

Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Nous papers d'I κ B α i 14-3-3 en la regulació de les vies d'NF κ B i Notch

Cristina Aguilera Xiol

2006

Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Doctorat en Biomedicina
Bienni 2002-04

“Nous papers d'I κ B α i 14-3-3 en la regulació de les vies d'NF κ B i Notch”

Memòria presentada per Cristina Aguilera Xiol per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha esta codirigida pels doctors:

Anna Bigas Salvans

Lluís Espinosa Blay

Doctoranda: Cristina Aguilera Xiol

Tutora: Carme Caelles Franch

Cristina Aguilera Xiol
2006

Presentació

Aquesta tesi s'ha desenvolupat al laboratori de Transducció de Senyal i Regulació Gènica del departament d'Oncologia Molecular a l'Institut de Recerca Oncològica (Barcelona).

Aquest treball és la continuació dels treballs iniciats per la Dra. Anna Bigas i el Dr. Lluís Espinosa, codirectors d'aquesta tesi, de l'estudi entre l'interrelació entre la via de transducció de senyal de Notch i la d' $\text{NF}\kappa\text{B}$. La primera part de la tesis se centra en l'estudi de la via d' $\text{NF}\kappa\text{B}$ i més en concret en el paper de les 14-3-3 en la seva regulació. Aquest treball ha donat lloc a una publicació que comprén el capítol I dels resultats d'aquesta tesi. En el capítol II s'inclou la publicació que demostra com el repressors de $\text{NF}\kappa\text{B}$, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ participa en el control transcripcional del gen diana de Notch, *hes1*.

La memòria s'ha escrit en forma de compilació d'articles, precedits per una Introducció i seguits per una Discussió. La introducció inclou apartats generals referents a la regulació de la transcripció gènica i a les proteïnes que la regulen a més de tota la informació referent a les vies de transducció de senyal de Notch i d' $\text{NF}\kappa\text{B}$, incloent aquells articles que han estat publicats durant el desenvolupament d'aquesta tesi.

Agraïments

A l'Anna i al Lluís, els directors de la tesi.

A la Júlia, i a la resta de la gent del laboratori, a l'Alex, a la Vane, i a les noves;
l'Elena, la Vero, l'altre Cris i la Cati. També a la Irene.

A la resta de la gent del departament, especialment a la Mariangi.

A totes les nenes de pràctiques, la Sonia, la Jessi, l'Anna, la Vero, la Marta,.....

A la gent del confocal, l'Esther i el Benja.

Al professor Haegeman i el grup de Gent.

A l'Alex Hoffmann i a la gent de San Diego.

I naturalment, a la meva família i als meus amics.

Abreviatures

ADAM: a disintegrin and metalloprotease
AP-1: activating protein 1
Apc: adenomatosis polyposis coli
ATF2: activating transcription factor 2
BCL: B cell lymphoma
bHLH: basic helix-loop-helix
Bcl: B lymphocyte chemoattractant
bp: base pairs
C: citosina
CBF1: C-repeat/DRE Binding Factor 1
CBP: CREB binding protein
cdc25c: cell division cycle 25C
CDK2: cyclin dependent kinase 2
CDY: chromodomain Y
clAP: inhibitor of apoptosis protein
COT: cancer Osaka thyroid
CpG: citosina-phospho-guanina
CSL: Chisel
DNA: desoxirribonucleic acid
DSS: dextran sodium sulfat
Efp: estrogen-responsive finger protein
Elc: essential light chain
F: fenilalanina
FADD: FAS-associating death domain-containing protein
FKHL: forkhead homolog like
FOXO3A: forkhead box O3A
G: guanina
GCN5L: Gcn5 like
GNAT: Gnc5 related N-acetyltransferase
H: histona
hash1: human achaete-scute homologue

HAT: histona acetil transferasa
HBO1: histone acetyltransferase binding to ORC
Hda1: histone deacetylase 1
HDAC: histone deacetylase
hes: Hairy/Enhancer of Split
herp: HES-related repressor protein
hrt: Hes-related transcription
I κ B: inhibitor of NF κ B
IKK: I κ B kinase
IL: interleukin
IL-1R: interleukin 1 receptor
K: lisina
KDa: kilo Dalton
lif: leukemia inhibitory factor
LPS: lipopolysaccharide
MAML: mastermind-like
mash1: murine achaete-scute homologue
mcp-1: monocyte chemoattractant protein-1
mdr2-KO: multidrug resistance protein2-knockout
MEKK: mitogen-activated protein kinase
MOZ: monocytic leukemia zinc finger
MSK: mitogen-and-stress-activated protein kinase
MyoD: myoblast determination
MYST: MOZ, YBF2/SAS 3, SAS 2, i Tip60
N: nucleòtid
NAD⁺: nicotinamide adenine dinucleotide
NCOR: nuclear receptor corepressor
NEMO: NF- κ B Essential Modulator
NES: nuclear export signal
NF κ B: nuclear factor κ B
NICD: Notch intracellular domain
NIK: NF κ B inducing kinase
NLS: nuclear localization signal

NotchIC: Notch intracellular
P: prolina
PCAF: p300/CBP associated factor
PKA o C: protein kinase A o C
pS: phosphorylated serine
R: arginina
RBP κ : J κ -recombination signal binding protein
RHD: Rel homology domain
RIP: receptor-interacting protein
RNA: ribonucleic acid
ROS: reactive oxigen species
Rpd3: reduced potassium dependency 3
S: serina
Sas: something about silencing
Sdf : stromal cell-derived factor
Sir: silent information regulator
SMRT: silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SRC-1: Steroid receptor coactivator-1
TACE: TNF α converting enzyme
TAK1: transforming growth factor β (TGF- β)-activating kinase 1
T-ALL: T cell acute lymphoblastic leukemia
TBK1: TANK-binding kinase 1
TCR: T-cell receptor
TERT: telomerase reverse transcriptase
TFIIB: transcription factor IIB
Tip60: Tat interactive protein 60kD
TLE: temporal lobe epilepsy
TLR: toll like receptor
TNF: tumor necrosis factor
TNFR: tumor necrosis factor receptor
TRADD: TNFR1-associated death domain
Traf: TNFR-associated factor
TSA: trichostatin A
Y: citosina o timina

ÍNDEX

Índex

	<u>Pàg.</u>
1.Introducció	1
1.1. La regulació transcripcional	2
1.1.1.La transcripció gènica	2
1.1.2. Proteïnes que regulen l'estructura de la cromatina	2
1.1.3.Proteïnes que modifiquen les histones: acetilació	4
1.1.4.Els corepressors transcripcionals	8
1.2.Via de transducció de senyal per NFκB	11
1.2.1. Activació de la via d'NFκB	11
1.2.1.1.Via clàssica	11
1.2.1.2.Via alternativa	12
1.2.2.El complex IKK	14
1.2.2.1.Activació de les IKKs	15
1.2.3.Les proteïnes IκB	16
1.2.4.Les proteïnes NFκB	18
1.2.4.1.Regulació post-traducciona l de p65	20
1.2.5.NFκB en inflamació i tumorigènesi	21
1.3.Les proteïnes 14-3-3	26
1.3.1.Funcions de les 14-3-3	27
1.3.2.14-3-3 en tumorigènesi	28
1.4.Via de transducció de senyal mediada per Notch	29
1.4.1.Els gens diana de Notch: <i>hes1</i>	33
1.4.2.Hes en diferenciació i oncogènesi	36
1.5.Interrelació entre les vies d'NFκB i Notch	37
2.Objectius	39

3. Resultats	41
3.1. Capítol I: Efficient nuclear export of I κ B α /p65 complexes requires 1433	42
3.2. Capítol II: Recruitment of I κ B α to the <i>hes1</i> promoter is associated with transcriptional repression	55
4. Discussió	62
4.1. Les 14-3-3 com a reguladors d'NF κ B	63
4.2. Paper de les 14-3-3 en tumorigènesi	65
4.3. Funció d'I κ B α a la cromatina	66
4.4. Múltiples funcions de les IKKs	68
4.5. I κ B α cromatínic en els gens diana d'NF κ B	70
4.6. Interrelació entre la via de Notch i NF κ B: Hes1	70
5. Conclusions	74
6. Bibliografia	78

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

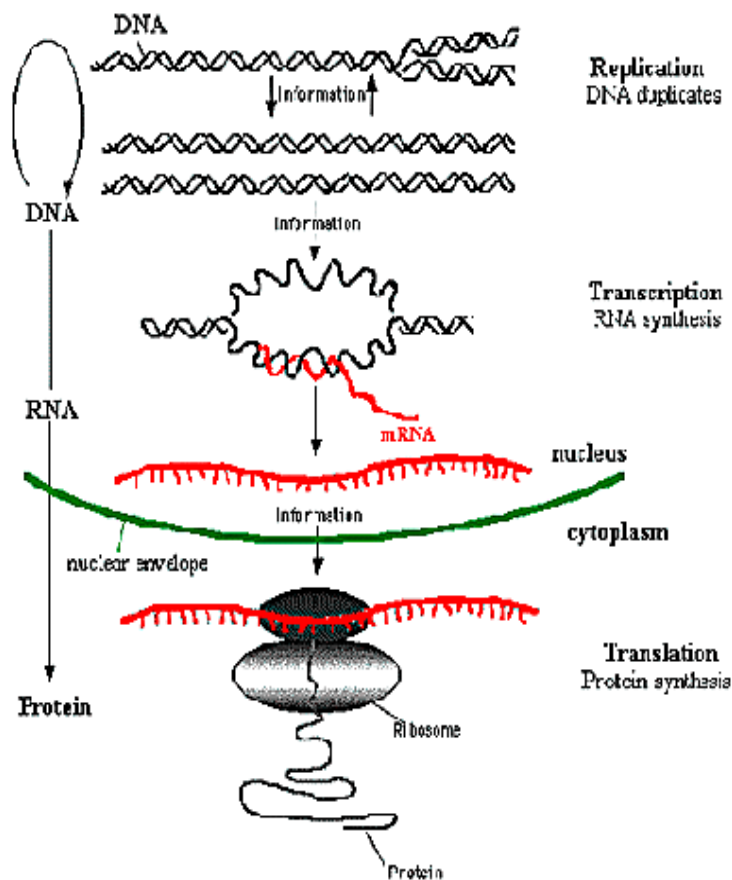
1.1 La regulació transcripcional

1.1.1 La transcripció gènica

La interpretació per part de la cèl.lula de la informació que està codificada en el genoma requereix d'un pas intermig que és la síntesi del RNA missatger. La seqüència del RNA és en últim terme la que determina la seqüència d'aminoàcids de les proteïnes d'una

cèl.lula, de manera que cada triplet del RNA es correspon amb un aminoàcid de la proteïna per la que codifica.

Figura1 : esquema on es mostra la síntesi de proteïnes a partir del material genètic:



La transcripció és un procés complex que requereix de la participació de múltiples proteïnes. No obstant, l'enzim encarregat específicament de la síntesi del RNA és l'RNA-polimerasa. En eucariotes es coneixen tres polimerases diferents, però és l'RNA-polimerasa II l'encarregada de la transcripció del mRNA que es traduirà a proteïna. Perquè l'RNA-polimerasa transcriu una seqüència concreta de DNA cal que aquest fragment estigui accessible. A més, la unió de la maquinària transcripcional al DNA no té lloc a l'atzar sinó que ve regulada per seqüències de DNA no transcrites que s'anomenen promotors.

Un promotor és una seqüència de DNA que al ser reconeguda per l'RNA-polimerasa II i d'altres proteïnes associades permet que un gen es transcriu.

Existeixen moltes proteïnes que la cèl.lula necessita de forma permanent per mantenir-se viva. Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes s'han d'expressar de forma constant i per això s'anomenen gens constitutius o *housekeeping*. En canvi, d'altres proteïnes participen en processos

més específics com ara el desenvolupament embrionari, la resposta immune o la diferenciació cel.lular i els gens que les codifiquen han de ser finament regulats a nivell transcripcional en moments i llocs concrets. La importància de la regulació transcripcional es posa de manifest pel gran nombre de proteïnes implicades. En eucariotes, aquestes proteïnes són els factors de transcripció, la maquinària transcripcional basal que inclou el complex de la polimerasa, els factors d'elongació, factors remodeladors de la cromatina, enzims que modifiquen les histones o el propi DNA, cofactors que fan de ponts entre les diferents proteïnes i d'altres.

1.1.2. Proteïnes que regulen l'estructura de la cromatina

El DNA està empaquetat en unes estructures compactes formades per proteïnes i DNA. La unitat bàsica d'organització de la cromatina es el nucleosoma que consisteix en 146 parells de bases (bp) de DNA que embolcallen un cor proteic amb dues còpies de les següents

histones: H2A, H2B, H3 i H4 (revisat a (de Ruijter et al., 2003)).

Durant la transcripció, la cromatina juga un paper molt important ja que de portar a terme; l'arquitectura local de la cromatina és un factor important de la regulació gènica. Les zones transcripcionalment actives se solen caracteritzar per tenir poca H1, i també per tenir les illes CpG (seqüències riques en dinucleòtids CG) poc metilades i les coneixem amb el nom d'eucromatina. D'altra banda, les regions del genoma transcripcionalment inactives estan empaquetades i formen la heterocromatina. Durant el desenvolupament embrionari, diferents tipus cel·lulars empaqueten els seus gens amb patrons específics d'eucromatina i heterocromatina, assegurant unes característiques úniques per a cada tipus cel·lular (Fahrner and Baylin, 2003). El cas extrem d'aquest mecanisme és la heterocromatització del cromosoma X en les femelles de mamífers.

En general s'assumeix que la cromatina es prepara per la transcripció eliminant barreres a la polimerasa; és el procés conegut com la remodelació de la cromatina.

ha d'adoptar una estructura que en permeti l'accessibilitat a les proteïnes que l'han

L'arquitectura de les diferents regions cromatíniques està molt influenciada per les modificacions post-traduccionals de les histones. Les histones poden fosforilar-se i metilar-se, però el mecanisme més estudiat que regula el nucleosoma és l'acetilació. Tots els tipus d'histones es poden acetilar *in vivo*, però les que s'han caracteritzat millor són les modificacions a les histones H3 i H4. Aquestes proteïnes es poden acetilar per enzims anomenats histona acetil transferases (HAT) en diferents residus incloent la lisina 9 i 14 de la H3 i les lisines 5, 8, 12 i 16 de la H4 (de Ruijter et al., 2003)). Altres proteïnes s'encarreguen de la deacetilació de les histones, les HDACs. Donades les múltiples modificacions covalents que poden patir les histones i que aquestes s'associen tan a l'activació com a la repressió d'un gen determinat han portat a postular la hipòtesi del codi de les histones; diferents modificacions a una o més cues de les histones actuen seqüencialment o de forma combinada per generar

un codi que serà llegit per altres proteïnes desembocant en diferents esdeveniments (Strahl and Allis, 2000).

1.1.3. Proteïnes que modifiquen les histones: acetilació

Les Histona Deacetilases (HDAC) són les proteïnes encarregades de treure els grups acetil de les histones, el que fa disminuir l'espai entre els nucleosomes i que així el DNA es compacti impedit l'accessibilitat als factors de transcripció. Generalment, la hipoacetilació de les histones s'associa a repressió transcripcional mentre que la hiperacetilació, mediada per les Histona Acetilases (HAT), s'associa a un increment en la transcripció gènica. Per això les HDACs són proteïnes associades a la repressió transcripcional mentre que les HAT ho són a l'activació.

La primera proteïna que es va associar a l'acetilació de les histones va ser Gnc5, una HAT de llevat. Des d'aleshores s'han identificat diverses proteïnes amb activitat acetilasa que es recluten a promotors de gens específics

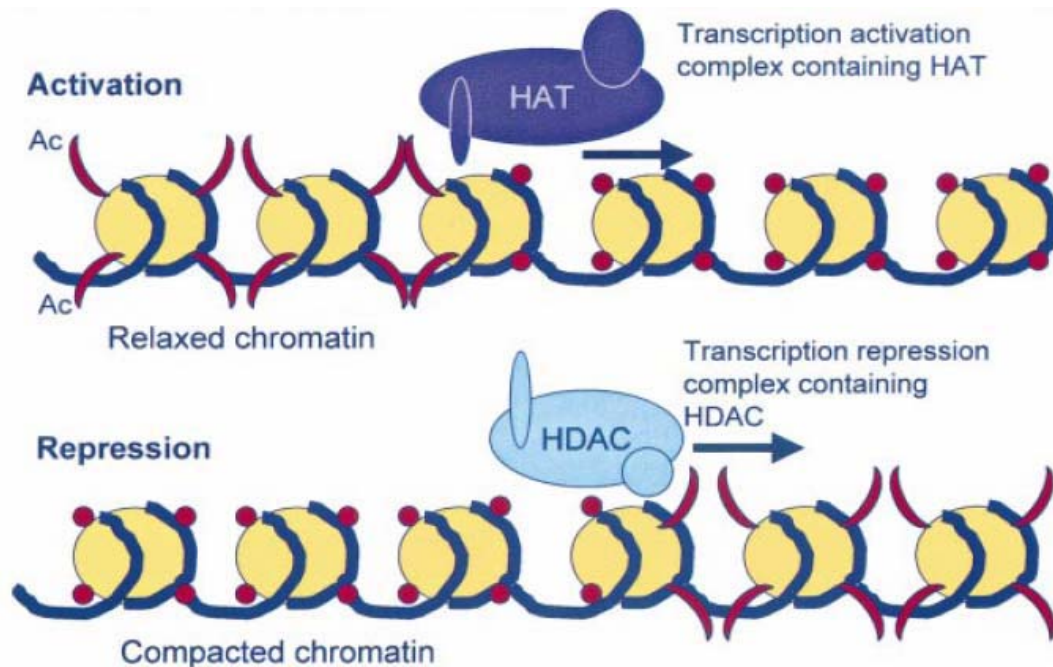
acetilant les histones a lisines específiques de l'extrem N-terminal per afavorir l'activació de la transcripció gènica.

S'han identificat dues superfamílies de HATs: les GNAT i les de la família MYST. Les superfamília de les GNAT (Gnc5-related N-acetyltransferase) és la més coneguda i inclou la família de Gnc5 i PCAF i la família de p300/CBP.

Gnc5 es va identificar en llevat però s'ha clonat en molts altres organismes, incloent els humans (Candau et al., 1996). PCAF es va identificar per la seva homologia amb Gnc5, s'ha vist que pot interaccionar amb CBP/P300 (Yang et al., 1996) i que funciona tant com a HAT i com a coactivador (Puri et al., 1997).

P300/CBP és una altra família d'histona acetiltransferases (Bannister and Kouzarides, 1996) ubiqües que s'ha vist que juguen un paper important en molt processos cel.lulars incloent la diferenciació, el cicle cel.lular i l'apoptosis. P300/CBP, dues proteïnes altament homòlogues, activen la transcripció de gens específics interaccionant amb diferents factors de transcripció com els receptors d'hormones nuclears (Reid et al., 2002).

Figura 2: esquema on es resumeix l'activitat acetilasa/deacetilasa associada a les histones i la seva funció en la regulació de la transcripció (de Ruijter et al., 2003):



:

Finalment s'ha descrit la família MYST que s'anomena així per les inicials dels primers components identificats; MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i Tip60 (Borrow et al., 1996), tots amb activitat acetiltransferasa.

In vivo, la majoria de les HATs existeixen en complexes de moltes subunitats que solen ser més actius que cadascun dels elements per separat (Yang, 2004b) i amb especificitat de substrat també

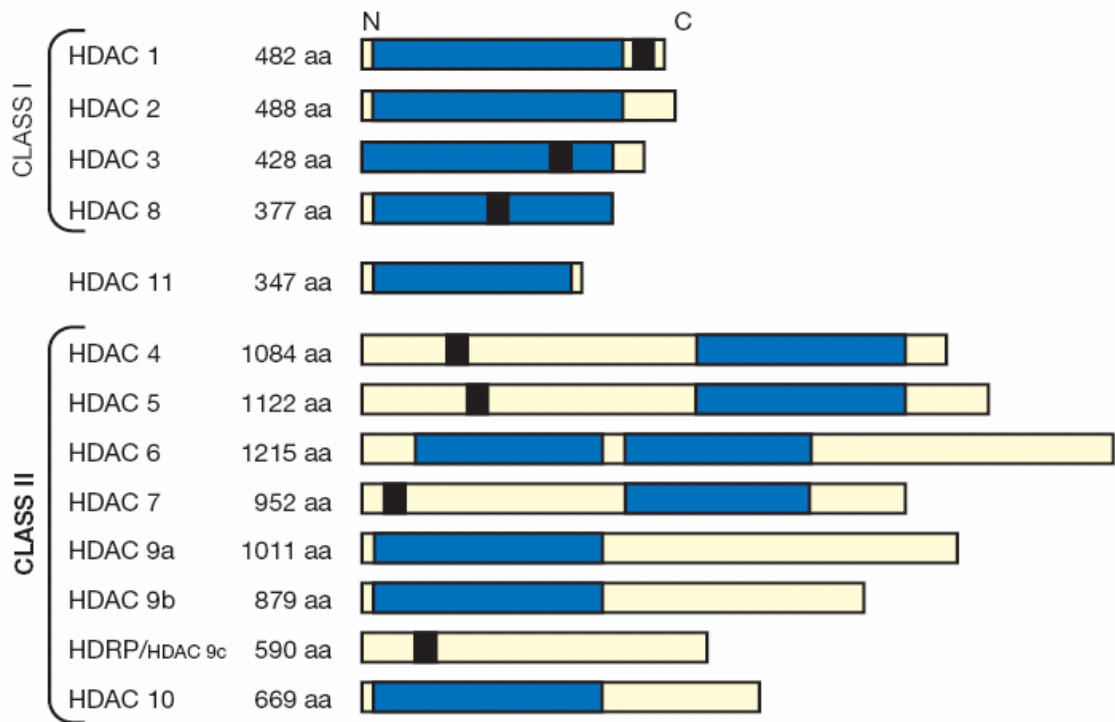
diferent (Boudreault et al., 2003; Grant et al., 1997).

Darrerament s'han descrit altres proteïnes amb activitat acetiltransferas que aporten més complexitat al sistema de les HATs.

Taula 1: taula on es recullen la majoria de les HATs més conegudes (adaptat de (Yang, 2004a)):

Família	LAT	Organisme
Hat1	Hat1	S. cerevisae
Gcn5	Gcn5	S. cerevisae
	GCN5L	C. elegans fins mamífers
	PCAF	mamífers
p300/CBP	CBP	C. elegans fins mamífers
	p300	mamífers
MYST	Sas2	S. cerevisae
	Sas3	S. cerevisae
	Mof	Drosophila
	Tip60	mamífers
	HBO1	mamífers
Altres famílies	SRC-1	mamífers
	ATF2	mamífers
	CDY	humans
	TFIIB	S.cerevisae fins mamífers

A Figura 3: esquema on es mostren les diferents HDACs de classe I i II i la seva estructura, assenyalant els seu domini catalític en blau (de Ruijter et al., 2003):



Al genoma humà s'han descrit fins a 18 proteïnes amb activitat deacetilasa, que s'han classificat en tres classes d'HDACs, classe I, classe II i classe III basant-se en la seva homologia amb les HDACs de llevat; Rpd3 (reduced potassium dependency 3), Hda1 (histone deacetilase I) i Sir2 (silent information regulator 2), respectivament (Marks et al., 2001). Les HDACs de tipus I estan expressades en tots tipus cel.lulars

mentre que les HDACs classe II tenen una expressió més restringida, probablement perquè regulen processos relacionats amb la diferenciació cel.lular i el desenvolupament (revisat a (de Ruijter et al., 2003). Ambdós tipus són sensibles a TSA (trichostatina A) mentre que les de classe III no ho són, però requereixen el cofactor NAD+.

L'activitat de les HDACs sobre les histones de la cromatina té lloc al nucli. Les HDACs de classe I tenen una localització nuclear i la seva funció es regula pel reclutament als promotors de gens específics. Les de classe II tenen a més altres nivells de regulació, com per exemple, la capacitat per a viatjar entre el nucli i el citoplasma en resposta a diferents senyals (Grozinger and Schreiber, 2000).

Les HDACs són reclutades a gens específics a través d'altres proteïnes ja que elles no tenen dominis d'unió al DNA. Les proteïnes encarregades de reclutar aquestes proteïnes als promotors són els corepressors transcripcionals, que no tenen activitat per ells mateixos i exerceixen la seva funció mitjançant el reclutament d'enzims modificadors de la cromatina.

1.1.4.Els coactivadors i els corepressors transcripcionals

L'activitat transcripcional d'un gen no depèn només dels factors de transcripció i dels enzims modificadors de la cromatina, sinó també d'unes altres proteïnes

reguladores anomenades coactivadors i corepressors transcripcionals.

Els corepressors dependents d'activitat HDACs més coneguts són NCoR (nuclear receptor co-repressors) i SMRT (silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors). Aquests corepressors es van definir en el model dels receptors nuclears d'hormones, on en absència d'hormona interaccionen d'una banda amb el receptor unit al DNA i de l'altra amb les HDACs, reclutant així l'activitat deacetilasa a promotors específics (revisat a (Jepsen et al., 2000)).

Figura 4: esquema que mostra l'activitat dels corepressors transcripcionals en els model dels receptors nuclears:

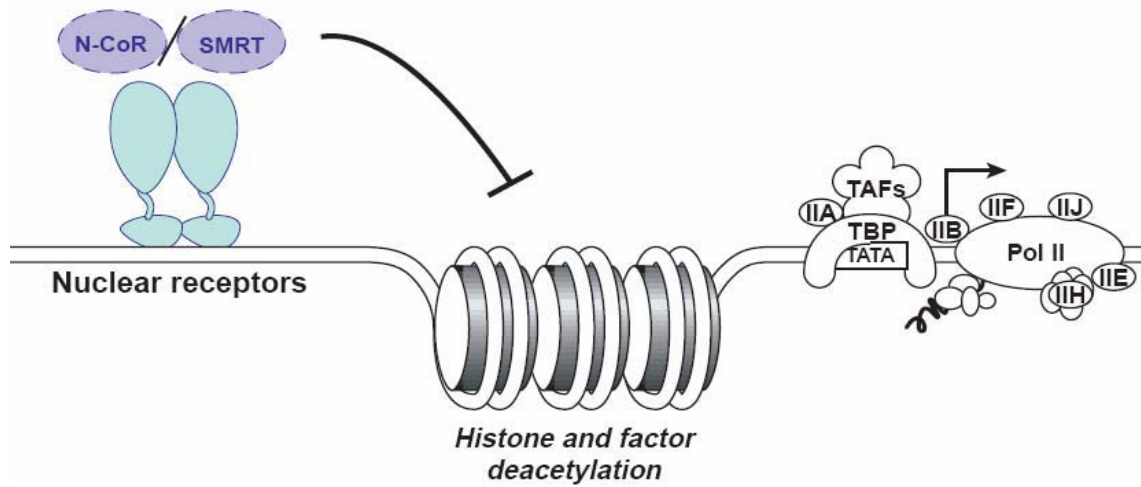
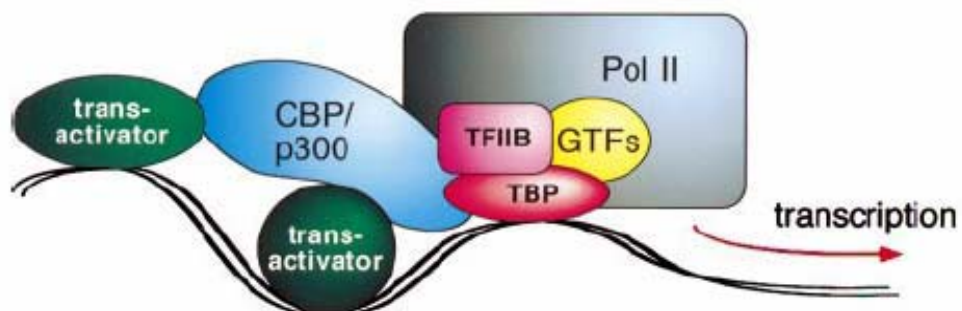


Figura 5: model en el que CBP/p300 actua de coactivador fent de pont entre factors de transcripció i la maquinària transcripcional basal (Blobel, 2000):



Els coactivadors recluten activitats acetilases als complexos activadors de la transcripció. Els coactivadors més estudiats, com CBP i p300, tenen activitat acetilasa intrínseca; així desenvolupen dues funcions a la cromatina; fan de coactivadors actuant de pont entre els factors de transcripció i elements del complex de transcripció basal i també, com s'acaba de descriure a l'apartat anterior, acetilen les histones (Blobel, 2000).

En general, els complexos de repressió, però també els activadors, són direccionats cap als

seus gens diana a través del reclutament per factors de transcripció específics de cadascun dels gens. Malgrat hi ha diferents tipus de corepressors nuclears, un mateix tipus de complex repressor pot regular l'activitat de més d'un factor de transcripció. Així, NCoR i SMRT no reprimeixen exclusivament els gens diana dels receptors d'hormona sinó que s'han vist associats a altres factors de transcripció com AP-1 (Lee et al., 2000), MyoD (Bailey et al., 1999) i els factors NF κ B i RBPj κ que es descriuran amb més detall al llarg d'aquesta tesi.

1.2. La via de transducció de senyal de NFκB

NFκB és un acrònim de Nuclear Factor kappa B. Es tracta d'un factor de transcripció que va ser descrit com a regulador de l'*enhancer* kappa de les immunoglobulines en cèl·lules B (Singh et al., 1986) i és en el sistema immune on s'ha estudiat més el seu paper. NFκB regula la producció de citoquines i factors de creixement però també activa l'expressió d'altres gens com molècules d'adhesió (revisat a (Baldwin, 1996)).

El factor de transcripció NFκB inclou un grup de proteïnes altament conservades al llarg de l'evolució des de *Drosophila* fins a humans. NFκB es troba, però, absent en els llevats i en *Caenorabditis elegans* la qual cosa s'havia relacionat amb el fet que aquests organismes no tenen resposta immune ni inflamatòria.

1.2.1. Activació de la via d'NFκB

NFκB és un factor de transcripció induïble que en absència d'estímuls s'associa a les seves proteïnes inhibidores (IκB) al citoplasma. En resposta a un estímul activador de

la via, IκB es degrada, alliberant NFκB el qual es translocarà al nucli per unir-se als seus gens diana i activar la transcripció gènica. Els estímuls activadors d'NFκB actuen a través de receptors específics situats a la membrana cel·lular i convergeixen en l'activació del complex de quinases d'IκB, IKK (veure Figura 6). S'han definit dues vies de transducció de la senyal que duen a l'activació d'NFκB per mecanismes diferents; la via clàssica o canònica i la via alternativa o no canònica.

1.2.1.1. Via clàssica

Aquesta via s'activa en resposta a citoquines pro-inflamatòries com el TNFα o la IL-1, o a molècules procedents de patògens, com el LPS. Cada una d'aquestes molècules activa els seus receptors específics (TNFR, IL-1R o TLRs) que, mitjançant mecanismes sofisticats que impliquen a diferents proteïnes adaptadores, serina/treonina quinases, ubiquitin-lligases, etc (revisat a (Baud and Karin, 2001)), acabaran activant el complex IKK que inclou les quinases IKKα, IKKβ i IKKγ/NEMO (NFκB essential modulator) que és

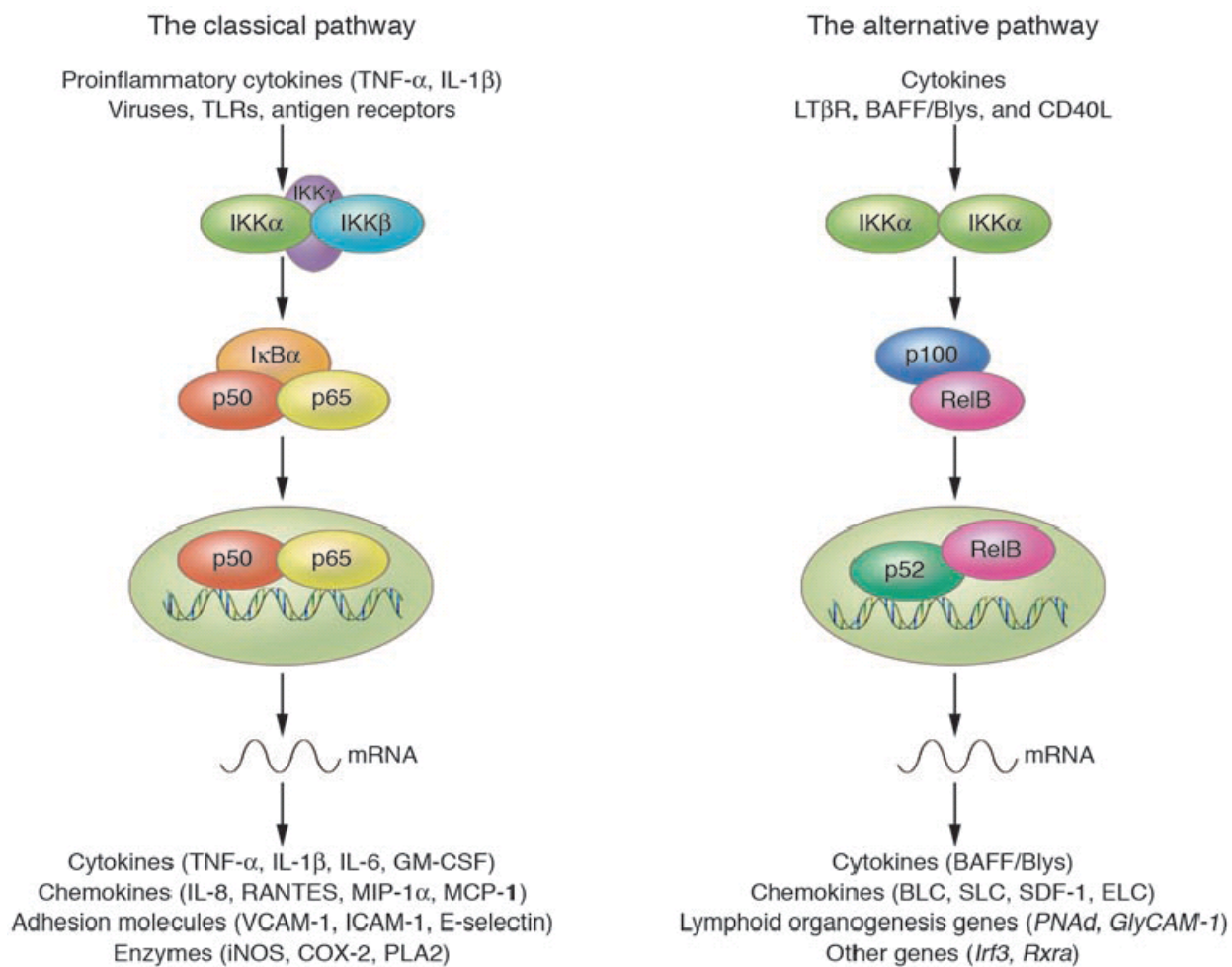
la subunitat reguladora. La conseqüència última de l'activació de la via clàssica es la fosforilació d'I κ B en les serines equivalents als residus S32 i S36 d'I κ B α . Aquesta fosforilació indueix la poliubiquitinació d'I κ B (a les lisines corresponents als residus K21 i K22 d'I κ B α) i a la seva subseqüent degradació pel proteosoma. La degradació d'I κ B allibera el dímer NF κ B (generalment p50/p65 en aquesta via) que al exposar els seus dominis NLS es pot translocar al nucli, unir-se al DNA i activar la transcripció dels seus gens diana. Al ser el propi I κ B α un dels principals gens diana d'aquesta via, l'activació d'NF κ B indueix la ràpida resíntesi de l'inhibidor, que entrarà al nucli per exportar els dímers d'NF κ B al citoplasma, aturant, així, la via.

1.2.1.2.Via alternativa

La via alternativa es independent d'IKK β i NEMO però requereix de l'activació dels homodímers d'IKK α . En resposta a estímuls específics com Linfotoxina beta o CD40L, la via alternativa convergeix en l'activació dels complexos d'IKK α (revisat a (Hayden and Ghosh,

2004)). IKK α activada fosforila a p100 al seu extrem C-terminal que estructural i funcionalment és similar a I κ B. La fosforilació de p100 per IKK α indueix la ubiquitinació i la degradació específica de l'extrem fosforilat, alliberant-se, d'aquesta manera, la molècula activa p52. Aquest monòmer d'NF κ B sol associar-se a RelB, donant lloc a heterodímers RelB/p52 que es translocaran al nucli per activar gens diana específics, que solen ser diferents als activats per la via clàssica. Alguns dels gens diana específics d'aquesta via són Blc, Sdf-1 o Elc (Bonizzi et al., 2004).

Figura 6: esquema on es resumeixen les dues vies d'activació d'NF κ B (Luo et al.,2005b):



1.2.2. El complex IKK

Un dels esdeveniments claus per l'activació d'NF κ B és l'activació del complex IKK. En la via clàssica l'activitat IKK duu a la fosforilació d'I κ B per induir-ne la seva degradació via proteosoma. Encara que s'ha demostrat que *in vitro*, tant IKK α com IKK β poden fosforilar I κ B (Li et al., 1998), la utilització de cèl.lules deficientes per a les diferents isoformes ha permès demostrar que és IKK β l'efectora d'aquesta funció (Delhase and Karin, 1999). No només les IKK sinó també altres quinases s'associen al complex IKK per a refinar la seva funció. Així la presència de MEKK2 o MEKK3 determina la fosforilació específica d'I κ B α o I κ B β per IKK en resposta a IL1 o TNF α (Schmidt et al., 2003).

En la via alternativa d'NF κ B, la

quinasa NIK (NF κ B Inducible Kinase) activa, a través de fosforilació, els dímers d'IKK α induint, així, el processament de p100 fins a p52 (Senftleben et al., 2001).

A més de les seves funcions citoplasmàtiques, recentment s'ha descrit un nou paper per a IKK α al nucli (Anest et al., 2003)(Yamamoto et al., 2003). En resposta a estímuls activadors d'NF κ B, IKK α es recluta als promotors de certs gens diana d'NF κ B per fosforilar la serina 10 de la histona 3 i permetre la seva activació transcripcional. També s'ha demostrat que IKK α s'uneix als promotors de cIAP2 i IL-8 per fosforilar el corepressor SMRT i alliberar-lo de la cromatina per permetre l'expressió d'aquels gens diana d'NF κ B (Hoberg et al., 2004).

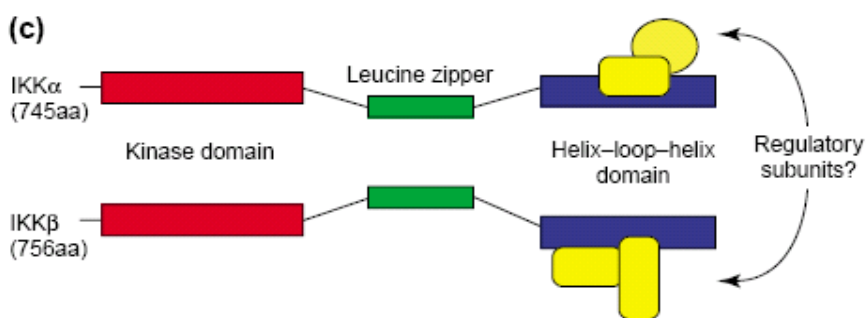


Figura 7: es mostren les dues quinases associades a l'activació de la via

d'NF κ B, (Bonizzi and Karin, 2004):

1.2.2.1. Activació de les IKKs

No es coneixen tots els detalls del mecanisme molecular pel qual els estímuls activadors d'NF κ B activen el complex IKK però s'ha demostrat que aquesta depèn de la fosforilació de dues serines de IKK β : serines 177 i 181 (Delhase and Karin, 1999) i 176 i 180 de IKK α per la alternativa (Ling et al., 1998). Les quinases que fosforilen aquests residus o altres que puguin estar implicades en l'activació del complex IKK varien segons l'estímul activador de la via i no s'han descrit en tots els casos. Per exemple, se sap que l'activació de les IKKs per TNFR1 requereix el reclutament de TRADD que serveix de plataforma per reclutar RIP1, FADD i TRAF2. Totes aquestes proteïnes són necessàries per l'activació òptima de les IKKs però cap d'elles les fosforila directament. Es coneixen moltes quinases que quan se sobreexpressen poden fosforilar les IKKs i activar NF κ B, mentre que les seves formes inactives inhibeixen aquesta via. Algunes de les quinases que directa o indirectament indueixen la fosforilació de les IKKs són MEKK1, MEKK2, MEKK3, AKT, COT o TAK1 (Baud and Karin, 2001).

Probablement l'activació d'NF κ B per diferents receptors i/o estímuls duu a la formació de complexes d'adaptadors diferents que activaran quinases específiques per al complex IKK.

S'han descrit altres esdeveniments necessaris per l'activació òptima del complex de les IKKs, com la ubiquitinació de la proteïna reguladora IKK γ / NEMO (Zhou et al., 2004).

1.2.3. Les proteïnes IκB

IκB és l'acrònim per l'inhibidor de NFκB. S'han definit quatre membres d'aquesta família; IκBα, IκBβ, BCL-3, IκBε (veure Figura 7). També es poden considerar de la família les proteïnes precursors p100 i p105 que contenen una regió C-terminal similar a un IκB. Aquestes proteïnes tenen diferent afinitat pels dímers d'NFκB específics, es regulen per estímuls diferents i algunes d'elles s'expressen diferencialment segons el teixit. El que tenen en comú és la presència de repeticions de tipus anquirina (de cinc a set repeticions depenent de cada IκB) que els confereix la capacitat d'unió a NFκB

(revisat a (Baldwin, 1996) i a (Hayden and Ghosh, 2004)).

La proteïna millor caracteritzada d'aquesta família és IκBα. A nivell estructural està formada per tres dominis: 1) una regió N-terminal que conté les dues serines conservades que es fosforilen per les IKKs en resposta a estímuls activadors de la via d'NFκB i que modulen la seva degradació pel proteasoma, 2) una estructura central formada per repeticions d'anquirina que és l'encarregada de l'unió a NFκB, i 3) una regió C-terminal que conté un domini de tipus PEST, que també es pot fosforilar, i que regula l'estabilitat de la proteïna en absència d'estímuls activadors d'NFκB.

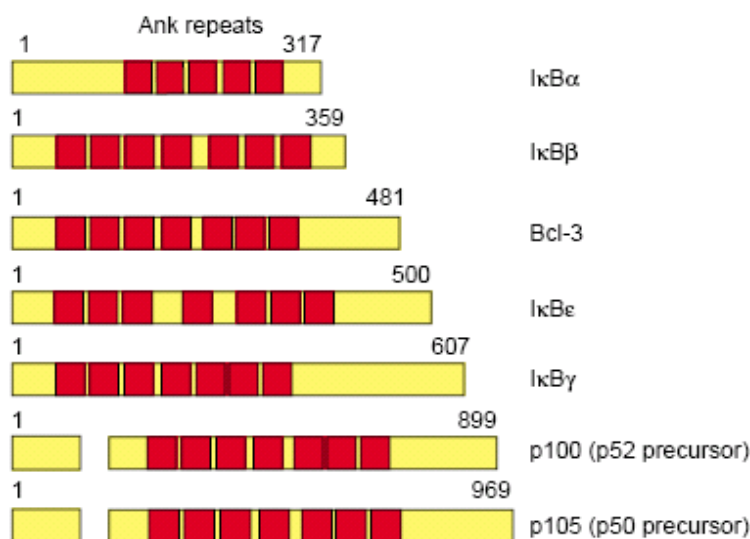


Figura 8: diagrama on es mostren esquemàticament les diferents proteïnes de la família d'IκB, incloent els seus dominis estructurals més rellevants (Bonizzi and Karin, 2004)

En general s'accepta que $I\kappa B\alpha$ s'uneix als dimers d' $NF\kappa B$, emmascarant els NLS de p65 i parcialment el de p50, impedit així l'entrada del factor de transcripció al nucli (Beg and Baldwin, 1993), i la seva interacció amb el DNA (Beg et al., 1992). Així, la unió d' $I\kappa B$ a $NF\kappa B$ assegura que aquest factor sigui transcripcionalment actiu només quan les cèl.lules reben els estímuls adequats. No obstant, el manteniment de les proteïnes Rel al citoplasma té lloc, en part, per un procés dinàmic que permet l'export dels complexos $NF\kappa B$ del nucli al citoplasma tant en situació de repòs com després de l'activació del factor de transcripció (Johnson et al., 1999)(Huang et al., 2000). El responsable d'aquest export actiu dels complexos d' $NF\kappa B$ és $I\kappa B\alpha$, el qual viatja contínuament entre el nucli i el citoplasma (Tam et al., 2000). Pel contrari, el paper dels homòlegs $I\kappa B\beta$ i $I\kappa B\epsilon$ en la retenció citoplasmàtica d' $NF\kappa B$ és més passiu (Tam and Sen, 2001) i encara que part de l' $I\kappa B\beta$ de nova síntesi s'ha localitzat al nucli (Suyang et al., 1996) no sembla que pugui retornar les proteïnes Rel al citoplasma amb l'eficiència d' $I\kappa B\alpha$.

La degradació d' $I\kappa B\alpha$ en front a estímuls activadors d' $NF\kappa B$ és molt ràpida i genera una resposta ràpida i puntual de la via. Pel contrari, estímuls que actuen a través d' $I\kappa B\beta$ generen una resposta més lenta i persistent (Thompson et al., 1995). Com els diferents estímuls operen a través d' $I\kappa B\alpha$ o $I\kappa B\beta$ no està totalment resolt però se sap que la transducció de la senyal per MEKK2 convergeix en el reclutament d' $I\kappa B\alpha$ al complex IKK, generant una resposta ràpida, mentre que l'activació via MEKK3 duu al reclutament d' $I\kappa B\beta$ donant lloc a una resposta més lenta i sostinguda d' $NF\kappa B$ (Schmidt et al., 2003).

Malgrat les proteïnes $I\kappa B$ juguen un paper clau en la inhibició de la via d' $NF\kappa B$ s'ha vist que en cèl.lules de ratolins deficients per $I\kappa B\alpha$, β i ϵ , p65 segueix estant majoritàriament citoplasmàtica (Tergaonkar et al., 2005), suggerint que altres proteïnes també regulen aquest procés.

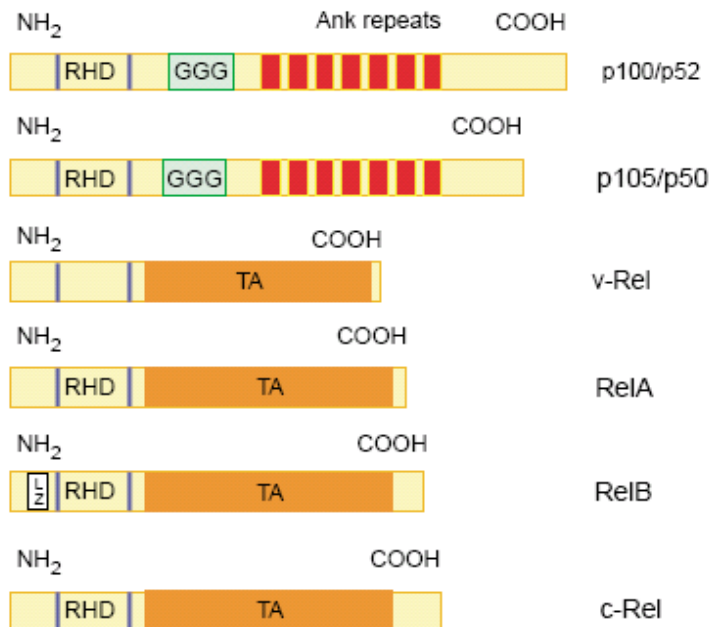
1.2.4. Les proteïnes NF κ B

S'han descrit cinc membres de la família d'NF κ B en mamífers; c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65) i RelB, que s'uneixen formant homo- o heterodímers per donar lloc al factor de transcripció NF κ B funcional (veure Figura 7). Aquestes proteïnes es caracteritzen per contenir un domini N-terminal d'uns 300 aminoàcids, anomenat Rel homology domain (RHD), que és comú per a tots els membres de la família. És a través d'aquest domini que els factors NF κ B poden dimeritzar, unir-se al DNA i interaccionar amb les proteïnes repressores I κ B. No obstant, un subgrup de les proteïnes NF κ B, que comprén p100 i p105 de mamífers (ortòlegs de Relish en *Drosophila*), contenen una seqüència I κ B-*like* en l'extrem C-terminal, llarga i rica en repeticions d'anquirina, que actua com a inhibidora dels propis factors. L'activació d'aquestes proteïnes requereix d'un processament proteolític que allibera la seqüència I κ B-*like*, generant proteïnes més curtes (p105 genera p50 i p100

genera p52) que poden translocar-se al nucli i unir-se al DNA. No obstant, p50 i p52 no tenen dominis de transactivació i necessiten dimeritzar amb c-Rel (o el seu homòleg víric v-Rel), RelB o RelA/p65 per poder ser transcripcionalment actius. Els dominis de transactivació de p65, RelB i c-Rel activen la transcripció gènica reclutant coactivadors transcripcionals i desplaçant els repressors (revisat a (Baldwin, 1996), (Bonizzi and Karin, 2004) i a (Hayden and Ghosh, 2004))

En estat de repòs, alguns dels gens diana d'NF κ B recluten homodímers de p50 associats a HDAC1 per tal de mantenir-se reprimits (Zhong et al., 2002). En altres casos, la pròpia p65 es capaç de reclutar repressors (Ashburner et al., 2001) com les HDACs a la cromatina per mantenir aquest gens reprimits.

Figura 9: diagrama on es mostren esquemàticament les diferents proteïnes de la família d'NF κ B, incloent els seus dominis estructurals més rellevants (Bonizzi and Karin, 2004). TA=tranactivation domain, RHD=Rel Homology Domain, LZ=Leucine zipper i GGG=zona rica en Gs:



El dímer d'NF κ B més estudiat és p65-p50, i malgrat haver-se descrit altres homo- i heterodímers, com p50-p50 o p65-p65, no totes les combinacions són possibles; per exemple, RelB només dimeritza amb p50 o p52 (Ryseck et al., 1995).

A més, tot i haver una seqüència consensus GGGRNYYCC (on N=qualsevol base, R=purina i

Y=pirimidina) per a la unió d'NF κ B al DNA, diferents dímers tenen propietats diferents i reconeixen amb una determinada afinitat seqüències específiques dels promotors o *enhancers* dels gens diana.

Mitjançant la utilització de ratolins deficientes pels diferents membres d'NF κ B s'ha demostrat que en resposta a TNF α alguns dels dímers d'NF κ B activen gens diana específics (Hoffmann et al., 2003). Així, mentre alguns gens com *mcp-1*

s'activen per qualsevol dímer que contingui una proteïna rel (p65 o c-rel) d'altres, com *lif*, requereixen dímers p50:p65 específics per la seva activació. Tot i que no s'ha pogut determinar amb exactitud la seqüència de DNA encarregada de reclutar específicament els dímers d'NF κ B a la cromatina, sí que s'ha relacionat la seqüència del κ B *site* amb l'abilitat del dímer p65-p50 per a reclutar coactivadors (Leung et al., 2004), suggerint que l'estructura que adopta el dímer és diferent segons la seqüència a la que s'uneix. A més, Bonizzi et al. demostren que els dímers RelB-p52, associats a l'activació de la via alternativa d'NF κ B, s'uneixen a seqüències diferents que els dímers p65-p50 (Bonizzi et al., 2004). En conjunt, aquesta heterogeneïtat permet regular de forma específica diferents grups de gens en determinats moments o teixits.

1.2.4.1.Regulació post-traduccionals de p65

Perquè l'activitat transcripcional del factor NF κ B unit al DNA sigui completa es requereixen diferents modificacions post-traduccionals

com la fosforilació o l'acetilació de les proteïnes del complex, les quals modulen la seva interacció amb coactivadors o corepressors. Això representa un nivell addicional de regulació de la via d'NF κ B. S'han descrit diverses serines de p65 que es fosforilen en resposta a estímuls, encara que el significat fisiològic de cadascuna d'aquestes fosforilacions resta per determinar. La serina 276 és fosforilada per PKA (Zhong et al., 1998) o MSK1-2 (Vermeulen et al., 2003) en resposta a TNF α incrementant, així, l'afinitat de p65 pel transactivador CBP (Zhong et al., 1998). La fosforilació de la serina 536 és essencial pel correcte import de p65 al nucli en l'activació per TCR (Mattioli et al., 2004) així com pel reclutament de la maquinària transcripcional a la cromatina. En cèl.lules mieloides, la fosforilació de la serina 536 per IKK β es imprescindible per induir la degradació de p65 limitant la resposta inflamatòria (Yang et al., 2003). Altres quinases com IKK α o TBK1 (Buss et al., 2004) fosforilen també aquest residu de p65. La fosforilació de les serines 468 per IKK β (Schwabe and Sakurai, 2005) i IKK ϵ (Mattioli et al., 2006) i 311 per

PKC ζ (Duran et al., 2003) són també importants per a la regulació de l'activitat transcripcional de p65. Una altra de les modificacions post-traduccionals que pateix p65 i que de la lisina 221 per CBP/p300 incrementa l'activitat transcripcional de p65 i impedeix la seva unió a l'inhibidor I κ B α (Chen et al., 2002).

Fins el moment, s'han descrit dos mecanismes encarregats d'aturar la senyal d'NF κ B i limitar la seva durada. Aquests inclouen la degradació de p65 (Saccani et al., 2004) i la resíntesi d'I κ B α , induïda per la pròpia activació d'NF κ B (Huang and Miyamoto, 2001), el qual entra al nucli per unir-se als dímers actius d'NF κ B, dissociar-los del DNA i exportar-los al citoplasma. Les modificacions post-traduccionals d'NF κ B no només regulen la seva activitat transcripcional sinó també la durada d'aquesta activació. Per exemple, p65 ha de ser deacetilada per HDAC3 per poder interaccionar amb I κ B α i ser eficientment exportada al citoplasma (Chen et al., 2001).

regula la seva activitat transcripcional es l'acetilació de lisines específiques; l'acetilació

1.2.5.NF κ B en inflamació i tumorigènesis

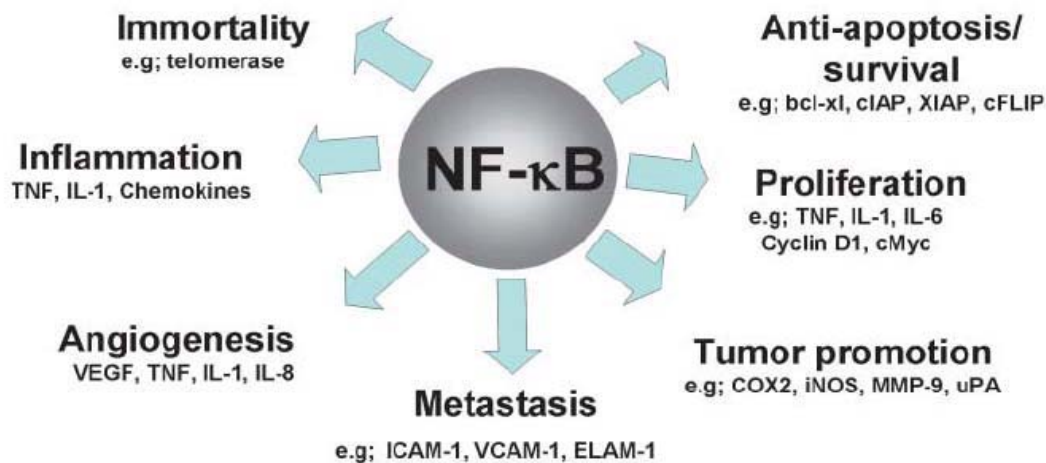
Una de les funcions més importants associada a NF κ B és la de protegir les cèl.lules de l'apoptosi, induint l'expressió de molts gens antiapoptòtics; *c-IAP-1*, *c-IAP-2*, *traf1*, *traf2*, *a20*, *iex-1L* i *bcl-x* (Lin and Karin, 2003). D'altra banda, NF κ B també controla l'expressió de factors de creixement i citoquines implicades en la resposta a stress, la proliferació cel.lular i el cicle cel.lular com per exemple c-myc i ciclina D1 (Kessler et al., 1992), (Hinz et al., 1999) (Fig 10).

És per les pròpies funcions fisiològiques d'NF κ B, que l'activació inadequada o excessiva de les proteïnes Rel/NF κ B juga un paper clau en la iniciació i progressió tumoral en diferents tipus de càncer. El primer factor d'aquesta via identificat com a proteïna oncogènica fou la proteïna vírica v-Rel. Des d'aleshores s'han

identificat diferents virus oncogènics, com per exemple el virus de Epstein-Barr, que usen

l'activació d'NF κ B com a part del seu mecanisme transformant (Bowie and Haga, 2005).

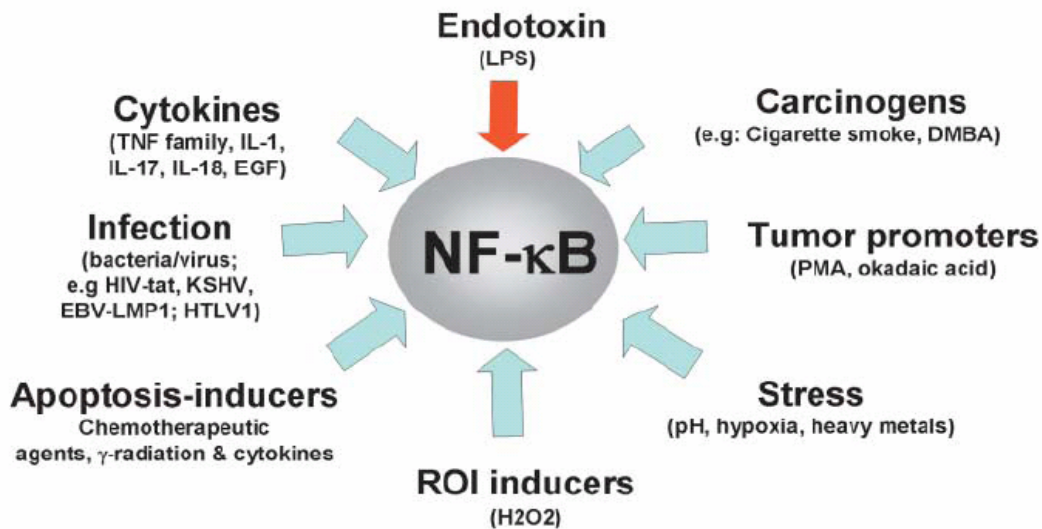
Figura 10: expressió d'alguns gens implicats en oncogènesi regulats per l'activació d'NF κ B (Aggarwal, 2004):



NF κ B està actiu en algunes línies tumorals (Aggarwal, 2004), tant derivades de tumors sòlids com de tumors hematopoiètics i també en tumors primaris humans, com per exemple alguns mielomas (Feinman et al., 1999), leucèmies (Griffin, 2001), tumors de pròstata (Palayoor et al., 1999) i de mama (Nakshatri et al., 1997). En canvi, en cèl.lules normals no se sol trobar activitat

NF κ B, excepte en casos específics com en cèl.lules B o T proliferants. S'ha demostrat que la inhibició de la via d'NF κ B en les cèl.lules tumorals, expressant el superrepressor I κ B α_{32-36} (Pikarsky et al., 2004) o eliminant l'activitat IKK (Greten et al., 2004) indueix l'aturada del cicle cel.lular i promou l'apoptosis, suggerint que NF κ B és necessari per a mantenir el creixement i la

Figura 11: inductors de l'activació d'NF κ B (Aggarwal, 2004):



supervivència dels tumors. L'activació d'NF κ B s'ha relacionat també amb una major malignitat dels tumors en diferents models de càncer, aquest és el cas en algunes línies i tumors primaris de càncer de mama (Sovak et al., 1997). En models animals Nakshatri et al. han demostrat que l'activació de la via d'NF κ B és un dels mecanismes utilitzats per les cèl.lules tumorals de mama per esdevenir hormona independents (Nakshatri et al., 1997), suggerint que la utilització d'inhibidors de la via d'NF κ B seria una possible terapia alternativa o complementària en aquest i en altres tipus de tumors (revisat a (Pande and Ramos, 2005)).

Diferents leucèmies i linfomes, com per exemple el linfoma de Hodgkin o les leucèmies linfooblàstiques agudes, mostren també una activitat d'NF κ B constitutiva (Lu et al., 1991). En cada sistema, però, l'activació d'NF κ B té lloc per causes diferents, en molt dels casos desconegudes. En alguns linfomes de Hodgkin s'han detectat mutacions en I κ B α (Cabannes et al., 1999) però això no sembla ser un mecanisme general.

La relació entre inflamació, NF κ B i càncer sembla cada cop més evident. En primer lloc, el microambient del tumor conté cèl·lules immunitàries que secreten citokines proinflamatòries i quimoquines, moltes d'elles dianes d'NF κ B, com el TNF α , IL-1, IL6, i IL-8, així com enzims encarregats de

degradar la matriu extracel·lular, factors de creixement i espècies reactives de l'oxigen (ROS). Aquest ambient promou la proliferació cel·lular, inhibeix l'apoptosi, i activa l'angiogènesi i la migració cel·lular, afavorint el creixement del propi tumor (Fig 11).

En el cas de la colitis ulcerosa, una malaltia crònica inflamatòria d'etiologia desconeguda, els pacients presenten un risc augmentat de patir càncer colorectal en funció del temps que fa que tenen la malaltia (Itzkowitz and Yio, 2004). D'altra banda, l'administració crònica d'antiinflamatoris redueix la mortalitat de pacients amb càncers colorectals esporàdics (Oshima and Taketo, 2002).

S'han proposat diversos mecanismes que relacionarien inflamació i càncer, i en tots ells el paper d'NF κ B és clau. Greten et al. van demostrar com la delecció específica d'IKK β en les cèl.lules intestinals del ratolí feia als animals més susceptibles al dany per DSS (substància que s'usa per induir una patologia similar a la colitis ulcerosa) mentre que reduïa el risc de fer tumors colorectals. De fet l'activitat NF κ B en les cèl.lules epitelials intestinals contribueix a la formació dels tumors prevenint l'entrada de les cèl.lules en apoptosi (Greten et al., 2004). D'altra banda, Pikarsky et al. van demostrar un mecanisme similar, relacionant la inflamació crònica i

tumorigènesi a través d'NF κ B, en càncer de fetge (Pikarsky et al., 2004). El ratolins mdr2-KO desenvolupen hepatitis crònica que evoluciona cap a la formació de tumors en els que es detecta l'activació d'NF κ B. L'expressió específica de l'inhibidor I κ B α_{32-36} al fetge dels mdr2-KO és suficient per reduir el nombre de tumors que desenvolupen els animals tot i seguir patint hepatitis crònica. De fet el que succeeix és que la majoria de cèl.lules transformades no progressen sinó que entren en apoptosi.

Finalment, i pel seu paper com a regulador negatiu d'NF κ B, I κ B es podria considerar un supressor tumoral. No obstant, la desregulació d'NF κ B deguda a una malfunció d'I κ B s'ha pogut determinar en molts pocs càncers, com el ja esmentat del limfoma de Hodgkin.

1.3. Les proteïnes 14-3-3

Les 14-3-3 són una família de proteïnes que es troben en totes les cèl·lules eucariotes. Estan altament conservades des dels llevats fins als humans i el seu pes molecular oscil·la entre els 28 i 33 KDa.

En humans s'han definit fins a set isoformes que són molt semblants entre elles; 14-3-3 α/β , γ , ϵ , η , σ , τ (θ) i ζ . Casi totes les isoformes es troben molt expressades en tots els teixits, amb l'excepció de 14-3-3 σ que és específica de cèl·lules epitelials.

Les 14-3-3 s'uneixen a proteïnes que contenen la seqüència consensu RSXpSXP (tipus 1) o la seqüència RXY/FXpSXP (tipus 2) on pS representa una serina fosforilada. En general, doncs la unió de 14-3-3 als seus substrats depèn de fosforilació (revisat a (Dougherty and Morrison, 2004) i a (Hermeking, 2003).

El primer consens d'unió a 14-3-3 va ser identificat en la proteïna Raf-1; aquesta quinasa és activa quan es troba fosforilada a la serina 62, esdeveniment que genera un lloc d'unió a 14-3-3. S'ha descrit que les 14-3-3 es requereixen pel manteniment d'aquesta serina

fosforilada i, per tant, per l'activitat quinasa de Raf-1 (Thorson et al., 1998). En els estudis de cristalografia es va veure que les 14-3-3 formen dímers i creen una estructura de tassa on s'hi introdueixen els substrats (Yaffe et al., 1997) (Fig 12). Mitjançant la generació de mutants puntuals s'han definit els residus de les 14-3-3 necessaris per la interacció amb els seus lligands (Thorson et al., 1998).

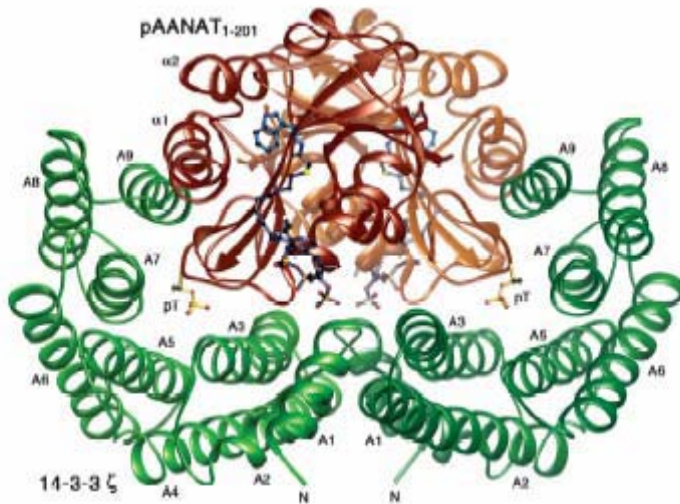


Figura 12: esquema de les 14-3-3 cristalitzades (en verd) unides a un dels seus substrats AANAT (en vermell) (Mackintosh, 2004):

Entre les proteïnes que s'uneixen a les 14-3-3 al ser fosforilades trobem elements tant importants per la homeostasi cel.lular com *cdc25c* que controla el cicle cel.lular (Graves et al., 2001), FKHL que promou l'apoptosi (Brunet et al., 1999) o HDAC4 i 5 implicades en la diferenciació cel.lular (Grozinger and Schreiber, 2000). També hi ha alguns exemples de proteïnes que interaccionen amb 14-3-3 però no contenen cap consens d'unió o la seva unió no depèn de fosforilació: com A20, proteïna proapoptòtica activada per NF κ B (Vincenz and Dixit, 1996), TERT, subunitat catalítica de la telomerasa (Zhang et al., 2003) o Par1 (Benton et al., 2002). Fins ara s'han definit més de 100 substrats per les 14-3-3 (van Hemert et al., 2001) i (Aitken, 2002).

1.3.1. Funcions de les 14-3-3

Les 14-3-3 actuen unint-se als seus substrats alterant, així, alguna propietat de la proteïna a la que regulen. Per exemple, poden 1) alterar l'activitat enzimàtica del substrat, com en el cas de la quinasa Raf-1; 2) alterar-ne la capacitat d'unió a DNA, com s'ha demostrat per p53 que presenta una major afinitat pel DNA unida a 14-3-3 (Waterman et al., 1998) i 3) segrestar els substrats en un determinat compartiment cel.lular, generalment el citoplasma, on no poden exercir la seva funció com seria el cas de FOXO3A o les HDACs de classe II. S'ha proposat que les 14-3-3 indueixen l'acumulació de factors nuclears al citoplasma mitjançant dos mecanismes diferents; d'una banda,

l'extrem C-terminal de les 14-3-3 conté dominis NES que cooperen amb els NES del substrat per exportar el complex substrat:14-3-3 al citoplasma. Per l'altra, la unió a 14-3-3 induïx canvis conformacionals en el substrat que el fa exposar els propis NES i amagar-ne els NLS (Brunet et al., 2002).

1.3.2. 14-3-3 en tumorigènesi

Com ja hem vist, les 14-3-3 regulen proteïnes implicades en cicle cel.lular, en apoptosi i en la diferenciació cel.lular. És per això que canvis en els nivells de 14-3-3 s'associen a diferents patologies com ara el càncer.

Per exemple, la sobreexpressió de 14-3-3 σ s'ha observat en alguns càncers de colon (Perathoner et al., 2005) mentre que altres isoformes de 14-3-3, com la β, γ, σ i ω presenten nivells augmentats en càncer de pulmó (Qi et al., 2005). No obstant, no s'ha demostrat cap relació funcional entre la sobreexpressió de 14-3-3 i la progressió tumoral en aquests càncers.

Pel contrari, en altres tumors epitelials és la pèrdua de l'expressió de 14-3-3 la que s'associa amb

tumorigènesi. Un dels mecanismes per a suprimir l'expressió de 14-3-3 σ és la hipermetilació del seu promotor i s'ha descrit en tumors de mama (Ferguson et al., 2000), de fetge (Iwata et al., 2000) i de pulmó (Osada et al., 2002). En altres tumors de mama que són negatius per 14-3-3 σ , l'expressió augmentada de la ubiquitin-ligasa Efp, promou la degradació de 14-3-3 σ pel proteasoma (Urano et al., 2002). El tractament amb oligonucleòtids antisentit contra Efp reestableix els nivells de 14-3-3 σ i es suficient per induir la remissió dels tumors en ratolins. Es creu que el paper de 14-3-3 com a supressor tumoral té a veure amb la seva capacitat per a segrestar la fosfatasa de CDK2, cdc25c, responsable d'induir l'entrada de les cèl.lules en mitosi (Bulavin et al., 2003). A més, les 14-3-3 també regulen factors proapoptòtics com FoxO (Brunet et al., 1999) o BAD (Zha et al., 1996).

1.4. La via de transducció de senyal de Notch

Notch és una via de transducció de senyal molt conservada que regula la determinació dels destins cel·lulars en metazoos a través d'interaccions cèl·lula-cèl·lula (Artavanis-Tsakonas and Simpson, 1991), (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Molts dels components de la via de Notch es van definir inicialment com a gens implicats en la neurogènesi en *Drosophila* (Parks et al., 1997); la senyalització per Notch restringeix la diferenciació neural ja que reprimeix l'expressió dels gens proneurals. En vertebrats, els receptors i els lligands de la via de Notch estan expressats en molts òrgans i teixits diferents, així mutacions en molècules implicades en aquesta via generen malformacions en molts teixits com el sistema nerviós, el cor o el sistema hematopoètic.

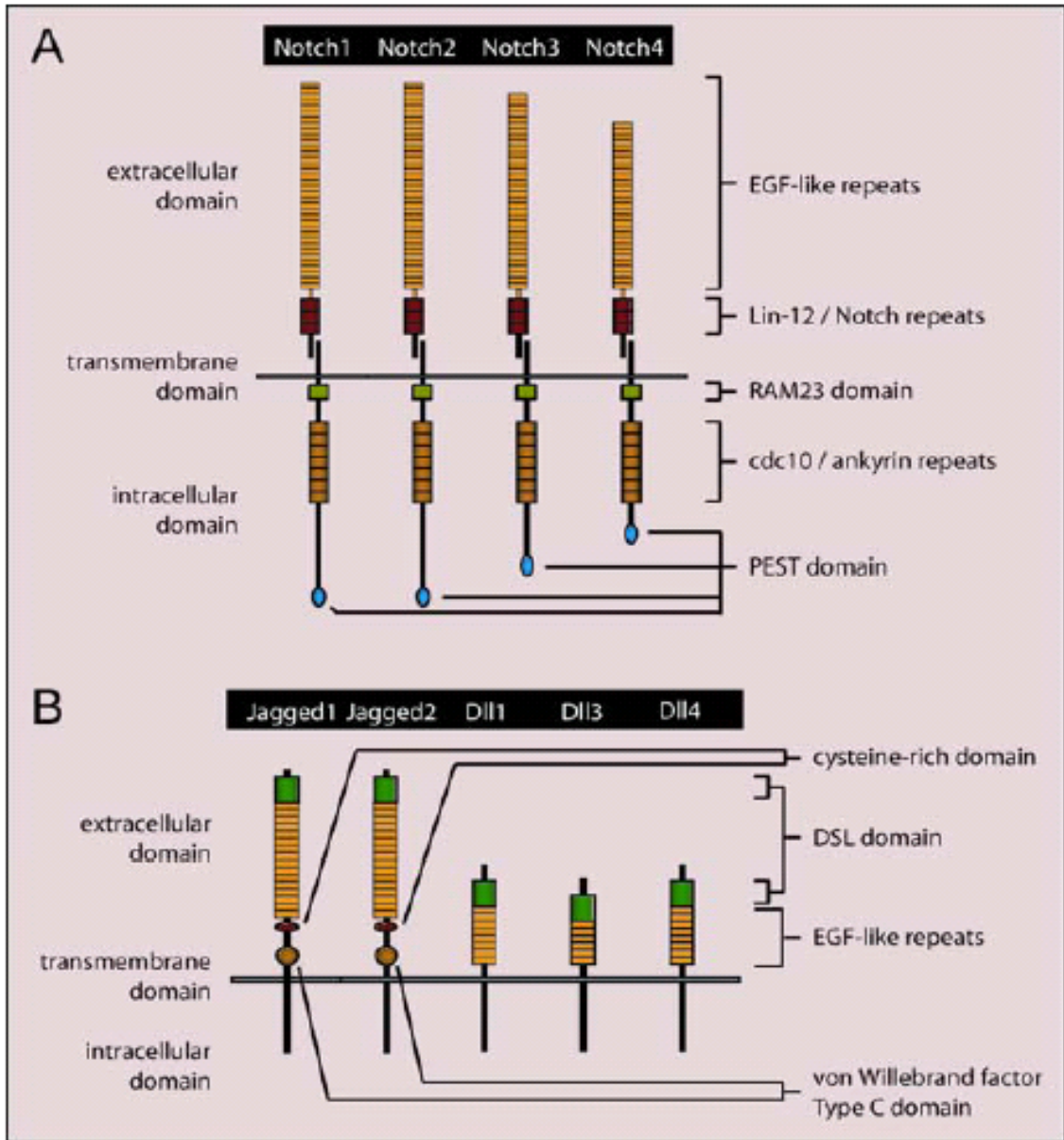
En general, l'activació de la via de Notch inhibeix la diferenciació cel·lular induïda per estímuls específics, mantenint així la integritat dels compartiments de cèl·lules precursors dels diferents llinatges. Així, l'activació de Notch és una estratègia per impedir que

totes les cèl·lules pluripotents adquireixin el mateix llinatge, com en el cas que acabem d'exposar dels progenitors proneurals, en la diferenciació granulocítica (Milner et al., 1996) o en la miogènesi (Kopan et al., 1994).

Un segon paper de Notch és el de promoure el desenvolupament d'un tipus cel·lular, en general induint l'expressió de reguladors positius per aquest llinatge. En molts casos, l'activació de Notch crea un nou tipus cel·lular a conseqüència d'interaccions cèl·lula-cèl·lula en un marge entre diferents poblacions cel·lulars. Per exemple, l'activitat Notch determina el destí de les cèl·lules T cap al subtipus $\alpha\beta$ en detriment del subtipus $\gamma\delta$ (Washburn et al., 1997). També s'ha descrit que en queratinòcits i adipòcits Notch promou la diferenciació d'aquests tipus cel·lulars en cèl·lules nervioses (Rangarajan et al., 2001) o hematopoètiques (Ross et al., 2004).

En mamífers existeixen 4 membres de la família; Notch1, Notch2, Notch3 i Notch4. Aquestes proteïnes són receptors transmembrana que s'activen mitjançant el contacte del seu

Figura 13: esquema que mostra les diferents molècules de Notch i els seus lligands. Se senyalen les parts estructurals més rellevants (Leong and Karsan, 2006):



domini extracel·lular amb els lligands expressats en una cèl·lula veïna. Els lligands de Notch poden ser de dos tipus diferents, els Jagged; Jagged 1 i 2, ortòlegs de Serrate a *Drosophila* o els ortòlegs

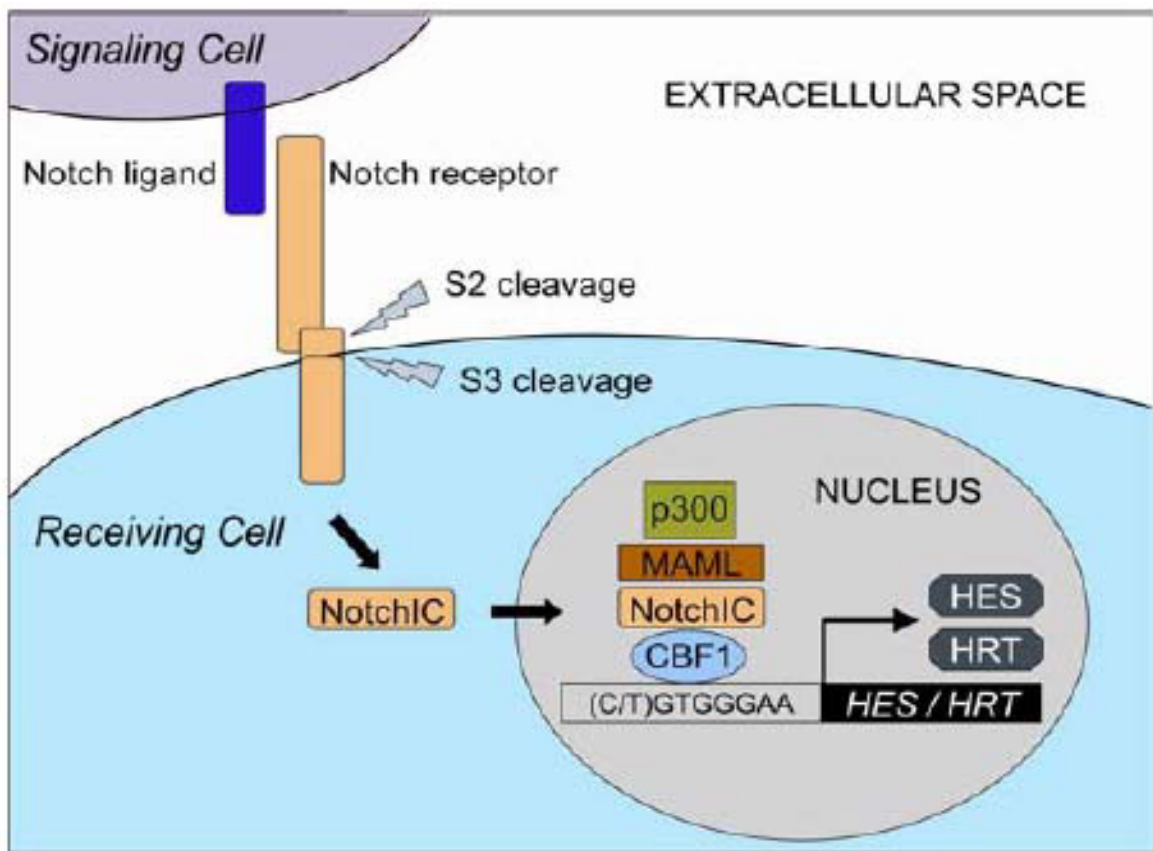
de Delta, Delta-like (DLL)1,3 i 4 (Leong and Karsan, 2006) (Fig 13). El receptor Notch inactiu es localitza a la membrana cel·lular, on pot interaccionar amb lligands que expressen les cèl·lules veïnes. La interacció de Notch amb els seus

l·ligands desencadena una sèrie de processaments proteolítics que tenen com a fi l'activació del receptor. El primer processament es dona a la regió extracel·lular i està produït per una proteasa de la família ADAM anomenada TACE ($\text{TNF}\alpha$ converting enzyme) en vertebrats o kuzbanian en *Drosophila*. Aquest processament resulta en un canvi conformacional que exposa una regió en el domini transmembrana del receptor que és sensible a la proteòlisi per un complex amb activitat γ -secretasa que inclou les proteïnes presenilina 1 i 2, nicastrina, Pen-2 i Aph1. L'activitat γ -secretasa talla la proteïna Notch alliberant un fragment intracel·lular (NotchIC o NICD) que es transloca al nucli on s'uneix al factor de transcripció RBPj κ per activar els seus gens diana.

En absència d'estímul, RBPj κ (també anomenat CBF1 o CSL) està unit als mateixos gens diana de Notch a través d'una seqüència consens (C/T)GTGGGAA i recluta repressors transcripcionals que cooperen per inhibir la transcripció d'aquests gens (revisat a (Leong and Karsan, 2006).

L'activació de Notch fa que NotchIC s'uneixi a RBPj κ convertint-lo en un activador transcripcional. Per aquest procés es requereix la col·laboració de Mastermind-like (MAML), una família d'activadors transcripcionals (Wu et al., 2000). Aquest complex ternari recluta altres coactivadors, com CBP/p300, que acetilarà les histones induint els canvis conformacionals necessaris per que tingui lloc la transcripció (Fig 14).

Figura 14: diagrama on es resumeixen els esdeveniments que donen lloc a l'activació gènica mediada per Notch i els seus lligands (Leong and Karsan,



2006):

1.4.1. Els gens diana de Notch: *hes1*

En mamífers podem trobar dues subfamílies de gens activats per Notch; la subfamília de *hes*, que inclou *hes1*, *5* i *7* i la de *hrt* (Hairy related transcription factor), que inclou *hrt1/herp2* i *hrt2/herp1* (revisat a (Iso et al., 2003).

Aquests gens diana de Notch codifiquen per proteïnes que pertanyen a la família bHLH (basic helix-loop-helix), nom que defineix la seva estructura; el domini bàsic els serveix d'ancoratge al DNA, mentre que les estructures en hèlix alfa donen la capacitat de dimeritzar amb altres proteïnes tipus bHLH. Així, els bHLH s'uneixen a seqüències específiques de DNA com a dímers. S'han definit tres famílies de bHLH en funció de la seqüència gènica a la que s'uneixen; classe A, B i C:

Les proteïnes Hes són bHLH de la classe C; s'uneixen a seqüències tipus CACGNG tot i que també es poden unir a seqüències tipus N-Box.

De la família *hes* es coneixen 7 membres, *hes1* al *7*, però només *hes1* (Jarriault et al., 1995), *hes5*

(Ohtsuka et al., 2001) i *hes7* (Bessho et al., 2001) s'ha demostrat que siguin dianes de Notch. En general, els membres d'aquesta família de bHLH són repressors transcripcionals, excepte Hes6 que es podria definir com a activador per la seva capacitat d'inhibir a Hes1 (Bae et al., 2000). S'han proposat tres mecanismes pel quals les proteïnes Hes farien la seva funció; per una banda s'uneixen com a homodímers a seqüències específiques de DNA i inhibeixen els seus gens diana pel reclutament del repressor Groucho (TLE en mamífers). Aquest repressor recluta Rpd3 (HDACs en mamífers) que deacetila la cromatina induint-ne la seva compactació (Fisher et al., 1996). El segon mecanisme és passiu i es basa en la formació d'heterodímers no funcionals amb altres bHLH que, en absència de Hes1, actuarien com factors de transcripció. En un sistema com el de la diferenciació muscular Hes1 s'uneix a E47, un factor de transcripció tipus bHLH de classe A, impedint la formació d'un complex activador de E47 amb els seus partners MyoD i Mash1 (Sasai et al., 1992). El tercer mecanisme, encara poc definit, és essencial per la

pròpia repressió de *hes1* i també de *p21^{waf}*, i se sap que requereix d'un domini anomenat Orange domain. Es creu que aquest domini podria reclutar repressors a la cromatina (Castella et al., 2000).

Es coneixen diversos gens diana de Hes1, entre ells el propi *hes1* que conté una N-box al seu promotor (Takebayashi et al., 1994). També en són diana de Hes1 el gen *mash1*, ortòleg a mamífers del gen proneural *achaete-scute* de *Drosophila* (Kageyama et al., 1995), el receptor CD4 de les cèl.lules T (Tomita et al., 1999), *p21^{waf}* (Kabus et al., 2002), un inhibidor de les quinases ciclina-depenents (CDK) reguladores del cicle cel.lular o la calcipresina (Mammucari et al., 2005).

Taula 3a: classificació de les proteïnes tipus bHLH (adaptat de (Iso et al., 2003)), classificades per la seqüència de DNA a la que s'uneixen:

Fisher and Caudy (1998)	Massari and Murre (2000)	
Classe A	I, II	Activadors transcripcionals
Classe B	III, IV	Proteïnes bHLH-cremallera de leucina
Classe C	VI	Repressors transcripcionals
	V	Proteïnes HLH sense domini bàsic
	VII	Proteïnes bHLH-PAS

Taula 3b: seqüències a les que s'uneixen al DNA les proteïnes tipus bHLH:

Seqüències consens d'unió al DNA dels bHLH		
Classificació	Consens	Exemples
Classe A	CANCTG	CACCTG, CAGCTG
Classe B	CANGTG	CACGTG, CATGTG
Classe C	CACGNG	CACGCG, CACGAG
E box	CANNTG	CACCTG, CAGCTG
N box	CACNAG	CACGAG, CACAAG

1.4.2. Hes 1 en diferenciació i oncogènesi

La via de Notch juga un paper clau en el desenvolupament embrionari i en el manteniment de l'homeostasi dels teixits adults, regulant processos cel·lulars claus com la diferenciació, la proliferació o l'apoptosis. En molts d'aquests processos, s'ha pogut demostrar que la funció de Notch és dependent de l'expressió del gen *hes1*.

Donat que Notch intervé en processos tan diversos, s'ha descrit que mutacions en components de la via de Notch estan a la base de diferents malalties com ara la leucèmia linfoblàstica aguda de cèl·lules T (T-ALL) (Ellisen et al., 1991). Una de les causes d'aquesta leucèmia és una translocació cromosòmica que fusiona la part intracel·lular de Notch amb el receptor de cèl·lules T (TCR), així les cèl·lules leucèmiques tenen la via de Notch constitutivament activa. També s'han descrit mutacions del receptor Notch que faciliten el trencament de la molècula i la consegüent activació de la via (Weng et al., 2004).

A més de en leucèmies, també s'ha observat l'expressió anòmala de components de la via de Notch en diferents tumors sòlids com els càncers de còlon (revisat a (Radtke and Clevers, 2005), de pàncreas (Miyamoto et al., 2003) o de pulmó (Dang et al., 2000). En la majoria dels estudis, però, no s'ha identificat el mecanisme oncogènic pel qual aquestes proteïnes operen. Se sap, però, que l'expressió de *hes1* es imprescindible per mantenir la tumorigènesi induïda per k-Ras (Weijzen et al., 2002) o per mutacions en APC (van Es et al., 2005). Pel contrari, en tumors de pulmó de cèl·lula petita *hes1* es troba reprimat i això duu a l'activació del seu gen diana *hash1* que és necessari per mantenir el fenotip neuroendocrí del tumor (Ito et al., 2003).

1.5. Interrelació entre les vies d'NFκB i de Notch

La comunicació entre cèl·lules és un requeriment bàsic per la funcionalitat dels organismes pluricel·lulars, ja que és un element clau no només durant el desenvolupament embrionari, sinó també en el manteniment de l'homeostasi de l'organisme adult.

El càncer no és el resultat d'una única alteració genètica sinó que sol ser conseqüència de l'acumulació progressiva de mutacions en proto-oncogens o gens supressors tumorals que provoquen defectes en el creixement, la diferenciació i la supervivència cel·lulars. Donat que els elements que regulen l'expressió dels gens tampoc actuen de forma independent i que moltes vies de transducció de senyal cooperen o s'inhibeixen entre elles, és important conèixer com s'integren aquestes vies en el context de la fisiologia de la cèl·lula normal i tumoral per tal de millorar les teràpies contra el càncer. Donada la gran importància de les vies de Notch i d'NFκB en la gènesi i progressió tumoral l'estudi dels possibles interaccions entre ambdues vies és de màxima importància.

S'han publicat alguns treballs on s'estudia la relació entre les vies de Notch i d'NFκB. Inicialment, Wang et al. van demostrar que en cèl·lules T, la fracció intracel·lular de Notch1 interaccionava amb la subunitat p50 d'NFκB, però no amb p65 i van proposar que Notch jugaria un paper similar al d'IκB al nucli, regulant negativament els gens diana d'NFκB al impedir la unió del factor de transcripció als seus gens diana (Wang et al., 2001). Aquest mecanisme s'ha proposat, però no demostrat, que podria estar operant en cèl·lules precursors hematopoiètiques (Cheng et al., 2001).

En el model del desenvolupament de les cèl·lules T s'ha trobat relació entre Notch i NFκB; Notch3 indueix un increment en l'expressió del gen pTα (un dels components del pre-TCR) que comporta una activació sostinguda de la senyalització pel pre-TCR, que augmenta l'activitat NFκB a través de l'activació del complex IKK (Bellavia et al., 2003). També en cèl·lules T s'ha descrit que Notch1 augmenta l'activitat NFκB facilitant la seva retenció al

nucli ja que competiria amb I κ B per unir-se al factor de transcripció (Shin et al., 2006).

S'ha demostrat un mecanisme in vitro i del qual no està clara la rellevància fisiològica, en el que RBPj κ s'uneix a seqüències diana d'NF κ B (Shirakata et al., 1996). Aquesta interacció determinaria que l'activitat dependent d'NF κ B en aquests gens estigués negativament regulat en absència de Notch i positivament en la seva presència. Aquest és el cas de *il-6* (Interleuquina-6), en el que s'ha detectat RBPj κ al seu promotor en alguns tipus cel·lulars que s'ha relacionat amb la repressió basal d'aquest gen (Plaisance et al., 1997).

Un cas especial d'aquest mecanisme és el promotor d'I κ B α ; conté una seqüència d'unió per NF κ B on es pot unir RBPj κ reprimint el gen al competir amb NF κ B pel mateix domini d'unió al DNA (Oakley et al., 2003). Així la via de Notch/RBPj κ podria mantenir l'activació crònica d'NF κ B al impedir la síntesi de l'inhibidor I κ B α .

Pel que fa a la via alternativa d'NF κ B, s'ha demostrat que RBPj κ s'uneix al promotor d'*nfkb2*, el gen que codifica per p100/p52, i que aquest gen pot ser activat transfectant Notch1 (Oswald et al., 1998), suggerint que *nfkb2* seria una diana de la via de Notch. S'ha demostrat recentment que aquest mecanisme opera en sinoviòcits (Nakazawa et al., 2001).

De forma similar, c-Rel i p65 modulen la via de Notch a través de l'activació transcripcional del seu lligand *jagged1* (Bash et al., 1999).

A un altre nivell de regulació, l'expressió ectòpica de I κ B α ₃₂₋₃₆ és capaç d'activar directament la transcripció de gens com *hes1* (Espinosa et al., 2002), (Espinosa et al., 2003) al segrestar els corepressors transcripcionals N-CoR i SMRT al citoplasma.

OBJECTIUS

Objectius

L'objectiu general plantejat en aquesta tesi ha estat entendre els mecanismes que regulen la via d'NF κ B i la de Notch i estudiar la seva interrelació. Aquest objectiu general s'ha desglossat en dos objectius més específics:

- 1- Estudiar el paper de les 14-3-3 en la regulació de la via clàssica d'NF κ B
- 2- Estudiar el mecanisme pel qual I κ B α regula els gens diana de Notch

RESULTATS

3.1. Capítol I :

Efficient nuclear export of I κ B α /p65 complexes requires 14-3-3

En aquest article es demostra com les 14-3-3 regulen la via clàssica d'NF κ B afavorint l'export citoplasmàtic dels complexos p65/I κ B α després de l'activació per TNF α .

Demostrem que p65 conté dos dominis d'unió a 14-3-3 que inclouen els aminoàcids 38-44 i 278-283, i mapem el lloc d'unió d'I κ B α a 14-3-3 en els aminoàcids 60-65. La mutació d'aquests dominis redistribueix p65 i I κ B α al nucli de les cèl.lules suggerint que 14-3-3 participa en l'export d'aquestes proteïnes del nucli.

El tractament amb TNF α promou el reclutament de 14-3-3 i d'I κ B α als promotors de gens diana d'NF κ B així com la unió de p65 a les 14-3-3. A l'inhibir l'activitat NF κ B amb un dominant negatiu de les 14-3-3, els complexos I κ B α /p65 s'acumulen al nucli de les cèl.lules. En aquestes condicions s'observa una associació constitutiva de p65 als seus gens diana que dona lloc a una falta de resposta d'aquests gens a l'activació induïda per TNF α . Així demostrem que les 14-3-3 són necessàries per la correcta regulació de la via d'NF κ B ja que facilita l'export del nucli dels complexos I κ B α /p65.

Aquest mecanisme podria ser especialment important en alguns càncers de mama com indica la presència de p65 nuclear en tumors que presenten nivells anormalment reduïts de 14-3-3 σ .

Efficient nuclear export of p65-I κ B α complexes requires 14-3-3

Aguilera C., Fernández-Majada V., Inglés-Esteve J., Rodilla V., Bigas A.*, Espinosa L.*

Centre Oncologia Molecular, IDIBELL-Institut de Recerca Oncologica.

I κ B are responsible for maintaining p65 in the cytoplasm under non-stimulating conditions and promoting the active export of p65 from the nucleus following NF κ B activation to terminate the signal. We now show that 14-3-3 proteins regulate the NF κ B signaling pathway by physically interacting with p65 and I κ B α proteins. We identify two functional 14-3-3 binding domains in the p65 protein involving residues 38-44 and 278-283, and map the interaction region of I κ B α in residues 60-65. Mutation of these 14-3-3 binding domains in p65 or I κ B α results in a predominantly nuclear distribution of both proteins. TNF α treatment promotes recruitment of 14-3-3 and I κ B α to NF κ B-dependent promoters and enhances the binding of 14-3-3 to p65. Disruption of 14-3-3 activity by transfecting a dominant-negative 14-3-3 leads to the accumulation of nuclear p65-I κ B α complexes and the constitutive association of p65 to the chromatin. In this situation, NF κ B-dependent genes become unresponsive to TNF α stimulation. Together our results indicate that 14-3-3 proteins facilitate the nuclear export of I κ B α -p65 complexes and are required for the appropriate regulation of NF κ B signaling.

Altered NF κ B activity has been linked to several human diseases such as inflammation and cancer. Several extracellular stimuli such as TNF α lead to I κ B phosphorylation (residues 32-36 in I κ B α) and degradation, thus releasing NF κ B and permitting the transcriptional activation of NF κ B target genes. In general, I κ B proteins inhibit NF κ B by maintaining p65 in the cytoplasm (reviewed in reference (Baldwin, 1996)) whereas I κ B α plays a unique role in actively removing p65 from the nucleus because of its ability for nucleo-cytoplasmic shuttling both in basal condition (Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999) or in response to stimuli (Huang et al., 2000; Huang and Miyamoto, 2001; Johnson et al., 1999; Nomura et al., 2003; Tam and Sen, 2001). Despite this specific function has been classically associated with I κ B proteins, in cells lacking I κ B α , β and ϵ isoforms, p65 remains cytoplasmic (Tergaonkar et al., 2005). Although p100 and p105 can interact with p65 in these cells, other unknown proteins may be involved (Moorthy and Ghosh, 2003; Prigent et al., 2000; Tergaonkar et al., 2005).

14-3-3 is a highly conserved family of proteins that regulate a wide variety of signal transduction pathways (Fu et al., 2000; Tzivion et al., 2001) by promoting the cytoplasmic export of prephosphorylated substrates (Brunet et al., 2002; Grozinger and Schreiber, 2000). Many different 14-3-3 targets have already been identified such as Raf-1 (Thorson et al., 1998), the cell cycle regulator Cdc25 (Lopez-Girona et al., 1999), Histone Deacetylases (Grozinger and Schreiber, 2000), the proapoptotic factors FKHL1 (Brunet et al.,

2002), Bad (Hsu et al., 1997) and Bax (Nomura et al., 2003), the tumor suppressor p53 (Waterman et al., 1998) or the kinase Par1 (Benton et al., 2002), and most of them, but not all, require prephosphorylated 14-3-3 binding domains corresponding to the RXXpSXP or RXXXpSXP consensus, being pS a phosphorylated serine. Although 14-3-3 are primarily cytoplasmic proteins, it has been shown that Protein Kinase B-dependent phosphorylation of the 14-3-3 binding sites of FKHL1, that promotes its cytoplasmic translocation, occurs in the nucleus thus suggesting that the interaction between both proteins takes place in this cellular compartment (Brunet et al., 2002).

Since nuclear-cytoplasmic shuttling is crucial in the regulation of NF κ B activity, we investigated whether 14-3-3 proteins may play a role in this signaling pathway. Here we show that 14-3-3 interact with both p65 and I κ B proteins and play a role in the regulation of NF κ B pathway after TNF α treatment by facilitating the export of I κ B α -p65 complexes.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. Expression vectors for pCMV-HA-I κ B α ₃₂₋₃₆, GFP-p65, Flag-p65, myc-14-3-3 η , myc-14-3-3 η _{R56A-R60A} (DN-14-3-3), and GST-14-3-3 η have been previously described (DiDonato et al., 1995; Thorson et al., 1998). I κ B α and p65 constructs were obtained by PCR and primer sequences are available upon request. PCR products were cloned in frame into the pGEX-5.3 vector (Pharmacia) or into the pcDNA3.1-HA. GFP-p65 mutants were generated with the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). All construct sequences were confirmed by automated sequencing.

Antibodies and inhibitors. α -I κ B α (sc-1643 and sc-371G), α -p65 (sc-109), α -HDAC1 (sc-7872), α -14-3-3 β (sc-629) and α -14-3-3 γ (sc-731) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. α -14-3-3 β (recognizing different 14-3-3 isoforms and referred as α -pan-14-3-3) (KAM-CCO13) was from Bioreagents, α -flag (clone M2) and α -alpha-tubulin from Sigma, α -HA from Babco and α -HDAC4 (07-040) and α -I κ B α (06-494) were from Upstate and α -phospho-14-3-3 binding motif (9601) was from Cell Signaling. Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) were purchased from DAKO. Fluorescein-conjugated goat anti-mouse or Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody was from Amersham and Alexa-fluor-594-conjugated goat anti-mouse antibody was from Molecular Probes.

BAY 11-7082, JNK inhibitor II and SB203580 were used at 100 μ M, 20 μ M and 12 μ M respectively and purchased from Calbiochem. TNF α was purchased from Preprotech and used at 40 ng/ml.

Cell culture and transfection. HEK-293T, RWP1 pancreatic cancer cells, NIH-3T3 murine embryonic fibroblasts (MEF), p65^{-/-} MEF and I κ B α ^{-/-} MEFs were cultured in DMEM plus 10% FBS. Cells were plated at subconfluence and transfected with calcium phosphate or Lipofectamine Reagent (Invitrogen). Cells were harvested after 24h for immunofluorescence, coimmunoprecipitation, ChIP or western blot analysis.

Cell fractionation. Individualized cells were incubated in 500 μ l of 0.1% NP-40/PBS for 5 min on ice and the reaction was stopped by adding 3ml of cold PBS. Nucli were isolated by centrifugation at 2,000 rpm and washed with 3ml of cold PBS twice. After washing, nucli were lysed for 30 min in 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5mM EGTA, 5mM EDTA, 20mM NaF and complete protease inhibitor cocktail (Roche).

siRNA transfection: siRNAs against 14-3-3 β (sc-29186), 14-3-3 γ (sc-29582), 14-3-3 ϵ (sc-29588) or control siRNA (sc-36869) were transfected in HEK-293T cells with the siRNA reagents from Santa Cruz Biotechnology, according to the manufacturer's instructions (sc-36868).

Pull down assays. Pull down assays have been previously described (Espinosa et al., 2003). Briefly, GST fusion proteins were purified and incubated with 400 μ g of cell lysates for 2h at 4°C in lysis buffer and extensively washed. Pulled down proteins were analyzed by western blot.

Coimmunoprecipitation assays. Cells were lysed for 30min at 4°C in 500 μ l of PBS containing 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 100 μ M Na-orthovanadate, 0.25 mM PMSF and complete protease inhibitor cocktail (Roche). After centrifugation, supernatants were incubated for 3h at 4°C with 1 μ g of the indicated antibody coupled to Protein A-Sepharose beads. Beads were extensively washed with the precipitation buffer and samples were assayed by western blot.

Immunofluorescence. Cells were grown on glass slides and transfected with the indicated plasmids. After 48h, cells were fixed in 3% PFA and permeabilized with 0.3% Triton X-100, 10% FBS and 5% non-fat dry milk in PBS. After incubation with the appropriate antibodies, slides were mounted with Vectashield plus DAPI or Propidium Iodide (PI) (Vector) and stainings were visualized in an Olympus BX-60 microscope or a Leica TCS-NT laser scanning confocal microscope equipped with the x63 Leitz Plan-Apo objective (NA 1.4). Representative images were edited on Adobe Photoshop. For each experiment a minimum of 200 cells was counted in the Olympus BX-60 by two independent researchers (CA and LE).

Protein Kinase assays. Cells were lysed for 30min at 4°C in 500ml of PBS containing 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 100 mM Na-orthovanadate, 0.25 mM PMSF and complete protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were assayed for kinase activity on GST-p65 peptides in the presence of ³²P γ -ATP.

Chromatin Immunoprecipitation Assay. Chromatin from crosslinked cells was sonicated, incubated overnight with the indicated antibodies in RIPA buffer and precipitated with protein G/A-Sepharose. Cross-linkage of the coprecipitated DNA-protein complexes was reversed, and

DNA was used as a template for semiquantitative PCR. Primer sequences are available upon request.

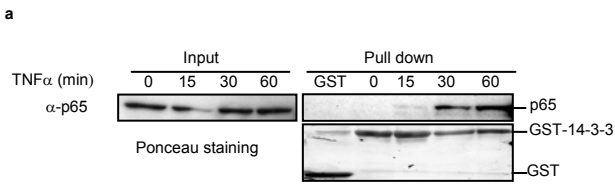
RT-PCR. Total RNA from HEK-293T cells was isolated using Trizol Reagent (Invitrogen), and cDNA was obtained with RT-First Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. Densitometric analysis of the PCRs was performed with the Quantity One software from Biorad. Oligonucleotide sequences are provided upon request.

RESULTS

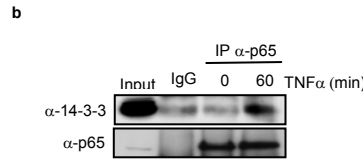
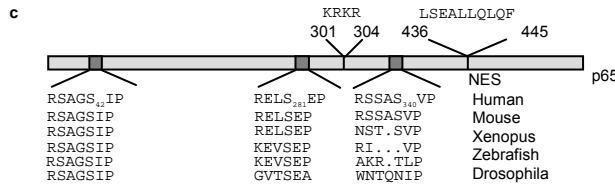
TNF α induces p65 binding to 14-3-3. By pull down experiments, we first demonstrated that p65 physically bound to GST-14-3-3 η in response to TNF α stimulation and that this interaction was maintained after 60 min of chronic treatment in HEK-293T cells (Fig 1a). We next confirmed this interaction by precipitating endogenous p65 from these cells and detecting 14-3-3 after TNF α treatment in the precipitates (Fig 1b). By sequence analysis, we identified three putatives 14-3-3 binding domains containing the RXXSXP and RXXXSXP (Yaffe, 2002), involving residues AA38-44 (BD42), AA278-283 (BD281), and AA336-342 (BD340) of human p65. Nevertheless, only two of these domains, 38 to 44 and 278 to 283 are evolutionary conserved, suggestive of their functional relevance (Fig 1c).

In many identified 14-3-3 substrates, phosphorylation is required for 14-3-3 binding (Muslin et al., 1996). To further investigate whether binding of p65 to 14-3-3 was phosphorylation-dependent, we incubated protein extracts from TNF α -treated HEK-293T cells with acid phosphatase and performed pull down assays with GST-14-3-3 η . In Fig 2a, we show that phosphatase treatment completely abolished the TNF α -induced binding of p65 to 14-3-3, indicating that this interaction was phosphorylation-dependent. To investigate which kinases were involved in regulating this interaction, we treated HEK-293T cells with different kinase inhibitors such as BAY11-7082 (IKK), JNK inhibitor, SB203580 (p38), Wortmanin (PKC and PI3K), PD98059 (ERK) and H89 (PKA and MSK) and used the different cell lysates for pull down assays with GST-14-3-3 η (Fig 2b and Supplemental Information, Fig S1). Our results demonstrated that BAY11-7082 specifically abrogated the interaction between p65 with 14-3-3 suggesting that IKK activity is required for p65 binding to 14-3-3.

We next tested whether the three theoretical 14-3-3 binding domains of p65 were phosphorylated in response to TNF α . With this aim we generated GST fusion proteins that contained these domains from wild type p65 (GST-BD42, -BD281 and -BD340) and the corresponding Ser to Ala mutants. Wild type or mutated GST-p65 peptides were incubated with



Together, these results indicate that both Ser42 and Ser281 are phosphorylated in response to TNFα to create two functional 14-3-3 binding sites in p65. Despite we did not detect phosphorylation of Ser340 in response to



untreated or TNFα-treated cell lysates in the presence of ³²P-ATP. We detected TNFα-dependent phosphorylation in GST-BD42 and GST-BD281 proteins that was abrogated by the point mutations S42A and S281A (Fig 2c), while GST-BD340 was not phosphorylated. To confirm that S42 and S281 were phosphorylated in response to TNFα, an antibody that specifically binds to phosphorylated 14-3-3 binding motifs (α-P-14-3-3BM) efficiently recognized precipitated GFP-p65 from TNFα treated cells and in a minor extent the GFP-p65 mutants S42A and S281A (Fig 2d).

To test whether these binding domains were functionally involved in the interaction between p65 and 14-3-3, we performed pull down assays with cell extracts from HEK-293T transfected with GFP-p65wt or the point mutants S42A, S281A and S340A. In Fig 2e, we show that 30 min after TNFα treatment, interaction between 14-3-3 and p65 is severely reduced in mutants S42A and S281A.

FIG 1: p65 binds to 14-3-3 proteins in response to TNFα.(a) Pull down experiment using GST-14-3-3_η and lysates from untransfected HEK-293T cells incubated with TNFα at the indicated times. Upper panel shows immunoblot with α-p65. Ponceau staining of GST proteins is shown in lower panel. Inputs represent 1/10 of the lysates. (b) Cell lysates from HEK-293T, untreated or treated with TNFα, were precipitated with α-p65 antibody or rabbit IgG as a control. The presence of 14-3-3 in the precipitates was determined by immunoblot with α-14-3-3_η antibody recognizing different 14-3-3 isoforms (α-pan-14-3-3). (c) Schematic overview of the p65 protein sequence indicating the putative 14-3-3 binding domains.

TNFα, we observed a decrease in the interaction between S340A mutant and 14-3-3. Based on this result, we cannot exclude that BD340 is also involved in 14-3-3 binding.

IkBα interacts with 14-3-3 in a TNFα independent manner. We next tested whether other NFκB family members were also associated with 14-3-3 proteins. By pull down experiments, we demonstrated that the NFκB inhibitor IkBα binds to GST-14-3-3 in untreated HEK-293T cells, whereas TNFα resulted in a decrease in both, the total levels of IkBα as expected, and in the amount of IkBα bound to 14-3-3 (Fig 3a). However, coprecipitation experiments from HEK-293T transfected with the non-degradable IkBα₃₂₋₃₆ demonstrated that TNFα treatment is not inhibiting the binding of IkBα to 14-3-3 (Fig 3b)

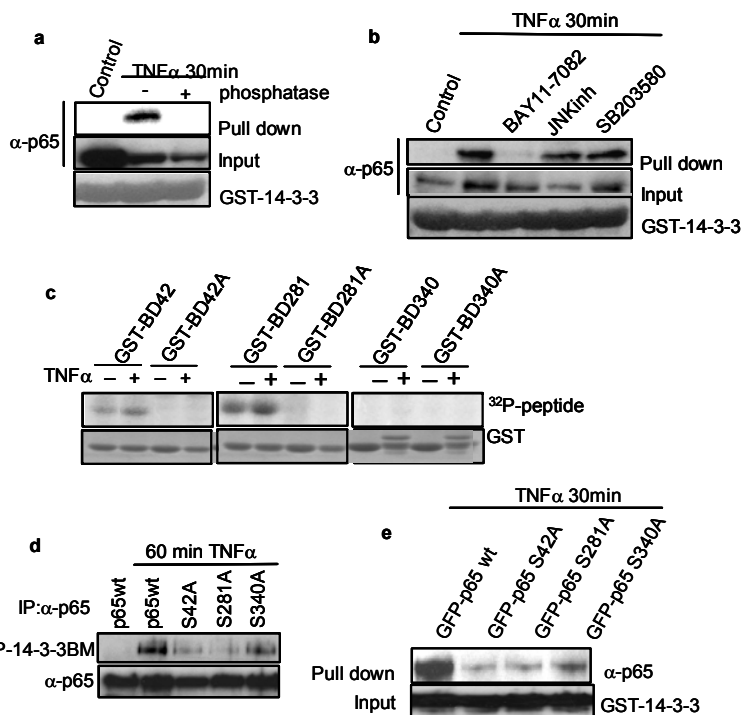
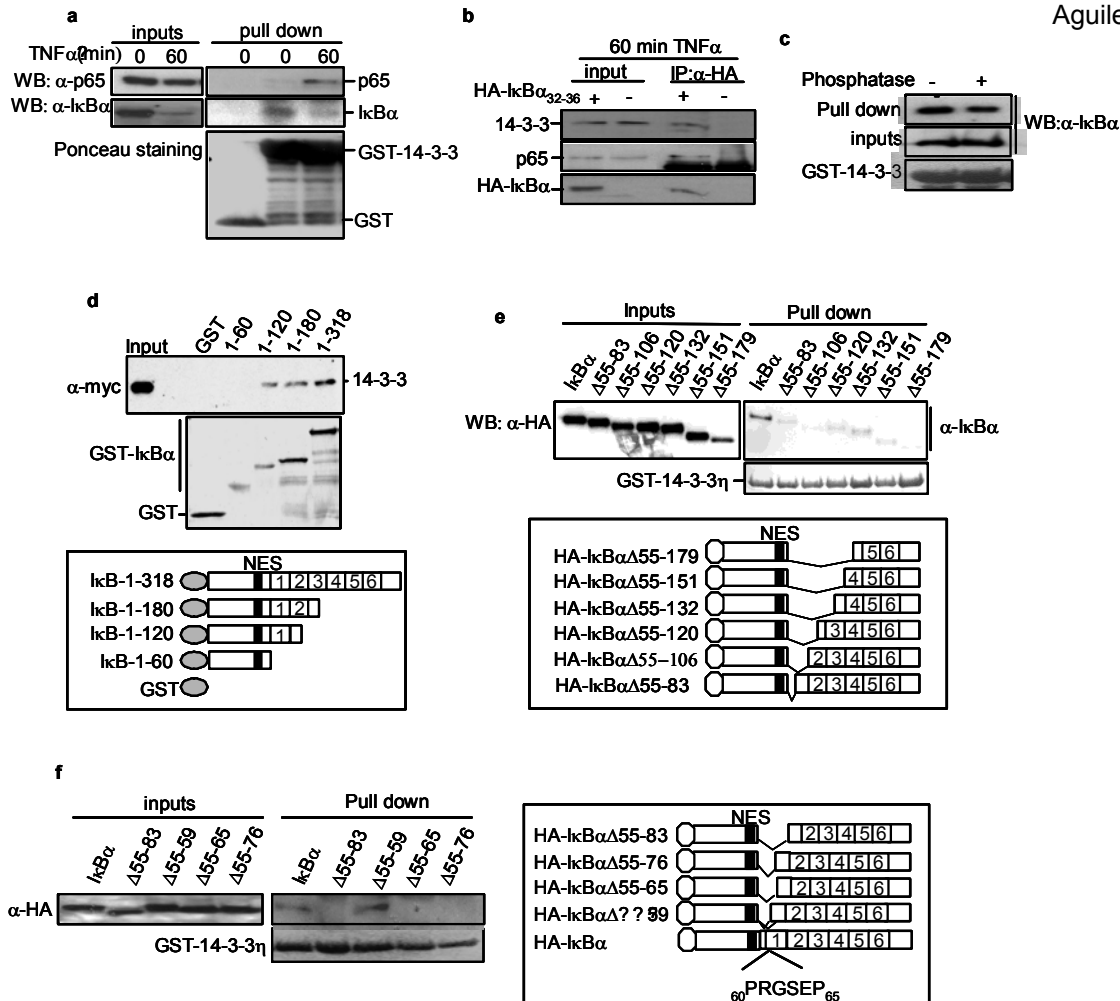


FIG 2: Interaction between p65 and 14-3-3 depends on phosphorylation.

(a and b) Pull down assay with GST-14-3-3_η and cell lysates from TNFα-treated HEK-293T cells incubated with acid phosphatase for 30 min (a) or from cells incubated for 2 hours with the indicated inhibitors plus 30min with TNFα (b). The presence of p65 in the precipitates was determined by western blot with α-p65 antibody. Coomassie staining of GST proteins is shown in lower panel. Inputs represent 1/10 of the lysates.

(c) In vitro kinase assay to test the capacity of total cell lysates, from untreated or TNFα-treated HEK-293T cells, to phosphorylate GST-p65 peptides including the putative 14-3-3 binding domains. Upper panels show phosphorylated peptides by autoradiography. Coomassie staining of GST proteins is shown in lower panel.

(d) Cell lysates from HEK-293T transfected with the full length GFP-p65wt and the indicated mutant plasmids, treated for 60min with TNFα were precipitated with the α-p65 antibody. Western blot analysis with α-P-14-3-3 binding motif antibody confirmed the presence of phosphorylated 14-3-3 binding domains in p65. Precipitated GFP-p65 protein levels are shown in the lower panel.(e) Pull down experiment using GST-14-3-3_η and lysates from HEK-293T cells transfected with the indicated p65 mutants and treated for 30min with TNFα. Upper panel shows immunoblot with α-p65. Coomassie staining of GST proteins is shown in lower panel. Inputs represent 1/10 of the lysates.



Pull down assays with phosphatase-treated cell extracts demonstrated that phosphorylation of I κ B α was not required for its binding to 14-3-3 (Fig 3c). Next, we analyzed the I κ B α protein sequence for the presence of conserved 14-3-3 binding motifs. As we could not identify any consensus, we generated sequential I κ B α deletion mutants (Figs 3d, e and f) and tested their ability to bind 14-3-3 in pull down assays. From these experiments, we identified a unique region in the first ankyrin repeat of I κ B α that was required for the interaction of I κ B α with 14-3-3. Since I κ B α Δ 55-59 still bound GST-14-3-3 whereas I κ B α Δ 55-65 did not (Fig 3f), we propose that 14-3-3 binding domain of I κ B α includes residues AA60-65, that greatly resembles a 14-3-3 binding motif (Fig 3f).

14-3-3 binding domains of p65 and I κ B α are required for their efficient nuclear export. Since 14-3-3 proteins regulate the subcellular distribution of many of their substrates, we determined the subcellular localization of GFP-p65 wild type compared to GFP-p65 mutants S42A and S281A in RPW1 (Fig 4a) and HEK-293T (data not shown) cells. As shown in Fig 4a, transiently transfected GFP-p65 was mainly cytoplasmic, as expected. Single mutation of S42 or S340 to A resulted in a moderate increase in the nuclear localization of GFP-p65 (56% and 66% respectively) compared to the wild type (43%) whereas S281A mutation was sufficient to promote the nuclear retention of p65 in almost all the cells (94%) (Fig 4a). These results indicate that 14-3-3 binding domains of p65, and particularly BD281, are required for its cytoplasmic localization.

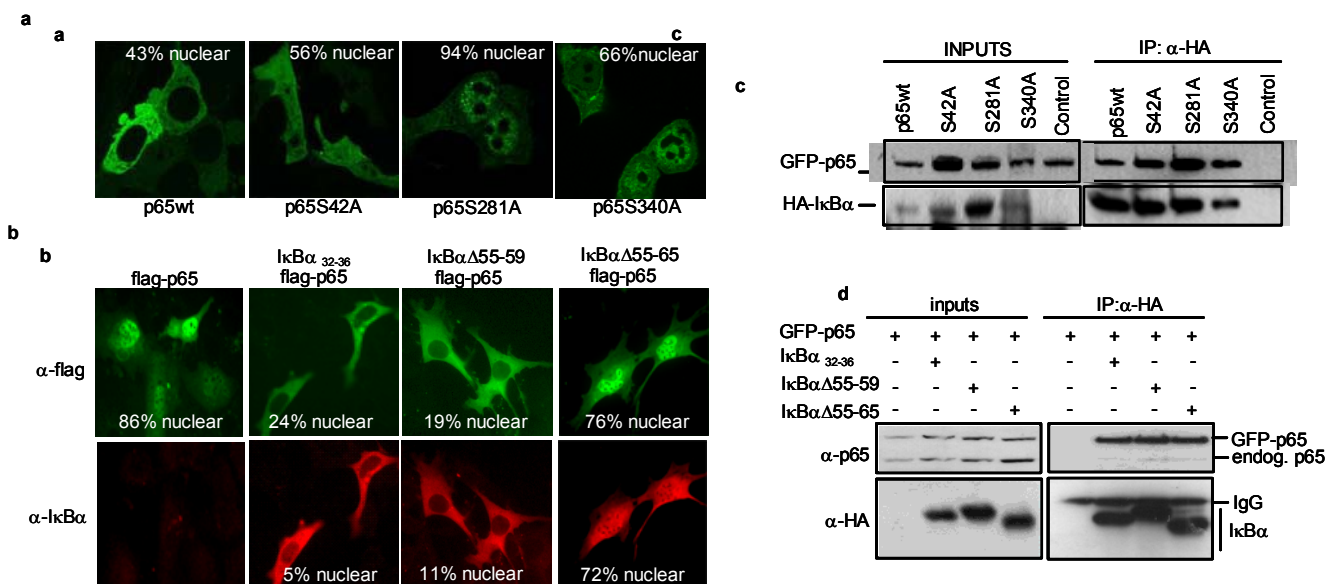
To test the functional relevance of the 14-3-3-binding region of I κ B α , we determined the subcellular distribution of the 14-3-3-binding-deficient mutant, I κ B α Δ 55-65, as well as its capacity to induce cytoplasmic localization of p65 in I κ B α -deficient MEFs. As shown in Fig 4b, transfected flag-p65 primarily localized in the nucleus in most of the I κ B α ^{-/-} cells (86%). Coexpression of the non-degradable I κ B α ₃₂₋₃₆ or the I κ B α Δ 55-59 mutant that binds 14-3-3 leads to the cytoplasmic redistribution of GFP-p65 compared to the control (24% and 19% nuclear respectively). By contrast, the I κ B α Δ 55-65 mutant, lacking the 14-3-3 binding site, failed to retain p65 in the cytoplasm (76% nuclear) (Fig 4b). Of note, localization of this I κ B α Δ 55-65 mutant, containing an intact NES (see Fig 3f), was predominantly nuclear, suggesting that

14-3-3 also regulates subcellular distribution of I κ B α . As a control, we performed coprecipitation experiments to demonstrate that mutations in the 14-3-3 binding motifs do not affect the interaction between p65 and I κ B α (Figs 4c and 4d).

14-3-3 activity is required for the appropriate nuclear export of p65-I κ B α complexes. To test whether the aberrant nuclear distribution of the p65 and I κ B α mutants was due to 14-3-3, we analyzed the subcellular localization of endogenous p65 (Fig 5a) in control HEK-293T cells transfected with a dominant-negative form of 14-3-3 (DN-14-3-3) (Thorson et al., 1998) that blocks the interaction

FIG 3: I κ B α binds to 14-3-3 proteins irrespective of TNF α .

(a) Pull down experiment using GST-14-3-3 η and lysates from HEK-293T cells incubated with TNF α as indicated. Upper panel shows immunoblot with α -p65 and α -I κ B α antibodies. Ponceau staining of GST proteins is shown in lower panel. Inputs represent 1/10 of the lysates.
 (b) Immunoprecipitation with α -HA from HEK-293T cells control and transfected with HA-I κ B α ₃₂₋₃₆, treated for 60 min with TNF α . The presence of coprecipitated endogenous 14-3-3 and p65 was determined by western blot with α -14-3-3 γ /1 η or α -p65 antibodies.
 (c) Pull down assay with GST-14-3-3 η and cell lysates from HEK-293T cells untreated or treated with acid phosphatase for 30 min. The presence of I κ B α proteins in the precipitates was determined by immunoblot with α -I κ B α antibody. Ponceau staining of GST proteins is shown in lower panel. Inputs represent 1/10 of the lysates.
 (d) Pull down experiment using different GST-I κ B α constructs and lysates from HEK-293T cells transfected with myc-14-3-3 η . Upper panel shows immunoblot with α -myc antibody. Coomassie staining of GST proteins is shown in lower panel.
 (e and f) Pull down experiments using GST-14-3-3 η and lysates from HEK-293T cells transfected with the indicated Ha-I κ B α deletion mutants. Upper panel shows immunoblot with α -HA. Coomassie staining of GST proteins is shown in lower panel. Inputs represent 1/10 of the lysates. A schematic overview of the I κ B α protein is shown, indicating the putative 14-3-3 binding domain.



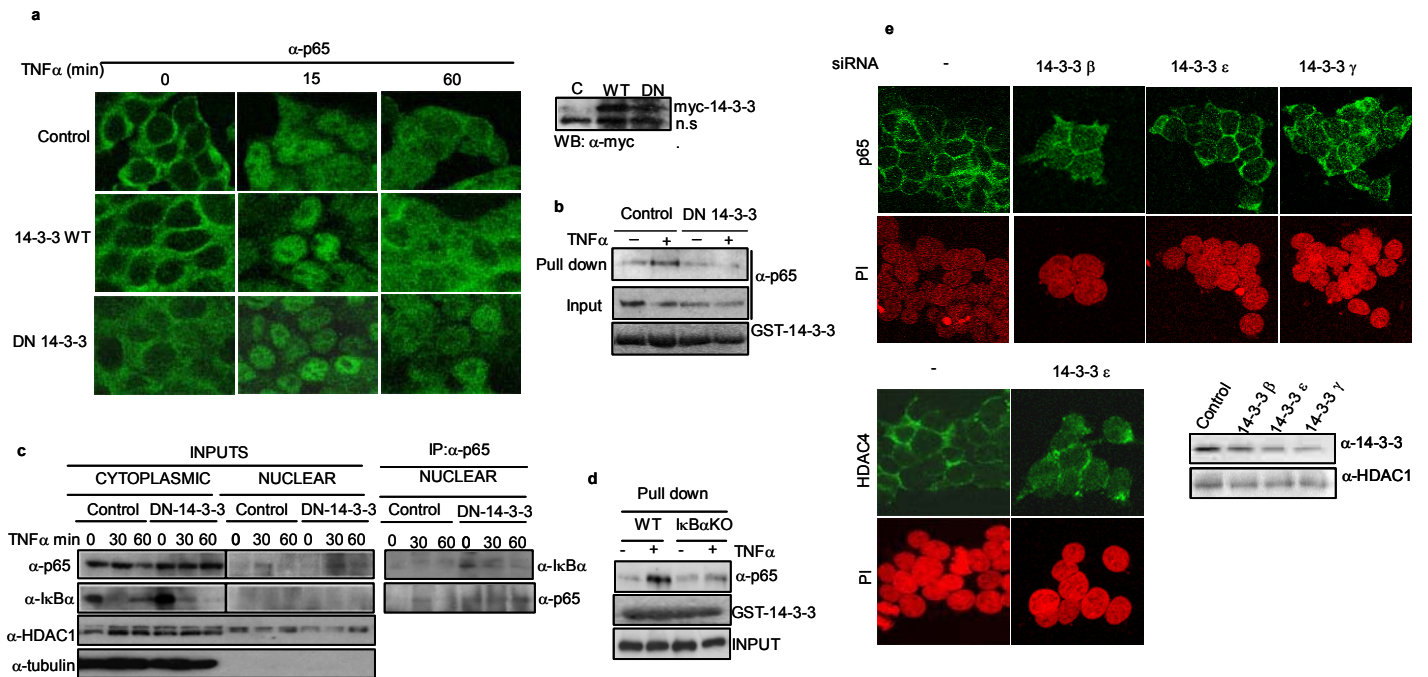


FIG 5: 14-3-3 activity is required to maintain p65 in the cytoplasm.

(a) Immunolocalization of endogenous p65 in HEK-293T cells transfected with the indicated 14-3-3 plasmids and incubated with TNF α for 15 and 60min as indicated. Representative confocal images are shown (630x). Western blot showing the levels of transfected wild type (WT) and DN-14-3-3 (DN) with α -myc antibody.

(b) Pull down experiment using GST-14-3-3 η and lysates from HEK-293T cells untransfected or transfected with DN-14-3-3 treated for 30 min with TNF α as indicated. Upper panels show immunoblot with α -p65. Inputs represent 1/10 of the lysates. Ponceau staining of GST proteins is shown in lower panel.

(c) Nuclear extracts from HEK-293T cells, untransfected or transfected with DN-14-3-3 and treated with TNF α at different time points, were precipitated with the α -p65 antibody. Coprecipitated I κ B α was detected by western blot with α -I κ B α antibody. Tubulin is shown as fractionation control and HDAC1 as loading control for nuclear extracts in the left panel. Inputs represent 1/10 of the lysates.

(d) Pull down experiment using GST-14-3-3 η and lysates from wild type or I κ B α knockout MEF cells untreated or treated for 30 min with TNF α as indicated. Upper panels show immunoblot with α -p65. Inputs represent 1/10 of the lysates. Ponceau staining of GST proteins is shown in lower panel.

(e) Subcellular localization of endogenous p65 in HEK-293T cells treated with siRNA against different 14-3-3 isoforms. Right panels show the nuclear entrance of HDAC4 in the 14-3-3- ϵ siRNA-treated cells as a control. Representative confocal images are shown (630x). PI was used for nuclear staining. Western blot assayed with α -pan-14-3-3 antibody recognizing 14-3-3 family members shows the levels of 14-3-3 in cell lysates from HEK-293T treated with the isoform-specific siRNA. HDAC1 is shown as loading control.

between p65 and 14-3-3 induced by TNF α (Fig 5b). Confocal microscopy showed that in unstimulated HEK-293T cells, DN-14-3-3 induces a partial redistribution of p65 into the nuclear compartment compared to the exclusively cytoplasmic p65 observed in the control or in cells transfected with wild type 14-3-3. After 15min of TNF α treatment nuclear entrance of p65 was observed in both control cells and cells expressing myc-14-3-3 constructs, as expected. Interestingly, expression of DN-14-3-3 significantly reduced the nuclear export of p65 after 60min of TNF α treatment (Fig 5a). By western blot (Fig 5a) and immunofluorescence (data not shown) with α -myc antibody, we confirmed that 80-90% of the cells expressed similar levels of the 14-3-3 constructs. Since I κ B α is mainly responsible for p65 nuclear export after TNF α activation, we reasoned that nuclear persistence of p65 in the DN-14-3-3 expressing cells in both non-stimulated and 60 min TNF α -treated cells might

be due to 1) the nuclear accumulation of I κ B α -p65 complexes or 2) the impairment of nuclear p65 to bind I κ B α . To investigate these possibilities we isolated nuclear extracts from HEK-293T cells expressing DN-14-3-3, precipitated endogenous p65 and checked for the presence of I κ B α in the precipitates. We demonstrated that nuclear extracts from DN-14-3-3 expressing cells contained increased levels of p65 bound to I κ B α compared to almost undetectable levels of this complex in untransfected cells (Fig 5c), suggesting that 14-3-3 activity is required for the efficient nuclear export of I κ B α -p65 complexes.

Further indicating that after TNF α treatment a ternary complex is formed, we did not detect TNF α -dependent interaction of p65 with GST-14-3-3 in I κ B α knockout cells (Fig 5d).

To confirm the requirement of 14-3-3 for regulating subcellular distribution of p65, we used specific siRNA to knockdown different 14-3-3 isoforms in HEK-293T cells. As shown in Fig 5e, treatment with siRNA against both 14-3-

3β and 14-3-3γ resulted in the nuclear retention of endogenous p65 compared to HEK-293T control cells and cells treated with the specific 14-3-3ε siRNA. Altogether, these results demonstrated that abrogation of specific 14-3-3 activities results in a general redistribution of p65 protein to the nucleus in both unstimulated cells and most interesting in response to TNFα activation.

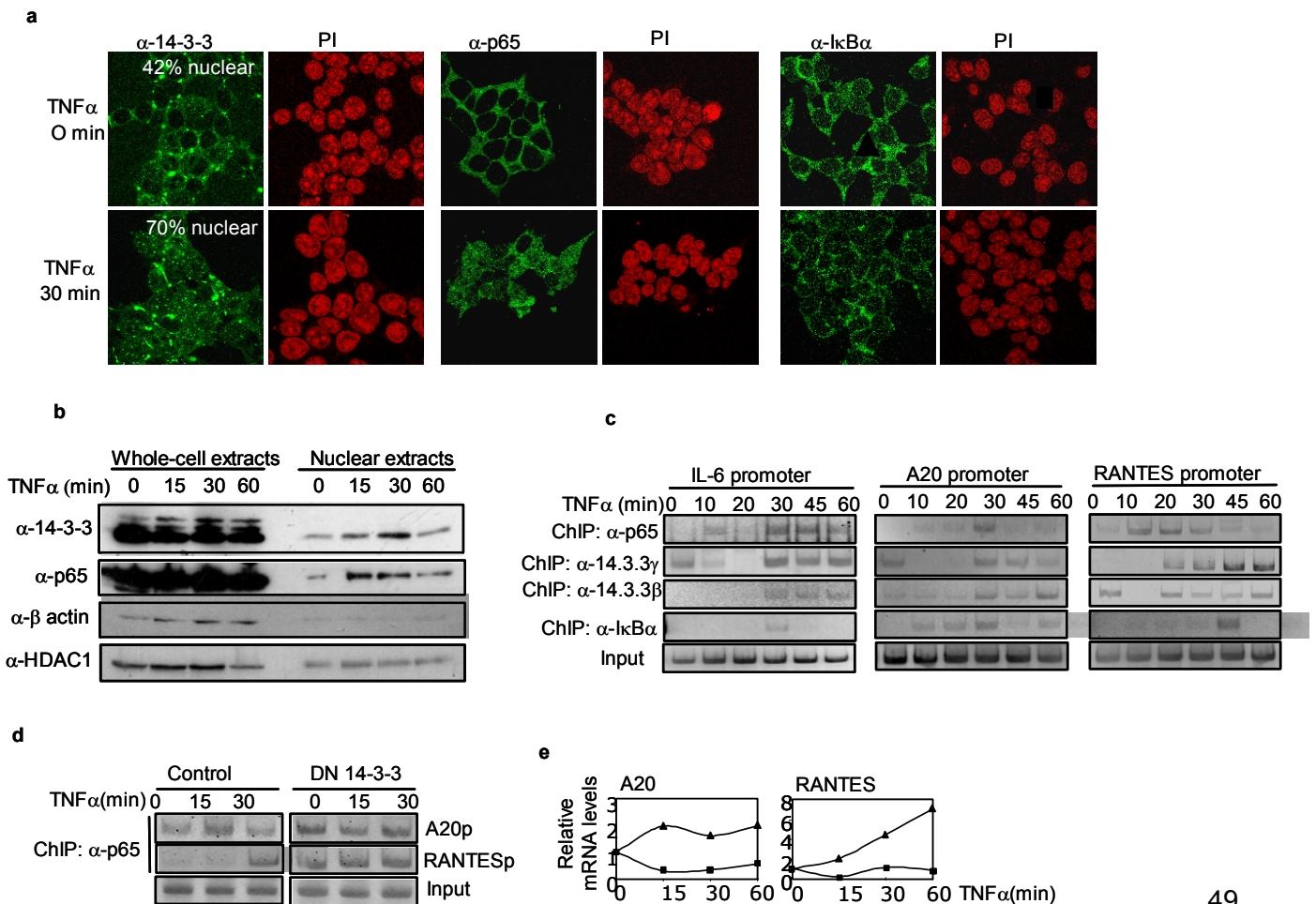
14-3-3 are recruited to the chromatin and modulate NFκB-dependent transcription.

Since 14-3-3 can enter the nucleus to bind specific partners (Brunet et al., 2002; Miska et al., 2001; Wakui et al., 1997) and after TNFα treatment p65 is mainly nuclear, we tested whether the subcellular distribution of 14-3-3 proteins was modulated by TNFα. Immunodetection of endogenous 14-3-3 with an antibody recognizing different isoforms demonstrated that 30min of TNFα treatment induces a partial redistribution of these proteins from a predominantly cytoplasmic localization into a combined cytoplasmic plus nuclear pattern (Fig 6a). Nuclear entrance of 14-3-3 was confirmed by western blot analysis with nuclear extracts from HEK-293T cells treated with TNFα at different time points (Fig 6b). Our results demonstrated that nuclear levels of 14-3-3 gradually increased following TNFα treatment and reached a maximum at 30 min. Interestingly, nuclear accumulation of 14-3-3 seemed delayed compared to p65 nuclear entrance and both nuclear p65 and 14-3-3 levels decreased after 60min of chronic TNFα treatment

Recruitment of 14-3-3ε proteins to the chromatin has been shown to occur in both cIAP-2 and IL-8 promoters in response to laminin attachment resulting in the release of chromatin-associated SMRT and facilitating gene activation (Hoberg et al., 2004). We

FIG 6: 14-3-3 proteins associate with the chromatin in response to TNFα to modulate NFκB-dependent transcription.

(a) Subcellular localization of endogenous 14-3-3 (left panels), p65 (middle panels) and IκBα (right panels) in control or 30min TNFα-treated HEK-293T cells. PI was used for nuclear staining. Slides from three independent experiments were counted on the BX-60 microscope and the percentage of cells displaying nuclear 14-3-3 is indicated. Representative confocal images are shown (630x).
 (b) Western blot with the indicated antibodies of total cell lysates (left) and nuclei (right) from HEK-293T cells incubated with TNFα at different time points. Absence of β-actin in the nuclear extracts is shown as a fractionation control whereas HDAC1 is a nuclear loading control.
 (c) Chromatin from TNFα-treated NIH-3T3 cells was immunoprecipitated with α-14-3-3β and γ, α-p65 and α-IκBα antibodies. The presence of the indicated NFκB target promoters in the precipitates was determined by PCR.
 (d) Chromatin from HEK-293T cells untransfected or transfected with DN14-3-3 and treated with TNFα at different time points, was immunoprecipitated with the α-p65 antibody. The presence of the indicated NFκB target promoters in the precipitates was determined by PCR.
 (e) Semiquantitative RT-PCR to determine the transcriptional activity of the indicated NFκB target genes in HEK-293T cells untransfected (triangle) or transfected with DN-14-3-3 (round) treated with TNFα at the indicated time points. Graphs represent the relative amounts of mRNA levels, as measured by densitometric analysis, from one of two equivalent experiments.



speculated that 14-3-3 could also interact with the chromatin to facilitate the release of chromatin-bound p65 from specific genes, thus participating in the termination of TNF α signaling. Chromatin precipitation from NIH-3T3 cells demonstrated that 14-3-3 β , 14-3-3 γ and I κ B α associated with the IL-6, A20 and RANTES promoters in response to TNF α with a kinetics that is slightly delayed compared to p65 recruitment (Fig 6c). In contrast, in HEK-293T cells transfected with DN-14-3-3, p65 was constitutively associated to the NF κ B-target promoters in the absence or presence of TNF α (Fig 6d), suggesting that 14-3-3 play a role in regulating the specific interaction of p65 with the chromatin. To test whether 14-3-3 modulate the transcriptional activity of NF κ B, we performed semiquantitative RT-PCR of different NF κ B targets from HEK-293T cells transfected with DN-14-3-3. We detected an increased basal transcriptional activity from A20 and RANTES genes that correlated with the higher association of p65 to the chromatin in unstimulated conditions (Fig 6d). However, DN-14-3-3 expressing cells became unresponsive to TNF α -dependent transcriptional activation (Fig 6e).

Altogether, our results fit in a model in which 14-3-3 cooperate with I κ B α in the release of p65 from the chromatin of specific promoters and participate in the subsequent nuclear export of I κ B α -p65 complexes after TNF α treatment.

DISCUSSION

14-3-3 regulate the subcellular distribution of many proteins that are crucial in both cell cycle control and cell signaling (reviewed in (Tzivion et al., 2001)). In this study, we show that 14-3-3 binds to both p65 and I κ B α , facilitates the nuclear export of I κ B α -p65 complexes and are required for the appropriate regulation of NF κ B activity.

Part of the complexity of NF κ B resides in the regulation of its nucleo-cytoplasmic shuttling. Although it is clearly established that I κ B α is mainly responsible for sequestering NF κ B in the cytoplasm, it also participates in the nuclear export of NF κ B complexes not only after TNF α stimulation but also in basal conditions to ensure the NF κ B-target gene silencing (Huang and Miyamoto, 2001). Nevertheless, it has been recently reported that in the absence of the three classical I κ B family members, p65 remains localized in the cytoplasm (Tergaonkar et al., 2005). Although p100 and p105 are overexpressed and interact with p65 in these cells, other proteins such as 14-3-3 could also play a role (Moorthy and Ghosh, 2003; Prigent et al., 2000; Tergaonkar et al., 2005). We have characterized two functional 14-3-3 binding consensus including AA38-44 and AA278-283

of p65 that are highly conserved from *Drosophila* to human.

We also demonstrate that I κ B α interacts with 14-3-3 independent of TNF α stimulation. By pull down assay we characterize a unique functional 14-3-3 binding site in the I κ B α protein involving AA60-65, close to its nuclear export signal (NES). Interestingly, it has been proposed that 14-3-3 might facilitate subcellular redistribution by masking-unmasking the nuclear localization signal (NLS) or NES of their substrates (Muslin and Xing, 2000). By comparative sequence analysis we show that S63, located in the core of this 14-3-3 binding domain, is exclusively found in the human I κ B α protein but not in closely related species such as mouse or swine consistent with the finding that phosphorylation is not required for I κ B α to bind 14-3-3.

Although many efforts have been made to identify proteins that interact with the NF κ B pathway after TNF α treatment, the direct association between p65 and I κ B α with 14-3-3 had not previously been detected (Bouwmeester et al., 2004).

It has been described that formation of heterodimers between different 14-3-3 isoforms may allow the interaction between signaling proteins that do not directly associate (Jones et al., 1995). Although this is not the case for p65 and I κ B α our results suggest that after TNF α treatment, phosphorylated nuclear p65 binds to I κ B α and 14-3-3 leading to the formation of a ternary complex that is more efficiently exported from the nucleus. Involvement of 14-3-3 proteins in the export of nuclear factors has been extensively reported mainly associated with cell differentiation, cell cycle and apoptosis (Brunet et al., 2002; Lopez-Girona et al., 1999; Yoshida et al., 2005) and both altered expression of 14-3-3 and aberrant activation of NF κ B have been directly implicated in cancer development (reviewed in (Garg and Aggarwal, 2002; Hermeking, 2003)). More specifically, 14-3-3 σ is considered a tumor suppressor gene in breast carcinomas by promoting the nuclear export of cdc25 thus leading to cell cycle arrest (Urano et al., 2002). However abrogation of NF κ B activity is sufficient to inhibit cell proliferation and to induce cell death in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells (Tanaka et al., 2006). Considering our results, it is tempting to speculate that aberrant NF κ B activation may result from deficiency of 14-3-3 in breast cancer. To address this question we are currently investigating the precise role of specific 14-3-3 isoforms in regulating the NF κ B pathway in cancer cells.

In summary, we have demonstrated that 14-3-3 are required for regulating the appropriate subcellular distribution of p65 and that abrogation of 14-3-3 activity by DN-14-3-3 or

specific siRNA induces the accumulation of p65-I κ B α complexes in the nucleus and the constitutive binding of p65 to the chromatin. Since efficient nuclear export of p65-I κ B α complexes is required for reestablishing the permissive conditions for NF κ B to be rapidly activated in response to specific stimuli (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Huang and Miyamoto, 2001), abrogation of 14-3-3 function results in a deficiency in NF κ B-target gene activation after TNF α treatment

REFERENCES

- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L. and Dargemont, C.** (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* **110**, 369-78.
- Baldwin, A. S., Jr.** (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-83.
- Benton, R., Palacios, I. M. and St Johnston, D.** (2002). Drosophila 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation. *Dev Cell* **3**, 659-71.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S. et al.** (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 97-105.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B.** (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**, 817-28.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F. and Karin, M.** (1995). Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **15**, 1302-11.
- Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Aguilera, C. and Bigas, A.** (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem* **278**, 32227-35.
- Fu, H., Subramanian, R. R. and Masters, S. C.** (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 617-47.
- Garg, A. and Aggarwal, B. B.** (2002). Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* **16**, 1053-68.
- Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L.** (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7835-40.
- Hermeking, H.** (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* **3**, 931-43.
- Hoberg, J. E., Yeung, F. and Mayo, M. W.** (2004). SMRT derepression by the I kappa B kinase alpha: a prerequisite to NF-kappa B transcription and survival. *Mol Cell* **16**, 245-55.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., Zhu, L. and Hsueh, A. J.** (1997). Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Mol Endocrinol* **11**, 1858-67.
- Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M. and Miyamoto, S.** (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I kappa B alpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappa B/I kappa B alpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1014-9.
- Huang, T. T. and Miyamoto, S.** (2001). Postrepression activation of NF-kappa B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I kappa B alpha. *Mol Cell Biol* **21**, 4737-47.
- Johnson, C., Van Antwerp, D. and Hope, T. J.** (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I kappa B alpha. *EMBO Journal* **18**, 6682-93.
- Jones, D. H., Ley, S. and Aitken, A.** (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* **368**, 55-8.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. and Russell, P.** (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172-5.
- Miska, E. A., Langley, E., Wolf, D., Karlsson, C., Pines, J. and Kouzarides, T.** (2001). Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation. *Nucleic Acids Res* **29**, 3439-47.
- Moorthy, A. K. and Ghosh, G.** (2003). p105.I kappa B gamma and prototypical I kappa Bs use a similar mechanism to bind but a different mechanism to regulate the subcellular localization of NF-kappa B. *J Biol Chem* **278**, 556-66.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-97.
- Muslin, A. J. and Xing, H.** (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* **12**, 703-9.
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y.** (2003). 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* **278**, 2058-65.
- Prigent, M., Barlat, I., Langen, H. and Dargemont, C.** (2000). I kappa B alpha and I kappa B alpha /NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *J Biol Chem* **275**, 36441-9.
- Tam, W. F. and Sen, R.** (2001). I kappa B family members function by different mechanisms. *J Biol Chem* **276**, 7701-4.
- Tanaka, A., Muto, S., Konno, M., Itai, A. and Matsuda, H.** (2006). A new I kappa B kinase beta inhibitor prevents human breast cancer progression through negative regulation of cell cycle transition. *Cancer Research* **66**, 419-26.
- Tergaonkar, V., Correa, R. G., Ikawa, M. and Verma, I. M.** (2005). Distinct roles of I kappa B proteins in regulating constitutive NF-kappa B activity. *Nat Cell Biol* **7**, 921-3.
- Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnicka-Worms, H. and Shaw, A. S.** (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1

phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol* **18**, 5229-38.

Tzivion, G., Shen, Y. H. and Zhu, J. (2001). 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* **20**, 6331-8.

Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y. and Inoue, S. (2002). Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* **417**, 871-5.

Wakui, H., Wright, A. P., Gustafsson, J. and Zilliacus, J. (1997). Interaction of the ligand-activated glucocorticoid receptor with the 14-3-3 eta protein. *J Biol Chem* **272**, 8153-6.

Waterman, M. J., Stavridi, E. S., Waterman, J. L. and Halazonetis, T. D. (1998). ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**, 175-8.

Yaffe, M. B. (2002). How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* **513**, 53-7.

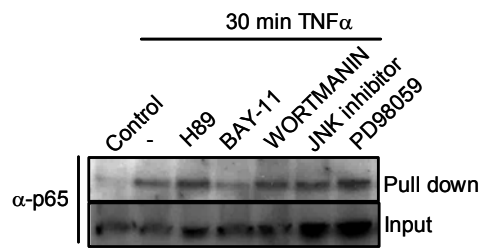
Yoshida, K., Yamaguchi, T., Natsume, T., Kufe, D. and Miki, Y. (2005). JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in

Aguilera et al.
the apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **7**, 278-85.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge M. Karin, A.S. Shaw, W. Greene for kindly providing plasmids, A. Hoffmann for the I κ B α MEFs and Serveis Científico-Tècnics, UB-Bellvitge for confocal microscopy technical support. We thank Veronica Barceló for technical assistance, Claudia Orelio and the members of the lab for helpful discussions. LE is an investigator from the Carlos III program. CA is a recipient of a MEyC pre-doctoral fellowship (BES-2002-0028), VFM is a recipient of a DURSI pre-doctoral fellowship (2005FI00458). This work was supported by ISCIII/02/3027 and PI041890 grants from Instituto de Salud Carlos III, and from the Fundació La Marató TV3 (Grant 030730).

Supplemental Figure S1: Pull down experiment using GST-14-3-3 η and lysates from untransfected HEK-293T cells incubated with the indicated inhibitors for 2 hours plus 30min TNF α . Upper panel shows immunoblot with α -p65. H89 and Wortmanin were used at 1mM and PD98059 was used at 50mM



Annex I:

De: Sue Chamberlain [mailto:sue@biologists.com]
Enviado el: jue 4/6/2006 3:47
Para: abigas@iro.es
Asunto: JCS 16536

Re: JCS 16536 - Efficient nuclear export of p65-IB complexes requires 14-3-3.

Dear Dr Bigas,

Thank you for submitting your paper "Efficient nuclear export of p65-IB complexes requires 14-3-3. " to the Journal of Cell Science. The referees reports are enclosed. As you will see they like the paper but make some suggestions for improvement. If you were able submit a revised version which takes into account the points raised it would be sent back for re-review.

If you choose to make the revisions suggested, please submit your revised manuscript to the ESPERE system as a New Submission but be sure to state in your covering letter that it is a revised manuscript and include your manuscript number.

The letter should be prepared as a separate PDF file and uploaded using the Covering Message File upload button provided. Please remember, your covering letter should also include your point-by-point response to the reviewers comments.

In order to promote timely publication, we require that the revision be completed within three months from the date of this letter. Manuscripts received after that time will be considered as new submissions.

We look forward to receiving the revised manuscript.

Yours sincerely,

Sue Chamberlain

For John Heath - Editor, Journal of Cell Science

3.2. Capítol II:

Recruitment of I κ B α to the *hes1* promoter is associated with transcriptional repression

En aquest article es demostra com l'inhibidor de la via d'NF κ B, I κ B α , juga un paper nuclear associant-se a la cromatina de gens diana de Notch com *hes1* i *herp2*, sent aquest un nou element en els mecanismes d'interrelació entre la via de Notch i la d'NF κ B. Proposem que I κ B α participa en la repressió transcripcional reclutant elements corepressors a promotors específics.

En l'article es mostra com I κ B α interacciona amb elements repressors com corepressors nuclears i HDACs. Per immunoprecipitacions de cromatina es demostra que I κ B α es recluta al promotor de *hes1* juntament amb HDAC1 i HDAC5. I κ B α s'allibera temporalment del promotor de *hes1* quant es tracten les cèl.lules amb TNF α , aquest fet correlaciona amb un increment en l'acetilació de les histones i l'activitat transcripcional del gen. L'alliberament d'I κ B α de *hes1* i la seva activació transcripcional coincideix amb el reclutament d'IKK α i d'IKK β a aquest promotor. A més a més, tant l'alliberament d'I κ B α de *hes1* com l'increment d'acetilació de les histones induït per TNF α estan afectats en els fibroblastes deficients per IKK α .

Recruitment of I κ B α to the *hes1* promoter is associated with transcriptional repression

Cristina Aguilera*, Ruben Hoya-Arias[†], Guy Haegeman[†], Lluís Espinosa^{**}, and Anna Bigas^{**§}

*Centre Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge–Institut de Recerca Oncològica, Barcelona 08907, Spain; and [†]Laboratory of Eukaryotic Gene Expression and Signal Transduction, Molecular Biology Department, Ghent University, Ghent 9000, Belgium

Edited by Mark T. Groudine, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, and approved October 11, 2004 (received for review June 21, 2004)

The NF- κ B pathway plays a pivotal role in proliferation, differentiation, apoptosis, and immune responses in mammals. The NF- κ B inhibitor, I κ B, has classically been characterized for its ability to sequester NF- κ B transcription factors in the cytoplasm. Nevertheless, a nuclear fraction of I κ B α has consistently been detected and associated with repression of nuclear NF- κ B. Now we show that I κ B α physically associates with different repression elements such as nuclear corepressors and histone acetyltransferases and deacetylases (HDACs). More remarkably, chromatin immunoprecipitation experiments demonstrate that I κ B α is recruited to the promoter regions of the Notch-target gene, *hes1*, together with HDAC1 and -5, whereas we did not detect I κ B α associated with classical NF- κ B target genes such as *IL6* and *RANTES*. TNF- α treatment results in a temporary release of I κ B α from the *hes1* promoter that correlates with increased histone acetylation and transcriptional activation. In addition, we demonstrate that both I κ B kinase- α and - β are simultaneously recruited to the *hes1* promoter in response to TNF- α , coinciding with a maximum of I κ B α release and gene activation. Moreover, TNF- α -dependent histone H3 acetylation, release of I κ B α from the *hes1* promoter, and *hes1* mRNA synthesis are affected in IKK- α ^{-/-} mouse embryonic fibroblasts. We propose that I κ B α plays a previously undescribed role in regulating the recruitment of repression elements to specific promoters. Recruitment of IKKs to the nucleus in response to TNF- α may induce chromatin-associated I κ B α release and gene activation. These findings provide additional insight in the cross-talk between NF- κ B and other signaling pathways.

I κ B kinase | NF- κ B | chromatin | TNF- α

The role of histone acetyltransferases and deacetylases (HDACs) in the control of individual gene expression has clearly been established. A diversity of complexes containing different combinations of corepressors and HDACs mediate specific gene silencing, thus playing critical roles in the regulation of biological processes, including cell proliferation, development, and tissue homeostasis (1–3). Nuclear corepressor (N-CoR) and silence mediator of retinoic acid and thyroid hormone (SMRT) are components of these multiprotein repression complexes and interact with other repression elements such as mSin3, Sharp (4), or different HDACs class I (5, 6) and class II (7). In addition, they also associate with several transcription factors (7, 8), including nuclear hormone receptors (9), MyoD (10), p65-NF- κ B (11), or RBP-J κ (12), which are thought to drive the repression complexes to specific gene promoters.

The I κ B proteins are classically considered as the specific inhibitors of the NF- κ B transcription factors (13). In the canonical NF- κ B pathway, the NF- κ B inhibitor I κ B binds to different NF- κ B homo- or heterodimers, thus masking their nuclear localization sequences and causing their cytoplasmic retention. Multiple NF- κ B stimuli, including TNF- α , activate the I κ B kinase complex that in turn binds and phosphorylates cytoplasmic I κ B, leading to its proteasomal degradation (14, 15). This allows the NF- κ B transcription factors to translocate into the nucleus and activate gene transcription (reviewed in refs. 15 and 16). Nevertheless, several reports have demonstrated that I κ B α

can also shuttle between the nucleus and the cytoplasm (17, 18), thus adding further complexity to the system. Although nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α is important for regulating NF- κ B signaling termination (19, 20), its physiological relevance is not completely understood, thus pointing to the possibility that I κ B α can play additional nuclear functions (21). Recently, a new nuclear function for I κ B kinase (IKK- α) in phosphorylating histone H3 has been reported. IKK- α is specifically recruited to the chromatin of NF- κ B-dependent promoters in response to TNF- α and participates in the activation of these genes. Nevertheless, not only IKK- α , but also IKK- β , is recruited to the chromatin, and they are both required for the appropriate transcriptional activation of NF- κ B targets (22, 23).

We have shown that p65-NF- κ B and I κ B α participate in the regulation of the Notch-target gene, *hes1*, which is not a classical NF- κ B target gene (11, 24), by modifying subcellular distribution of repression elements such as N-CoR. Besides, recent work showed the association of cytoplasmic I κ B α with HDACs class I (25). Now, we present evidence that I κ B α regulates transcription through its recruitment to the DNA regulatory regions of *hes1* together with HDAC1 and -5. Release of I κ B α in response to TNF- α is associated with acetylation of the *hes1* promoter and increased transcriptional activation of the gene. In addition, IKK- α and - β are recruited to the *hes1* promoter in response to TNF- α and release of *hes1*-associated I κ B α together with TNF- α -dependent *hes1* activation is affected in IKK- α -deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Surprisingly, this regulatory mechanism is not operating on two classical NF- κ B-dependent genes such as *IL-6* and *RANTES*.

Materials and Methods

Plasmids. Expression vectors for pCMV-HA-I κ B α _{32–36}, myc-SMRTc, flag-N-CoR, flag-HDAC4, flag-HDAC5, flag-HDAC1, and flag-HDAC2 have been described (8, 26–28). Myc-N-CoRc and GFP-N-CoR details are available upon request.

Antibodies. α -I κ B α (sc-1643 and sc-371), α -HDAC5 (sc-11419), α -p65 (sc-109), α -HDAC1 (sc-7872), and α -IKK- β (sc-7330) were from Santa Cruz Biotechnology; α -Flag (clone M2) and α - β -actin were from Sigma; α -hemagglutinin (HA) was from Babco (Richmond, CA); α -SMRTc (06-891), α -I κ B α (06-494), and α -acetyl-histone-H3 (06-599) were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY); and α -IKK- α was from Oncogene (OP133). Irrelevant immunoglobulins from mouse, rabbit, and goat were from Sigma.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: HDAC, histone acetyltransferase and deacetylase; N-CoR, nuclear corepressor; SMRT, silence mediator of retinoic acid and thyroid hormone; MEF, mouse embryonic fibroblast; IP, immunoprecipitation; ChIP, chromatin IP; I κ B, NF- κ B inhibitor; HA, hemagglutinin; IKK, I κ B kinase.

[†]L.E. and A.B. contributed equally to this work.

[§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: abigas@iro.es.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

Cell Culture and Transfection. 3T3, 293T, L929sA, $I\kappa B\alpha^{-/-}$, WT MEF, $IKK-\alpha^{-/-}$, and $IKK-\beta^{-/-}$ MEF were cultured in DMEM and 10% FBS. Cells were plated at subconfluence and transfected with Lipofectamine Reagent (Invitrogen). Murine and human $TNF-\alpha$ were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ) and Upstate Biotechnology and were used at 25–40 ng/ml, respectively.

Coimmunoprecipitation Assays. Cells were lysed for 30 min at 4°C in 500 μ l of immunoprecipitation (IP) buffer containing 0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 100 μ M Na-orthovanadate, 0.25 mM PMSF, and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics) in PBS. After centrifugation, supernatants were incubated for 3 h at 4°C with 1 μ g of the indicated antibody coupled to Protein A-Sepharose beads.

Immunofluorescence. 3T3, 293T, and $I\kappa B\alpha^{-/-}$ MEF or $I\kappa B\alpha$ WT MEF were seeded on slides and transfected with the different plasmids. After 48 h, cells were fixed in 3% paraformaldehyde and permeabilized in 0.3% Triton X-100/10% FBS/5% nonfat dry milk in PBS and incubated with the primary and secondary antibodies. Slides were visualized in an Olympus BX-60 (Melville, NY) microscope or in a Leica (Deerfield, IL) TCS-NT laser-scanning confocal microscope with the $\times 63$ Leitz Plan-Apo objective (numerical aperture, 1.4).

Northern Blot Analysis. Total RNA was extracted by using the TRIzol Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Hybridization was analyzed in a PhosphorImager (Molecular Imager FX, Bio-Rad), and RNA levels were quantified with QUANTITY ONE software (Bio-Rad). To evaluate the statistical significance, the area under the curve (AUC) was calculated for the increase from baseline between 0 and 60 min ($AUC_{0-60min}$) by using the standard trapezoidal method.

Chromatin IP (ChIP) Assay. Chromatin from crosslinked cells was sonicated, incubated with primary antibodies in RIPA buffer, and precipitated with protein G/A-Sepharose. Crosslinkage of DNA-protein complexes was reversed, and DNA was used as a template for PCR. For second ChIP experiments, complexes from the first ChIP were eluted by incubation in 25 μ l of 10 mM DTT for 30 min at 37°C. After centrifugation, the supernatant was diluted with RIPA buffer and subjected to the ChIP procedure. PCR primers are available upon request.

Results

We previously described (11, 24) that p65 and $I\kappa B\alpha$ can interact with the nuclear corepressor SMRT, thus modulating the transcriptional activation of NF- κ B-independent promoters, and we hypothesized that $I\kappa B\alpha$ together with p65 could play a direct role in transcriptional repression. Coprecipitation experiments demonstrated that the nondegradable $I\kappa B\alpha_{32-36}$ mutant (29) physically interacts with N-CoRs (myc-N-CoR and myc-SMRT) (Fig. 1a), HDACs class I (flag-HDAC1 and -2) [as recently reported (25)] and HDACs class II (flag-HDAC4 and -5) (Fig. 1b). As a control, we did not detect $I\kappa B\alpha_{32-36}$ in the precipitates from other myc-tagged proteins such as dishevelled1 (dvl1) or the nuclear form of Notch1 (N1-IC) (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). We next investigated whether these interactions occur under physiological conditions. Using 293T cell extracts, we demonstrated that endogenous $I\kappa B\alpha$ coprecipitates with α -SMRT (Fig. 1c) and α -HDAC1 and -5 antibodies, whereas no $I\kappa B\alpha$ was detected in the precipitates with nonrelevant IgG (Fig. 1d) or with α -p300 (Fig. 7). Moreover, by pull-down and coprecipitation experiments, we determined that N-CoRs and HDACs bind to different $I\kappa B\alpha$ regions (AA151-179 for N-CoRs and AA180-317 HDACs), thus suggesting that both proteins directly bind to

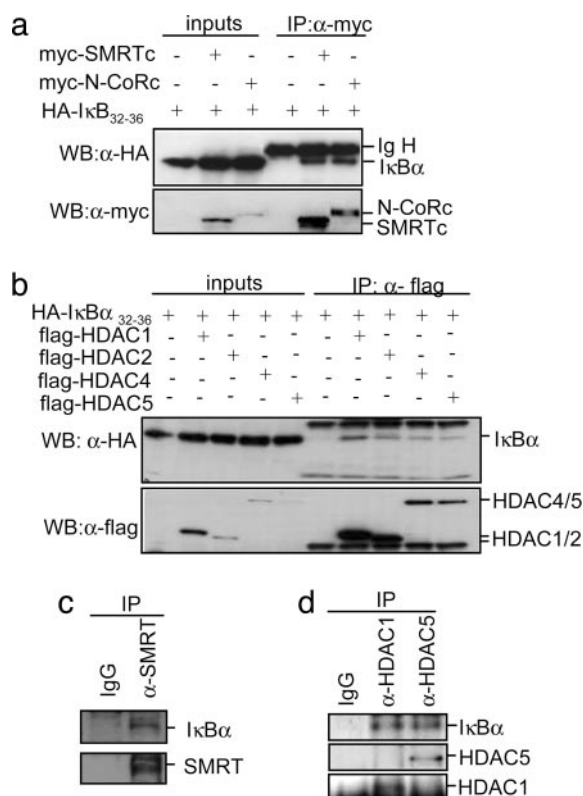


Fig. 1. $I\kappa B\alpha$ binds to multiple repressor proteins including N-CoRs and HDACs. (a) Whole-cell lysates from 293T cotransfected with the indicated plasmids were immunoprecipitated with the α -myc followed by immunoblotting with α -HA; 1/50 of the input is shown. (Lower) Immunoblotting with α -myc to detect N-CoR and SMRT. (b) Lysates from 293T cells transfected with HA- $I\kappa B\alpha$ alone or cotransfected with flag-HDAC4, -5, -1, or -2 were immunoprecipitated with α -flag. Coprecipitated $I\kappa B\alpha$ was detected with α -HA; 1/50 of the input is shown (Left). Western blot with the α -flag is shown as a control for precipitation. (c) 293T cell lysates were precipitated with control IgG or α -SMRTe. (Upper) Coprecipitated $I\kappa B\alpha$. (d) Endogenous HDAC1 and -5 were precipitated from 293T cells with specific antibodies. (Upper) Coprecipitated $I\kappa B\alpha$ was detected with the α - $I\kappa B\alpha$ by Western blot.

$I\kappa B\alpha$ (see Supporting Text, which is published as supporting information on the PNAS web site, and Fig. 7).

To address whether these interactions were taking place in the nucleus or in the cytoplasm, we determined the subcellular distribution of $I\kappa B\alpha$ and the different repression elements. Consistent with previous reports (17), confocal microscopy revealed that endogenous $I\kappa B\alpha$ is mainly distributed in the cytoplasm, although the presence of a nuclear fraction displaying a punctuate pattern was consistently detected. Because the different repression elements displayed a predominantly homogeneous nuclear distribution (data not shown), colocalization experiments of the endogenous proteins were not informative. Taking advantage of the fact that coexpression of ectopic HDAC5 with N-CoR induced relocation of both repression elements into nuclear speckles, we now performed colocalization experiments in these conditions. We detected endogenous $I\kappa B\alpha$ colocalizing with some, but not all, N-CoR/HDAC5-containing nuclear speckles (Fig. 2a), suggesting that $I\kappa B\alpha$ might be a component of specific repression complexes. Because different cytokines such as $TNF-\alpha$ lead to $I\kappa B$ phosphorylation and subsequent degradation (14), we tested whether $I\kappa B$ was involved in regulating repression complexes by incubating the N-CoR/HDAC5-transfected cells with $TNF-\alpha$ for 30 min. We observed a 30–40% reduction in the number of cells displaying

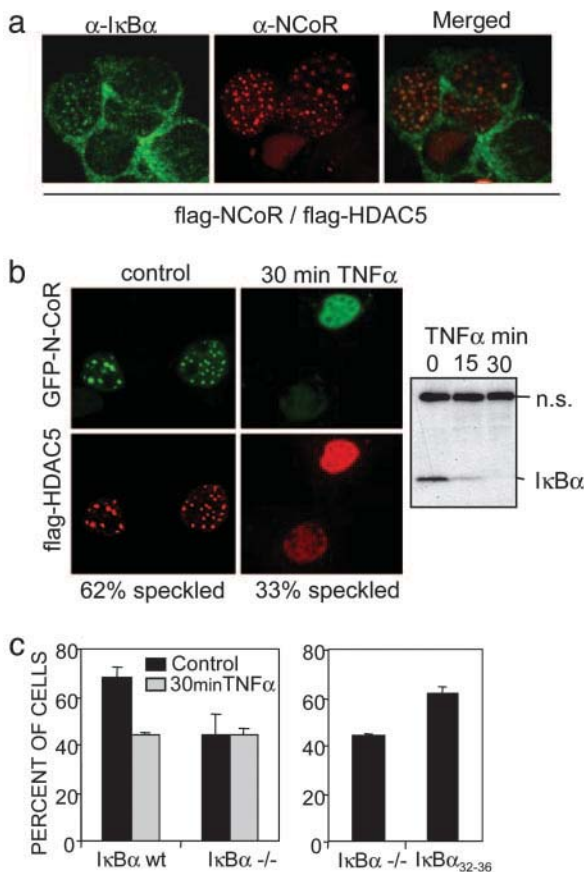


Fig. 2. Endogenous $I\kappa B\alpha$ colocalizes with N-CoR/HDAC5 nuclear speckles. (a) Colocalization of endogenous $I\kappa B\alpha$ with ectopic N-CoR/HDAC5-containing nuclear speckles [confocal image ($\times 630$)]. (b) Subcellular localization of GFP-N-CoR and flag-HDAC5 in cotransfected 293T cells before (Left) and after 30 min of TNF- α treatment (Right). A minimum of 200 cells were counted for each condition in an Olympus BX-60 microscope [confocal image ($\times 630$)]. The α - $I\kappa B\alpha$ immunoblot shows TNF- α -induced $I\kappa B\alpha$ degradation. (c) Percentage of cells displaying N-CoR/HDAC5 speckles in $I\kappa B\alpha^{+/+}$ and $I\kappa B\alpha^{-/-}$ MEFs cotransfected with GFP-N-CoR and flag-HDAC5 in the control or after 30 min of TNF- α treatment (Left) or in the $I\kappa B\alpha^{-/-}$ MEFs transiently transfected with $I\kappa B\alpha_{32-36}$ (Right). A minimum of 200 cells were counted for each condition in an Olympus BX-60 microscope.

N-CoR/HDAC5-containing speckles in these conditions (Fig. 2b). A similar reduction in the number of nuclear speckles was observed when N-CoR and HDAC5 were transfected into $I\kappa B\alpha^{-/-}$ MEF. Moreover, these complexes were not responsive to TNF- α treatment (Fig. 2c). When $I\kappa B\alpha^{-/-}$ MEF were reconstituted with $I\kappa B\alpha_{32-36}$, the number of cells displaying the nuclear speckles increased up to 65%, similar to that observed in the $I\kappa B\alpha$ WT MEF (Fig. 2c). Nevertheless, chronic TNF- α treatment plays a double role in regulating the levels of $I\kappa B\alpha$; first, triggering its degradation and next, activating its synthesis to terminate NF- κB signaling (30). Consistent with this, we observed that N-CoR/HDAC5-containing speckles increased after 2 h of TNF- α treatment (data not shown), coinciding with the increase in the levels of $I\kappa B\alpha$ protein. Together, these observations strongly suggested a role for $I\kappa B\alpha$ in the formation or stabilization of specific repression complexes.

Because we previously reported that $I\kappa B\alpha$ modulates the expression of different Notch-target genes such as *hes1* (11), we now hypothesized that the $I\kappa B\alpha$ fraction that interacts with repressor elements was directly responsible for *hes1* repression. To test this, we performed ChIP assays to investigate whether $I\kappa B\alpha$ protein was recruited to the promoter region of this gene.

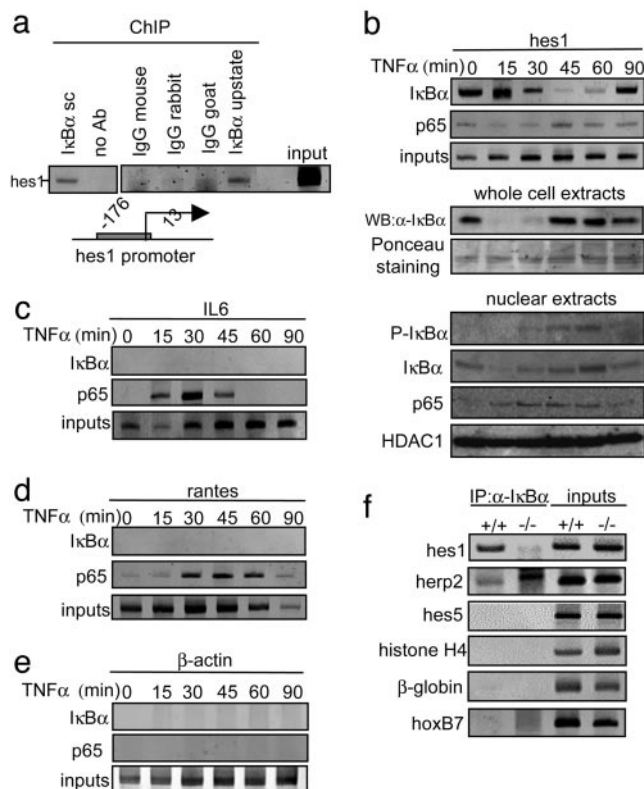


Fig. 3. $I\kappa B\alpha$ is recruited to the *hes1* gene regulatory sequences. (a) Chromatin obtained from 3T3 cells was immunoprecipitated with two different α - $I\kappa B\alpha$ antibodies (Santa Cruz sc-1643 and Upstate Biotechnology 06-494) or different irrelevant immunoglobulins. Recruitment of $I\kappa B\alpha$ to the *hes1* promoter was analyzed by PCR. (b) Effect of TNF- α treatment in the recruitment of $I\kappa B\alpha$ and p65 to the *hes1* promoter was analyzed by ChIP assay followed by PCR (Top). Western blot analysis showing the kinetics of total $I\kappa B\alpha$ levels after TNF- α treatment and Ponceau staining as a loading control (Middle). Western blot showing the levels of nuclear $I\kappa B\alpha$ or phospho- $I\kappa B\alpha$ after TNF- α treatment. Nuclear levels of p65 and HDAC1 are shown as a control (Bottom). (c–e) Recruitment of $I\kappa B\alpha$ and p65 to the *IL6* (c), *RANTES* (d), and β -actin (e) promoters was determined by ChIP assay followed by PCR analysis. All results are representative of at least two independent ChIP experiments. (f) Recruitment of $I\kappa B\alpha$ to the indicated promoters analyzed by ChIP assay from $I\kappa B\alpha^{+/+}$ and $I\kappa B\alpha^{-/-}$ MEF.

We consistently detected the *hes1* promoter from chromatin precipitated with two different α - $I\kappa B\alpha$ antibodies (Fig. 3a), thus indicating that this promoter is indeed occupied by $I\kappa B\alpha$. As a control, we could not amplify *hes1* from precipitates with different nonrelevant immunoglobulins (Fig. 3a). We next investigated whether the recruitment of $I\kappa B\alpha$ to the *hes1* promoter was fine-tuned in response to TNF- α . For these studies, we performed ChIP assays from 3T3 cells treated with TNF- α at various times after stimulation. We detected a strong association of $I\kappa B\alpha$ with the *hes1* promoter in control conditions, that progressively decreased after 30 min of TNF- α treatment, was minimal at 45–60 min, and reappeared after 90 min of treatment (Figs. 3b and 4a). Of note is that $I\kappa B\alpha$ dissociation kinetics was delayed compared with the kinetics of cytoplasmic $I\kappa B\alpha$ degradation, suggesting the presence of a specific mechanism that regulates chromatin-associated $I\kappa B\alpha$ (Fig. 3b). We next tested whether phosphorylation and degradation of $I\kappa B\alpha$ by TNF- α were occurring in the nuclear fraction. Western blot from 3T3 nuclear extracts showed that nuclear levels of $I\kappa B\alpha$ were moderately affected after TNF- α treatment, as described (31). In contrast, phosphorylation at serine 32–36 of $I\kappa B\alpha$ consistently increased after 30–60 min of treatment, coinciding with the

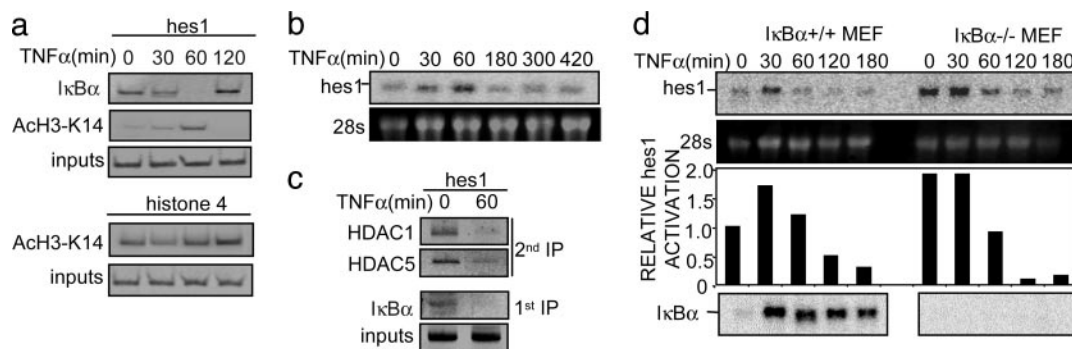


Fig. 4. Recruitment of α -I κ B α correlates with histone deacetylation and *hes1* repression. (a) Chromatin prepared from TNF- α -treated 3T3 cells was immunoprecipitated with α -I κ B α (Upper) and α -ACh3-K14 (Lower) antibodies. Coprecipitated DNA was analyzed by PCR with specific primers for *hes1* or *histone H4*. Results are representative of two independent experiments. (b) TNF- α treatment induces a temporary activation of the endogenous *hes1* transcription. Northern blot from 293T cells treated with TNF- α at different time points showing *hes1* mRNA levels. 28s rRNA is shown as a loading control. (c) Chromatin from control or 60 min TNF- α -treated 3T3 cells was first precipitated with α -I κ B α (Lower). Chromatin was then eluted and a second precipitation with α -HDAC1 or -5 antibodies was performed (Upper). The presence of *hes1* promoter in the precipitates was determined by PCR analysis. (d) Northern blot showing relative *hes1* transcriptional activation in I κ B α ^{+/+} (Left) and I κ B α ^{-/-} (Right) MEF treated with TNF- α at the indicated time points. 28s ribosomal RNA is shown as a loading control. RNA levels were quantified, and the ratio between *hes1* and 28s is represented (Lower). Induction of I κ B α transcription in the I κ B α ^{+/+} is shown as a control of TNF- α activation (Lower).

release of I κ B α from the *hes1* promoter, thus suggesting that the interaction between I κ B α and the chromatin may be regulated by phosphorylation. As a control, p65 is recruited to the nucleus after TNF- α treatment, whereas HDAC1 is constitutively detected in the nuclear fraction (Fig. 3b).

Because we previously reported that not only I κ B α but also p65 plays a role in regulating *hes1* transcription (11), and because p65 can bind to a very broad spectrum of NF- κ B-dependent and -independent genes (32), we tested whether the *hes1* promoter was also occupied by p65. We observed that p65 was only marginally, but constitutively, associated with the *hes1* promoter in a TNF- α -independent manner (Fig. 3b), suggesting that *hes1* is not regulated by the recruitment of NF- κ B transcription factors to its promoter. Further studies were performed to define whether I κ B α was also associated with classical NF- κ B-dependent promoters such as *IL6* and *RANTES*. We detected I κ B α recruitment to these promoters neither in control conditions nor after TNF- α stimulation up to 90 min (Fig. 3c and d). As expected, p65 was recruited to these promoters in a TNF- α -dependent manner (Fig. 3c and d). In contrast, we did not detect association of I κ B α or p65 to the β -actin gene (Fig. 3e). Altogether, these results demonstrate that I κ B α binds to the *hes1* promoter, and that this association is regulated by TNF- α . Because of the kinetics observed for the association of I κ B α and p65 to the *hes1* promoter, the possibility that p65 may be involved in recruiting I κ B α to the chromatin instead of I κ B α binding itself might be considered. We next extended our study to different Notch targets and other unrelated genes, and we detected I κ B α associated not only with *hes1* but also with the Notch-target gene *herp-2*, but not with *hes5* or the Notch-unrelated genes *histone H4*, β -globin, or *hoxB7*. As a control, we used I κ B α ^{-/-} MEF and, as expected, we could not amplify any of these promoters from the I κ B α precipitates (Fig. 3f).

Because we speculated that chromatin-associated I κ B α is playing a role in gene repression, we investigated whether I κ B α recruitment inversely correlates with acetylation of histone H3 and transcriptional activation of the *hes1* promoter in response to TNF- α . Our results demonstrate that acetylation of Lys-14 of histone H3 in the *hes1* promoter progressively increased after 30 min of TNF- α treatment, being maximal at 60 min (Fig. 4a). This kinetics nicely correlates with the release of I κ B α from the *hes1* promoter (Fig. 4a) and with the increased transcriptional activation measured by *hes1* mRNA levels (Fig. 4b). In contrast, we

did not observe any changes in the acetylation levels of the *histone H4* promoter (Fig. 4a).

Based on these results, together with the observed interaction of I κ B α with different repression elements, we hypothesized that nuclear I κ B α could be recruiting deacetylase activities to specific promoters. To test this possibility, we precipitated chromatin from untreated or 60-min TNF- α -treated 3T3 cells with the α -I κ B α , followed by a second precipitation with α -HDAC1 or -5 antibodies (Fig. 4c). We consistently detected *hes1* in both α -HDAC1 and -5 precipitates from untreated cells, indicating that I κ B α and HDACs coincide on this promoter in the absence of stimuli. As a control, we could not detect *hes1* promoter in the precipitates from TNF- α -treated cells when I κ B α is not present in this promoter (Fig. 4c). To further confirm the role of I κ B α in repressing the *hes1* gene, we performed Northern blot assays and determined *hes1* mRNA levels in the I κ B α ^{-/-} MEF compared with WT after TNF- α treatment. In the absence of stimuli, we detected higher levels of the *hes1* mRNA in the I κ B α ^{-/-} MEF compared with WT (Fig. 4d). Surprisingly, *hes1* transcription was consistently down-regulated after 60-min TNF- α treatment in both knockout and WT cells (Fig. 4d), suggesting that I κ B α is not required for the late repression of this gene or that in the absence of I κ B α , other compensatory mechanisms are operational. These observations strongly support that chromatin-associated I κ B α is involved in the recruitment of specific repression complexes in the noninduced state, and that TNF- α regulates *hes1* transcriptional activation by modulating the association of I κ B α with the *hes1* promoter.

While this work was in progress, a new mechanism for TNF- α -dependent gene activation involving a nuclear function of IKKs, the upstream regulators of the NF- κ B signaling, was reported (22, 23). Both IKK- α and - β are shown to be recruited to NF- κ B-dependent promoters after TNF- α treatment, where IKK- α is responsible for phosphorylating Ser-10 of histone H3 and activation of gene transcription. Nuclear function of IKK- β is still unknown. Because IKKs could also play a role in NF- κ B-independent gene transcription (33), we next investigated whether these kinases are involved in *hes1* transcription in response to TNF- α stimulation. ChIP assay with α -IKK- α and - β antibodies demonstrated that both kinases are recruited to the *hes1* promoter in response to TNF- α with a maximum at 60 min of treatment (Fig. 5a), whereas, as a control, we did not detect IKK- α or - β bound to the β -actin gene. The simultaneous presence of both IKKs on the *hes1* promoter coincides with its

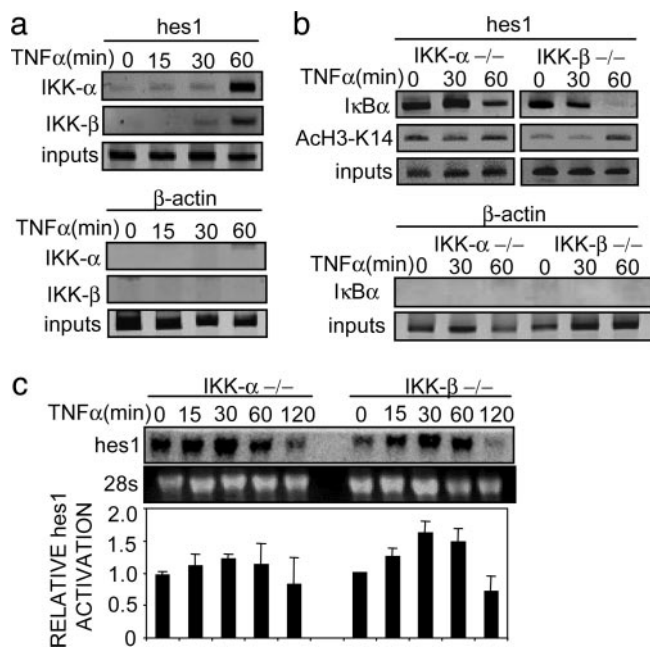


Fig. 5. IKK- α and - β are recruited to the *hes1* promoter and correlate with I κ B α release. (a) Chromatin prepared from TNF- α -treated 3T3 cells was immunoprecipitated with α -IKK- α or - β antibodies. Association of IKKs to the *hes1* (Upper) or β -actin (Lower) genes was analyzed by PCR analysis. (b) Chromatins from TNF- α -treated IKK- α ^{-/-} and - β ^{-/-} MEFs were precipitated with α -I κ B α and α -AcH3-K14 antibodies. (Upper) Recruitment of I κ B α and acetylation of histone H3 on the *hes1* promoter was determined by PCR analysis. (Lower) I κ B α is not recruited to the β -actin gene in these cells. (c) Northern blot showing *hes1* transcriptional activation in IKK- α ^{-/-} (lanes 1–5) and IKK- β ^{-/-} (lanes 6–10) MEF treated with TNF- α at the indicated time points. 28s ribosomal RNA is shown as a loading control. RNA levels were quantified and the ratio between *hes1* and 28s is represented (Lower). Differences between IKK- α ^{-/-} and - β ^{-/-} were statistically significant, being the median area under the curve (AUC_{0min-60min}) of 3.43 and 4.18, respectively ($P = 0.032$). One representative of three independent experiments is shown.

higher transcriptional activity and with the release of I κ B α from the chromatin (Fig. 4 *a* and *b*). Because I κ B α is the best-characterized IKK substrate, and we observed that phosphorylation of nuclear I κ B α is maximal at 30–60 min of TNF- α treatment (Fig. 3*b*), it is tempting to speculate that recruitment of IKKs to the promoters could induce phosphorylation and subsequent degradation of chromatin-associated I κ B α . To further determine the role of IKKs in the regulation of chromatin associated I κ B α , we performed ChIP assays with α -I κ B α from IKK- α ^{-/-} and - β ^{-/-} MEFs. Release of I κ B α from the *hes1* promoter was affected in IKK- α ^{-/-} cells, because we detected only a slight decrease after 60 min of TNF- α treatment (Fig. 5*b*) compared with 3T3 cells (Fig. 4*a*). In contrast, in IKK- β ^{-/-} MEFs, TNF- α stimulation results in the release of *hes1*-associated I κ B α after 60 min (Fig. 5*b*). We next tested the acetylation kinetics of the *hes1* promoter in response to TNF- α in the absence of IKK- α or - β . Consistent with the stabilization of *hes1*-associated I κ B α in the IKK- α ^{-/-} cells, TNF- α treatment results in minor changes in the acetylation of Lys-14 of histone H3 in this promoter (Fig. 5*b*), concomitant with a reduced transcriptional activation of the gene (Fig. 5*c*). In contrast, in the IKK- β ^{-/-} cells, Lys-14 of histone H3 on the *hes1* promoter is acetylated in response to TNF- α coinciding with the transcriptional activation of the *hes1* gene (Fig. 5*b* and *c*). Altogether, these results suggest that IKK- α plays a predominant role in the release of I κ B α from the *hes1* gene, although both IKK- α and - β are recruited to the promoter in response to TNF- α . Additional

work should be done to better characterize the role of *hes1*-associated IKK- α and - β .

In summary, our results are consistent with a previously undescribed role for I κ B α in recruiting HDAC activity to repress the *hes1* gene. TNF- α treatment results in the release of *hes1*-associated I κ B α , coinciding with the transcriptional activation of this gene. In addition, both IKK- α and - β proteins are simultaneously recruited to the *hes1* promoter, strongly suggesting a role for these proteins in regulating *hes1* transcription. In agreement with this, I κ B α release, histone acetylation, and *hes1* activation are impaired in IKK- α ^{-/-} cells.

Discussion

We previously demonstrated that I κ B α binds to the SMRT corepressor, leading to changes in its subcellular localization and affecting the transcription of NF- κ B-independent promoters (11). Although I κ B proteins were first identified as cytoplasmic inhibitors of NF- κ B, it is now clear that they shuttle between the nucleus and the cytoplasm (17). An important nuclear function postulated for I κ B α is the repression of the NF- κ B signal by inducing the nuclear export of the transcription factor (34). In this work, we investigate the putative role of nuclear I κ B α in transcriptional repression on non-NF- κ B target genes. We here describe that I κ B α interacts with N-CoRs and HDACs and is recruited to the regulatory sequences of the Notch-target promoters *hes1* and *herp2*. Chromatin-associated I κ B α is released from the *hes1* promoter in response to TNF- α correlating with increased levels of histone H3 acetylation, strongly suggesting that deacetylase activity is associated with the presence of I κ B α . Consistent with this, we demonstrate that HDAC1 and -5 are associated with the *hes1* promoter together with I κ B α . Moreover, I κ B α ^{-/-} cells showed increased basal *hes1* transcription and failed to up-regulate *hes1* in response to TNF- α . Nevertheless, late TNF- α -dependent repression is still operating in these cells. Although this repression could be explained by I κ B α -independent mechanisms, we consider most likely that other I κ B members could compensate I κ B α deficiency. In agreement with this, there is strong evidence for I κ B β compensation in I κ B α ^{-/-} cells (20, 35).

Although this is a completely unexpected function for I κ B α , a new mechanism for TNF- α -dependent gene activation has recently been reported involving a nuclear function of another upstream regulator of the NF- κ B signaling, IKK- α (22, 23). IKK- α is recruited to NF- κ B-dependent promoters after TNF- α treatment to phosphorylate Ser-10 of histone H3 and to activate gene transcription. In fact, both IKK- α and - β are recruited to NF- κ B-dependent promoters, although the function of chromatin-associated IKK- β is not known. Recently, the possibility that IKKs are associated with NF- κ B-independent promoters has been suggested (33). We have demonstrated that both IKK- α and - β are recruited to the *hes1* promoter, and that the release of I κ B α is affected in IKK-deficient cells. Because I κ B α is a well known IKK substrate, and based in the kinetics of nuclear I κ B α phosphorylation, it is reasonable to speculate that recruitment of

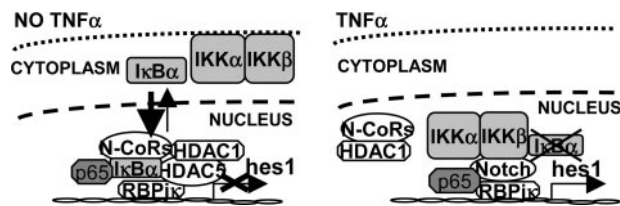


Fig. 6. Model illustrates that nuclear I κ B α is recruited to the *hes1* promoter together with repressor elements under basal conditions. Upon TNF- α induction, IKKs are recruited to this promoter resulting in I κ B α release and transcriptional activation.

IKKs to NF- κ B-independent promoters upon TNF- α treatment could induce phosphorylation and subsequent degradation of chromatin-associated I κ B α . Because we cannot exclude that most of the nuclear I κ B α is phosphorylated in the cytoplasm, future work should address whether I κ B α bound to specific promoters is phosphorylated and requires the recruitment of IKK- α and/or - β . Because maximal recruitment of IKKs to the *hes1* promoter is observed after 60 min of TNF- α induction, coinciding with the maximal activation of this gene, it is possible that *hes1*-associated IKK- α is also phosphorylating histone H3, as reported for NF- κ B-dependent genes (22, 23).

Current experiments are directed toward investigating the role of I κ B α in different promoters as well as the mechanism that dictates the specificity of the I κ B α -containing complexes that respond to TNF- α . That we could not detect I κ B α in *IL6* or *RANTES* promoters suggests this regulatory mechanism does not generally operate on NF- κ B target genes. Nevertheless, numerous genes are regulated by NF- κ B and, to completely exclude this possibility, a broader spectrum of early- and late-responding NF- κ B promoters should be analyzed in more detail.

The physiological significance of the TNF- α -dependent *hes1* up-regulation is extremely intriguing. Hes1 is a basic helix-loop-helix protein with a well characterized transcriptional repression function. Most of the Hes1 target genes are tissue-specific transcriptional activators involved in cell differentiation such as

MASH1 or *neurogenin* (36). Based on our results, it is tempting to speculate on a putative role of Hes1 protein in the postactivation repression or delayed activation of NF- κ B-dependent genes after TNF- α treatment. Indeed, Hes1 has already been reported to repress an NF- κ B target gene (37). This hypothesis is currently under investigation.

Together, our results support the idea that I κ B α binds to the chromatin in specific promoters (*hes1* and *herp2*) to facilitate HDAC recruitment. After TNF- α treatment, IKK- α and - β associate with the same promoters, leading to the release of I κ B α and permitting gene activation (see model in Fig. 6).

We thank M. Karin (University of California at San Diego, Los Angeles), R. Evans (The Salk Institute, San Diego), A. Israel (Pasteur Institute, Paris), and S. Schreiber (Harvard University, Cambridge, MA) for kindly providing plasmids; A. Hoffmann and D. Baltimore (California Institute of Technology, Los Angeles) for I κ B α ^{-/-} MEF; and M. Karin for IKK- α ^{-/-} and - β ^{-/-} MEF. We thank F. Torres for statistical analysis; J. Inglés-Esteve, all of the members of the lab, and W. Vanden Berghe for helpful discussions; and Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona Bellvitge, for confocal microscopy technical support. L.E. is an investigator from the Carlos III program (ISCIII/02/3027). C.A. is a recipient of a MCyT predoctoral fellowship (BES-2002-0028). This work was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Salud (Grant SAF2001-1191), and the Fundació La Marató TV3 (Grant 030730).

- Hermanson, O., Jepsen, K. & Rosenfeld, M. G. (2002) *Nature* **419**, 934–939.
- Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunyak, V., McEvelly, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., *et al.* (2000) *Cell* **102**, 753–763.
- Jepsen, K. & Rosenfeld, M. G. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 689–698.
- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H. Y., Ordentlich, P., Tsai, C. C., Hon, M. & Evans, R. M. (2001) *Genes Dev.* **15**, 1140–1151.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. & Evans, R. M. (1997) *Cell* **89**, 373–380.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., *et al.* (1997) *Nature* **387**, 43–48.
- Kao, H. Y., Downes, M., Ordentlich, P. & Evans, R. M. (2000) *Genes Dev.* **14**, 55–66.
- Lee, S. K., Kim, J. H., Lee, Y. C., Cheong, J. & Lee, J. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 12470–12474.
- Zamir, I., Harding, H. P., Atkins, G. B., Horlein, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. & Lazar, M. A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5458–5465.
- Bailey, P., Downes, M., Lau, P., Harris, J., Chen, S. L., Hamamori, Y., Sartorelli, V. & Muscat, G. E. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 1155–1168.
- Espinosa, L., Inglés-Esteve, J., Robert-Moreno, A. & Bigas, A. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 491–502.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M. & Kadesch, T. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2269–2277.
- Whiteside, S. T. & Israel, A. (1997) *Semin. Cancer Biol.* **8**, 75–82.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. & Siebenlist, U. (1995) *Science* **267**, 1485–1488.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000) *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621–663.
- Li, Q. & Verma, I. M. (2002) *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725–734.
- Johnson, C., Van Antwerp, D. & Hope, T. J. (1999) *EMBO J.* **18**, 6682–6693.
- Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M. & Miyamoto, S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1014–1019.
- Renard, P., Percherancier, Y., Kroll, M., Thomas, D., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. & Bachelier, F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15193–15199.
- Huang, T. T. & Miyamoto, S. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4737–4747.
- Ghosh, S. & Karin, M. (2002) *Cell* **109**, S81–S96.
- Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D. & Baldwin, A. S. (2003) *Nature* **423**, 659–663.
- Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T. & Gaynor, R. B. (2003) *Nature* **423**, 655–659.
- Espinosa, L., Santos, S., Inglés-Esteve, J., Munoz-Canoves, P. & Bigas, A. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 1295–1303.
- Viatour, P., Legrand-Poels, S., van Lint, C., Warnier, M., Merville, M. P., Gielen, J., Piette, J., Bours, V. & Chariot, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46541–46548.
- Groinger, C. M. & Schreiber, S. L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7835–7840.
- Xie, J. & Black, D. L. (2001) *Nature* **410**, 936–939.
- Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28001–28007.
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S. & Karin, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1295–1304.
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. (2002) *Science* **298**, 1241–1245.
- Rodriguez, M. S., Thompson, J., Hay, R. T. & Dargemont, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9108–9115.
- Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T. E., Luscombe, N. M., Rinn, J. L., Nelson, F. K., Miller, P., Gerstein, M., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12247–12252.
- Anest, V., Cogswell, P. C. & Baldwin, A. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 31183–31189.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D. & Hay, R. T. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2689–2696.
- Cheng, J. D., Ryseck, R. P., Attar, R. M., Dambach, D. & Bravo, R. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 1055–1062.
- Kageyama, R. & Nakanishi, S. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 659–665.
- Fujimori, K., Fujitani, Y., Kadoyama, K., Kumanogoh, H., Ishikawa, K. & Urade, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 6018–6026.

DISCUSSIÓ

4. Discussió

En aquesta tesi s'han identificat dos nous mecanismes de regulació transcripcional dependents de la via d' $\text{NF}\kappa\text{B}$ que contribueixen a resoldre part de la complexitat d'aquesta via de senyalització, així com la seva interacció amb d'altres vies.

4.1. Les 14-3-3 com a reguladors d' $\text{NF}\kappa\text{B}$

En el primer capítol d'aquesta tesi es descriu el paper de les 14-3-3 en la regulació de la via clàssica d' $\text{NF}\kappa\text{B}$. Hem demostrat que aquestes proteïnes són necessàries per la correcta distribució subcel·lular de p65 ja que la disrupció de la funció de les 14-3-3 indueix una acumulació de complexos $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{p65}$ al nucli. En aquestes condicions observem una associació constitutiva del factor de transcripció als promotors dels seus gens diana. Al no exportar-se correctament el complex $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{p65}$ al citoplasma, els gens diana d' $\text{NF}\kappa\text{B}$ esdevenen tolerants i no responen eficientment a l'activació per $\text{TNF}\alpha$.

També hem demostrat que tant p65 com $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ s'uneixen directament a les 14-3-3 tot i que no ho fan de la mateixa manera; la unió d' $\text{I}\kappa\text{B}$ a les 14-3-3 és independent de fosforilació, similar al que s'ha descrit per altres substrats com A20 (Vincenz and Dixit, 1996). No obstant, podria ser que altres modificacions post-traduccionals que no hem investigat en aquest treball modulessin la interacció entre ambdues proteïnes. Per exemple, modificacions com la ubiquitinació, la sumoilació o l'acetilació podrien actuar com a reguladors positius o negatius d'aquesta interacció.

Pel contrari, la interacció entre p65 i 14-3-3 és dóna per la fosforilació de dos dominis que es corresponen amb els consenus d'unió a 14-3-3. Aquests dos dominis estan molt conservats des de *Drosophila* fins al humans, indicant la seva rellevància fisiològica. Un dels llocs inclou la serina 281 que és fosforilada en resposta a $\text{TNF}\alpha$ per les IKKs (dades no publicades).

La presència de llocs d'unió a 14-3-3 en la proteïna p65 significa incrementar el seu potencial de ser

exportada al citoplasma. A nivell funcional sembla un mecanisme addicional per a induir una aturada ràpida de la senyal després de l'estimulació per $TNF\alpha$. A més, el fet que les mateixes quinases que s'encarreguen d'activar la via siguin responsables d'aturar la senyal fa que la fiabilitat del mecanisme d'aturada sigui absoluta. Recentment s'ha descrit una funció per les IKKs associada a la cromatina (Anest et al., 2003), (Yamamoto et al., 2003), (Hoberg et al., 2004). Per acabar d'entendre com funciona aquest mecanisme volem determinar si són les IKKs citoplasmàtiques o les IKKs associades als promotors qui fosforila la serina 281 de p65 per crear els llocs d'unió a 14-3-3.

La quinasa o quinases responsables de la fosforilació a la serina 42 de p65 encara no ha estat identificada. Malgrat això, sabem que es tracta d'una activitat quinasa activada per $TNF\alpha$.

Inicialment vam identificar una regió incloent la serina 340 com a possible consensus d'unió per 14-3-3. La seva seqüència, però, no està conservada en cap espècie tret dels humans. Aquest fet sol ser indicatiu

de la seva poca rellevància funcional. Això és així perquè l'evolució segueix un procés conservatiu pel qual elements que regulen funcions importants de les proteïnes se solen conservar. A més, no hem pogut demostrar que aquest domini es fosforili en resposta a $TNF\alpha$ com sí que ho fan els dominis que inclouen les serines 42 i 281. Així pensem que el domini de p65 que inclou la serina 340 no és un veritable lloc d'unió a 14-3-3. Existeix la possibilitat que altres estímuls indueixin la fosforilació d'aquest motiu i generin un lloc d'unió a les 14-3-3 en algún sistema en particular. En aquest sentit, hi ha molts estímuls diferents que activen la via d' $NF\kappa B$ de manera específica i en el que participen quinases concretes (Hayden and Ghosh, 2004).

Les diferents isoformes de les 14-3-3 són molt similars entre elles i s'ha vist que en general totes les cèl.lules contenen alts nivells d'aquestes proteïnes (Aitken et al., 1992). A més a més els anticossos comercials contra isoformes de 14-3-3 específiques solen reconèixer més d'una isoforma, probablement degut a la seva similitud. Per la

mateixa raó es fa difícil saber fins a quin punt són específics els siRNAs i altres reactius utilitzats, i fins i tot es fa difícil descartar que existeixin mecanismes de compensació entre elles que emmascarin l'efecte d'eliminar una isoforma. Amb aquestes limitacions, queda per demostrar quina o quines isoformes de les 14-3-3 són responsables de regular, en condicions fisiològiques, la via d'NF κ B.

4.2. Paper de les 14-3-3 en tumorigènesi

Malgrat la majoria de les 14-3-3 s'expressen en tots els tipus cel·lulars, s'ha descrit una excepció; les 14-3-3 σ . Aquesta isoforma s'expressa exclusivament en cèl·lules epitelials (Leffers et al., 1993). Es tracta d'una dada interessant ja que la major part del càncers provenen de cèl·lules epitelials. Apuntant a un possible paper per les 14-3-3 com a supressors tumorals s'ha observat que en molts tumors de mama hi ha nivells anormalment reduïts de 14-3-3 σ . Els treballs de Urano et al. demostren que al restablir els nivells normals de 14-3-3 σ s'inhibeix la

proliferació de les cèl·lules de càncer de mama injectades en ratolins indicant que la manca de 14-3-3 σ és una de les causes del creixement cel·lular en aquest tipus de tumors (Urano et al., 2002).

Les 14-3-3 regulen la distribució subcel·lular de la fosfatasa de CDKs, cdc25 (Graves et al., 2001) i això podria ser suficient per explicar el paper de les 14-3-3 en el manteniment dels fenotip transformant. Nosaltres creiem que la regulació anòmala de la via d'NF κ B induïda per la manca de 14-3-3 σ podria tenir un paper important en la supervivència de les cèl·lules transformades. Com s'ha comentat a la introducció, en molts càncers es detecta p65 nuclear i aquesta activació anòmala d'NF κ B podria fins i tot estar induïda pel propi sistema immunitari de l'hoste. El que nosaltres proposem es que la manca de 14-3-3 σ impediria l'aturada de la senyal en resposta a una situació d'estimulació crònica de la via d'NF κ B. En aquest sentit s'ha vist que l'activació crònica d'NF κ B és necessària per la progressió del càncer de mama (Nakshatri and Goulet, 2002) i que la presència de p65 nuclear es un

factor de mal pronòstic en aquest tipus de càncer (Biswas et al., 2004).

4.3. Funció d'I κ B α a la cromatina

En el segon capítol (Aguilera et al., 2004) hem definit una nova funció per I κ B α que es independent de la seva funció clàssica associada a la via d'NF κ B. Per primer cop, s'ha demostrat que I κ B α pot interaccionar físicament amb la cromatina en gens específics, concretament *hes1* i *herp2*, juntament amb repressors transcripcionals com les HDACs. En estimular les cèl.lules amb TNF α , I κ B α és alliberat del promotor de *hes1*, fet que es correlaciona perfectament amb un increment en l'acetilació de les histones i amb l'activació transcripcional del gen. L'acetilació en residus específics de les cues de les histones genera un impediment estèric que obliga al DNA a desplegar-se, fet que s'associa amb una millor accessibilitat dels factors de transcripció a la cromatina i l'activació de gens. En estat de repòs, les HDACs són els enzims implicats de mantenir les histones

deacetilades i, per tant, la cromatina compactada. Aquesta correlació, juntament amb el fet que I κ B α està unit als seus gens diana amb HDACs, suggereix que el mecanisme pel qual I κ B α reprimeix la transcripció és a través de l'acció deacetilasa de les HDACs. De totes maneres no es pot descartar que I κ B α reprimeixi els gens diana de diferents maneres que cooperin entre elles, com per exemple reclutant corepressors específics o emmascarant el lloc d'unió de un factor de transcripció a proteïnes activadores. El paper d'I κ B α com a repressor transcripcional de *hes1* encaixa amb el fet que *hes1* es troba sobreexpressat tant en fibroblastes immortalitzats com en cèl.lules del llinatge mieloide dels ratolins deficientes per I κ B α (Rupec et al., 2005).

I κ B α sempre s'havia considerat una proteïna de funció principalment citoplasmàtica. Tot i així I κ B α es capaç de viatjar contínuament entre el nucli i el citoplasma, la qual cosa s'havia associat al paper que juga en la terminació de la senyal d'NF κ B ja que exporta del nucli els complexos p50/p65 (Huang et al.,

2000). El fet de trobar I κ B α a la cromatina de *hes1* i *herp2* demostra que aquesta proteïna té una funció nuclear totalment nova, que sembla independent d'NF κ B, i que afecta a gens diana de Notch. Probablement, l'I κ B soluble que regula la via d'NF κ B i l'I κ B α associat a la cromatina que regula els gens de la via de Notch tenen alguna modificació post-traduccionals que els diferencia i modula la seva funció. Hi ha moltes modificacions post-traduccionals descrites que afecten les funcions d'una proteïna; la fosforilació, la metilació, la sumoïlació o la ubiquitinació. Cada modificació genera un canvi diferent segons la proteïna de la que es tracta. Per exemple, la ubiquitinació s'associa en general a la degradació de la proteïna, però no sempre és així. És difícil predir a priori quines modificacions podrien fer que I κ B α es pogués associar a la cromatina. Així doncs, caldrà fer més experiments per definir quines poblacions d'I κ B α conviuen en la cèl.lula i com aquests diferents I κ Bs participen específicament dels mecanismes de regulació transcripcional. També caldrà determinar quins són els elements

que regulen l'especificitat d'unió d'I κ B α nuclear als seus gens diana. Una possibilitat seria que I κ B α s'unís directament a la cromatina, a través d'una seqüència concreta. Degut al fet que el mecanisme és nou, no s'ha identificat mai una seqüència específica de DNA encarregada d'unir I κ B α . També té sentit pensar que I κ B α s'uneix als promotors dels gens a través de p65, un factor de transcripció reconegut per I κ B α i amb llocs d'unió al DNA perfectament definits. El fet que hem detectat la presència de p65 unida de forma constitutiva al promotor de *hes1* reforça aquesta hipòtesi. Una altra possibilitat seria que I κ B α interaccionés amb RBP κ o altres factors presents als promotors de *hes1* i *herp2* i que el reclutament de Notch en resposta a estímuls activadors induís l'alliberament d'I κ B juntament amb els elements repressors transcripcionals. Una forma d'intentar validar aquesta hipòtesi seria activar el reclutament de NotchIC al seus promotors diana a través d'estímuls diferents de TNF α .

4.4. Múltiples funcions de les IKKs

Diferents grups, entre ells el nostre, han demostrat recentment que la quinasa d'I κ B, IKK α , responsable de l'activació de la via alternativa d'NF κ B i de funció clàssicament citoplasmàtica, té una funció nuclear associada a la cromatina. En primer lloc els grups de Gaynor (Yamamoto et al., 2003) i Baldwin (Anest et al., 2003) van demostrar que els gens diana d'NF κ B requereixen la funció cromatínica d'IKK α per fosforilar la serina 10 de la histona 3 la qual cosa és necessària per la seva activació.

Els nostres treballs demostren que IKK α i β es recluten al promotor de *hes1* en resposta a TNF α coincidint amb l'alliberament d'I κ B α . Donat que l'I κ B α citoplasmàtic és una diana clàssica del complex IKK, pensem que les IKKs que es recluten a la cromatina podrien estar fosforilant l'I κ B α unit al promotor de *hes1* induint la seva fosforilació i posterior degradació. Això indicaria que les mateixes proteïnes estarien exercint funcions reguladores similars al citoplasma cel·lular i a la cromatina de promotors específics.

En aquest cas, podria tractar-se de mecanismes de seguretat per permetre l'activació gènica només en els casos en que totes les senyals que han arribat a la cèl·lula hagin estat correctes, o bé al contrari, una forma de restringir quins són els gens diana d'aquesta regulació. El més probable és que els diferents mecanismes d'activació per IKK estiguin actuant al mateix temps i podria ser que la IKK α reclutada al promotor de *hes1* fosforilés la serina 10 de la histona 3, com en el cas dels gens d'NF κ B, per generar un context òptim per l'activació dels gens diana de Notch al mateix temps que fosforila I κ B α per alliberar-ne les HDACs i corepressors. Si es comprovés aquesta hipòtesi, tindríem dues famílies de gens diferents, activats per factors de transcripció diferents, que compartien part del mecanisme d'activació transcripcional. Es podria tractar d'una manera de coordinar l'activació de totes dues vies en resposta a estímuls específics. Pel contrari, podria ser que l'activació d'una d'elles impedís l'activació de l'altra al competir pel reclutament de

les IKK nuclears als seus gens diana.

Un dels punts importants que estem intentant determinar és si l'I κ B α associat als promotors es degrada després del tractament amb TNF α , i si aquesta degradació té a veure amb el reclutament de les IKKs al promotor. En aquest cas, l'I κ B α que es torna a unir al promotor de *hes1* a temps llargs d'incubació amb TNF α , i que es correlaciona amb una aturada de l'expressió, hauria de ser I κ B α de nova síntesi. Aquesta possibilitat podria ser testada utilitzant inhibidors de la síntesi proteica. També volem definir si el promotor d'I κ B α és també diana del mecanisme que es descriu al segon article i seria resintetitzat, un cop degradat, per tornar a reprimir els seus gens diana, en aquest cas els gens diana de Notch com *hes1*. Hem detectat I κ B α unit al promotor d'*ikb α* , suggerint que la proteïna pot estar reprimint la seva síntesi. En contra d'això, hem vist que quant es tracten les cèl.lules amb TNF α , I κ B α es torna a reclutar a *hes1* després del seu alliberament suggerint que I κ B α es pot tornar a

sintetitzar o bé que el mecanisme d'alliberament no inclou degradació.

Com ja hem explicat, *hes1* se sobreexpressa en cèl.lules deficientes per I κ B α i no respon a l'estimulació per TNF α indicant que I κ B α regula negativament els nivells basals de *hes1*. Sorprenentment, a temps llargs de tractament amb TNF α ; a 120 minuts post-estimulació, *hes1* es torna a reprimir tant en les cèl.lules *wild type* com en les que són deficientes per I κ B α . Això suggeriria que o la repressió post-activació de *hes1* no és deguda al reclutament d'I κ B α associat a HDACs o que en les cèl.lules deficientes per I κ B α existeixen mecanismes alternatius de compensació. De fet s'ha descrit que I κ B β pot exercir la funció d'I κ B α en la seva absència (Huang and Miyamoto, 2001), (Cheng et al., 1998), encara que no es pot descartar que altres I κ Bs, inclòs I κ B β , també exerceixin algun tipus de funció nuclear o cromatínica, semblant a I κ B α . En aquest cas es podria pensar que diferents I κ Bs podrien reprimir gens específics o reclutar complexes repressors diferents, depenents o no de

HDACs, o fins i tot regular diferentment un mateix gen depenent de l'estat de la cèl.lula.

4.5. I κ B α cromatínic en els gens diana d'NF κ B

Encara que en el nostre treball no hem demostrat que aquest mecanisme de repressió tingui lloc en els gens diana d'NF κ B, només hem estudiat els promotors de *il6* i *RANTES*, dos citoquines diana de p65 que s'activen en resposta a TNF α . Fins el moment es coneixen dues vies principals que activen els gens diana d'NF κ B; la via clàssica o canònica i la alternativa o no canònica. En canvi existeixen infinitat de gens diana d'NF κ B que responen amb diferents cinètiques als mateixos estímuls (Hoffmann et al., 2003), o s'expressen en teixits diferents o responen específicament a alguns estímuls com TNF α però no a LPS (revisat a (Xiao, 2004). Aquesta complexitat suggereix que existeixen mecanismes addicionals que regulen de forma fina l'expressió dels gens diana d'NF κ B. Nosaltres pensem que un d'aquests mecanismes podria ser la repressió de gens específics per l'I κ B α

cromatínic associat a HDACs. En aquest sentit, caldria fer un *screening* per veure si alguna subfamília de gens diana d'NF κ B té I κ B α associat als seus promotors operant com a repressor transcripcional. Una altra possibilitat seria que *hes1*, una vegada activat per TNF α funcionés com a repressor transcripcional d'alguns gens diana d'NF κ B. En aquest cas Hes1 podria actuar de forma similar a I κ B α evitant l'activació crònica de determinats gens diana d'NF κ B. Per respondre a aquestes qüestions, estem estudiant si Hes1 es capaç d'unir-se als promotors d'NF κ B impedit, per exemple, la unió de p65 o si l'expressió de *hes1* interfereix en el reclutament d'algun element necessari per a l'activació d'aquests gens.

4.6. Interrelació entre la via de Notch i NF κ B: Hes1

De moment, no coneixem quina és la funció del Hes1 que es sintetitza en resposta a l'activació de la via d'NF κ B i encara està per descriure un sistema fisiològic on aquest mecanisme operi. Pensem, però, que el nou mecanisme que hem

descriu podria estar coordinant l'activació de les vies de Notch i NF κ B durant la diferenciació cel·lular per tal de mantenir els patrons adequats d'expressió gènica. Com s'ha descrit a la introducció, NF κ B està activat en molts tipus de càncers (Lin and Karin, 2003) i es creu que el seu paper principal es la generació de senyals promitogèniques (Aggarwal, 2004) i antiapoptòtiques (Luo et al., 2005a) en les cèl·lules transformades. Mai s'ha descrit, però, que NF κ B pugui activar gens implicats en el manteniment del fenotip indiferenciat en càncer. Hes1, que està expressat en molts tumors (Leong and Karsan, 2006) en seria un candidat. Darrerament s'ha relacionat inflamació i càncer a través de l'activació d'NF κ B (Pikarsky et al., 2004), (Greten et al., 2004). Com s'acaba d'explicar, es coneixen gens dianes d'NF κ B implicats en la inhibició d'apoptosi que probablement expliquen parcialment el paper d'NF κ B en la tumorigènesi. L'activació de *hes1* podria ser una aportació important a aquest procés. NF κ B, a més de promoure la supervivència de les cèl·lules tumorals podria estar

prevenint la seva diferenciació a través de l'activació de *hes1*. També caldria determinar si la inflamació associada amb càncer dóna lloc a l'activació de *hes1*, i en aquest cas quina seria l'aportació de Hes1 al manteniment del fenotip tumoral.

Una eina molt útil per tal de determinar la funció d'una proteïna a la cèl·lula i, per tant, en l'organisme són els ratolins *knock out*. Els animals deficients per I κ B α poden desenvolupar-se correctament però moren al poc temps de néixer, el que impedeix estudiar el paper tumorigènic d'I κ B α utilitzant aquests ratolins.

No obstant, s'ha demostrat que la mort dels ratolins deficients per I κ B α es produeix per un desordre mieloproliferatiu (Beg et al., 1995), (Klement et al., 1996) que no es dóna en animals al que s'ha eliminat específicament l'I κ B α en les cèl·lules mieloides (Rupec et al., 2005) suggerint que el problema té l'origen en l'òrgan hematopoètic on es desenvolupen les cèl·lules. En el mateix article es demostra que l'expressió de *jagged1* està augmentada en els òrgans hematopoètics dels animals deficients per I κ B α que duu a

l'activació aberrant de *hes1* en les cèl.lules precursors del llinatge mieloide. Els autors justifiquen l'increment d'expressió de Jagged1 per un augment en l'activitat NF κ B (Bash et al., 1999) i proposen que Hes1 es responsable del desordre proliferatiu de les cèl.lules mieloides. Els nostres resultats demostren que les cèl.lules deficientes per I κ B α sobreexpressen *hes1* pel mecanisme de regulació transcripcional que hem descrit. A més, resultats obtinguts al nostre laboratori (dades no publicades) suggereixen que la manca d'I κ B α es responsable directe de la sobreexpressió de *jagged1* independentment de l'activitat NF κ B. Pensem que en l'activació de *hes1* en els animals deficientes per I κ B α podrien estar cooperant dos mecanismes; la manca de la repressió associada a I κ B α en el propi promotor de *hes1* i l'activació de la via de Notch per la presència d'alts nivells del lligand Jagged1 en les cèl.lules de l'estroma.

Actualment existeixen *knock outs* condicionals en que es pot deleccionar el gen de forma teixit específica o administrant fàrmacs que indueixen la pèrdua del gen en

el moment que es desitja. La utilització d'animals en els que s'elimini l'expressió d'I κ B α , per exemple en l'intestí o en la glàndula mamària, pot ser molt útil per a l'estudi del paper d'I κ B α en càncer.

En resum, hem identificat dos nous mecanismes de regulació transcripcional que afecten a les vies de transducció de senyal de Noth i d'NF κ B. Aquestes vies són clau en la gènesi i la progressió tumoral. Pensem que cal seguir estudiant els mecanismes que regulen les funcions cel.lulars normals per tal de detectar-ne els elements que es troben alterats en diferents tipus de tumor. Això ens permetrà intervenir d'una manera més eficaç al dissenyar teràpies específiques per a cada tipus de càncer segons les alteracions identificades.

CONCLUSIONS

5. Conclusions

En aquesta tesi hem demostrat que:

1. I κ B α s'associa a la cromatina; s'uneix a promotors dels gens diana de Notch *hes1* i *herp2*
2. Aquesta associació d'I κ B α amb la cromatina es regula per TNF α .
3. I κ B α s'associa amb repressors transcripcionals, concretament NCoR, SMRT i HDACs.
4. La unió d'I κ B α al promotor s'associa amb la repressió transcripcional de *hes1*
5. Les IKKs es recluten al promotor de *hes1* i juguen un paper fonamental en la regulació de *hes1* per TNF α i I κ B α
6. P65 s'uneix a les 14-3-3 en resposta a TNF α
7. La interacció entre 14-3-3 i p65 depèn de la fosforilació de dos dominis conservats de p65
8. I κ B α s'uneix a les 14-3-3 i aquesta unió es independent de TNF α i de fosforilació
9. Les 14-3-3 participen en l'export del nucli dels complexos I κ B α /p65

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografía

- Aggarwal, B. B.** (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* **6**, 203-8.
- Aguilera, C., Hoya-Arias, R., Haegeman, G., Espinosa, L. and Bigas, A.** (2004). Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16537-42.
- Aitken, A.** (2002). Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol Biol* **50**, 993-1010.
- Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G. and Soll, J.** (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* **17**, 498-501.
- Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D. and Baldwin, A. S.** (2003). A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* **423**, 659-63.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M. E.** (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S. and Simpson, P.** (1991). Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. *Trends Genet* **7**, 403-8.
- Ashburner, B. P., Westerheide, S. D. and Baldwin, A. S., Jr.** (2001). The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* **21**, 7065-77.
- Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M. and Kageyama, R.** (2000). The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* **127**, 2933-43.
- Bailey, P., Downes, M., Lau, P., Harris, J., Chen, S. L., Hamamori, Y., Sartorelli, V. and Muscat, G. E.** (1999). The nuclear receptor corepressor N-CoR regulates differentiation: N-CoR directly interacts with MyoD. *Mol Endocrinol* **13**, 1155-68.
- Baldwin, A. S., Jr.** (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-83.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-3.
- Bash, J., Zong, W. X., Banga, S., Rivera, A., Ballard, D. W., Ron, Y. and Gelinas, C.** (1999). Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors. *Embo J* **18**, 2803-11.
- Baud, V. and Karin, M.** (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**, 372-7.
- Beg, A. A. and Baldwin, A. S., Jr.** (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* **7**, 2064-70.
- Beg, A. A., Ruben, S. M., Scheinman, R. I., Haskill, S., Rosen, C. A. and Baldwin, A. S., Jr.** (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* **6**, 1899-913.

- Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T. and Baltimore, D.** (1995). Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev* **9**, 2736-46.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Vacca, A., Gulino, A. and Screpanti, I.** (2003). Notch3, another Notch in T cell development. *Semin Immunol* **15**, 107-12.
- Benton, R., Palacios, I. M. and St Johnston, D.** (2002). Drosophila 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation. *Dev Cell* **3**, 659-71.
- Bessho, Y., Miyoshi, G., Sakata, R. and Kageyama, R.** (2001). Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells* **6**, 175-85.
- Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B. and Iglehart, J. D.** (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10137-42.
- Blobel, G. A.** (2000). CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* **95**, 745-55.
- Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D. C., Johnson-Vroom, K. E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A. G., Aronow, B. J., Ghosh, G., Rickert, R. C. et al.** (2004). Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *Embo J* **23**, 4202-10.
- Bonizzi, G. and Karin, M.** (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-8.
- Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Disteche, C., Dube, I., Frischauf, A. M. et al.** (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* **14**, 33-41.
- Boudreault, A. A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R. T., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Tan, S. and Cote, J.** (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev* **17**, 1415-28.
- Bowie, A. G. and Haga, I. R.** (2005). The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* **42**, 859-67.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B.** (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**, 817-28.
- Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Demidenko, Z. N., Meek, S., Graves, P., Phillips, C., Zhao, H., Moody, S. A., Appella, E., Piwnica-Worms, H. et al.** (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat Cell Biol* **5**, 545-51.
- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M. L., Hoffmann, E., Resch, K. and Kracht, M.** (2004). Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-kappaB at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including

I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem* **279**, 55633-43.

Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R. F. and Hay, R. T. (1999). Mutations in the I κ Ba gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* **18**, 3063-70.

Candau, R., Moore, P. A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C. Y., Rosen, C. A. and Berger, S. L. (1996). Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol* **16**, 593-602.

Castella, P., Sawai, S., Nakao, K., Wagner, J. A. and Caudy, M. (2000). HES-1 repression of differentiation and proliferation in PC12 cells: role for the helix 3-helix 4 domain in transcription repression. *Mol Cell Biol* **20**, 6170-83.

Chen, L., Fischle, W., Verdin, E. and Greene, W. C. (2001). Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* **293**, 1653-7.

Chen, L. F., Mu, Y. and Greene, W. C. (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B. *Embo J* **21**, 6539-48.

Cheng, J. D., Ryseck, R. P., Attar, R. M., Dambach, D. and Bravo, R. (1998). Functional redundancy of the nuclear factor κ B inhibitors I κ B α and I κ B β . *J Exp Med* **188**, 1055-62.

Cheng, P., Zlobin, A., Volgina, V., Gottipati, S., Osborne, B., Simel, E. J., Miele, L. and Gabilovich, D. I. (2001). Notch-1 regulates NF- κ B activity in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* **167**, 4458-67.

Dang, T. P., Gazdar, A. F., Virmani, A. K., Sepetavec, T., Hande, K. R., Minna, J. D., Roberts, J. R. and Carbone, D. P. (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1355-7.

de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-49.

Delhase, M. and Karin, M. (1999). The I κ B kinase: a master regulator of NF- κ B, innate immunity, and epidermal differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 491-503.

Dougherty, M. K. and Morrison, D. K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**, 1875-84.

Duran, A., Diaz-Meco, M. T. and Moscat, J. (2003). Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF- κ B transcriptional activation. *Embo J* **22**, 3910-8.

Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-61.

Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Robert-Moreno, A. and Bigas, A. (2003). I κ B α and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NF κ B pathways. *Mol Biol Cell* **14**, 491-502.

Espinosa, L., Santos, S., Ingles-Esteve, J., Munoz-Canoves, P. and Bigas, A. (2002). p65-NFkappaB synergizes with Notch to activate transcription by triggering cytoplasmic translocation of the nuclear receptor corepressor N-CoR. *J Cell Sci* **115**, 1295-303.

Fahrner, J. A. and Baylin, S. B. (2003). Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad. *Genes Dev* **17**, 1805-12.

Feinman, R., Koury, J., Thames, M., Barlogie, B., Epstein, J. and Siegel, D. S. (1999). Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood* **93**, 3044-52.

Ferguson, A. T., Evron, E., Umbricht, C. B., Pandita, T. K., Chan, T. A., Hermeking, H., Marks, J. R., Lambers, A. R., Futreal, P. A., Stampfer, M. R. et al. (2000). High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6049-54.

Fisher, A. L., Ohsako, S. and Caudy, M. (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol* **16**, 2670-7.

Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F. et al. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**, 1640-50.

Graves, P. R., Lovly, C. M., Uy, G. L. and Piwnica-Worms, H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**, 1839-51.

Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F. and Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**, 285-96.

Griffin, J. D. (2001). Phosphatidylinositol signaling by BCR/ABL: opportunities for drug development. *Cancer Chemother Pharmacol* **48 Suppl 1**, S11-6.

Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7835-40.

Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**, 2195-224.

Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* **3**, 931-43.

Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. and Strauss, M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* **19**, 2690-8.

Hoberg, J. E., Yeung, F. and Mayo, M. W. (2004). SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol Cell* **16**, 245-55.

Hoffmann, A., Leung, T. H. and Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *Embo J* **22**, 5530-9.

Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M. and Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha

controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1014-9.

Huang, T. T. and Miyamoto, S. (2001). Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* **21**, 4737-47.

Iso, T., Kedes, L. and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**, 237-55.

Ito, T., Udaka, N., Okudela, K., Yazawa, T. and Kitamura, H. (2003). Mechanisms of neuroendocrine differentiation in pulmonary neuroendocrine cells and small cell carcinoma. *Endocr Pathol* **14**, 133-9.

Itzkowitz, S. H. and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G7-17.

Iwata, N., Yamamoto, H., Sasaki, S., Itoh, F., Suzuki, H., Kikuchi, T., Kaneto, H., Iku, S., Ozeki, I., Karino, Y. et al. (2000). Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **19**, 5298-302.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-8.

Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunyak, V., McEvelly, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E. et al. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* **102**, 753-63.

Johnson, C., Van Antwerp, D. and Hope, T. J. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J* **18**, 6682-93.

Kabos, P., Kabosova, A. and Neuman, T. (2002). Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21(CIP1/WAF1) in human neural stem cells. *J Biol Chem* **277**, 8763-6.

Kageyama, R., Sasai, Y., Akazawa, C., Ishibashi, M., Takebayashi, K., Shimizu, C., Tomita, K. and Nakanishi, S. (1995). Regulation of mammalian neural development by helix-loop-helix transcription factors. *Crit Rev Neurobiol* **9**, 177-88.

Kessler, D. J., Spicer, D. B., La Rosa, F. A. and Sonenshein, G. E. (1992). A novel NF-kappa B element within exon 1 of the murine c-myc gene. *Oncogene* **7**, 2447-53.

Klement, J. F., Rice, N. R., Car, B. D., Abbondanzo, S. J., Powers, G. D., Bhatt, P. H., Chen, C. H., Rosen, C. A. and Stewart, C. L. (1996). IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol Cell Biol* **16**, 2341-9.

Kopan, R., Nye, J. S. and Weintraub, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**, 2385-96.

Lee, S. K., Kim, J. H., Lee, Y. C., Cheong, J. and Lee, J. W. (2000). Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J Biol Chem* **275**, 12470-4.

Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Honore, B., Andersen, A. H., Walbum, E., Vandekerckhove, J. and Celis, J. E. (1993). Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signalling pathway. *J Mol Biol* **231**, 982-98.

Leong, K. G. and Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* **107**, 2223-33.

Leung, T. H., Hoffmann, A. and Baltimore, D. (2004). One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell* **118**, 453-64.

Li, J., Peet, G. W., Pullen, S. S., Schembri-King, J., Warren, T. C., Marcu, K. B., Kehry, M. R., Barton, R. and Jakes, S. (1998). Recombinant IkappaB kinases alpha and beta are direct kinases of Ikappa Balpha. *J Biol Chem* **273**, 30736-41.

Lin, A. and Karin, M. (2003). NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* **13**, 107-14.

Ling, L., Cao, Z. and Goeddel, D. V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3792-7.

Lu, D., Thompson, J. D., Gorski, G. K., Rice, N. R., Mayer, M. G. and Yunis, J. J. (1991). Alterations at the rel locus in human lymphoma. *Oncogene* **6**, 1235-41.

Luo, J. L., Kamata, H. and Karin, M. (2005a). The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol* **25**, 541-50.

Luo, J. L., Kamata, H. and Karin, M. (2005b). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* **115**, 2625-32.

Mackintosh, C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* **381**, 329-42.

Mammucari, C., Tommasi di Vignano, A., Sharov, A. A., Neilson, J., Havrda, M. C., Roop, D. R., Botchkarev, V. A., Crabtree, G. R. and Dotto, G. P. (2005). Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev Cell* **8**, 665-76.

Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T. and Kelly, W. K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* **1**, 194-202.

Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M. and Schmitz, M. L. (2006). Inducible Phosphorylation of NF-kappaB p65 at Serine 468 by T Cell Costimulation Is Mediated by IKK{epsilon}. *J Biol Chem* **281**, 6175-83.

Mattioli, I., Sebald, A., Bucher, C., Charles, R. P., Nakano, H., Doi, T., Kracht, M. and Schmitz, M. L. (2004). Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol* **172**, 6336-44.

Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D. and Martin, D. I. (1996). Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13014-9.

- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I. M., Wolfe, M. S. et al.** (2003). Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**, 565-76.
- Nakazawa, M., Ishii, H., Nakamura, H., Yoshino, S. I., Fukamizu, A., Nishioka, K. and Nakajima, T.** (2001). NFkappaB2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes. *Int J Mol Med* **7**, 31-5.
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr. and Sledge, G. W., Jr.** (1997). Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* **17**, 3629-39.
- Nakshatri, H. and Goulet, R. J., Jr.** (2002). NF-kappaB and breast cancer. *Curr Probl Cancer* **26**, 282-309.
- Oakley, F., Mann, J., Ruddell, R. G., Pickford, J., Weinmaster, G. and Mann, D. A.** (2003). Basal expression of IkappaBalpha is controlled by the mammalian transcriptional repressor RBP-J (CBF1) and its activator Notch1. *J Biol Chem* **278**, 24359-70.
- Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* **276**, 30467-74.
- Osada, H., Tatematsu, Y., Yatabe, Y., Nakagawa, T., Konishi, H., Harano, T., Tezel, E., Takada, M. and Takahashi, T.** (2002). Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers. *Oncogene* **21**, 2418-24.
- Oshima, M. and Taketo, M. M.** (2002). COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des* **8**, 1021-34.
- Oswald, F., Liptay, S., Adler, G. and Schmid, R. M.** (1998). NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol* **18**, 2077-88.
- Palayoor, S. T., Youmell, M. Y., Calderwood, S. K., Coleman, C. N. and Price, B. D.** (1999). Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* **18**, 7389-94.
- Pande, V. and Ramos, M. J.** (2005). NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr Med Chem* **12**, 357-74.
- Parks, A. L., Huppert, S. S. and Muskavitch, M. A.** (1997). The dynamics of neurogenic signalling underlying bristle development in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* **63**, 61-74.
- Perathoner, A., Pirkebner, D., Brandacher, G., Spizzo, G., Stadlmann, S., Obrist, P., Margreiter, R. and Amberger, A.** (2005). 14-3-3sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **11**, 3274-9.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. and Ben-Neriah, Y.** (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**, 461-6.
- Plaisance, S., Vanden Berghe, W., Boone, E., Fiers, W. and Haegeman, G.** (1997). Recombination signal sequence binding protein Jkappa

is constitutively bound to the NF-kappaB site of the interleukin-6 promoter and acts as a negative regulatory factor. *Mol Cell Biol* **17**, 3733-43.

Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. et al. (1997). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* **1**, 35-45.

Qi, W., Liu, X., Qiao, D. and Martinez, J. D. (2005). Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues. *Int J Cancer* **113**, 359-63.

Radtke, F. and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**, 1904-9.

Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P. et al. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* **20**, 3427-36.

Reid, G., Denger, S., Kos, M. and Gannon, F. (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* **59**, 821-31.

Ross, D. A., Rao, P. K. and Kadesch, T. (2004). Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 3505-13.

Rupic, R. A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., Flaig, M. J., Moosmann, S., Plewig, G., Dorken, B. et al. (2005). Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. *Immunity* **22**, 479-91.

Ryseck, R. P., Novotny, J. and Bravo, R. (1995). Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. *Mol Cell Biol* **15**, 3100-9.

Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A. A. and Natoli, G. (2004). Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J Exp Med* **200**, 107-13.

Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* **6**, 2620-34.

Schmidt, C., Peng, B., Li, Z., Sclabas, G. M., Fujioka, S., Niu, J., Schmidt-Suppran, M., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L. and Chiao, P. J. (2003). Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* **12**, 1287-300.

Schwabe, R. F. and Sakurai, H. (2005). IKKbeta phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *Faseb J* **19**, 1758-60.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. et al. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-9.

Shin, H. M., Minter, L. M., Cho, O. H., Gottipati, S., Fauq, A. H., Golde, T. E., Sonenshein, G. E. and Osborne, B. A. (2006). Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. *Embo J* **25**, 129-38.

Shirakata, Y., Shuman, J. D. and Coligan, J. E. (1996). Purification of a novel MHC class I element binding activity from thymus nuclear extracts reveals

that thymic RBP-Ikappa/CFB1 binds to NF-kappaB-like elements. *J Immunol* **156**, 4672-9.

Singh, H., Sen, R., Baltimore, D. and Sharp, P. A. (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* **319**, 154-8.

Sovak, M. A., Bellas, R. E., Kim, D. W., Zanieski, G. J., Rogers, A. E., Traish, A. M. and Sonenshein, G. E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* **100**, 2952-60.

Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5.

Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I. and Ghosh, S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **16**, 5444-9.

Takebayashi, K., Sasai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1994). Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *J Biol Chem* **269**, 5150-6.

Tam, W. F., Lee, L. H., Davis, L. and Sen, R. (2000). Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* **20**, 2269-84.

Tam, W. F. and Sen, R. (2001). IkappaB family members function by different mechanisms. *J Biol Chem* **276**, 7701-4.

Tergaonkar, V., Correa, R. G., Ikawa, M. and Verma, I. M. (2005). Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity. *Nat Cell Biol* **7**, 921-3.

Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S. (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**, 573-82.

Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnica-Worms, H. and Shaw, A. S. (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol* **18**, 5229-38.

Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, N. and Kageyama, R. (1999). The bHLH gene Hes1 is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev* **13**, 1203-10.

Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y. and Inoue, S. (2002). Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* **417**, 871-5.

van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D. J., Radtke, F. et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-63.

van Hemert, M. J., Steensma, H. Y. and van Heusden, G. P. (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**, 936-46.

Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* **22**, 1313-24.

Vincenz, C. and Dixit, V. M. (1996). 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem* **271**, 20029-34.

Wang, J., Shelly, L., Miele, L., Boykins, R., Norcross, M. A. and Guan, E. (2001). Human Notch-1 inhibits NF-kappa B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain. *J Immunol* **167**, 289-95.

Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B. J., Cado, D. and Robey, E. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* **88**, 833-43.

Waterman, M. J., Stavridi, E. S., Waterman, J. L. and Halazonetis, T. D. (1998). ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**, 175-8.

Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., Osborne, B. A., Gottipati, S., Aster, J. C., Hahn, W. C. et al. (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* **8**, 979-86.

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T. and Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-71.

Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. and Griffin, J. D. (2000). MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* **26**, 484-9.

Xiao, W. (2004). Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol* **1**, 425-35.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-71.

Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T. and Gaynor, R. B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* **423**, 655-9.

Yang, F., Tang, E., Guan, K. and Wang, C. Y. (2003). IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* **170**, 5630-5.

Yang, X. J. (2004a). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* **32**, 959-76.

Yang, X. J. (2004b). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**, 1076-87.

Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-24.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-28.

Zhang, P., Chan, S. L., Fu, W., Mendoza, M. and Mattson, M. P. (2003). TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability. *Faseb J* **17**, 767-9.

Zhong, H., May, M. J., Jimi, E. and Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* **9**, 625-36.

Zhong, H., Voll, R. E. and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* **1**, 661-71.

Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W. and Dixit, V. M. (2004). Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* **427**, 167-71.