51.

Dietz, R. (1966). The dispensability of the centrioles in the spermatocyte division of *Pales ferruginea*. London.

Diviani, D. and Scott, J. D. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J Cell Sci* **114**, 1431-7.

Dlagic, M., Grinberg, A. V., Leonard, D. A. and Kerppola, T. K. (2001). DNA sequence-dependent folding determines the divergence in binding specificities between Maf and other bZIP proteins. *Embo J* **20**, 828-40.

Dodson, H., Bourke, E., Jeffers, L. J., Vagnarelli, P., Sonoda, E., Takeda, S., Earnshaw, W. C., Merdes, A. and Morrison, C. (2004). Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *Embo J* **23**, 3864-73.

Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 688-98.

Doxsey, S., McCollum, D. and Theurkauf, W. (2005). Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 411-34.

Edo, M. (2006). Caracterización molecular y funcional de una nueva interacción entre el inhibidor de ciclo celular p27 y SNX6, una proteína involucrada en el tráfico intracelular. Valencia: Universidad de Valencia.

Eferl, R. and Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859-68.

Estus, S., Zaks, W. J., Freeman, R. S., Gruda, M., Bravo, R. and Johnson, E. M., Jr. (1994). Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* **127**, 1717-27.

Fabbro, M., Zhou, B. B., Takahashi, M., Sarcevic, B., Lal, P., Graham, M. E., Gabrielli, B. G., Robinson, P. J., Nigg, E. A., Ono, Y. et al. (2005). Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell* **9**, 477-88.

Fragher, A. J. and Fry, A. M. (2003). Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol Biol Cell* **14**, 2876-89.

Ferrara, P., Andermarcher, E., Bossis, G., Acquaviva, C., Brockly, F., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2003). The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene* **22**, 1461-74.

Fisch, T. M., Prywes, R., Simon, M. C. and Roeder, R. G. (1989). Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev* **3**, 198-211.

Fisk, H. A. and Winey, M. (2001). The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell* **106**, 95-104.

Flemming, W. (1875). Studien über die Entwicklungsgeschichte der Najaden. *Sitzungsber Akad Wissensch Wien* **71**, 81-147.

Forgues, M., Difilippantonio, M. J., Linke, S. P., Ried, T., Nagashima, K., Feden, J., Valerie, K., Fukasawa, K. and Wang, X. W. (2003). Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol* **23**, 5282-92.

Friedlander, M. (1982). Centrioles and centrospheres in giant cells of human gliomas. *J Submicrosc Cytol* **14**, 401-6.

Fry, A. M., Arnaud, L. and Nigg, E. A. (1999). Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. *J Biol Chem* **274**, 16304-10.

Fry, A. M., Descombes, P., Twomey, C., Bacchieri, R. and Nigg, E. A. (2000). The NIMA-related kinase X-Nek2B is required for efficient assembly of the zygotic centrosome in *Xenopus laevis*. *J Cell Sci* **113** (Pt 11), 1973-84.

Fry, A. M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y. D., Tanaka, K. and Nigg, E. A. (1998a). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol* **141**, 1563-74.

Fry, A. M., Meraldi, P. and Nigg, E. A. (1998b). A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J* **17**, 470-81.

Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* **230**, 6-19.

Fukasawa, K. (2007). Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* **7**, 911-24.

Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S. and Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271**, 1744-7.

Futerman, A. H. and Pagano, R. E. (1991). Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem J* **280** (Pt 2), 295-302.

Ghadimi, B. M., Sackett, D. L., Difilippantonio, M. J., Schrock, E., Neumann, T., Jauho, A., Auer, G. and Ried, T. (2000). Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in

diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* **27**, 183-90.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-60.

Gil, G. A., Bussolino, D. F., Portal, M. M., Pecchio, A. A., Renner, M. L., Borioli, G. A., Guido, M. E. and Caputto, B. L. (2004). c-Fos activated phospholipid synthesis is required for neurite elongation in differentiating PC12 cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1881-94.

Ginty, D. D., Bonni, A. and Greenberg, M. E. (1994). Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* **77**, 713-25.

Glover, J. N. and Harrison, S. C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* **373**, 257-61.

Gobl, A. E., Berg, M., Lopez-Egido, J. R., Oberg, K., Skogseid, B. and Westin, G. (1999). Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1447**, 51-6.

Gomard, T., Jariel-Encontre, I., Basbous, J., Bossis, G., Mocquet-Torcy, G. and Piechaczyk, M. (2008). Fos family protein degradation by the proteasome. *Biochem Soc Trans* **36**, 858-63.

Gonzalez, J. M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P. and Andres, V. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol* **183**, 653-66.

Gorman, C., Padmanabhan, R. and Howard, B. H. (1983). High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells. *Science* **221**, 551-3.

Gould, M. C. and Stephano, J. L. (1999). MAP kinase, meiosis, and sperm centrosome suppression in *Urechis caupo*. *Dev Biol* **216**, 348-58.

Graser, S., Stierhof, Y. D. and Nigg, E. A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J Cell Sci* **120**, 4321-31.

Greenberg, M. E. and Ziff, E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* **311**, 433-8.

Grigoryan, G. and Keating, A. E. (2008). Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 477-83.

Gromley, A., Yeaman, C., Rosa, J., Redick, S., Chen, C. T., Mirabelle, S., Guha, M., Sillibourne, J. and Doxsey, S. J. (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell* **123**, 75-87.

Guido, M. E., de Arriba Zerpa, G. A., Bussolino, D. F. and Caputto, B. L. (1996). Immediate early gene c-fos regulates the synthesis of phospholipids but not of gangliosides. *J Neurosci Res* **43**, 93-8.

Gustafson, L. M., Gleich, L. L., Fukasawa, K., Chadwell, J., Miller, M. A., Stambrook, P. J. and Gluckman, J. L. (2000). Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. *Laryngoscope* **110**, 1798-801.

Habedanck, R., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J. and Nigg, E. A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* **7**, 1140-6.

Hai, T. and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3720-4.

Hai, T. and Hartman, M. G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive

element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**, 1-11.

Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. and Leder, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* **55**, 917-24.

Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., de Maziere, A. M., Vieira, O. V., Mattjus, P., Klumperman, J., van Meer, G. and Sprong, H. (2007). Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J Cell Biol* **179**, 101-15.

Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C. M., Lallemand, D., Yaniv, M. and Rubin, L. L. (1995). A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* **14**, 927-39.

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A. and Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* **155**, 1109-16.

Harper, J. W. (1997). Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* **29**, 91-107.

Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 56-64.

Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H. and Ohta, T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* **276**, 14537-40.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-9.

Hayward, D. G., Clarke, R. B., Faragher, A. J., Pillai, M. R., Hagan, I. M. and Fry, A. M. (2004). The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer. *Cancer Res* **64**, 7370-6.

He, H. and Ping, F. (2009). The SIE, SRE, CRE, and FAP-1 four intracellular signal pathways between stimulus and the expression of c-fos promoter. *J Cell Biochem* **106**, 764-8.

Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* **382**, 420-5.

Helps, N. R., Luo, X., Barker, H. M. and Cohen, P. T. (2000). NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J* **349**, 509-18.

Herdegen, T. and Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28**, 370-490.

Herdegen, T. and Waetzig, V. (2001). AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* **20**, 2424-37.

Hinchcliffe, E. H., Li, C., Thompson, E. A., Maller, J. L. and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* **283**, 851-4.

Hinchcliffe, E. H. and Sluder, G. (2001). "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev* **15**, 1167-81.

Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T. A., Kim, K. E., Tolosa, E., Ashwell, J. D. et al. (1999). Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* **23**, 176-84.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.

Hsu, L. C. and White, R. L. (1998). BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12983-8.

Hung, L. Y., Chen, H. L., Chang, C. W., Li, B. R. and Tang, T. K. (2004). Identification of a novel microtubule-destabilizing motif in CPAP that binds to tubulin heterodimers and inhibits microtubule assembly. *Mol Biol Cell* **15**, 2697-706.

Hung, L. Y., Tang, C. J. and Tang, T. K. (2000). Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol Cell Biol* **20**, 7813-25.

Hut, H. M., Lemstra, W., Blaauw, E. H., Van Cappellen, G. W., Kampinga, H. H. and Sibon, O. C. (2003). Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell* **14**, 1993-2004.

Iovino, F., Lentini, L., Amato, A. and Di Leonardo, A. (2006). RB acute loss induces centrosome amplification and aneuploidy in murine primary fibroblasts. *Mol Cancer* **5**, 38.

Ivorra, C., Kubicek, M., Gonzalez, J. M., Sanz-Gonzalez, S. M., Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J. E., Burke, B. and Andres, V. (2006). A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev* **20**, 307-20.

Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A. and Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**, 143-8.

Jakobs, A., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M. and Niedenthal, R. (2007). Ubc9 fusion-directed SUMOylation identifies constitutive and inducible SUMOylation. *Nucleic Acids Res* **35**, e109.

Jallepalli, P. V. and Lengauer, C. (2001). Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* **1**, 109-17.

Jariel-Encontre, I., Bossis, G. and Piechaczyk, M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 153-77.

Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. and Papaioannou, V. (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* **71**, 577-86.

Kanaitzuka, T., Itani, K., Shigeta, H., Yamamura, Y., Kogawa, T., Yoshikawa, T., Sugino, S., Kanatsuna, T., Kondou, M., Takashina, K. et al. (1987). [A case report of giant retroperitoneal hemolymphangioma]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* **76**, 1595-603.

Kaneko, H., Ishikawa, S., Sumida, T., Sekiya, M., Toshima, M., Kobayashi, H. and Naka, Y. (1980). Ultrastructural studies of a thymic carcinoid tumor. *Acta Pathol Jpn* **30**, 651-8.

Kantidze, O. L., Kamalyukova, I. M. and Razin, S. V. (2009). Association of the mammalian transcriptional regulator kaiso with centrosomes and the midbody. *Cell Cycle* **8**, 2303-4.

Kaul, S. C., Reddel, R. R., Mitsui, Y. and Wadhwa, R. (2001). An N-terminal region of mot-2 binds to p53 in vitro. *Neoplasia* **3**, 110-4.

Kerppola, T. K. (1997). Comparison of DNA bending by Fos-Jun and phased A tracts by multifactorial phasing analysis. *Biochemistry* **36**, 10872-84.

Kerppola, T. K. and Curran, T. (1994). Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene* **9**, 675-84.

Khan, S. H. and Wahl, G. M. (1998). p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest. *Cancer Res* **58**, 396-401.

Khodjakov, A., Cole, R. W., Oakley, B. R. and Rieder, C. L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol* **10**, 59-67.

Khodjakov, A. and Rieder, C. L. (1999). The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol* **146**, 585-96.

Khodjakov, A. and Rieder, C. L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol* **153**, 237-42.

Kim, J., Krishnaswami, S. R. and Gleeson, J. G. (2008a). CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Hum Mol Genet* **17**, 3796-805.

Kim, J. C., Ou, Y. Y., Badano, J. L., Esmail, M. A., Leitch, C. C., Fiedrich, E., Beales, P. L., Archibald, J. M., Katsanis, N., Rattner, J. B. et al. (2005). MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. *J Cell Sci* **118**, 1007-20.

Kim, K., Lee, S., Chang, J. and Rhee, K. (2008b). A novel function of CEP135 as a platform protein of C-NAP1 for its centriolar localization. *Exp Cell Res* **314**, 3692-700.

Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K. and Okano, Y. (1997). Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J Biol Chem* **272**, 13766-71.

Kirkham, M., Muller-Reichert, T., Oegema, K., Grill, S. and Hyman, A. A. (2003). SAS-4 is a *C. elegans* centriolar protein that controls centrosome size. *Cell* **112**, 575-87.

Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y. D. and Nigg, E. A. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* **13**, 190-202.

Ko, L. J. and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**, 1054-72.

Kochanski, R. S. and Borisy, G. G. (1990). Mode of centriole duplication and distribution. *J Cell Biol* **110**, 1599-605.

Kohyama-Koganeya, A., Sasamura, T., Oshima, E., Suzuki, E., Nishihara, S., Ueda, R. and Hirabayashi, Y. (2004). Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors. *J Biol Chem* **279**, 35995-6002.

Kovacs, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* **20**, 665-72.

Koyanagi, M., Hijikata, M., Watashi, K., Masui, O. and Shimotohno, K. (2005). Centrosomal P4.1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **280**, 12430-7.

Kubbutat, M. H., Jones, S. N. and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.

Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S. and Shiina, N. (1999). Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J Cell Biol* **147**, 969-80.

Kumar, D., Ray, A. and Ray, B. K. (2009). Transcriptional synergy mediated by SAF-1 and AP-1: critical role of N-terminal polyalanine and two zinc finger domains of SAF-1. *J Biol Chem* **284**, 1853-62.

Kuo, K. K., Sato, N., Mizumoto, K., Maehara, N., Yonemasu, H., Ker, C. G., Sheen, P. C. and Tanaka, M. (2000). Centrosome abnormalities in human carcinomas of the gallbladder and intrahepatic and extrahepatic bile ducts. *Hepatology* **31**, 59-64.

Kuroki, Y., Shiozawa, S., Kano, J. and Chihara, K. (1995). Competition between c-fos and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the transcriptional control of type I collagen synthesis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Cell Physiol* **164**, 459-64.

LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A. and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**, 847-62.

Lacey, K. R., Jackson, P. K. and Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2817-22.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-64.

Lane, D. P. and Benchimol, S. (1990). p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* **4**, 1-8.

Lane, H. A. and Nigg, E. A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* **135**, 1701-13.

Laner-Plamberger, S., Kaser, A., Paulischta, M., Hauser-Kronberger, C., Eichberger, T. and Frischauf, A. M. (2009). Cooperation between GLI and JUN enhances transcription of JUN and selected GLI target genes. *Oncogene* **28**, 1639-51.

Lange, B. M. (2002). Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 35-43.

Lange, B. M. and Gull, K. (1995). A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J Cell Biol* **130**, 919-27.

Lavigne, P., Crump, M. P., Gagne, S. M., Hodges, R. S., Kay, C. M. and Sykes, B. D. (1998). Insights into the mechanism of heterodimerization from the 1H-NMR solution structure of the c-Myc-Max heterodimeric leucine zipper. *J Mol Biol* **281**, 165-81.

Lee, C. S. and Charalambous, D. (1994). Immunohistochemical localisation of the c-fos oncoprotein in pancreatic cancers. *Zentralbl Pathol* **140**, 271-5.

Lee, H. J., Palkovits, M. and Young, W. S., 3rd. (2006). miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15669-74.

Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. and Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* **325**, 368-72.

Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**, 741-52.

Leidel, S., Delattre, M., Cerutti, L., Baumer, K. and Gonczy, P. (2005). SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nat Cell Biol* **7**, 115-25.

Leidel, S. and Gonczy, P. (2003). SAS-4 is essential for centrosome duplication in *C. elegans* and is recruited to daughter centrioles once per cell cycle. *Dev Cell* **4**, 431-9.

Levchenko, A., Bruck, J. and Sternberg, P. W. (2000). Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5818-23.

Levine, A. J., Momand, J. and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453-6.

Li, M., Satinover, D. L. and Brautigan, D. L. (2007). Phosphorylation and functions of inhibitor-2 family of proteins. *Biochemistry* **46**, 2380-9.

Lingle, W. L., Barrett, S. L., Negron, V. C., D'Assoro, A. B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C. M., Reynolds, C. and Salisbury, J. L. (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1978-83.

Lingle, W. L., Lutz, W. H., Ingle, J. N., Maihle, N. J. and Salisbury, J. L. (1998). Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2950-5.

Lingle, W. L. and Salisbury, J. L. (1999). Altered centrosome structure is associated with abnormal mitoses in human breast tumors. *Am J Pathol* **155**, 1941-51.

Lingle, W. L. and Salisbury, J. L. (2000). The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol* **49**, 313-29.

Liu, H., Deng, X., Shyu, Y. J., Li, J. J., Taparowsky, E. J. and Hu, C. D. (2006a). Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *Embo J* **25**, 1058-69.

Liu, J., Zheng, Q., Deng, Y., Cheng, C. S., Kallenbach, N. R. and Lu, M. (2006b). A seven-helix coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15457-62.

Lukasiewicz, K. B. and Lingle, W. L. (2009). Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environ Mol Mutagen* **50**, 602-19.

Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**, 375-82.

Ma, Z., Izumi, H., Kanai, M., Kabuyama, Y., Ahn, N. G. and Fukasawa, K. (2006). Mortalin controls centrosome duplication via modulating centrosomal localization of p53. *Oncogene* **25**, 5377-90.

Mack, G. J., Rees, J., Sandblom, O., Balczon, R., Fritzler, M. J. and Rattner, J. B. (1998). Autoantibodies to a group of centrosomal

proteins in human autoimmune sera reactive with the centrosome. *Arthritis Rheum* **41**, 551-8.

Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B. K., Jackson, P. K., Bartek, J. and Lukas, J. (2002). Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **4**, 317-22.

Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. and Vogt, P. K. (1987). Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2848-52.

Malnou, C. E., Salem, T., Brockly, F., Wodrich, H., Piechaczyk, M. and Jariel-Encontre, I. (2007). Heterodimerization with Jun family members regulates c-Fos nucleocytoplasmic traffic. *J Biol Chem* **282**, 31046-59.

Mallery, D. L., Vandenberg, C. J. and Hiom, K. (2002). Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *Embo J* **21**, 6755-62.

Marino, M., Galluzzo, P. and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* **7**, 497-508.

Martin, M. L., Lieberman, P. M. and Curran, T. (1996). Fos-Jun dimerization promotes interaction of the basic region with TFIIE-34 and TFIIIF. *Mol Cell Biol* **16**, 2110-8.

Matsumoto, Y., Hayashi, K. and Nishida, E. (1999). Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol* **9**, 429-32.

Matsumoto, Y. and Maller, J. L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* **306**, 885-8.

Mayor, T., Hacker, U., Stierhof, Y. D. and Nigg, E. A. (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *J Cell Sci* **115**, 3275-84.

Mayor, T., Stierhof, Y. D., Tanaka, K., Fry, A. M. and Nigg, E. A. (2000). The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J Cell Biol* **151**, 837-46.

McDermott, K. M., Zhang, J., Holst, C. R., Kozakiewicz, B. K., Singla, V. and Tlsty, T. D. (2006). p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol* **4**, e51.

Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *Embo J* **21**, 483-92.

Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E. A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 29-36.

Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A. M., Bartek, J. and Nigg, E. A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* **1**, 88-93.

Meraldi, P. and Nigg, E. A. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J Cell Sci* **114**, 3749-57.

Meraldi, P. and Nigg, E. A. (2002). The centrosome cycle. *FEBS Lett* **521**, 9-13.

Merdes, A. and Cleveland, D. W. (1998). The role of NuMA in the interphase nucleus. *J Cell Sci* **111 (Pt 1)**, 71-9.

Mi, J., Guo, C., Brautigan, D. L. and Larner, J. M. (2007). Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res* **67**, 1082-9.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding,

W. et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71.

Milde-Langosch, K. (2005). The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer* **41**, 2449-61.

Miller, A. D., Curran, T. and Verma, I. M. (1984). c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* **36**, 51-60.

Minella, A. C., Swanger, J., Bryant, E., Welcker, M., Hwang, H. and Clurman, B. E. (2002). p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr Biol* **12**, 1817-27.

Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-42.

Mogensen, M. M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V. and Bornens, M. (2000). Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J Cell Sci* **113** (Pt 17), 3013-23.

Monje, P., Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2003). Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol* **23**, 7030-43.

Morris, V. B., Brammall, J., Noble, J. and Reddel, R. (2000). p53 localizes to the centrosomes and spindles of mitotic cells in the embryonic chick epiblast, human cell lines, and a human primary culture: An immunofluorescence study. *Exp Cell Res* **256**, 122-30.

Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (2002). Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* **294**, 1-12.

Motohashi, H., Ohta, J., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1998). A core region of the mafK gene IN promoter directs neurone-specific transcription in vivo. *Genes Cells* **3**, 671-84.

Motoyama, N. and Naka, K. (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 11-6.

Moudjou, M. and Bornens, M. (1994). Isolation of centrosomes from cultured animal cells. London: Academic Press Inc.

Mowat, D. R., Croaker, G. D., Cass, D. T., Kerr, B. A., Chaitow, J., Ades, L. C., Chia, N. L. and Wilson, M. J. (1998). Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med Genet* **35**, 617-23.

Murphy, K. L., Dennis, A. P. and Rosen, J. M. (2000). A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model. *FASEB J* **14**, 2291-302.

Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C. and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**, 556-64.

Mussman, J. G., Horn, H. F., Carroll, P. E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. A. and Fukasawa, K. (2000). Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* **19**, 1635-46.

Musti, A. M., Treier, M. and Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* **275**, 400-2.

Nakagawa, Y., Yamane, Y., Okanou, T., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2001). Outer dense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: its identification from isolated centrosomes. *Mol Biol Cell* **12**, 1687-97.

Newman, J. R. and Keating, A. E. (2003). Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* **300**, 2097-101.

Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 21-32.

Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**, 815-25.

Nigg, E. A. (2006). Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* **119**, 2717-23.

Nigg, E. A. and Raff, J. W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* **139**, 663-78.

Nooren, I. M. and Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *Embo J* **22**, 3486-92.

Okazaki, K. and Sagata, N. (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *Embo J* **14**, 5048-59.

Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E. et al. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**, 127-40.

Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H. and Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol* **108**, 107-28.

Palazzo, R. E., Vogel, J. M., Schnackenberg, B. J., Hull, D. R. and Wu, X. (2000). Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol* **49**, 449-70.

Palmada, M., Kanwal, S., Rutkoski, N. J., Gustafson-Brown, C., Johnson, R. S., Wisdom, R. and Carter, B. D. (2002). c-jun is essential for sympathetic neuronal death induced by NGF withdrawal but not by p75 activation. *J Cell Biol* **158**, 453-61.

Pedraza-Alva, G., Zingg, J. M., Donda, A. and Perez-Martinez, L. (2009). Estrogen receptor regulates MyoD gene expression by preventing AP-1-mediated repression. *Biochem Biophys Res Commun* **389**, 360-5.

Pelletier, L., O'Toole, E., Schwager, A., Hyman, A. A. and Muller-Reichert, T. (2006). Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **444**, 619-23.

Peng, B., Sutherland, K. D., Sum, E. Y., Olayioye, M., Wittlin, S., Tang, T. K., Lindeman, G. J. and Visvader, J. E. (2002). CPAP is a novel stat5-interacting cofactor that augments stat5-mediated transcriptional activity. *Mol Endocrinol* **16**, 2019-33.

Perkins, K. K., Dailey, G. M. and Tjian, R. (1988). Novel Jun- and Fos-related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *Embo J* **7**, 4265-73.

Piechaczyk, M. and Blanchard, J. M. (1994). c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* **17**, 93-131.

Piechaczyk, M. and Farras, R. (2008). Regulation and function of JunB in cell proliferation. *Biochem Soc Trans* **36**, 864-7.

Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C. L. and Bornens, M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J Cell Biol* **149**, 317-30.

Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U. and Bornens, M. (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* **291**, 1550-3.

Pihan, G. A. and Doxsey, S. J. (1999). The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* **9**, 289-302.

Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. and Doxsey, S. J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**, 3974-85.

Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Malhotra, R., Liotta, L. and Doxsey, S. J. (2001). Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res* **61**, 2212-9.

Pihan, G. A., Wallace, J., Zhou, Y. and Doxsey, S. J. (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* **63**, 1398-404.

Portal, M. M., Ferrero, G. O. and Caputto, B. L. (2007). N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene* **26**, 3551-8.

Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., Siddiqui, K., Spector, D. L. and Stillman, B. (2004). Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *Embo J* **23**, 2651-63.

Prasanth, S. G., Prasanth, K. V. and Stillman, B. (2002). Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* **297**, 1026-31.

Prober, D. A. and Edgar, B. A. (2001). Growth regulation by oncogenes--new insights from model organisms. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 19-26.

Rasmussen, R., Benvegnu, D., O'Shea, E. K., Kim, P. S. and Alber, T. (1991). X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 561-4.

Rauscher, F. J., 3rd, Cohen, D. R., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. and Franza, B. R., Jr. (1988a). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* **240**, 1010-6.

Rauscher, F. J., 3rd, Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. and Spiegelman, B. M. (1988b). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* **52**, 471-80.

Rauscher, F. J., 3rd, Voulalas, P. J., Franza, B. R., Jr. and Curran, T. (1988c). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev* **2**, 1687-99.

Rodrigues-Martins, A., Riparbelli, M., Callaini, G., Glover, D. M. and Bettencourt-Dias, M. (2007). Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. *Science* **316**, 1046-50.

Roux, P., Blanchard, J. M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P. and Piechaczyk, M. (1990). Nuclear localization of c-Fos, but not v-Fos proteins, is controlled by extracellular signals. *Cell* **63**, 341-51.

Rubio, N., Rojo, P. and Torres, C. (1996). Overexpression of basal c-fos and c-jun but not of ras oncogenes after Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of glial cells. *J Neurovirol* **2**, 167-74.

Ryseck, R. P. and Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* **6**, 533-42.

Salvat, C., Jariel-Encontre, I., Acquaviva, C., Omura, S. and Piechaczyk, M. (1998). Differential directing of c-Fos and c-Jun proteins to the proteasome in serum-stimulated mouse embryo fibroblasts. *Oncogene* **17**, 327-37.

Sambucetti, L. C. and Curran, T. (1986). The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science* **234**, 1417-9.

Sankaran, S., Crone, D. E., Palazzo, R. E. and Parvin, J. D. (2007). Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res* **67**, 11186-94.

Sankaran, S., Starita, L. M., Simons, A. M. and Parvin, J. D. (2006). Identification of domains of BRCA1 critical for the ubiquitin-dependent inhibition of centrosome function. *Cancer Res* **66**, 4100-7.

Sasaki, T., Kojima, H., Kishimoto, R., Ikeda, A., Kunimoto, H. and Nakajima, K. (2006). Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. *Mol Cell* **24**, 63-75.

Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Maehara, N., Minamishima, Y. A., Nishio, S., Nagai, E. and Tanaka, M. (2001). Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* **126**, 13-9.

Sayer, J. A., Otto, E. A., O'Toole, J. F., Nurnberg, G., Kennedy, M. A., Becker, C., Hennies, H. C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B. V. et al. (2006). The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* **38**, 674-81.

Schatten, H. (2008). The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem Cell Biol* **129**, 667-86.

Schatten, H., Wiedemeier, A. M., Taylor, M., Lubahn, D. B., Greenberg, N. M., Besch-Williford, C., Rosenfeld, C. S., Day, J. K. and Ripple, M. (2000). Centrosome-centriole abnormalities are markers for abnormal cell divisions and cancer in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model. *Biol Cell* **92**, 331-40.

Scherer, S. J., Maier, S. M., Seifert, M., Hanselmann, R. G., Zang, K. D., Muller-Hermelink, H. K., Angel, P., Welter, C. and Scharl, M. (2000). p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J Biol Chem* **275**, 37469-73.

Schmit, A. C. (2002). Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int Rev Cytol* **220**, 257-89.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**, 6419.

Setoyama, C., Frunzio, R., Liau, G., Mudryj, M. and de Crombrughe, B. (1986). Transcriptional activation encoded by the v-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3213-7.

Sharp, G. A., Weber, K. and Osborn, M. (1982). Centriole number and process formation in established neuroblastoma cells and primary dorsal root ganglion neurones. *Eur J Cell Biol* **29**, 97-103.

Shaulian, E. and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-400.

Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6.

Shimada, M. and Komatsu, K. (2009). Emerging connection between centrosome and DNA repair machinery. *J Radiat Res (Tokyo)* **50**, 295-301.

Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638-44.

Smeyne, R. J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S. J., Miao, G. G., Schilling, K., Robertson, L. M., Curran, T. and Morgan, J. I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* **363**, 166-9.

Sng, J. C., Taniura, H. and Yoneda, Y. (2004). A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* **27**, 606-12.

Soubry, A., Staes, K., Parthoens, E., Noppen, S., Stove, C., Bogaert, P., van Hengel, J. and van Roy, F. The transcriptional repressor Kaiso localizes at the mitotic spindle and is a constituent of the pericentriolar material. *PLoS One* **5**, e9203.

St-Arnaud, R. and Quelo, I. (1998). Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone. *Front Biosci* **3**, d838-48.

Starita, L. M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J. E., Griffin, K., Schlegel, B. P., Gygi, S. P. and Parvin, J. D. (2004). BRCA1-dependent

ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Mol Cell Biol* **24**, 8457-66.

Starita, L. M. and Parvin, J. D. (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 345-50.

Stearns, T. and Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* **76**, 623-37.

Stephano, J. L. and Gould, M. C. (2000). MAP kinase, a universal suppressor of sperm centrosomes during meiosis? *Dev Biol* **222**, 420-8.

Storchova, Z. and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 45-54.

Strebhardt, K. and Ullrich, A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 321-30.

Sugihara, E., Kanai, M., Saito, S., Nitta, T., Toyoshima, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Fukasawa, K., Schwab, M., Saya, H. et al. (2006). Suppression of centrosome amplification after DNA damage depends on p27 accumulation. *Cancer Res* **66**, 4020-9.

Sun, A., Bagella, L., Tutton, S., Romano, G. and Giordano, A. (2007). From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem* **102**, 1400-4.

Sun, Q. Y. and Schatten, H. (2006). Role of NuMA in vertebrate cells: review of an intriguing multifunctional protein. *Front Biosci* **11**, 1137-46.

Sun, Q. Y., Wu, G. M., Lai, L., Bonk, A., Cabot, R., Park, K. W., Day, B. N., Prather, R. S. and Schatten, H. (2002). Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein

phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod* **66**, 580-8.

Sunkel, C. E. and Glover, D. M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* **89 (Pt 1)**, 25-38.

Sutherland, J. A., Cook, A., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1992). Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev* **6**, 1810-9.

Tanos, T., Marinissen, M. J., Leskow, F. C., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J. S. and Coso, O. A. (2005). Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J Biol Chem* **280**, 18842-52.

Tarapore, P. and Fukasawa, K. (2002). Loss of p53 and centrosome hyperamplification. *Oncogene* **21**, 6234-40.

Tarapore, P., Horn, H. F., Tokuyama, Y. and Fukasawa, K. (2001). Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21Waf1/Cip1 pathway. *Oncogene* **20**, 3173-84.

Tarapore, P., Okuda, M. and Fukasawa, K. (2002). A mammalian in vitro centriole duplication system: evidence for involvement of CDK2/cyclin E and nucleophosmin/B23 in centrosome duplication. *Cell Cycle* **1**, 75-81.

Terasawa, K., Okazaki, K. and Nishida, E. (2003). Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* **8**, 263-73.

Thomas, R. C., Edwards, M. J. and Marks, R. (1996). Translocation of the retinoblastoma gene product during mitosis. *Exp Cell Res* **223**, 227-32.

Tratner, I., Ofir, R. and Verma, I. M. (1992). Alteration of a cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-Fos protein augments its transforming potential. *Mol Cell Biol* **12**, 998-1006.

Tsang, W. Y., Bossard, C., Khanna, H., Peranen, J., Swaroop, A., Malhotra, V. and Dynlacht, B. D. (2008). CP110 suppresses primary cilia

formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease. *Dev Cell* **15**, 187-97.

Tsang, W. Y., Spektor, A., Luciano, D. J., Indjeian, V. B., Chen, Z., Salisbury, J. L., Sanchez, I. and Dynlacht, B. D. (2006). CP110 cooperates with two calcium-binding proteins to regulate cytokinesis and genome stability. *Mol Biol Cell* **17**, 3423-34.

Tsou, M. F. and Stearns, T. (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* **442**, 947-51.

Tucker, R. W., Pardee, A. B. and Fujiwara, K. (1979). Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* **17**, 527-35.

Tulchinsky, E. (2000). Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol* **15**, 921-8.

Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V. and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375-86.

Uto, K. and Sagata, N. (2000). Nek2B, a novel maternal form of Nek2 kinase, is essential for the assembly or maintenance of centrosomes in early *Xenopus* embryos. *Embo J* **19**, 1816-26.

Van Beveren, C., Mitchell, R. L., Henning-Chubb, C., Huberman, E. and Verma, I. M. (1987). Expression of the c-fos gene during differentiation. *Adv Exp Med Biol* **213**, 263-74.

Van Beveren, E. (1876). Contribution al'histoire de la vesiculaire germinative et du premier embryonnaire. *Bull Acad R Belg* **42**, 35-97.

van Dam, H. and Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* **20**, 2453-64.

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171-82.

Verma, I. M., Mitchell, R. L. and Sassone-Corsi, P. (1986). Proto-oncogene fos: an inducible gene. *Princess Takamatsu Symp* **17**, 279-90.

Vesely, P. W., Staber, P. B., Hoefler, G. and Kenner, L. (2009). Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res* **682**, 7-12.

Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A. A., Moll, J. R. and Bonovich, M. (2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Mol Cell Biol* **22**, 6321-35.

Vriz, S., Lemaitre, J. M., Leibovici, M., Thierry, N. and Mechali, M. (1992). Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **12**, 3548-55.

Wadhwa, R., Takano, S., Robert, M., Yoshida, A., Nomura, H., Reddel, R. R., Mitsui, Y. and Kaul, S. C. (1998). Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem* **273**, 29586-91.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8.

Wakita, K., Ohyanagi, H., Yamamoto, K., Tokuhisa, T. and Saitoh, Y. (1992). Overexpression of c-Ki-ras and c-fos in human pancreatic carcinomas. *Int J Pancreatol* **11**, 43-7.

Wang, H. L., Wang, J., Xiao, S. Y., Haydon, R., Stoiber, D., He, T. C., Bissonnette, M. and Hart, J. (2002). Elevated protein expression of cyclin D1 and Fra-1 but decreased expression of c-Myc in human colorectal adenocarcinomas overexpressing beta-catenin. *Int J Cancer* **101**, 301-10.

Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U. and Wagner, E. F. (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**, 741-5.

Welcsh, P. L., Lee, M. K., Gonzalez-Hernandez, R. M., Black, D. J., Mahadevappa, M., Swisher, E. M., Warrington, J. A. and King, M. C.

(2002). BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7560-5.

Wilkinson, C. J., Andersen, J. S., Mann, M. and Nigg, E. A. (2004). A proteomic approach to the inventory of the human centrosome. In *Centrosomes in development and disease*, (ed. E. A. Nigg), pp. 125-142. Weinheim: Wiley-VCA Verlag GmbH & CoKGaG.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4.

Xu, W., Comhair, S. A., Zheng, S., Chu, S. C., Marks-Konczalik, J., Moss, J., Haque, S. J. and Erzurum, S. C. (2003). STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L137-48.

Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X. W., Harris, C. C., Ried, T. and Deng, C. X. (1999). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* **3**, 389-95.

Yan, X., Habedanck, R. and Nigg, E. A. (2006). A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. *Mol Biol Cell* **17**, 634-44.

Yang-Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J. and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **62**, 1205-15.

Yang, J., Adamian, M. and Li, T. (2006). Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol Biol Cell* **17**, 1033-40.

Yang, J., Gao, J., Adamian, M., Wen, X. H., Pawlyk, B., Zhang, L., Sanderson, M. J., Zuo, J., Makino, C. L. and Li, T. (2005). The ciliary

rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol Cell Biol* **25**, 4129-37.

Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O. and Li, T. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J Cell Biol* **159**, 431-40.

Yang, X., Hubbard, E. J. and Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* **257**, 680-2.

Yang, Y. and Cvekl, A. (2007). Large Maf Transcription Factors: Cousins of AP-1 Proteins and Important Regulators of Cellular Differentiation. *Einstein J Biol Med* **23**, 2-11.

Yu, C. T., Wu, J. C., Liao, M. C., Hsu, S. L. and Huang, C. Y. (2008). Identification of c-Fos as a mitotic phosphoprotein: regulation of c-Fos by Aurora-A. *J Biomed Sci* **15**, 79-87.

Zahnow, C. A. (2002). CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res* **4**, 113-21.

Zenz, R., Eferl, R., Scheinecker, C., Redlich, K., Smolen, J., Schonhaler, H. B., Kenner, L., Tschachler, E. and Wagner, E. F. (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* **10**, 201.

Zhao, L., Jin, C., Chu, Y., Varghese, C., Hua, S., Yan, F., Miao, Y., Liu, J., Thompson, W., Mann, D. et al. (2009). Dimerization of CPAP orchestrates centrosome cohesion plasticity. *J Biol Chem*.

Zhou, C., Cunningham, L., Marcus, A. I., Li, Y. and Kahn, R. A. (2006). Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell* **17**, 2476-87.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* **20**, 189-93.

Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V. and Gao, Q. (2005). Centrobin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *J Cell Biol* **171**, 437-45.