



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

DEP. BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Regulación del ciclo
celular y la integridad
genómica por la proteína
LANA2 de KSHV**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por
Pedro Gallego Jiménez

DIRECTORA:
Dr. Carmen Rivas Vázquez

Esta tesis ha sido posible gracias a:

- La ayuda JAE-PreDoc para la realización de tesis doctorales en centros e institutos del CSIC (2008-2012).
- Proyecto: “Estudio de la interacción de la proteína viral LANA2 con la familia de proteínas 14-3-3 y el supresor de tumores con actividad antiviral PML”, financiado por la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (2006-2009)
- Proyecto: “Control de los PML-nuclear bodies por la oncoproteína del virus del sarcoma de Kaposi LANA2”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2009-2011).
- Proyecto: “Control de la replicación viral por el supresor de tumores pRb y la acetilasa Sirt1”, financiado por Creación y consolidación de grupos de investigación CSIC (2009).
- Proyecto: “Alteración de los PML-nuclear bodies por la proteína de KSHV/LANA2”, financiado por Proyectos Intramurales especiales CSIC (2007-2008).

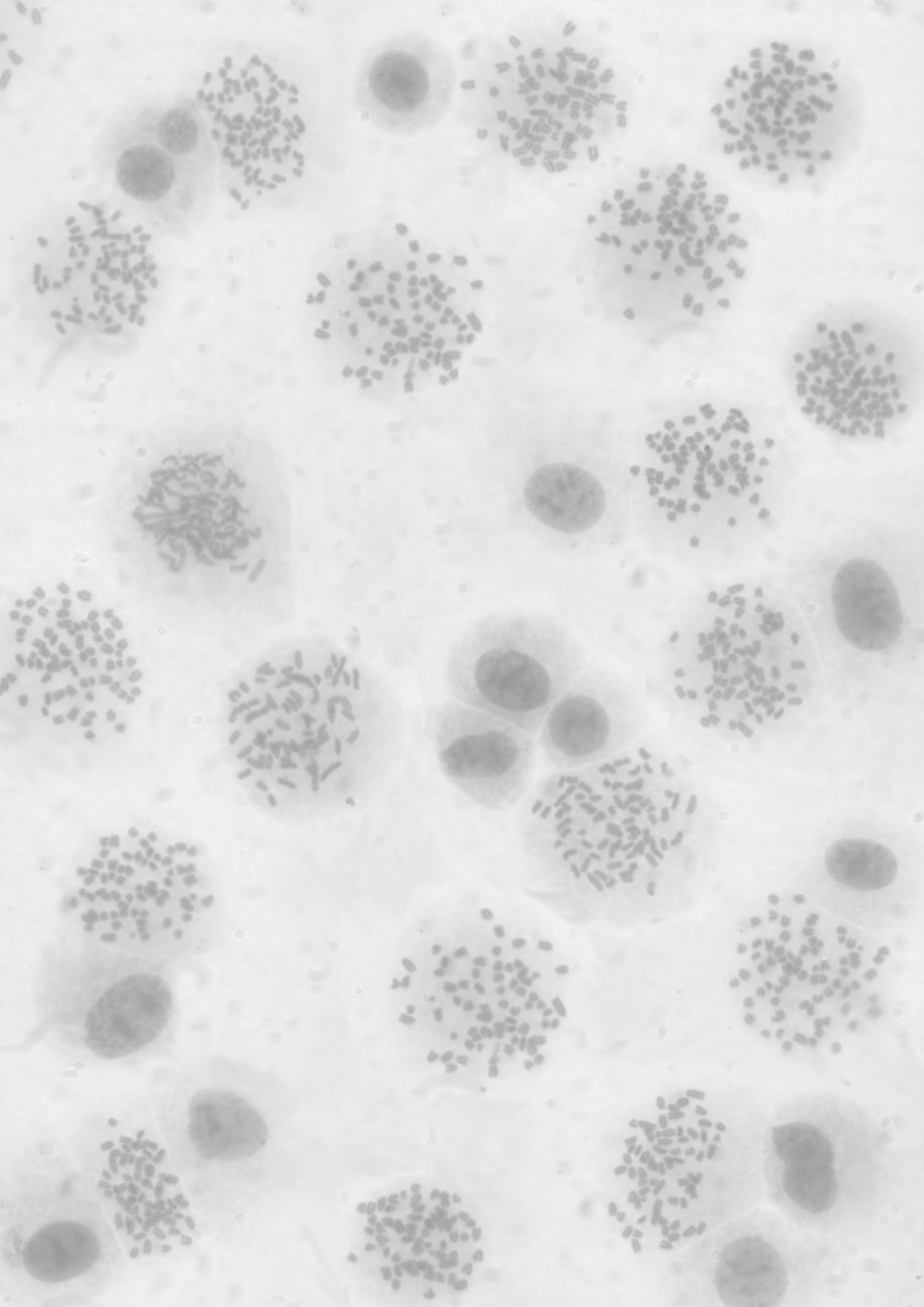
INDICE

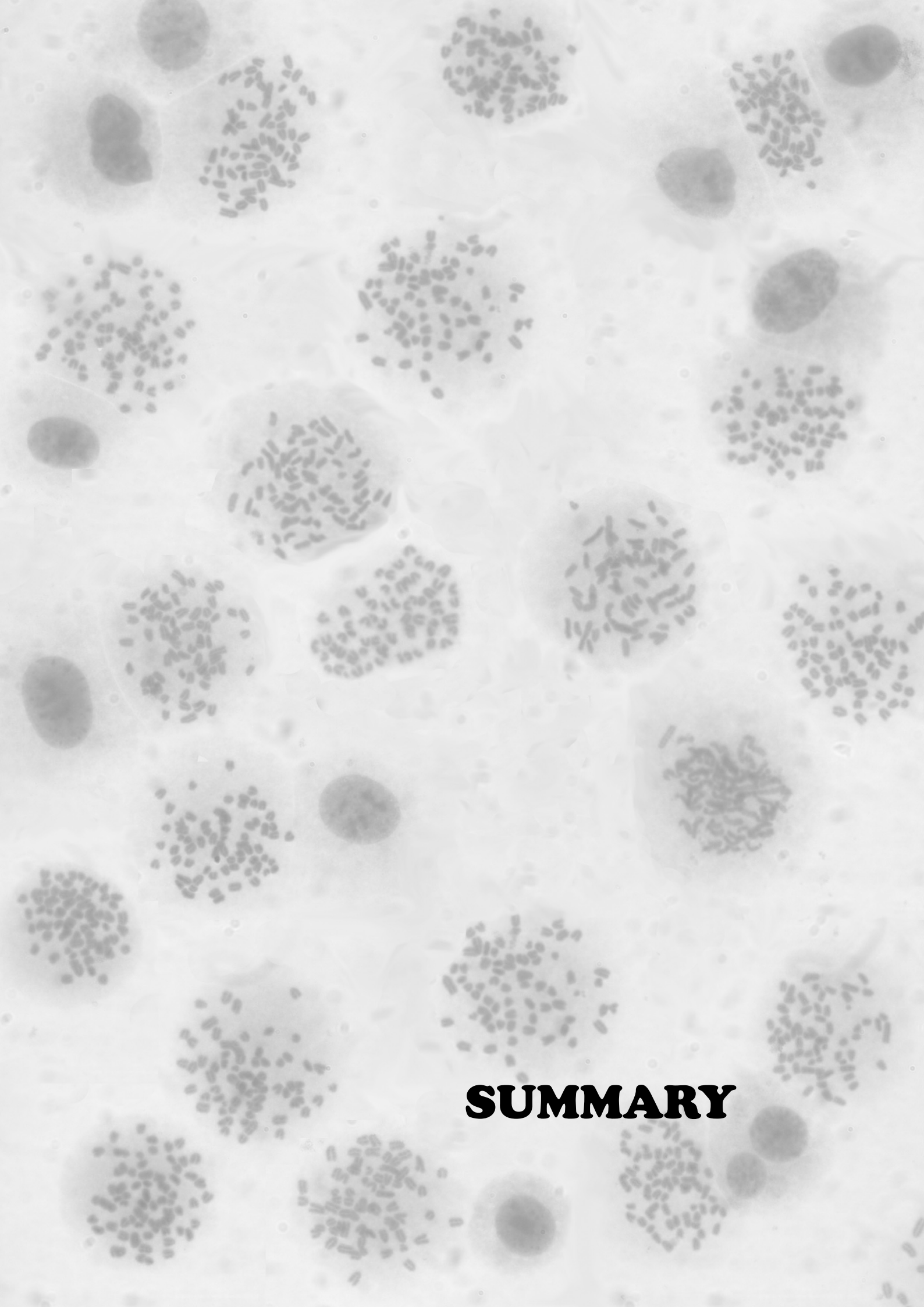
SUMMARY (Inglés)	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Virus del sarcoma de Kaposi (KSHV)	5
2. Antígeno nuclear asociado a latencia-2 (LANA2)	7
3. Regulación transcripcional en células infectadas con KSHV	8
4. Regulación de la expresión	9
5. SUMO	10
6. Ciclo celular y familia de las “pocket proteins”	12
7. Daño al ADN	16
8. Inestabilidad cromosómica	17
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Cultivos celulares	27
1.1. Líneas celulares empleadas	27
1.2. Medios de cultivo	27
1.3. Generación de líneas celulares estables	27
a) Líneas celulares estables para la expresión de LANA2	27
b) Líneas celulares de expresión inducible de LANA2	28
1.4. Transfección	29

a)	Agentes lipídicos	29
b)	Nucleofección	29
c)	Electroporación	29
1.5.	Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo	30
1.6.	Preparación de cromosomas en metafase	30
1.7.	Ensayos de proliferación	31
a)	Ensayo MTT	31
b)	Recuento tras tinción con azul tripán	31
1.8.	Ensayo de formación de colonias en agar blando	31
1.9.	Ensayo de formación de focos	32
1.10.	Ensayo de tumorigenicidad	32
2.	Cultivos bacterianos	32
2.1.	Transformación de bacterias competentes	32
2.2.	Extracción de ADN plasmídico	32
2.3.	Producción de proteínas GST	33
3.	Ácidos nucleicos	33
3.1.	Plásmidos utilizados	33
3.2.	Clonaje	34
a)	pTRE2hyg-GFP	34
b)	pTRE2hyb-GFP-LANA2	35
c)	pGL3-LANA2-Frgmt1	35
d)	pGL3-LANA2-Frgmt2	36
e)	pGL3-LANA2-Frgmt3	37
4.	Proteínas	37
4.1.	Anticuerpos empleados	37
4.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western-Blot (WB)	38

4.3. Inmunoprecipitación	38
4.4. Inmunofluorescencia	39
4.5. Transcripción-traducción <i>in vitro</i>	39
4.6. Ensayos de interacción <i>in vitro</i> de proteínas fusionadas a GST	39
4.7. Ensayos de luciferasa como gen reportero	40
4.8. Purificación de proteínas unidas a cola de histidinas	40
4.9. Ensayo de sumoilación <i>in vitro</i>	41
5. Programas informáticos	41
6. Análisis estadístico	41
RESULTADOS	45
1. La expresión estable de LANA2 induce cambios en la morfología de las células y favorece la proliferación celular	45
2. LANA2 no causa transformación celular	47
3. LANA2 induce inestabilidad cromosómica	50
4. Alteraciones cromosómicas en células que expresan LANA2	53
5. LANA2 inhibe el arresto inducido por nocodazol y por agua oxigenada	53
6. La proteína LANA2 co-localiza con los microtúbulos e interacciona con la tubulina- γ , pero no se asocia a los cromosomas	55
7. La expresión de LANA2 empleando un sistema inducible por doxiciclina favorece la proliferación celular	57
8. LANA2 induce inestabilidad cromosómica en líneas celulares de expresión inducible	59
9. La expresión de LANA2 en fibroblastos primarios de ratón induce inestabilidad cromosómica y apoptosis	61

10.La muerte de los fibroblastos primarios de ratón tras la expresión de LANA2 requiere la expresión de pRb	65
11.La proteína H2AX fosforilada se acumula en células que expresan establemente LANA2 o de forma inducible	65
12.LANA2 altera el patrón de fosforilación de p107 y p130	68
13.LANA2 inhibe la sumoilación de pRb a través del dominio LxCxE	69
14.El dominio LxCxE de LANA2 es necesario para su interacción con p107, pero no con pRb o p130	70
15.LANA2 inhibe el arresto de las células mediado por pRb, independientemente de su dominio LxCxE	72
16.Las “pocket proteins” p107 y p130 se sumoilan, y LANA2 reduce la sumoilación de ambas proteínas gracias a su dominio LxCxE	73
17.Evaluación de la regulación transcripcional de LANA2	75
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONS (Inglés)	91
BIBLIOGRAFÍA	95





SUMMARY

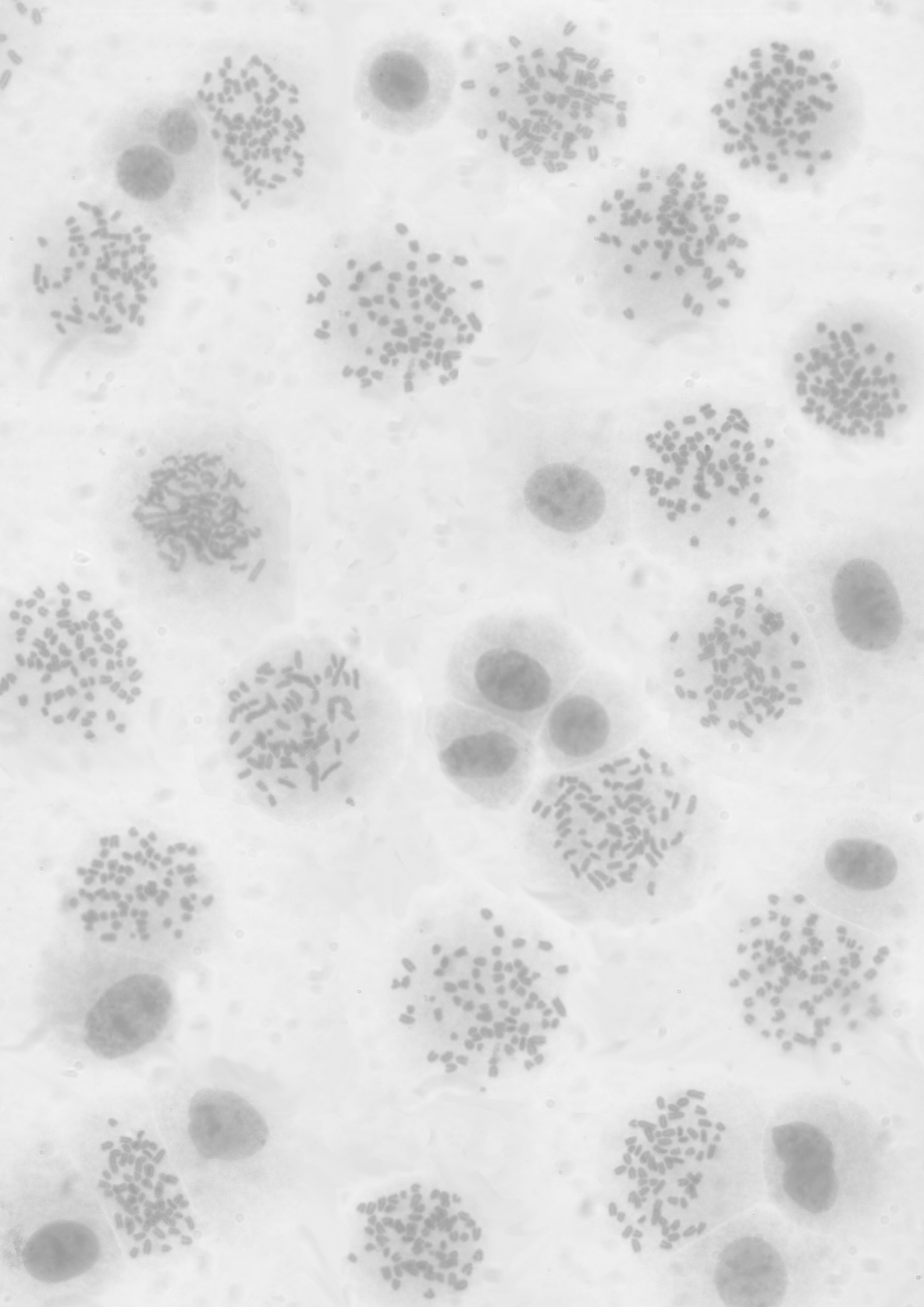
SUMMARY

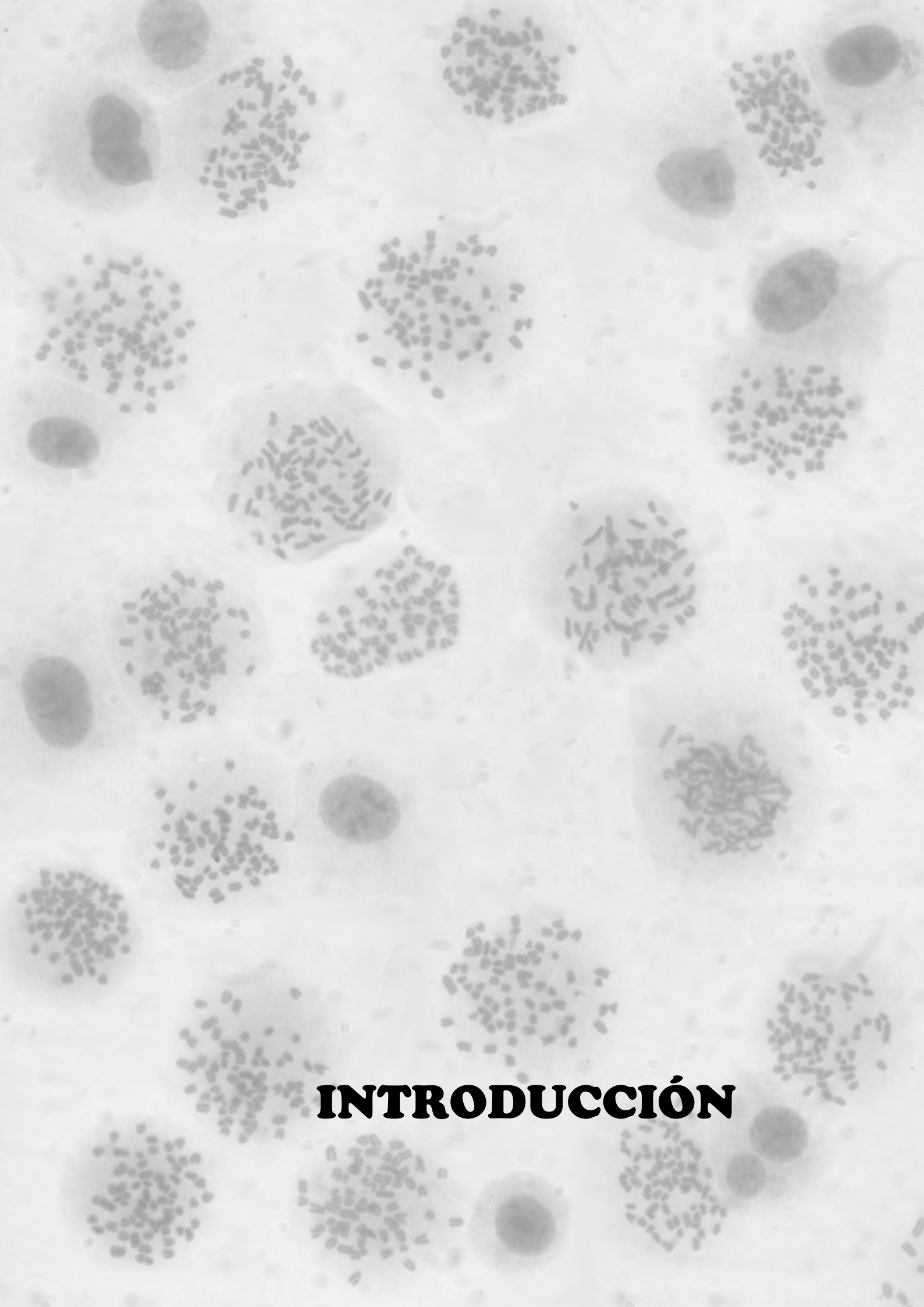
Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), also known as human herpesvirus 8, is associated with three proliferative diseases: multicentric Castleman's disease (CD), Kaposi's sarcoma (KS), and primary effusion lymphoma (PEL). The KSHV genome contains a cluster of open reading frames encoding proteins with homology to the cellular transcription factors of the interferon regulatory factor family (vIRFs). ORFK10.5 encodes the protein latency-associated nuclear antigen 2 (LANA2), also called vIRF3, which is only expressed in KSHV-infected hematopoietic tissues, including PEL and CD. LANA2 has been suggested to play an important role in KSHV-mediated tumorigenesis and it is required for the survival of the B cells infected with KSHV alone or dually infected with Epstein-Barr virus and KSHV. Here we have analyzed the consequences of LANA2 expression in different cell systems. We demonstrate that LANA2 induces centrosome amplification, interacts with microtubules in a cell cycle-dependent manner and inhibits mitotic assembly checkpoint. Consequently, LANA2 promotes chromosome instability and activation of the DNA damage response pathways. The result of this chromosome instability is the induction of cell death of primary cells expressing the viral protein, or the enhancement of Ras-mediated transforming activity. In addition, LANA2 expression also induces a proliferative advantage for immortal cells, although it is not capable of transforming cells on its own.

The induction of chromosome instability by LANA2 could be mediated by its modulation of the pocket proteins pRb, p107 and p130. In this sense, we have observed that LANA2 induces the hyperphosphorylation of p107 or p130, inhibits the cell proliferation arrest mediated by pRb, and inhibits the SUMOylation of the three pocket proteins. In addition, pRb may have a role in the bypass of nocodazol- or hydrogen peroxide-induced G2/M arrest mediated by the viral protein, since primary cells lacking pRb are resistant to the cell death caused by LANA2 expression. It has been suggested that SUMO2 modification of pRb can be related with the induction of senescence, so the expression of LANA2 would be avoiding the senescence process and contributing in that way to the transformation of the KSHV-infected cells.

So far, there are no reports on the regulation of LANA2 transcription. In this work we have identified a region upstream of LANA2 coding region that is transactivated after transfection of B cells, and a putative RBP-Jk response element that negatively modulates its expression, as it has been described for other KSHV genes.

All together, these results identify the induction of chromosome instability by LANA2 as a new mechanism that could contribute to the pathogenesis of the virus, and point to the pocket proteins pRb, p107 and p130 as important players in this process. These results also indicate that although LANA2 can control different cell cycle regulator pathways, it is not sufficient alone to induce cell transformation. Finally, our results also indicate that RBP-Jk may be a crucial regulator of LANA2 transcription.





INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS DEL SARCOMA DE KAPOSI (KSHV)

KSHV, también denominado herpesvirus humano 8 (HHV-8), pertenece a la familia de los gammaherpesvirus, cuyos miembros se caracterizan por su capacidad para establecer latencia en linfocitos (Chang et al., 1994). KSHV es el agente etiológico de diversas enfermedades proliferativas, tales como el linfoma de efusión primario (PEL), el sarcoma de Kaposi (KS) y la enfermedad multicéntrica de Castleman (CD). El sarcoma de Kaposi es una enfermedad proliferativa de carácter multifocal caracterizada por la aparición de células fusiformes en las lesiones, que se producen como resultado de la transformación de células endoteliales (Ganem, 1997). Los PEL son linfomas de células B de tipo no Hodgkin, que generalmente tienen un origen monoclonal, mientras que la CD asociada a KSHV es una hiperplasia policlonal de células B (Schulz, 2001).

El ADN del virus fue aislado por primera vez a partir de lesiones características del KS, presentes en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Chang et al., 1994). El porcentaje de individuos seropositivos para KSHV varía enormemente en función del área geográfica y de la pertenencia a un grupo de riesgo. En la mayoría de los países europeos el porcentaje de población seropositiva es menor al 5%, pero en determinadas zonas de Italia como Sicilia y Cerdeña, se alcanzan valores del 20%. También existe una elevada prevalencia del virus en algunas zonas de Egipto, como en Alejandría (20%) y en poblaciones judías de Israel (10%). En Estados Unidos, aunque en general la población seropositiva se mantiene en valores muy bajos, el porcentaje se eleva hasta un 23% en varones homosexuales infectados por VIH (Atkinson et al., 2003). El área de mayor prevalencia del virus es la zona sub-sahariana de África, en donde el porcentaje de seropositividad puede alcanzar hasta un 87% en determinadas regiones.

El genoma de KSHV está constituido por ADN de doble cadena de aproximadamente 170 kilobases (kB) (Figura 1), organizado en una región central de unas 140 kB flanqueada por múltiples secuencias terminales ricas en G+C (alrededor del 85%) de 801 pares de bases y que se han descrito como sitios potenciales de empaquetamiento (Russo et al., 1996). El genoma del virus se encuentra rodeado por una cápsida proteica icosaédrica, protegida por un tegumento de material amorfo y una envuelta lipídica de unos 120-150 nm de diámetro, en la que se insertan glicoproteínas de superficie. El genoma de KSHV se caracteriza por contener un gran número de genes que presentan alta homología con genes humanos, lo que ha llevado a considerarlo como uno de los mejores ejemplos conocidos de "piratería génica", y que apoya la existencia de una relación entre KSHV y el ser humano muy antigua en términos evolutivos.

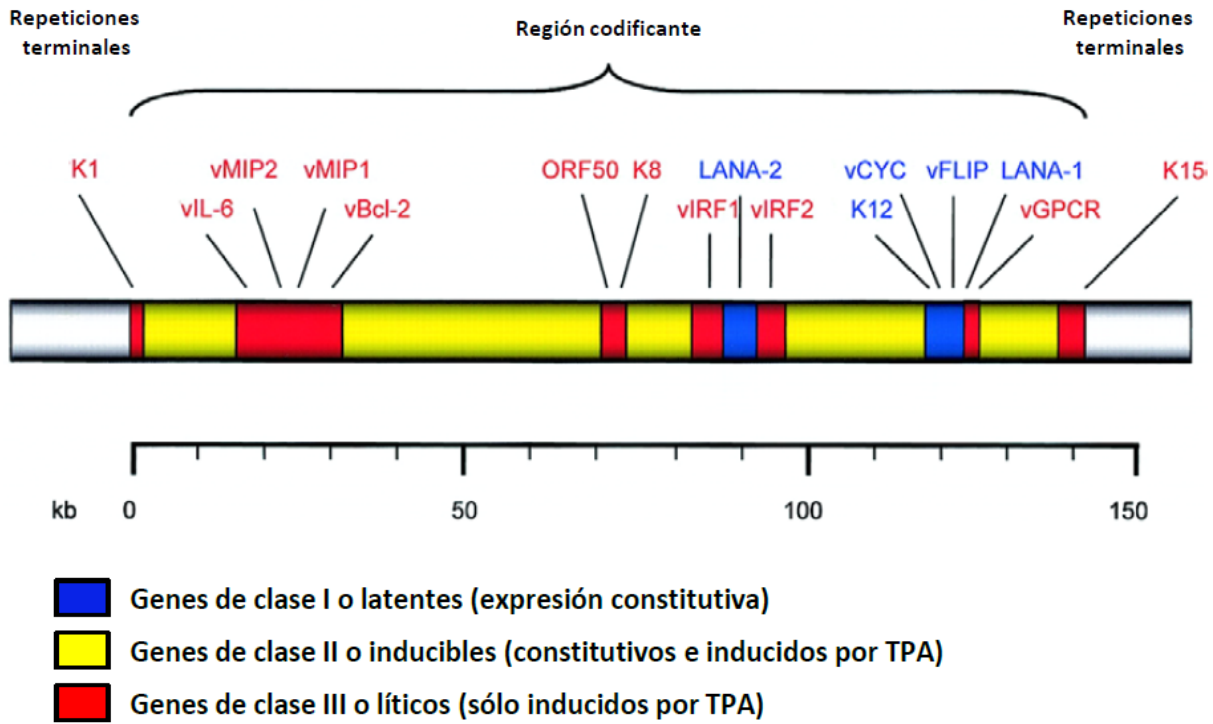


Figura 1. Representación del genoma de KSHV indicando algunos de los genes . Figura modificada a partir de Sodhi, 2004.

Los genes de KSHV se pueden agrupar dentro de tres tipos en función del momento en el que se expresan durante la infección: de clase I, II y III (Parravicini et al., 2000). Los genes de clase I, también denominados genes latentes, son aquellos que se expresan de forma constitutiva durante la fase de latencia del virus y cuya expresión no se induce por el tratamiento con 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), un inductor del ciclo lítico, ni se reprime por la acción del ácido fosfonofórmico (PFA), que inhibe la ADN polimerasa (Yu et al., 1999). En este grupo se incluye un número pequeño de genes, los que codifican las proteínas vFLIP, vCyc, kaposina, LANA1 o LANA2. Dentro de los genes de clase II, se encuentran aquellos que codifican proteínas que, aunque se expresan en fase latente, lo hacen a unos niveles casi indetectables y cuya expresión es inducida en fase lítica o tras el tratamiento con TPA. En este grupo se encuentran, por ejemplo, los genes que codifican vIL6 y vIRF-1. Finalmente, los genes de clase III, cuya expresión sólo ocurre durante la fase lítica de la infección o tras el tratamiento con TPA. Dentro de la clase III se encuentran los genes que codifican las proteínas estructurales del virus y aquellas que están directamente implicadas en la síntesis del ADN (Sarid et al., 1998). Esta clasificación es, sin embargo, artificial, ya que el patrón de expresión de las proteínas de KSHV es, además, dependiente de tejido. De esta forma, las proteínas mencionadas anteriormente, vIL6 y LANA2, se expresan exclusivamente en células hematopoyéticas y no en las células endoteliales infectadas con KSHV (Moore et al., 1996; Rivas et al., 2001).

Debido al carácter tumoral de las células infectadas con KSHV de modo latente, se piensa que la expresión de los genes de clase I contribuye en gran medida al carácter oncogénico del virus. Una de las proteínas codificadas por dichos genes, la proteína LANA2, es en la que se centra este estudio.

2. ANTÍGENO NUCLEAR ASOCIADO A LATENCIA-2 (LANA2)

La proteína latente LANA2, también llamada factor viral regulador del interferón-3 (vIRF3) (Lubyova and Pitha, 2000; Rivas et al., 2001), está codificada por el gen ORFK10.5, ubicado en una región del genoma de KSHV en la que se encuentran diversos genes que presentan una elevada homología con la familia de factores celulares reguladores del interferón (IRFs) (Rivas et al., 2001). En concreto LANA2 presenta una región con elevada homología con IRF-4. Como ya se mencionó anteriormente, LANA2 se expresa exclusivamente en células B infectadas por KSHV y se localiza principal, pero no exclusivamente, en el núcleo de las mismas (Lubyova et al., 2004; Munoz-Fontela et al., 2005; Rivas et al., 2001). Hasta la actualidad se han descrito numerosas actividades de la proteína (Figura 2) que justifican que LANA2 sea esencial para la supervivencia de las células B infectadas con el virus (Wies et al., 2008). De esta forma, se ha demostrado que LANA2 puede regular el sistema inmune del huésped y la apoptosis, al inhibir la actividad de NF- κ B inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , favoreciendo así la supervivencia celular, y probablemente, la replicación viral (Seo et al., 2004). LANA2 también inhibe la activación transcripcional del promotor IFNA mediada por el virus (Lubyova and Pitha, 2000) y bloquea la transducción de señales de la vía del interferón, a través de su interacción con IRF-7 (Joo et al., 2007) e IRF-3, aunque otros resultados indican que LANA2 estimula su actividad transcripcional (Lubyova et al., 2004). Además, LANA2 inhibe la apoptosis inducida tras la activación de la proteína quinasa dependiente del ARN de doble cadena activada por el interferón, PKR (Esteban et al., 2003). Otros trabajos implican a LANA2 en la regulación del ciclo celular. Así, LANA2 inhibe la apoptosis y la activación transcripcional mediadas por p53 (Rivas et al., 2001), interacciona con las proteínas de andamiaje 14-3-3 e inhibe la apoptosis dependiente del factor de transcripción Foxo3a (Munoz-Fontela et al., 2007). Además, LANA2 estimula la actividad transcripcional de c-Myc, contribuyendo así a la disregulación del crecimiento y diferenciación de las células B infectadas con KSHV (Baresova et al., 2012; Lubyova et al., 2007) e interacciona con el factor de hipoxia-1, promoviendo su estabilización y activación transcripcional, lo que implica a LANA2 en procesos de angiogénesis (Shin et al., 2008). Por último, se ha demostrado que la proteína LANA2 modula la dinámica microtubular, mediante su interacción con los microtúbulos (Munoz-Fontela et al., 2008) y favorece la degradación del supresor de tumores PML (Marcos-Villar et al., 2009).

LANA2 interacciona de forma covalente y no covalente con SUMO, y dicha unión modula la capacidad de la proteína viral de regular proteínas que a su vez interaccionan con SUMO. Así, la integridad del dominio de interacción no covalente con SUMO (SIM) de LANA2 es necesaria para la conjugación con SUMO de la propia proteína, y para promover la degradación de PML y desorganizar los dominios oncogénicos de PML (PODs) (Marcos-Villar et al., 2011; Marcos-Villar et al., 2009). LANA2 también se regula a través de su localización subcelular. LANA2 posee una señal de localización nuclear

(NLS) bipartita y una señal de exportación nuclear (NES). Además, existe un dominio de fosforilación por Akt que solapa parcialmente con dicha NES y que también regula la localización subcelular de la proteína (Munoz-Fontela et al., 2005).

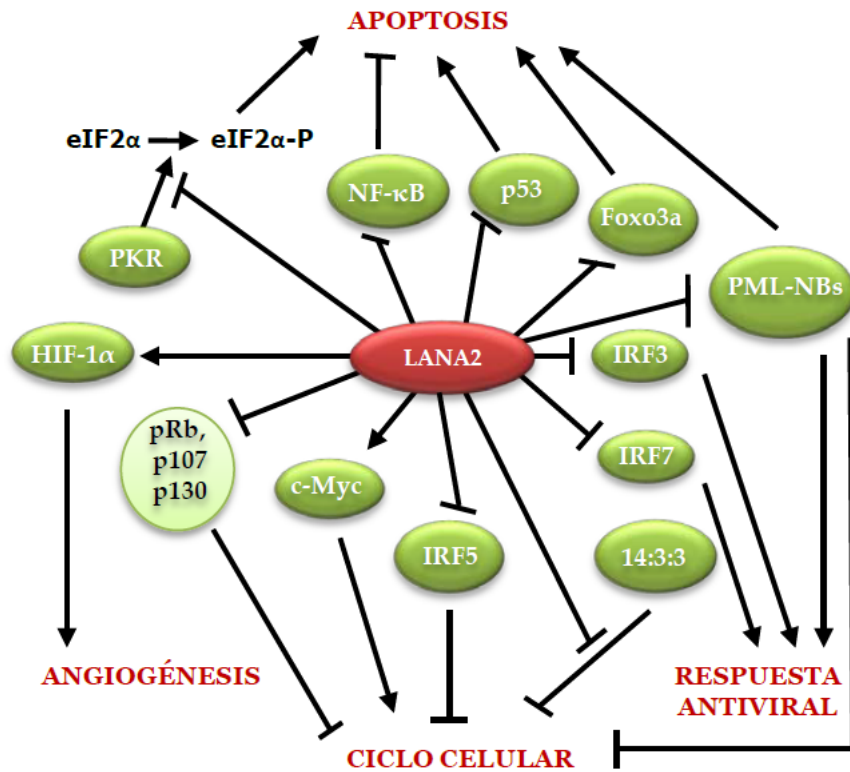


Figura 2. Resumen de las funciones de LANA2 descritas.

3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN CÉLULAS INFECTADAS CON KSHV

Durante la latencia de los herpesvirus, el episoma viral se une a histonas y se organiza en nucleosomas, asemejándose en su estructura a la de la cromatina celular. De hecho, varios estudios han identificado que la metilación del ADN y la acetilación de las histonas pueden jugar un papel en la regulación de la expresión génica de KSHV, de forma similar a lo que ocurre en la célula (Chen et al., 2001; Lu et al., 2003). El factor inmediato temprano de KSHV codificado por el ORF50, Rta, es el principal regulador de la entrada de KSHV en ciclo lítico (Lukac et al., 1998). Durante la latencia del virus, el promotor de Rta se asocia a deacetilasas de histonas (HDACs) que inhiben la expresión del gen (Lu et al., 2003). Además, la elevada metilación del ADN en estas zonas contribuye a reprimir su expresión durante la latencia (Chen et al., 2001). En general, se observó que en el genoma de KSHV en latencia, las modificaciones de histonas asociadas a activación (H3K9me3 y H3K27me3) se encuentran enriquecidas en genes que se expresan constitutivamente en latencia y en regiones genómicas que contienen genes líticos tempranos, mientras que, las señales represoras (H3k9me3 y H3K27me3) se encuentran principalmente en regiones del genoma que codifican para genes líticos tardíos y permanecen durante la fase temprana de reactivación (Toth et al., 2010).

4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN

Las células tumorales en general conservan muchas de las características del tipo celular del que provienen y esto es especialmente cierto en linfomas de células B, donde la morfología, inmunofenotipos y secuencias de genes de inmunoglobulinas (Ig) permiten clasificarlos por su célula de origen (Jenner et al., 2003). Sin embargo, las células PEL muestran una baja expresión de marcadores típicos de células B, como son los antígenos asociados a células B CD19, CD20, CD22 y/o CD79a, inmunoglobulinas de superficie y/o citoplásmicas. Además, no suelen expresar factores de transcripción típicos de células B como PAX-5 y Bcl-6 (Chadburn et al., 2004; Jenner et al., 2003). Una caracterización exhaustiva de los marcadores presentes en las mismas ha llevado a sugerir que, las células PEL provienen de centros postgerminales (Cesarman and Knowles, 1999), ya que expresan CD138 (Gaidano et al., 1997), BLIMP-1 (Chadburn et al., 2004) y MUM1/IRF4 (Carbone et al., 2000), que están asociados con fases tardías de la diferenciación de células B. Sin embargo, en algunos casos las secuencias de los genes para Ig no están mutados, lo que indican que no hubo selección por antígeno y por tanto, que dichas PEL tienen un origen en centros pregerminales. Todo esto sugiere que las PEL están representadas por células B transformadas en diferentes estados de la ontogenia (Matolcsy et al., 1998).

Uno de los factores de transcripción más importantes para la regulación de la transcripción de genes de KSHV es la proteína JK de unión a la señal de recombinación (RBP-Jk). RBP-Jk es una proteína monomérica de 60 kDa que se une a la secuencia de ADN consenso (C/T)GTGGGAA (Chung et al., 1994). En ausencia de una señal Notch, RBP-Jk unido a ADN reprime la transcripción por unión a correpresores de la transcripción asociados a deacetilasas de histonas, lo que resulta en el silenciamiento de la transcripción de la cromatina (Zhou et al., 2000; Zhou and Hayward, 2001). Tras la activación de Notch, el dominio intracelular del receptor se une a RBP-Jk para liberar los complejos de represión transcripcional y junto con otras proteínas, forma el complejo potenciador Notch. Este complejo multiproteico recluta proteínas acetiltransferasas de histonas y factores de elongación y transactiva la transcripción (Carroll et al., 2006). RBP-Jk juega un importante papel en el control del ciclo de vida de KSHV. RBP-Jk es clave para la replicación lítica viral, ya que fibroblastos murinos carentes de RBP-Jk tienen dramáticamente inhibida la reactivación de KSHV (Liang and Ganem, 2003). Estudios más extensos han demostrado que la inducción por RTA de numerosos promotores líticos virales como ORF57, ORF59 y ORF47, dependen de la unión al dominio represor de RBP-Jk activando así distintos promotores (Chang et al., 2010; Liang et al., 2002; Liu et al., 2008). RBP-Jk está también involucrada en el establecimiento de la latencia de KSHV. La activación del promotor de LANA por RTA es dependiente de RBP-Jk (Lan et al., 2005). Además, LANA interacciona directamente con RBP-Jk para reprimir el promotor de Rta y compete con Rta por unirse a RBP-Jk, lo que es importante para el mantenimiento de latencia de KSHV (Lan et al., 2005).

5. SUMO

SUMO (pequeño modificador relacionado con ubiquitina) es una proteína que se conjuga covalentemente de forma reversible a un residuo lisina del sustrato, modulando así las interacciones de las proteínas diana con otros factores en la célula. De esta forma, las consecuencias de la sumoilación son dependientes de cada sustrato y puede suponer cambios de localización del sustrato, la regulación de su estabilidad o una modulación de la actividad de la proteína (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

La proteína SUMO tiene un tamaño aproximado de 11 KDa, pero produce un incremento de alrededor de 20 KDa en el peso molecular del sustrato al que se conjuga. SUMO posee una estructura muy parecida a la de ubiquitina (Bayer et al., 1998), aunque ambas proteínas sólo comparten un 20% de identidad de secuencia de aminoácidos. SUMO se expresa en todo el reino eucariota y en humanos el genoma codifica para cuatro proteínas diferentes: SUMO1, SUMO2, SUMO3 Y SUMO4. SUMO4 parece expresarse únicamente en riñón, bazo y nódulos linfáticos (Guo et al., 2004). SUMO 2 y SUMO3 son idénticas en el 97% de su secuencia aminoacídica, pero sólo comparten un 50% de identidad con SUMO1 (Saitoh and Hinchey, 2000).

En el proceso de conjugación de SUMO se produce la formación de un enlace peptídico entre el residuo glicina del extremo C-terminal de SUMO y el grupo ϵ -amino del residuo lisina de la proteína sustrato. Se ha descrito la secuencia consenso de sumoilación ΨKxE , donde Ψ es un aminoácido alifático, K la lisina a la que se conjuga SUMO, x puede ser cualquier aminoácido y E ácido glutámico. Sin embargo, cada vez son más las proteínas que se ven sumoiladas en residuos lisina que no se encuentran en estos dominios consenso. La unión covalente de SUMO se produce a través de una cascada de reacciones enzimáticas en la que intervienen tres tipos de enzimas. El primer paso es la activación de la proteína SUMO mediante proteasas específicas (SENPs), que maduran el precursor de SUMO mediante la eliminación de un pequeño fragmento en el extremo C-terminal de la proteína, dejando al descubierto el motivo Gly-Gly que es esencial para la conjugación. El SUMO activado se transfiere a la enzima E1 formada por el heterodímero AOS1-UBA2 (Johnson et al., 1997). Posteriormente, SUMO se transfiere a la enzima E2 UBC9, y de ahí al sustrato mediante la formación de un enlace isopeptídico el residuo de glicina en el extremo C-terminal de SUMO y el residuo de lisina del sustrato gestionado por una E3 ligasa específica de SUMO. El resultado de la sumoilación es la conjugación de una única molécula de SUMO1 a cada lisina. Sin embargo, a diferencia de SUMO1, las moléculas de SUMO2 o SUMO3 poseen en su secuencia sitios de conjugación de SUMO, lo que puede dar lugar a la unión de cadenas de SUMO2/3 a cada lisina. La conjugación de SUMO al sustrato es transitoria y finaliza mediante la desconjugación de SUMO a través de la acción de sentrininas (SENP) (Figura 3).

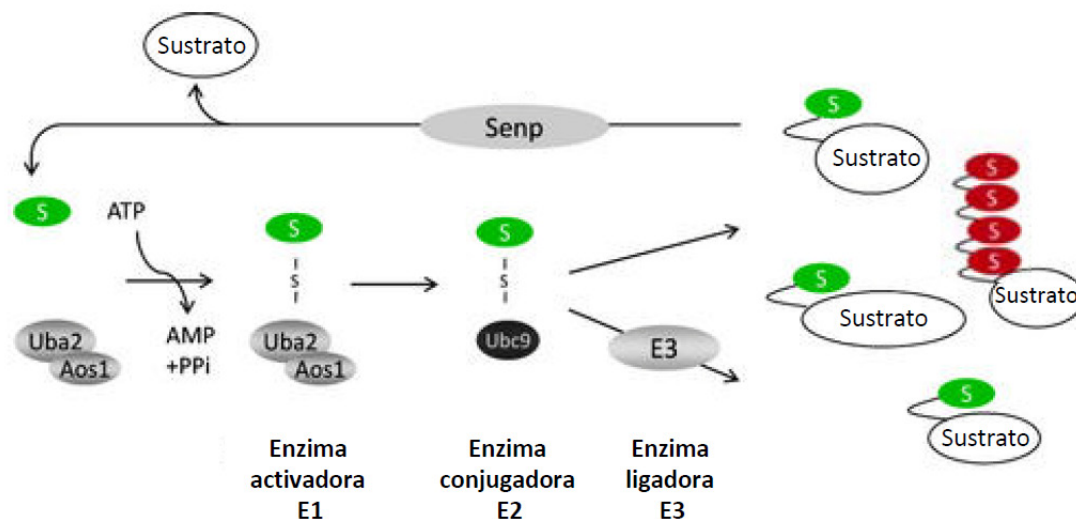


Figura 3. Esquema del proceso de conjugación de SUMO. Conjugación de SUMO1 (S en verde) o cadenas de SUMO2 (S en rojo) mediante las enzimas E1, E2 y E3, y desconjugación de SUMO a través de proteasas específicas (Senps).

A nivel molecular, la conjugación de SUMO con un sustrato puede conducir a la ocultación o exposición de sitios de unión con otros sustratos modificando así su relación con otras proteínas (Reverter and Lima, 2005). Además, muchas proteínas sumoiladas poseen dominios de interacción no covalente a SUMO (dominio SIM), formados por cuatro aminoácidos dispuestos en el siguiente orden: (V/I/L)-x-(V/I/L)-(V/I/L) o (V/I/L)-(V/I/L)-x-(V/I/L), donde x puede ser cualquier aminoácido (Hecker et al., 2006; Song et al., 2005), que les permite unirse a SUMO o a otras proteínas sumoiladas.

El proceso de sumoilación puede, además, estar regulado a través de distintos mecanismos. Muchas proteínas se modifican por SUMO sólo en respuesta a estímulos extracelulares o intracelulares, como el estadio del ciclo celular, el estado nutricional, choques térmicos o daños al ADN. En ocasiones, la sumoilación involucra a otras modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, la fosforilación de residuos próximos a la lisina a la que se conjuga SUMO puede favorecer la sumoilación (Hietakangas et al., 2006) o regularla negativamente (Desterro et al., 1998). Además, existen modificaciones post-traduccionales que compiten con SUMO por las lisinas, como son la acetilación, metilación o ubiquitinación.

Es importante destacar que normalmente es sólo una pequeña fracción de la proteína la que se sumoilta en un momento dado. Sin embargo, sus efectos son dramáticos, y se ha visto que es necesario un equilibrio en los procesos de sumoilación para el funcionamiento de la célula. SUMO es necesario para la reparación del ADN (Hardeland et al., 2002) y un aumento o una disminución en los procesos de sumoilación están relacionados con diversas enfermedades tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas o cardiovasculares (Sarge and Park-Sarge, 2009).

6. CICLO CELULAR Y FAMILIA DE LAS “POCKET PROTEINS”

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y su división en dos células hijas. La división celular se divide en dos fases: mitosis (M) o proceso de división nuclear, y la interfase, que es el interludio entre dos fases M. A su vez, la mitosis se divide en diversas fases: profase, metafase, anafase y telofase. La interfase incluye las fases G1, S y G2 (Norbury and Nurse, 1992). Durante la fase S tiene lugar la replicación del ADN, que ocurre posteriormente a la fase G1, durante la cual la célula se prepara para la síntesis de ADN, y le sigue la fase G2, en la que la célula se prepara para realizar la mitosis. Las células en G1 pueden, antes de llevar a cabo la replicación del ADN, entrar en un estado de quiescencia llamado G0, en el que se encuentran la mayor parte de las células que no crecen ni proliferan en el cuerpo humano (Vermeulen et al., 2003) (Figura 4).

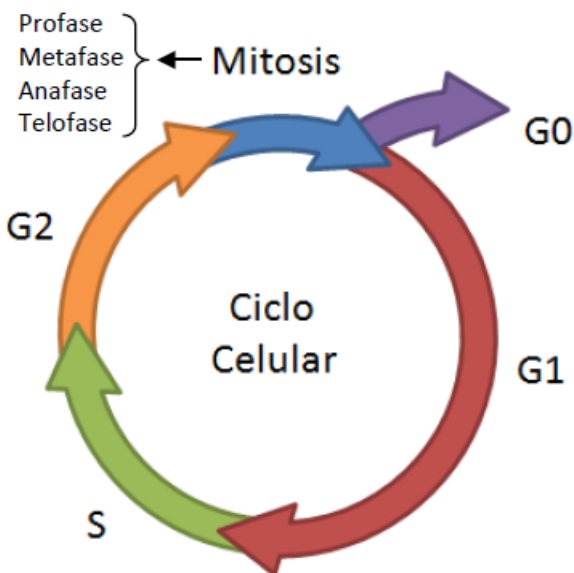


Figura 4. Esquema del ciclo celular. Las células que entran en G1 duplican su tamaño y aumenta la cantidad de organelas, enzimas y otras moléculas. A continuación, durante la fase S, la célula duplica su ADN, existiendo en este momento dos copias de la información genética. Al pasar a G2, las estructuras necesarias para la división empiezan a organizarse y los cromosomas comienzan a condensarse. Durante la mitosis, que comprende profase, metafase, anafase y telofase, los dos juegos de cromosomas se separan y el citoplasma se divide, dando lugar a dos células hijas iguales.

El ciclo celular se encuentra regulado por numerosos genes que actúan en distintos momentos del ciclo: hay genes que codifican para proteínas necesarias para el avance del ciclo celular y los que lo modulan negativamente llamados supresores de tumores. Dentro de este último grupo encontramos, por ejemplo, la familia de las “pocket proteins”.

La familia de las “pocket proteins” está constituida por la proteína del retinoblastoma (pRb) y las proteínas p107 y p130. Todas ellas comparten una estructura y función biológica similar, como es la regulación del ciclo celular. Además de su función en el control del ciclo celular, las “pocket proteins” también tienen un papel en la respuesta de daño a ADN, apoptosis y diferenciación (Cobrinik, 2005). Las tres tienen en común dos subdominios llamados A y B, que están separados por una región espaciadora altamente conservada. La presencia de esta región espaciadora permite el ensamblaje de los dos subdominios en una estructura similar a un bolsillo (“pocket”) y por esta razón los tres miembros de

la familia Rb son conocidos como “pocket proteins” (Giordano et al., 2007). Estas proteínas modulan negativamente la transición de G1 a S a través de la regulación de los genes que responden a los factores E2F (Cobrinik, 2005) y que son necesarios para la entrada en fase S.

Uno de los mecanismos que regulan la actividad de pRb son las modificaciones postraduccionales de la proteína, como son la fosforilación y la sumoilación. La fosforilación de pRb la llevan a cabo diversas ciclinas: ciclina D, actuando con Cdk4 o Cdk6, fosforilan a pRb en fase G1 temprana e intermedia, y ciclina E, con Cdk2, fosforilan a pRb en fase G1 tardía. Además, se ha descrito que deben de existir también otras kinasas implicadas en la fosforilación de Rb (Garnovskaya et al., 2004) En cuanto a su defosforilación, está mediada por la proteína fosfatasa I (Ludlow et al., 1993). De este modo, pRb se encuentra hipofosforilada en G0. Durante la progresión de G1 incrementa su estado de fosforilación y se mantiene hiperfosforilada hasta momentos finales en la mitosis. Cuando pRb se encuentra hipofosforilada se une e inhibe el dominio de transactivación de E2F, mientras que la fosforilación de pRb permite la liberación de E2F, con lo que permite la expresión de genes que median la entrada a fase S (Cobrinik, 2005; Flemington et al., 1993). De este modo, la pérdida o inhibición de su actividad conlleva la desregulación de E2F y la proliferación celular inapropiada. Esto ocurre, por ejemplo, tras la expresión de oncoproteínas de virus de ADN tumorales que al unirse a pRb desplazan a E2F (Dyson et al., 1992), tras la fosforilación inapropiada de pRb debido a la sobreexpresión de ciclinas D o tras la pérdida del inhibidor de Cdk4 o Cdk6, p16INK4A (Weinberg, 1995) (Figura 5). En el caso de la

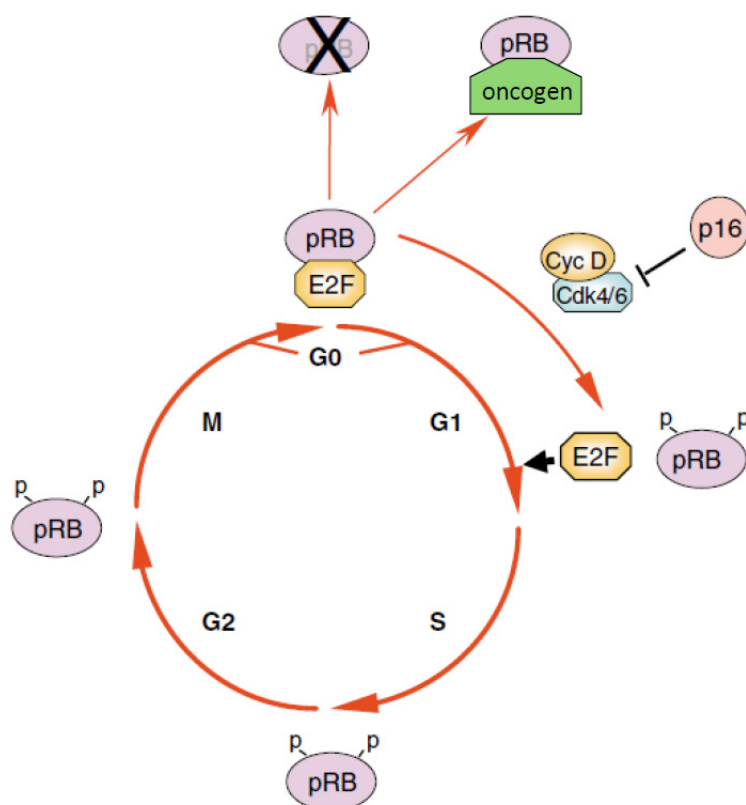


Figura 5. Esquema del control del ciclo celular ejercido por pRB. pRB se une a E2F y lo inhibe en G0 y al inicio de G1. En células en proliferación pRB es fosforilada por ciclina D-Cdk4/6 dejando libre a E2F, lo que favorece la entrada en fase S. La interacción pRB-E2F puede estar perturbada en células en las que hay una mutación del gen RB, por unión de pRB a oncoproteínas de virus de ADN tumorales, o por fosforilación inapropiada de pRB debido a sobreexpresión de ciclina D, pérdida del inhibidor de Cdk4/6 (p16INK4A), o por mutación o sobreexpresión de los genes Cdk4 o Cdk6 (figura tomada de Cobrinik 2005).

sumoilación de pRb, se ha descrito que tiene lugar en el residuo de lisina 720 y que se ve inhibida por la interacción con proteínas celulares o virales que poseen el dominio LxCxE, de interacción con el dominio “pocket”. Además, se ha descrito que la forma de pRb hipofosforilada es la que mayoritariamente se ve sumoilada (Ledl et al., 2005) y aunque no se conoce exactamente cómo la sumoilación de pRb afecta a su actividad, se ha descrito que un mutante de pRb en el sitio de sumoilación ve favorecido su efecto represor sobre E2F (Ledl et al., 2005).

Entre las “pocket proteins”, p107 y p130 están más relacionadas entre sí, que cada una de ellas con pRb, tanto en términos de estructura como de función (Classon and Dyson, 2001). La fosforilación de p107 o p130 también conlleva la liberación de los factores de transcripción de la familia E2F, al igual que ocurre con pRb. Sin embargo, cada “pocket protein” se une con distinta preferencia a distintos factores E2F, que median la regulación de diferentes genes (). Además, mientras que la expresión de p107 se ve favorecida en células proliferando y p130 en células arrestadas, pRb se expresa en ambas (Classon and Dyson, 2001).

A pesar de que muchas de las actividades de las “pocket proteins” se ejercen gracias a su interacción con E2F, otras funciones de dichas proteínas no dependen de dicha interacción. Así por ejemplo, pRb, p107 y p130 se unen e inhiben a ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2 (Kondo et al., 2001; Zhu et al., 1995). pRb puede, además, inhibir la actividad Cdk y la progresión de G1-S mediante el incremento de la expresión de p27 (Ji et al., 2004). Por otro lado, pRb puede inducir la formación de PODs (Fang et al., 2002), estructuras que tienen un amplio efecto en la proliferación celular, diferenciación y supervivencia (Salomoni and Pandolfi, 2002).

Junto con la regulación de la transición de G1 a S, las “pocket proteins” también pueden modular la transición temprana de G0 a G1. Las células en G0 se distinguen de aquellas que están en G1 por su menor contenido en ARN, fruto de una menor producción de ARN ribosomales y ARN transferentes (Ren and Rollins, 2004). Las “pocket proteins” en su estado hipofosforilado reprimen la expresión génica del ARN ribosomal y ARN transferente contribuyendo a la fase G0, mientras que su fosforilación puede permitir la restauración de los niveles de dichos ARNs y favorecer así el paso de G0 a G1 (Scott et al., 2001).

pRb también está conectada con la replicación a través de su papel en la prevención de la rereplicación genómica. pRb inhibe la producción espontánea de células poliploides y suprime el incremento de poliploidía que ocurre en células que experimentan daño en el ADN en fase S, en células que son bloqueadas en G2/M por expresión ectópica de inhibidores de kinasas de ciclinas (CKIs) y en células que están bloqueadas en fase M por drogas inhibidoras de microtúbulos (Harrington et al., 1998; Niculescu et al., 1998).

A pesar de que pRb y p107/p130 no regulan los genes que responden a E2F de una manera totalmente redundante, estas proteínas muestran una considerable redundancia a nivel del ciclo celular. Por ejemplo, en fibroblastos deficientes de pRb, la capacidad de arrestar en G0/G1 genera un incremento compensatorio de p107, que interesadamente, también ocurre en células tumorales humanas deficientes en pRb, teniendo un efecto antiproliferativo particularmente importante en células que tienen Ras activo (Williams et al., 2006). De esta forma se sabe que ciertos tipos celulares pueden depender de una “pocket protein” específica bien porque los otros miembros de la familia son expresados a niveles bajos o porque no se ha producido su incremento de forma compensatoria después de la pérdida inicial de alguna de las “pocket proteins” (Cobrinik, 2005).

Se han identificado diversas proteínas de virus tumorales capaces de interactuar con las “pocket proteins” y modular su actividad. Entre las proteínas virales que tienen como diana a pRb, p107 y p130, se encuentran la proteína E1A de adenovirus, la proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV) o el antígeno T grande (LTA) del virus SV40. Estas oncoproteínas virales reprimen la sumoilación de pRb gracias al dominio LxCxE que poseen en su secuencia (Ledl et al., 2005). Las tres proteínas tienen dominios LxCxE de interacción con el dominio “pocket”, aunque las tres proteínas interactúan además con las “pocket proteins” a través de otros dominios (Bargonetti et al., 1992; Zalvide and DeCaprio, 1995). E7 induce la desestabilización de pRb, E1A inhibe su sumoilación y tanto E1A como LTA inhiben la fosforilación de p107 y p130 (Lin and DeCaprio, 2003; Zalvide and DeCaprio, 1995). Otro ejemplo es la ciclina K codificada por el genoma de KSHV, que se une con Cdk6 permitiendo la interacción en múltiples sitios de pRb, facilitándose así la salida de quiescencia en las células infectadas (Child and Mann, 2001). Además, la proteína LANA de KSHV, aunque no posee un dominio LxCxE, se ha visto que interactúa con pRb y lo inactiva, permitiendo la expresión de genes diana de E2F para la progresión de ciclo celular (Radkov et al., 2000). En trabajos previos en nuestro laboratorio se observó que la proteína de KSHV objeto de estudio en esta tesis, LANA2, interactúa con las tres “pocket proteins” y que además posee uno de estos dominios LxCxE.

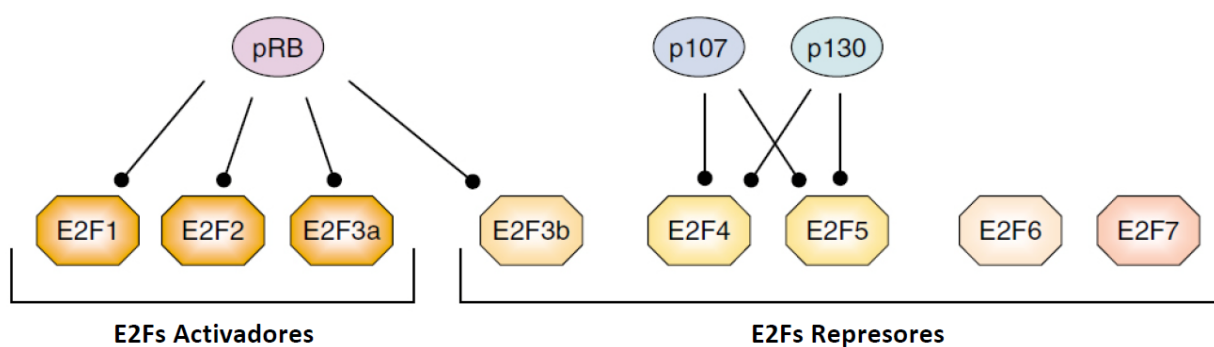


Figura 6. Interacción entre las “pocket proteins” y los factores de transcripción E2F. pRB se une preferentemente a E2Fs activadores, como E2F1, E2F2, y E2F3a, secuestrándolos y evitando su función. También se puede unir a E2F3b, formando complejos represores. P107 y p130 se unen preferentemente a E2Fs represores como E2F4 y E2F5. E2F6 y E2F7 son también represores pero no se unen a las “pocket proteins”. De este modo, se pone de manifiesto que las “pocket proteins” no tienen un papel totalmente redundante (figura tomada de Cobrinik 2005).

7. DAÑO AL ADN

En las células, debido tanto a factores ambientales como metabólicos, se producen toda una serie de lesiones en el ADN que se conocen como daño al ADN. La reparación de dichas lesiones son críticas para que la célula pueda seguir realizando sus funciones por lo que es necesario que exista un proceso de reparación del ADN que de forma constante esté identificando y corrigiendo los daños producidos. En las células existen diversos mecanismos, a veces redundantes, involucrados en responder al daño en el ADN. Una de las proteínas importantes en esta respuesta a daño al ADN (DDR) es ATM. ATM es una protein kinasa que es reclutada y activada por daño al ADN de doble cadena. Se encarga de fosforilar varias proteínas que inician la activación del punto de control del daño al ADN, incluyendo p53, CHK2 y H2AX (Lee and Paull, 2007), que llevarán a la célula a arrestarse, a reparar el ADN o su entrada en apoptosis.

Uno de los posibles estreses a los que puede verse sometida una célula y que llevan a la activación de la DDR es la infección por virus tumorales. Aproximadamente el 20% de los casos de cáncer en humanos tienen una etiología infecciosa, y de ellos cerca del 80% son de origen viral (Bouvard et al., 2009). Recientemente, varios estudios han revelado una relación de ciertas oncoproteínas virales y la inducción de DDR en las células (Figura 7). La replicación de virus tumorales está intrínsecamente unida a su habilidad para inducir proliferación celular. La mayoría de estos virus infectan células quiescentes

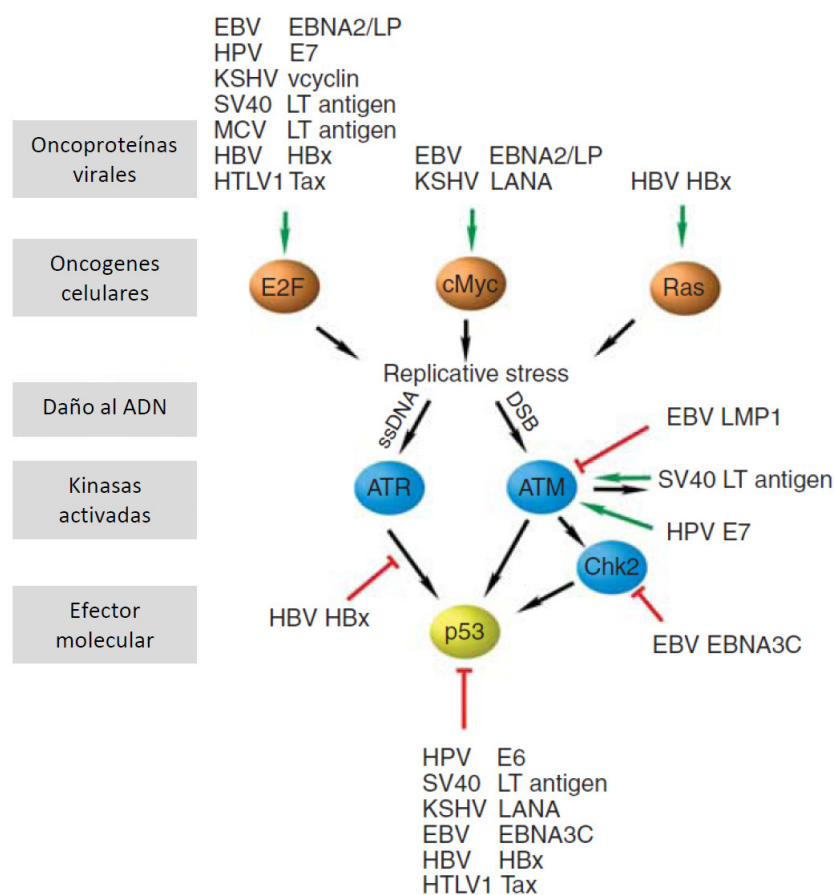


Figura 7. Interrelación entre oncoproteínas virales y la respuesta de daño al ADN. Algunas oncoproteínas virales activan oncogenes con el fin de entrar en ciclo. Esto conlleva la ruptura de una cadena en el ADN (ssDNA), induciendo con ello estrés replicativo, o rupturas en la doble cadena (DSB) generadas durante la reparación del ADN de cadena única. Estas rupturas son reconocidas por las kinasas ATR y ATM, que regulan la señalización hacia Chk2 y p53, entre otras. Las oncoproteínas de virus tumorales modulan la función de los componentes de la respuesta a daño al ADN mediante activación o supresión (figura adaptada de Nikitin Luftig, 2012).

llevándolas a la reentrada en el ciclo celular promoviendo así, un ambiente que facilite la replicación de los ácidos nucleicos virales. La consecuencia de dicha inducción de proliferación celular es el estrés replicativo, similar al producido por la activación de un oncogen celular, lo que induce daño al ADN. Como se mencionó anteriormente, los virus tumorales de ADN antagonizan la represión transcripcional mediada por las proteínas de la familia de pRb, promoviendo la proliferación celular, lo que activa una DDR dependiente de ATM (Rogoff et al., 2004). Esto ocurre también tras la expresión de oncoproteínas virales (Koopal et al., 2007; Nikitin et al., 2010) y como mencionamos anteriormente, una DDR adecuada es fundamental para el funcionamiento apropiado de la célula y para preservar la integridad del genoma. Así, defectos en DDR son la causa de mayor mutagénesis e inestabilidad cromosómica con consecuencias fatales para la célula. Existe una intensa interrelación entre DDR e inestabilidad cromosómica ya que a su vez, procesos inductores de inestabilidad cromosómica tales como errores en la segregación cromosómica son la causa de daño en el ADN y por lo tanto inducen una DDR. Esto se observa por ejemplo tras la expresión de la oncoproteína v-Cyc de KSHV. v-Cyc promueve la poliploidía y defectos en la citocinesis (Verschuren et al., 2002) debido a que induce la amplificación de centrosomas y un arresto en la fase S (Koopal et al., 2007) activando ATM. Otro ejemplo es el antígeno T grande de SV40 que se une al componente del punto de control de ensamblaje del huso mitótico Bub1, induciendo la activación de ATM/ATR (Hein et al., 2009).

8. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

La inestabilidad cromosómica se define como una tasa excesiva de cambios cromosómicos, tanto numéricos como estructurales (Saunders et al., 2000). La existencia de inestabilidad cromosómica en células tumorales y los datos que sugieren una relación entre inestabilidad cromosómica y un peor pronóstico de las enfermedades proliferativas, ha llevado a que sea considerado como un factor importante en cáncer, tanto en el inicio como en la progresión tumoral (Nowak et al., 2002).

Los cambios estructurales que tienen lugar cuando se ha producido inestabilidad cromosómica pueden ocurrir a nivel cromosómico (translocaciones, pérdidas o ganancias de fragmentos cromosómicos) o a nivel nucleotídico, afectando a la estructura o expresión génica (Bayani et al., 2007). Se han apuntado diversas causas como posibles promotoras de dichos cambios estructurales. Entre ellas se pueden citar fallos en las vías de reparación del ADN, o la existencia de cambios epigenéticos tales como el silenciamiento por la metilación del ADN o que tengan lugar procesos de recombinación mitótica ilegítima inter- o intra-cromosoma (Jefford and Irminger-Finger, 2006). En cuanto a los cambios numéricos asociados a la inestabilidad cromosómica, se ha comprobado que la maquinaria mitótica es una potencial fuente de aneuploidía en tumorigénesis (Pihan and Doxsey,

1999) (Figura 8). La formación y la función del huso mitótico requieren una compleja serie de eventos encadenados espacial y temporalmente. Por ello, existen distintas vías regulatorias que controlan estos eventos asegurándose que ocurren en el momento correcto a lo largo de la progresión del ciclo celular. Una alteración en alguno de estos procesos acarrea importantes consecuencias para la estabilidad cromosómica (Pihan and Doxsey, 1999).

Existen toda una serie de indicadores biológicos que ponen de manifiesto la presencia de inestabilidad cromosómica. Entre ellos, podemos citar la alteración en el número de centrosomas, la aparición de micronúcleos, el incremento de células polinucleadas o la presencia de alteraciones en los husos mitóticos como perturbaciones en la simetría de microtúbulos o en la bipolaridad del huso (Iarmarcovai et al., 2006; Jefford and Irminger-Finger, 2006; Pihan and Doxsey, 1999).

Al igual que ocurre con la mayoría de tumores sólidos, los linfomas producidos por la infección con KSHV, presentan inestabilidad cromosómica. El análisis de las alteraciones cromosómicas presentes en las células tumorales procedentes de distintos pacientes de PEL, demostró, además, un patrón similar en todas ellas, lo que indica la importancia de las mismas en la patogénesis de la enfermedad (Nair et al., 2006).

Son numerosos los ejemplos de virus o proteínas virales capaces de inducir un proceso de inestabilidad cromosómica. Un ejemplo es la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) que, a través de un aumento en la actividad telomerasa, es capaz de inducir inestabilidad cromosómica (Plug-DeMaggio et al., 2004). Además de este efecto, E6 al igual que E7 de HPV, aumentan la inestabilidad cromosómica mediante la desregulación de la mitosis a través de la inducción de la duplicación centrosómica y la formación de husos mitóticos multipolares (Duensing et al., 2000). Otro ejemplo es el del virus de la hepatitis C, capaz de generar inestabilidad cromosómica por mecanismos aún no esclarecidos pero que parecen implicar a aquellas proteínas virales capaces de alterar el control del ciclo celular mediado por p53 y la proteína del retinoblastoma (pRb) (McGivern and Lemon, 2009). En el caso de KSHV, se ha demostrado que diversas proteínas del virus tienen capacidad de inducir inestabilidad cromosómica, como son la proteína LANA, a través de la regulación de la vía de p53, y la proteína v-Cyc, por un proceso independiente de p53 (Si and Robertson, 2006; Verschuren et al., 2004). Como mencionamos anteriormente, LANA2, al igual que LANA, es capaz de inhibir la actividad transcripcional mediada por p53. Además, LANA2 puede interaccionar con las “pocket proteins” y con la tubulina favoreciendo su despolimerización y regulando así la desorganización del citoesqueleto (Munoz-Fontela et al., 2008). Estos datos sugieren que LANA2 podría estar implicada en la inducción de la inestabilidad cromosómica detectada en las células infectadas por KSHV.

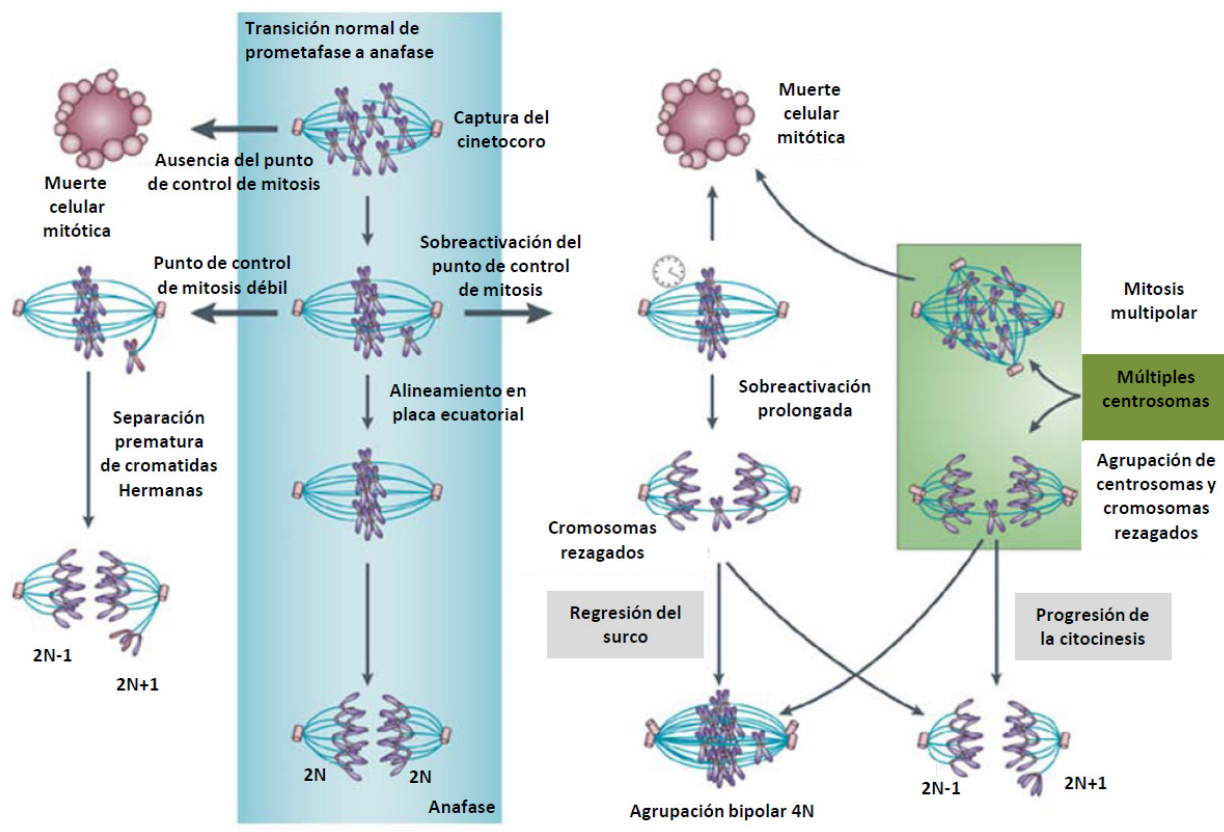
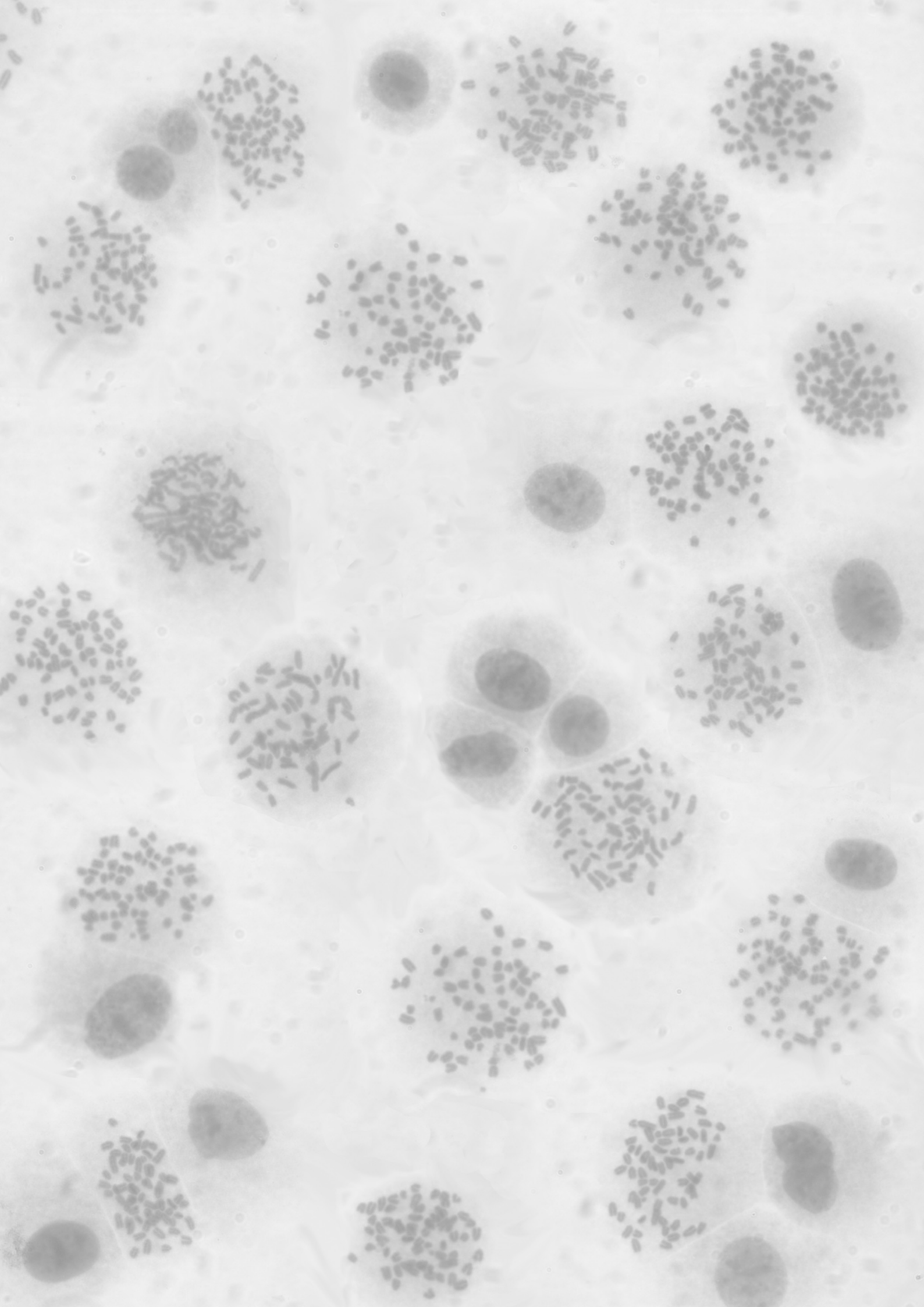
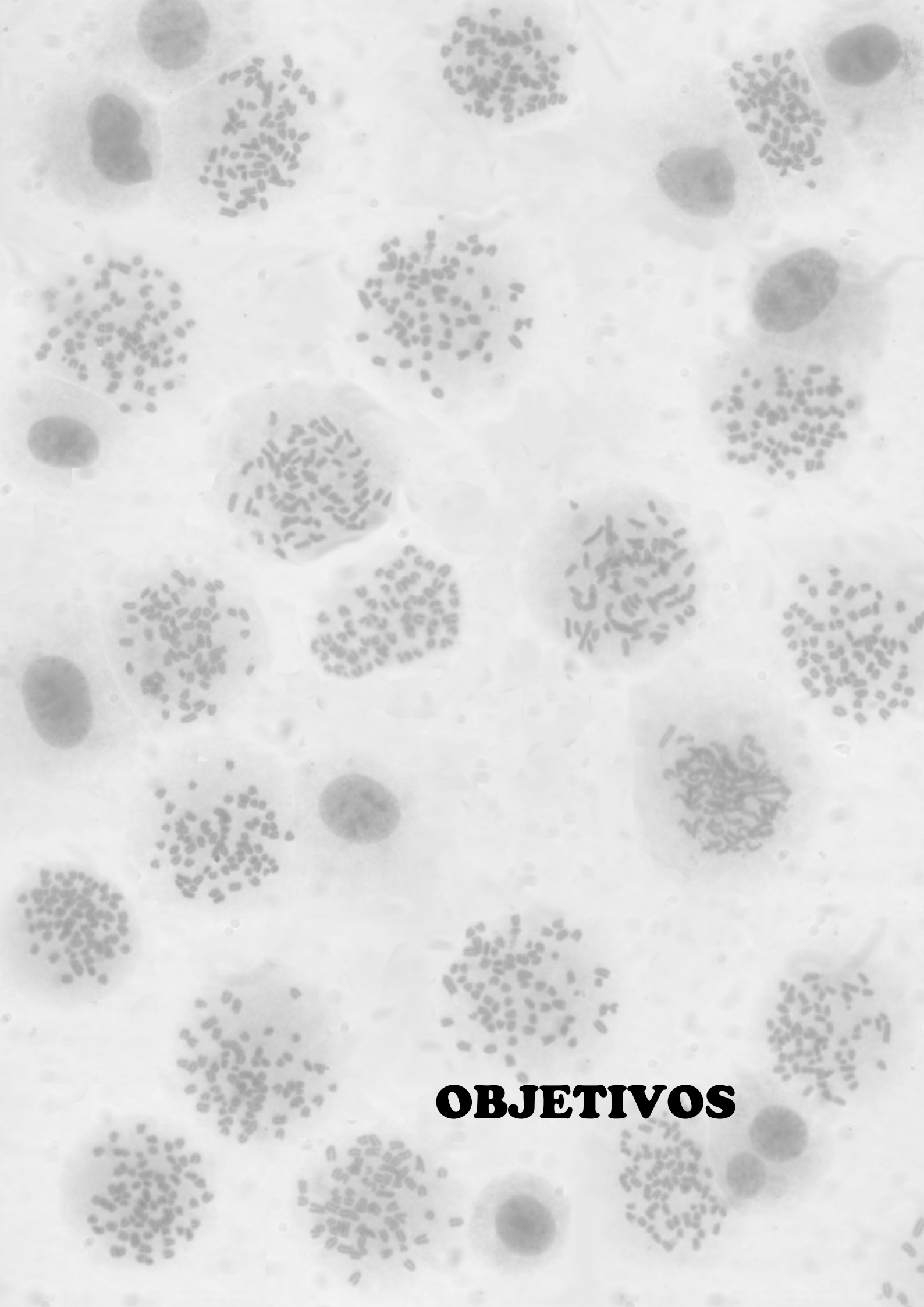


Figura 8. Múltiples mecanismos que conducen a aneuploidía. En el centro de la figura, sobre un fondo azul se esquematizan los eventos normales del paso de prometafase a anafase. La falta total de un punto de control de la mitosis lleva a la muerte celular. La existencia de un punto de control de la mitosis débil lleva a la separación de las cromátidas hermanas de forma prematura y a aneuploidía cercana a 2N. Un punto de control de la mitosis sobreactivado puede llevar tanto a muerte celular en mitosis como a cromosomas rezagados, y consecuentemente aneuploidías cercanas a 2N o tetraploidías. Los centrosomas multinumerarios pueden tener un efecto similar a una sobreactivación del punto de control de la mitosis. Una mitosis multipolar lleva a la muerte de la célula a menos que los centrosomas se agrupen, en cuyo caso hay una alta posibilidad de aparecer cromosomas rezagados (figura adaptada de Schwartzman, 2010).



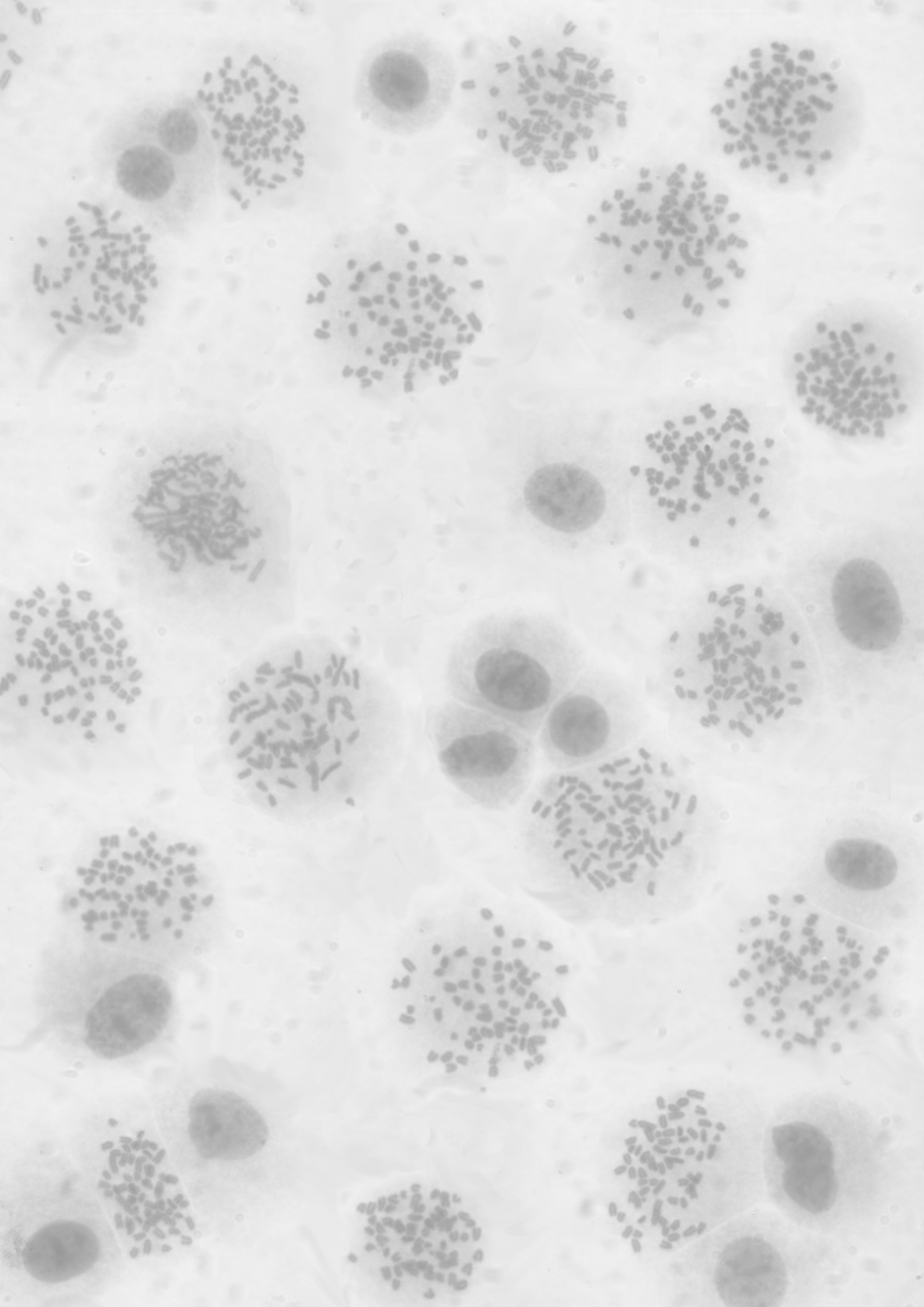


OBJETIVOS

OBJETIVOS

La infección latente de células B con KSHV provoca enfermedades linfoproliferativas tales como el linfoma de efusión primario y la enfermedad multicéntrica de Castleman. La proteína LANA2 se expresa exclusivamente en células B infectadas latentemente con KSHV y supone un factor esencial para la supervivencia de las mismas. Esta proteína multifuncional es capaz de interactuar y alterar la actividad de un elevado número de proteínas reguladoras del ciclo celular, otorgándole a LANA2 un importante papel en la patogénesis del virus. Sin embargo, no se han descrito qué consecuencias tiene la expresión de LANA2 en células primarias, inmortales o transformadas. Por todo ello, los objetivos de este trabajo fueron:

- Evaluar si LANA2 inducía inestabilidad cromosómica.
- Analizar el papel de LANA2 en la transformación celular.
- Estudiar la modulación de las modificaciones postraduccionales de las “pocket proteins” por LANA2 y sus posibles implicaciones en la desregulación del ciclo celular.
- Identificar algún factor que regule la transcripción de LANA2.



A black and white micrograph showing numerous plant cells. Each cell contains a large, dark, oval-shaped chloroplast. The cells are arranged in a somewhat regular pattern, and the chloroplasts are clearly visible within them. The background is light and slightly textured.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 Líneas celulares empleadas

Nombre	Crecimiento	Origen	Tipo Celular	Infección
BC-1	Suspensión	Humano	Células B de PEL	KSHV ⁺ / EBV ⁺
HEK-293T	Adherentes	Humano	Riñón embrionario	
HeLa	Adherentes	Humano	Adenocarcinoma de cuello de útero	
Karpas-422	Suspensión	Humano	Células B de linfoma no-Hodking	EBV ⁻
3T3 inducibles	Adherentes	Ratón	Fibroblastos embrionarios transgénicos para pTET-ON inmortalizados	
MEFs p53 KO	Adherentes	Ratón	Fibroblastos embrionarios	
MEFs pRb KO	Adherentes	Ratón	Fibroblastos embrionarios	
MEFs Salvajes (WT)	Adherentes	Ratón	Fibroblastos embrionarios	
MHH PREB-1	Suspensión	Humano	Células B de linfoma no-Hodking	EBV ⁻
NIH-3T3	Adherentes	Ratón	Fibroblastos inmortalizados	
SAOS-2	Adherentes	Humano	Osteosarcoma	

1.2 Medios de cultivo

Las células en suspensión se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco) y las adherentes, en medio esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementados ambos con 2 mM de L-glutamina (Gibco), 5×10^4 U/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco) y 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) (Biological Industries). Las células NIH-3T3 fueron crecidas en DMEM suplementado con L-glutamina, penicilina-estreptomicina y 3% de SBF. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C y al 5% de CO₂.

1.3 Generación de líneas celulares estables

a) Líneas celulares estables para la expresión de LANA2

Células HeLa se transfectaron con los vectores pcDNA, pcDNA-LANA2, pEGFP-C o pEGFP-LANA2, usando FuGENE (Roche) y siguiendo las indicaciones del fabricante del producto. Transcurridas 48 horas de la transfección, cuando los plásmidos ya se han expresado, las células se tripsinizaron e incubaron en medio suplementado con el agente de selección genética (G418, Sigma) a una concentración de 400 µg/mL. Las células seleccionadas en estas condiciones se consideraron el pase número 1 de la línea celular estable. Para la obtención de células 3T3 que expresan establemente

LANA2, se transfectaron células NIH-3T3 con los plásmidos pcDNA o pcDNA-LANA2, y a continuación se llevó a cabo exactamente el mismo protocolo descrito para las HeLa. Además de éste cultivo proveniente de una población multiclonal también seleccionamos clones individuales de células 3T3 gracias al uso de anillos de aislamiento.

b) Línea celular de expresión inducible de LANA2

Basándonos en el sistema inducible pTRE2Hyg/pTET-ON, partimos de MEFs inmortales transgénicos para pTET-ON, que transfectamos con el vector pTRE2Hyg en el previamente se clonaron las regiones codificantes de las proteínas GFP o GFP-LANA2, empleando Fugene. Transcurridas 48 horas de la transfección, las células se tripsinizaron y se incubaron en medio DMEM suplementado con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del agente de selección higromicina. Una vez seleccionadas las células se indujo la expresión de GFP o GFP-LANA2 tratando el cultivo con doxiciclina (Figura 9).

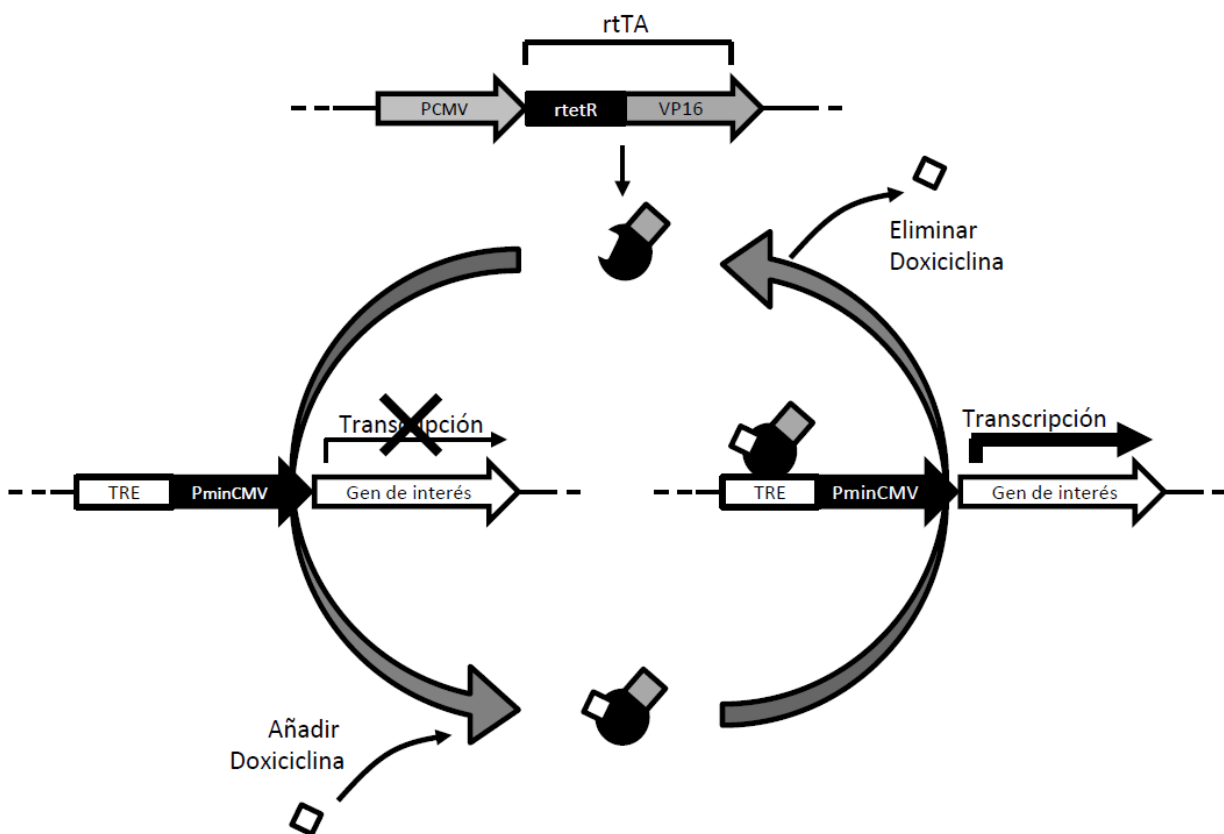


Figura 9. Sistema Tet-ON. rtTA se une a TRE y activa la transcripción en presencia de doxiciclina

1.4 Transfección

a) Agentes lipídicos

Contienen subunidades lipídicas que pueden formar liposomas en un ambiente acuoso. Los ácidos nucleicos son encapsulados en estas micelas que se fusionan con la membrana plasmática de las células y liberan dicha carga en el citoplasma. Los empleados en este trabajo son:

- Lipofectamina 2000 (Invitrogen): empleada para transfectar células HeLa.
- FuGENE (Roche): empleado para transfectar HEK-293, NIH-3T3 y 3T3 inducibles.
- X-tremeGENE 9 (Roche): empleado para transfectar HEK-293, NIH-3T3 y 3T3 inducibles.
- JetPEI (Poliplus): empleado para transfectar HEK-293 y Karpas.

b) Nucleofección

Método de transfección especialmente desarrollado para células difíciles de transfectar, tales como células primarias. Nosotros lo empleamos para la transfección de fibroblastos primarios. Es un método basado en una combinación de parámetros eléctricos y soluciones específicas para cada tipo celular. Esta tecnología permite que el ADN transfectado entre directamente al núcleo.

Para llevar a cabo la transfección se siguieron las instrucciones especificadas por la casa comercial y se utilizó el Nucleofector I de Amaxa (Lonza), la solución de nucleofección 1 para MEFs y el programa A-023.

c) Electroporación

Procedimiento por el cual, mediante un campo eléctrico externo, se aumenta la permeabilidad y conductividad eléctrica de la membrana plasmática, formándose poros durante un breve tiempo, a través de los cuales pasan los ácidos nucleicos al interior celular. Se empleó para transfectar células en suspensión y la línea celular SAOS-2.

En el caso de las células en suspensión, 10^7 células se resuspendieron en 0,5 mL de medio RPMI sin SBF, se añadieron entre 20 y 30 μg del ADN a transfectar y se introdujeron en una cubeta de electroporación de 0,4 cm de espacio entre electrodos (BioRad). La configuración del electroporador (Gene Pulser, BioRad) fue la siguiente: 960 μFD de capacitancia, 250 voltios de voltaje y 200 Ohms de

intensidad. Tras el pulso eléctrico, las células se dejaron reposar de 15 a 20 minutos y a continuación se resuspendieron en 4-5 mL de medio RPMI suplementado con 10% SBF para su cultivo.

En el caso de células adherentes, 10^6 células Saos-2 se resuspendieron en 0,5 mL de medio DMEM sin SBF y se añadieron 8 μg de ADN. A continuación, las células se electroporaron empleando las condiciones de electroporación descritas para las células en suspensión y tras el pulso eléctrico, las células se resuspendieron en 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% SBF y se sembraron en placas de 60 mm de diámetro.

1.5 Estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo

Las células objeto de estudio fueron recogidas, centrifugadas y fijadas mediante su incubación durante una hora a -20°C en una solución de etanol al 10% en PBS. Una vez fijadas las células, se lavaron con PBS y a continuación se incubaron a 37°C en una solución de PBS con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNAsa, durante 30 minutos. Finalmente, las células se incubaron en PBS con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de yoduro de propidio. El contenido de ADN de las células se analizó empleando un citómetro de flujo XL-MCL.

1.6 Preparación de cromosomas en metafase

Las células a analizar se incubaron en una dilución de colcemida al 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas. A continuación, las células fueron lavadas con PBS, levantadas con tripsina y centrifugadas durante 8 minutos a 800 rpm. Las células centrifugadas se resuspendieron en 1 mL de PBS, al que se le añadieron gota a gota 9 mL de tampón hipotónico (0,03 M citrato sódico) precalentado a 37°C mientras se agitaba suavemente en un vortex y se incubaron a 37°C durante 10-15 minutos. Posteriormente se volvieron a centrifugar durante 8 minutos a 800 rpm. Una vez centrifugadas, se decantó todo el volumen del sobrenadante excepto 1 mL, en el que se volvieron a resuspender las células. Se añadieron gota a gota 4 mL de fijador fresco (metanol/ácido acético 3:1) y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización. En el momento del análisis las células se volvieron a lavar con fijador fresco y se aspiraron con una pipeta Pasteur previamente tratada para obtener un capilar. Dichas células se dejaron caer desde la mayor altura posible sobre portas que posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Para contrastar los cromosomas se realizó una tinción con Giemsa, yoduro de propidio o DAPI.

1.7 Ensayos de proliferación

a) Ensayo MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es, así, proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células a estudiar se sembraron en triplicado o quintuplicado en placas de 96 pocillos (el número de células se especifica en cada experimento) en medio DMEM suplementado con 10% de suero. A distintos tiempos tras la siembra se añadió sobre los pocillos una solución de MTT a una concentración final de 1 mg/mL. A continuación, los cultivos fueron incubados a 37°C durante 5 horas, momento en el que se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en dimetil sulfóxido (DMSO, 50 µL/pocillo) y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Plus 6012).

b) Recuento tras tinción con azul tripán

Las células a analizar se sembraron en triplicado en placas de 6 ó 12 pocillos (el número de células se especifica en cada experimento). Transcurridos distintos tiempos desde el inicio de la siembra, las células se tripsinizaron y se hizo el recuento de células vivas y muertas. Para ello, la solución de células se mezcló con una solución de azul tripán en PBS (1:1). A continuación el número de células vivas y muertas se determinó mediante el uso de una cámara de Neubauer.

1.8 Ensayo de formación de colonias en agar blando

Éste ensayo sirve para evaluar la capacidad de las células para crecer sin anclarse al plástico de la placa, lo que se considera como un indicador de transformación celular. Placas de 6 cm de diámetro se cubren con 3 mL de una capa de agarosa al 0,5% en DMEM suplementado con FBS al 10%. 3×10^5 células se resuspenden en 4 mL de una solución de agarosa al 0,3% preparada también en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y calentada a 45°C, y se extienden sobre la capa inferior de agarosa ya solidificada. A continuación las placas se refrigeran a 4°C durante 15 minutos para que solidifique la capa superior de agarosa. Una vez solidificadas las placas se incuban a 37°C añadiendo 1 mL más de agarosa al 0,3% cada semana. La formación de colonias suele ser visible entre 2 y 3 semanas después.

1.9 Ensayo de formación de focos

Experimento utilizado para comprobar si las células han perdido la inhibición de crecimiento dependiente de la densidad (pérdida de inhibición por contacto), lo que es un indicativo de transformación celular. 5×10^5 células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro y se transfectaron con los plásmidos de interés. Las células se dejaron crecer y sobrepasar el estado de confluencia hasta la formación de focos. El resultado se reveló con tinción cristal violeta.

1.10 Ensayo de tumorigenicidad

Dicho ensayo sirve para analizar la capacidad de las células para proliferar y formar tumores en ratones desnudos. Se inocularon 5×10^5 células por vía subcutánea en ratones atímicos y dos semanas después se contaron y midieron los tumores formados.

2. CULTIVOS BACTERIANOS

2.1 Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes utilizadas para la transformación fueron *Escherichia coli* de la cepa DH5 α o BL21. Dichas bacterias se descongelaron en hielo y se incubaron con el ADN a transformar durante 30 minutos en hielo. A continuación fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 40 segundos, y de nuevo incubadas en hielo durante 5 minutos más. Entonces, se añadieron 500 μ L de medio de cultivo LB sin antibióticos a las bacterias y se incubaron a 37°C, en agitación a 500 rpm durante una hora. Posteriormente las bacterias se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico de resistencia presente en el plásmido transformado y se incubaron a 37°C toda la noche. El resultado de dicha siembra fueron colonias aisladas a partir de las cuales se puede hacer un inóculo en medio LB para crecerlas en el volumen deseado.

2.2 Extracción de ADN plasmídico

La extracción y purificación del ADN se llevó a cabo utilizando diferentes kits comerciales de la casa Quiagen o JetStar en función de la cantidad de ADN requerido. El protocolo seguido es el que aconseja el fabricante.

2.3 Producción de proteínas GST

Bacterias competentes BL21 se transformaron con plásmidos de expresión de proteínas fusionadas a GST. Las bacterias transformadas con el plásmido de interés, se crecieron en volúmenes de LB (entre 0,5 y 1 litro en función de las necesidades de producción). En el momento en el que los cultivos tuvieron una densidad óptica entre 0,6 y 0,8 unidades de absorbancia (fase exponencial), se les añadió IPTG (Duchefa) a una concentración final de 1mM para inducir la expresión de la proteína y se incubaron a 30°C durante 2 horas. Transcurrido dicho tiempo, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 25 minutos y tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 10 mL de PBS. Con el fin de lisar las bacterias y liberar las proteínas producidas, se sometió a las bacterias a tres pulsos de sonicación (30 segundos, 40 ciclos) en un sonicador “Vibra Cell” (Sonics & Materials). El lisado se centrifugó a 10.000 rpm durante 25 minutos para eliminar los restos celulares y quedarnos con el sobrenadante, el cual se incubó con bolas de Gluthation Sepharosa (Amersham) durante toda la noche a 4°C en un agitador circular. Transcurrido dicho tiempo, la resina se lavó siete veces con 0,5% de Triton-X-100 en PBS. Para evaluar la producción de la proteína de interés se analizó una muestra mediante el uso de geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) según se describe en el apartado 4.2 y posteriormente los geles se tiñeron con azul Coomasie.

3. ACIDOS NUCLEICOS

3.1 Plásmidos utilizados

- pcDNA3.1/His B (Invitrogen): Plásmido de expresión de proteínas bajo el promotor del citomegalovirus (CMV) fusionadas a una cola de histidinas.
- pcDNA3.1-LANA2: Plásmido que expresa la proteína LANA2 fusionada a una cola de histidinas (Rivas et al., 2001). Cedido a nuestro laboratorio por los Drs. Yuan Chang y Patrick Moore (Hillman Cancer Center, Pittsburgh, USA).
- pEGFP-C (Clontech): Plásmido que expresa la proteína verde fluorescente EGFP bajo el control de un promotor de CMV.
- pEGFP-LANA2: Plásmido que codifica la proteína LANA2 fusionada a EGFP (Muñoz et al; 2003).
- pEGFP-LANA2-LxCxE: Plásmido que codifica la proteína LANA2 mutada en el dominio LxCxE fusionada a EGFP.
- pTRE2Hyg (Clontech): plásmido que permite expresar el gen de interés bajo el sistema TET-ON/OFF

en función de la adición o depleción de tetraciclinas al medio, respectivamente. También contiene un gen de resistencia a higromicina.

- pcDNA3.1-Rb: Plásmido que expresa la proteína Rb fusionada a una cola de histidinas.
- pcDNA3.1-LANA2-LxCxE: Plásmido que codifica la proteína LANA2 mutada en el dominio LxCxE.
- pGL3 (Promega): vector reportero de luciferasa para análisis de promotores génicos.
- pRLTK (Promega): Plásmido que expresa la proteína renila bajo el control del promotor TK, utilizado como control interno de transfección en experimentos de medición de luciferasa con el fin de normalizar los datos obtenidos.
- pCR2.1-TOPO (Invitrogen): Plásmido del kit de clonaje TOPO-TA que facilita el clonaje de cualquier fragmento de PCR al poseer diversas dianas de restricción.
- RBP-Jκ: HA-RBP-Jκ, cedido por el Dr. Tilman Borggrefe, Instituto Max de Inmunobiología y Epigenética, Freiburg, Alemania.
- H2AmCherry: Plásmido de expresión de la histona H2A de ratón fusionada al fluoróforo Cherry-Red. Cedido por Francisco Iborra (CNB, CSIC, Madrid).
- pBabe-Puro-H-RasV12 (Addgene): Plásmido de expresión de H-Ras^{V12} y gen de resistencia a puromicina.
- pcDNA3.1-Ubc9-SV5: Plásmido de expresión de Ubc9 fusionada a la etiqueta SV5.
- pcDNA3.1-p107: Plásmido de expresión de p107
- pcDNA3.1-p130: Plásmido de expresión de p130
- pcDNA-His6-SUMO1: Plásmido que expresa la proteína SUMO1 fusionada a una cola de histidinas. Cedido por el Dr. Manuel S. Rodríguez (Proteomics Unit, CIC bioGUNE, Vizcaya).
- pcDNA-His6-SUMO2: Plásmido que expresa la proteína SUMO2 fusionada a una cola de histidinas. Cedido por el Dr. Manuel S. Rodríguez (Proteomics Unit, CIC bioGUNE, Vizcaya).

3.2 Clonaje

a) pTRE2hyg-GFP

Con el fin de introducir GFP en el sitio de clonaje múltiple (MCS) de pTRE2hyg, realizamos una

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos que contenían dianas de restricción para las enzimas BamHI y Sal I, como se indica a continuación:

- Sentido (BamHI-EGFP): 5' GGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG 3'
- Antisentido (EGFP-SalI): 5' GGGTCGACTTATCTAGATCCGGTGGA 3'

Como molde de la PCR se utilizó el plásmido pEGFP y el programa empleado para la PCR fue el siguiente:

-Desnaturalización general	94°C, 2 minutos
-Desnaturalización	94°C, 30 segundos
-Hibridación	65°C, 1 minuto
-Elongación	72°C, 5 minutos
-Número de ciclos	20 ciclos
-Elongación final	72°C, 5 minutos
-Conservación	4°C, 1 hora

Los productos de la PCR y el vector pTRE2hyg se digirieron con las enzimas BamHI y Sall, se purificaron mediante el uso de geles de agarosa y se extrajeron las bandas del gel empleando el Kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (250)" de QIAGEN. A continuación, vector e inserto se incubaron en una reacción de ligación. Para verificar la construcción, el plásmido se mandó a secuenciar.

b) pTRE2hyg-GFP-LANA2

Los pasos seguidos fueron los mismos que en el clonaje anterior, pero con algunas diferencias: el plásmido molde para la PCR fue pEGFP-LANA2, la temperatura de hibridación fue de 60°C y las enzimas de restricción que se utilizaron fueron NheI y ClaI. Los oligos que se emplearon en esta PCR son los siguientes:

- Sentido (NheI-EGFP-L2): 5' GGGGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG 3'
- Antisentido (L2-ClaI): 5' GGGATCGATTTAGTCATCACATGTAAC 3'

c) pGL3-LANA2-Frgmt1

Esta construcción contiene la secuencia que va desde el nucleótido que está en la posición -70

hasta -1477 contando desde el codón de inicio de la transcripción del gen de LANA2, clonada por delante del gen que codifica para la luciferasa en el plásmido pGL3. Para obtener dicho fragmento se empleó como molde el ADN genómico aislado de células PEL mediante un kit de extracción de ADN genómico (Promega) y se realizó una PCR con los siguientes oligos:

- Sentido: 5' AAGCTTTCTGTCATGGGTTTCAGGCCAGGAG 3'
- Antisentido: 5' GGTACCAAACCACAACATCTTCCTGCAGC 3'

Y empleando el siguiente programa:

-Desnaturalización general	95°C, 2 minutos
-Desnaturalización	95°C, 30 segundos
-Hibridación	55°C, 30 segundos
-Elongación	72°C, 30 segundos
-Número de ciclos	45 ciclos
-Elongación final	72°C, 5 minutos
-Conservación	15°C, 1 hora

El producto de la PCR fue introducido dentro del vector pCR 2.1-TOPO mediante el kit de clonaje TOPO-TA de Invitrogen. Tanto el plásmido resultante, TOPO-Fragmento1, como pGL3, fueron digeridos mediante las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*, y posteriormente el fragmento extraído y pGL3, se defosforilaron para evitar religaciones y se purificaron mediante el uso de geles de agarosa. Una vez purificados vector e inserto, se ligaron con ligasa T4. El producto de la reacción de ligación se transformó y el ADN plasmídico extraído se analizó mediante digestión con *SacI* y *XhoI*, y posteriormente se envió a secuenciar.

d) pGL3-LANA2-Frgmt2

Este plásmido contiene la secuencia nucleotídica que va desde la posición -70 hasta -973 nucleótidos contando desde el codón de iniciación de la transcripción del gen de LANA2, delante del gen que codifica para la luciferasa, clonado en el vector pGL3. Para su clonaje se empleó la misma estrategia que la descrita en el clonaje del fragmento 1, con la única diferencia de que el oligo sentido fue diferente:

- Sentido: 5' AAGCTTGAACACATATGTCAGACGGTACCC 3'

e) pGL3-LANA2-Frgmt3

Este plásmido contiene la secuencia nucleotídica que va desde el -70 hasta -565 nucleótidos contando desde el codón de inicio de la transcripción del gen de LANA2, clonada por delante del gen que codifica para la luciferasa en el plásmido pGL3. Para la PCR se utilizó el mismo oligo antisentido que en los dos casos anteriores y la misma estrategia. El oligo sentido fue el siguiente:

- Sentido: 5' AAGCTTAAGTCTTCTTGCTCACTCTGTCCGG 3'

4. PROTEÍNAS

4.1 Anticuerpos empleados

- Anti-Actina: monoclonal de ratón de MP Biomedicals.
- Anti-GFP (JL8): monoclonal de ratón de Clontech.
- Anti-LANA2: monoclonal de ratón, clon CM-A807, de Abcam.
- Anti-p53: monoclonal de ratón, clon DO-1, de Santa Cruz.
- Anti-Rb: monoclonal de ratón, clon G3-245, BD Pharmingen.
- Anti-p107: policlonal de conejo, Santa Cruz.
- Anti-p130: policlonal de conejo, Santa Cruz.
- Anti-gamma-tubulina: policlonal de conejo, Abcam; y monoclonal de ratón, clon GTU-88, Sigma.
- Anti-alfa-tubulina: monoclonal de ratón, clon YL1/2, de Serotec.
- Anti-Ser139Fosfo-H2AX: monoclonal de ratón, Upstate Biotechnology.
- Anti-PARP: policlonal de conejo, Cell Signaling.
- Anti AKT-Fosforilado: policlonal de conejo, Cell Signaling.
- Anti IκB-α: policlonal de conejo, Cell Signaling.
- Anti IκB-α-Fosforilado: monoclonal de ratón, Cell Signaling.
- Anti PKR: monoclonal de ratón, clon B-10, Santa Cruz.

- Anti-SV5: monoclonal de ratón, Cell Signaling.
- Anticuerpo frente a IgG de ratón o conejo, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (GE Healthcare).
- Anticuerpos frente IgG de ratón o conejo, conjugados con Alexa (A-488, A-546, A-594 o A-647) (Invitrogen).

4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western-Blot (WB)

Las células o extractos proteicos fueron resuspendidos en tampón de carga y hervidos durante 5 minutos. Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida que contenían SDS (SDS-PAGE) y a continuación se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Ya transferidas las membranas, se bloquearon en una solución de leche desnatada al 5% en tampón TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 0,1% v/v Tween20) durante 30 minutos. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en leche desnatada al 5% en TBST, durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en agitación. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con TBST sucesivas veces durante una hora y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) diluidos 1:1000 en leche desnatada al 5% en TBST, durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, y tras varios lavados de nuevo en tampón TBST, las membranas se incubaron con los reactivos del sistema de detección quimioluminiscente (ECL, Amersham), y después de eliminar el exceso de reactivo, se expusieron películas Hyperfilm MP de Amersham. El revelado se realizó de manera automática en un procesador Konica Minolta SRX-101A.

4.3 Inmunoprecipitación

Las células se recogieron en buffer de lisis RIPA (1% NP40, 1% NA deoxicolato, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0 y 2 mM EDTA) al que se habían añadido inhibidores de proteasas (Roche), 1mM de fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF) y 2 mM del inhibidor específico de SUMO-1 hidrolasa (NEM). El lisado se incubó durante 30 minutos en hielo y a continuación se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes, que contenían los extractos de proteínas, fueron incubados con los anticuerpos correspondientes a la concentración que recomienda la casa comercial, a 4°C durante toda la noche con rotación constante. A continuación se añadieron bolas de sefarosa-γ (GE Healthcare) y se incubaron durante 2 horas a 4°C en rotación constante. Posteriormente se precipitaron los complejos de proteínas unidos a las bolas de sefarosa mediante centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos. Después las bolas se lavaron en tampón RIPA sucesivas veces y finalmente se resuspendieron

en tampón de carga. Los complejos se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, y se analizaron mediante western-blot.

4.4 Inmunofluorescencia

Las células para inmunofluorescencia se cultivaron en placas de 24 pocillos sobre cristales circulares estériles. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS durante 20 minutos, se permeabilizaron incubándolas con tritón al 0,25% en PBS durante 30 minutos y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios utilizados se diluyeron en BSA al 0,2% en PBS a la concentración indicada por el fabricante. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4°C durante toda la noche, tras lo cual, las preparaciones se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos 1:500 en PBS durante una hora. Una vez lavadas las preparaciones, se incubaron con DAPI para teñir el ADN nuclear. Se realizaron los últimos lavados y las muestras se montaron con Prolong (Invitrogen). Finalmente las preparaciones fueron analizadas empleando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE-2000) o un microscopio confocal (Leica).

4.5 Transcripción-Traducción *in vitro*

Para la síntesis de proteínas *in vitro* se empleó el kit de transcripción/traducción *in vitro* “TnT Quick Coupled Transcription/Translation System” (Promega) y se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante, en presencia de metionina marcada radiactivamente (Easy Tag Express Protein Labeling Mix [³⁵S], Perking Elmer) o de metionina sin marcar. Para comprobar la eficiencia de la traducción, la proteína se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE. Si la muestra estaba marcada con metionina-S³⁵ el gel se secó en un seca-geles y se sometió a autorradiografía y si no se analizó mediante western-blot.

4.6 Ensayos de interacción *in vitro* de proteínas fusionadas a GST

Las proteínas fusionadas a GST y unidas a bolitas de glutatión sefarosa, se bloquearon con una solución de BSA al 5% en tampón de interacción (150 mM NaCl; 20 mM Tris (pH 8.0); 1 mM MgCl₂; 0,1% NP40 (Igepal); 10 % glicerol; 2 µg/mL leupeptina; 1 µg/mL pepstatina y 1 µg/mL aprotinina), a 4°C durante toda la noche en rotación. Al día siguiente se sometieron a 4 lavados con tampón de

interacción y se incubaron con proteína marcada radiactivamente durante 2 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se prosiguió con otros cinco lavados con tampón de interacción. Por último las bolitas de glutation sefarosa se resuspendieron en tampón de carga, se hirvieron y se analizaron mediante SDS-PAGE. Al terminar la electroforesis el gel, se secó y se sometió a su autorradiografía.

4.7 Ensayos de luciferasa como gen reportero

Células en cultivo fueron co-transfectadas con un plásmido de control de transfección que expresa renila (pRLTK) y las construcciones clonadas en pGL3, expresando el gen reportero luciferasa. Después de 48 horas de la transfección, se procedió a seguir las instrucciones del kit comercial “Dual Luciferase Reporter Assay” (Promega) para la medición de la luciferas. Resumiendo, las células fueron lavadas con PBS, recogidas en el tampón de lisis pasivo (PLB) e incubadas durante 15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo las células se sometieron a centrifugación y se recuperó el sobrenadante. A continuación 20 μ L de este sobrenadante se colocaron en un pocillo de una placa de 96 pocillos y se procedió a medir la cantidad de luciferasa presente en la muestra. El luminómetro empleado (Optocomp, MGM Instruments) añadió 50 μ L del tampón LAR II sobre cada muestra y luego otros 50 μ L del tampón Stop&Glo, y determinó la luciferasa y la renila presente midiendo cada muestra durante 10 segundos y dejando un retraso de 2,5 segundos entre adición de tampón y medición.

4.8 Purificación de proteínas unidas a cola de histidinas

Células HEK-293T se transfectaron con un plásmido que codifica para el gen de interés fusionado a una cola de histidinas. Tras 36-48 horas de la transfección dichas células fueron lavadas con tampón PBS y posteriormente resuspendidas en 1 mL del mismo tampón. El 10% del volumen de la suspensión se separó, se le añadió tampón de carga, se hirvió 5 minutos y se guardó a -20°C hasta su análisis. Esta fracción se utilizó como control de expresión. El resto de lo recogido en PBS se centrifugó y las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis G (6M de guanidina-HCl, 0.1M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.01M de Tris-HCl pH 8, 5mM de imidazol y 10mM de β -mercaptoetanol) y se incubaron 10 minutos en hielo. Las muestras lisadas se incubaron con 50 μ L de resina de agarosa-Ni²⁺-NTA (Invitrogen) o resina cobalto Talon (Clontech) durante 2 h a temperatura ambiente agitándose en una rueda giratoria. A continuación la resina fue lavada al menos cinco veces con el tampón U preparado en el momento [8M de Urea, 100 mM tampón fosfato, pH 8.0 (1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1 M Na_2HPO_4) y 1 M de Tris-HCl, pH 8.0]. Ya lavada, la resina se resuspendió en tampón de carga, se hirvió 5 minutos y se analizó mediante SDS-PAGE.

4.9 Ensayo de sumoilación *in vitro*

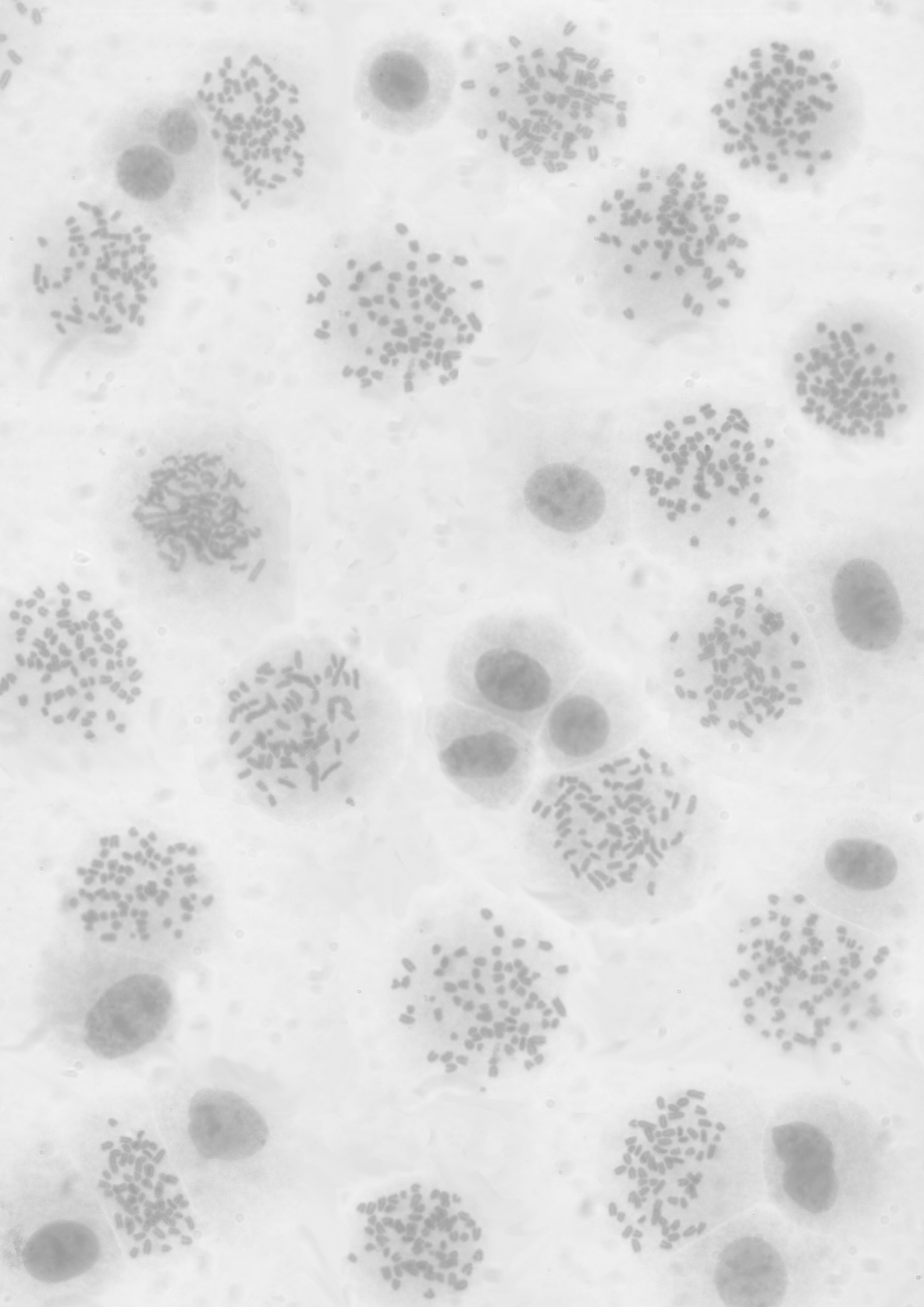
Para este experimento se realizó una mezcla de reacción que contenía 1 μL de la proteína a estudiar sintetizada *in vitro* marcada radiactivamente, 0,3 μg de E1/2 (Biomol, Enzo Life Sciences AG, Lausen, Switzerland), ATP 2 mM junto con su sistema de regeneración (Tris pH 7.6 50 mM, MgCl_2 5 mM, creatina fosfato 10 mM, creatina kinasa 3.5 U/mL y pirofosfatasa inorgánica 0.6 U/ml), 10 μg de SUMO1 o SUMO2 y 600 ng de Ubc9, en un volumen final de 10 μL . Las reacciones se incubaron a 30-37°C durante 90-120 minutos tras lo cual se paró la reacción mediante la adición de tampón de carga. Las muestras así preparadas se hirvieron y analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Los geles resultantes se secaron y se autorradiografiaron.

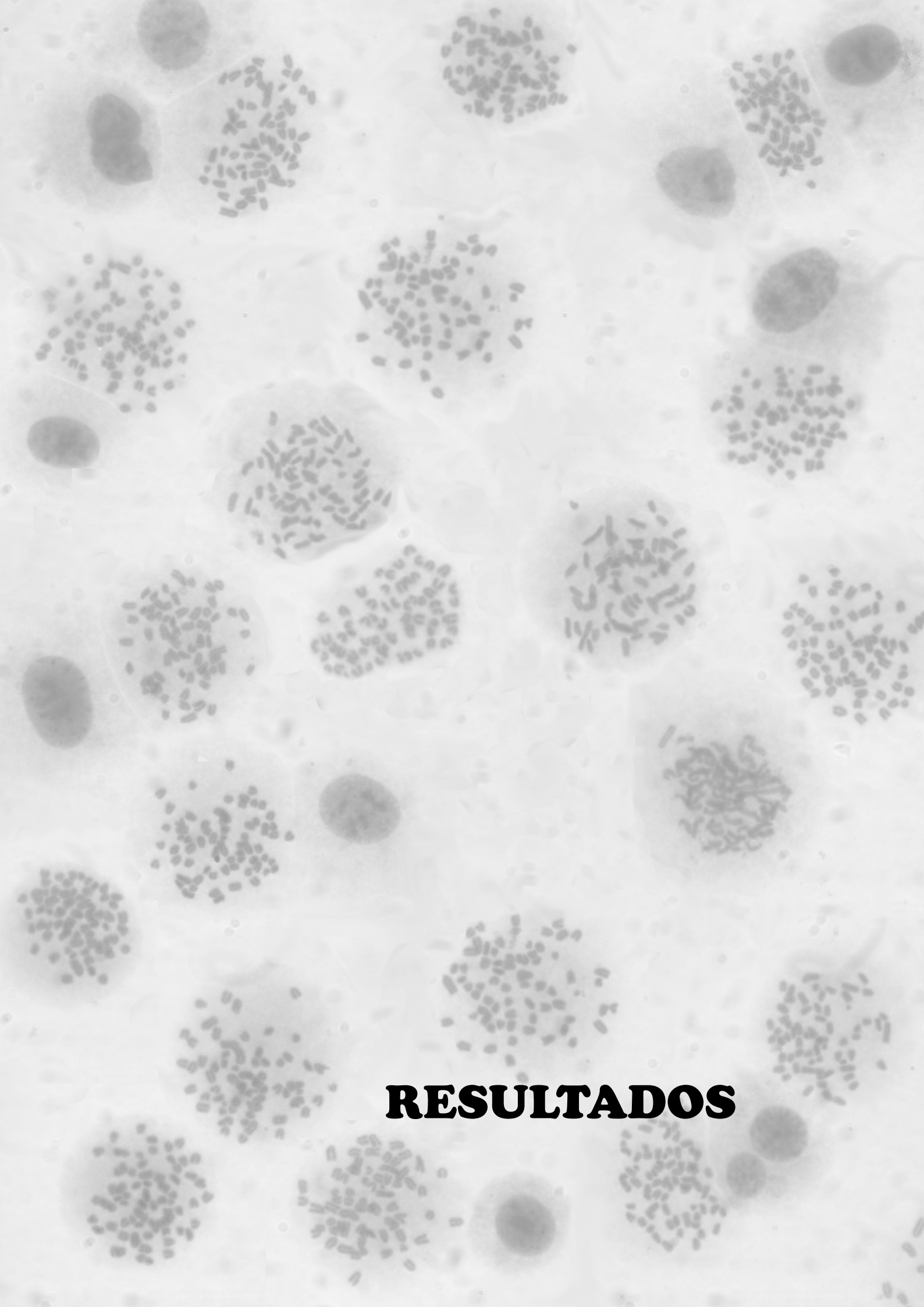
5. Programas informáticos

- Genomatix Software Suite V2.3: Programa destinado a la identificación de elementos de respuesta a factores de transcripción en promotores.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba paramétrica t de Student.





RESULTADOS

RESULTADOS

1. La expresión estable de LANA2 induce cambios en la morfología de las células y favorece la proliferación celular.

LANA2 se ha descrito como una proteína que al sobreexpresarse es capaz de bloquear la apoptosis inducida tras la activación de diversas vías moleculares y de activar distintas vías que promueven la proliferación celular. Sin embargo, no se ha descrito cuál es el efecto de la expresión estable de LANA2. Con este objetivo, generamos líneas celulares que expresan establemente la proteína LANA2, basándonos en la línea 3T3 (3T3-pcDNA y 3T3-LANA2), y en HeLa (HeLa-pcDNA, HeLa-LANA2, HeLa-GFP y HeLa-GFP-LANA2). En el caso de las 3T3, además de la población multiclonal, también se aislaron clones, con los que se repitieron experimentos con el fin de confirmar los resultados. Una vez generadas las líneas celulares, fueron analizadas mediante western-blot e inmunofluorescencia para comprobar la expresión de LANA2, GFP o GFP-LANA2, según el caso (Figura 10). Es importante indicar que durante la generación de las líneas estables se procedió a hacer un recuento del número de colonias resultantes de la selección de células 3T3 con el agente G418. Consistentemente se observó que el número de colonias resistentes al tratamiento con la droga y transfectadas con LANA2 eran la mitad de las que se encontraban tras transfectar el vector vacío, lo que sugería que LANA2 ejerce un efecto negativo sobre la supervivencia o proliferación de estas células.

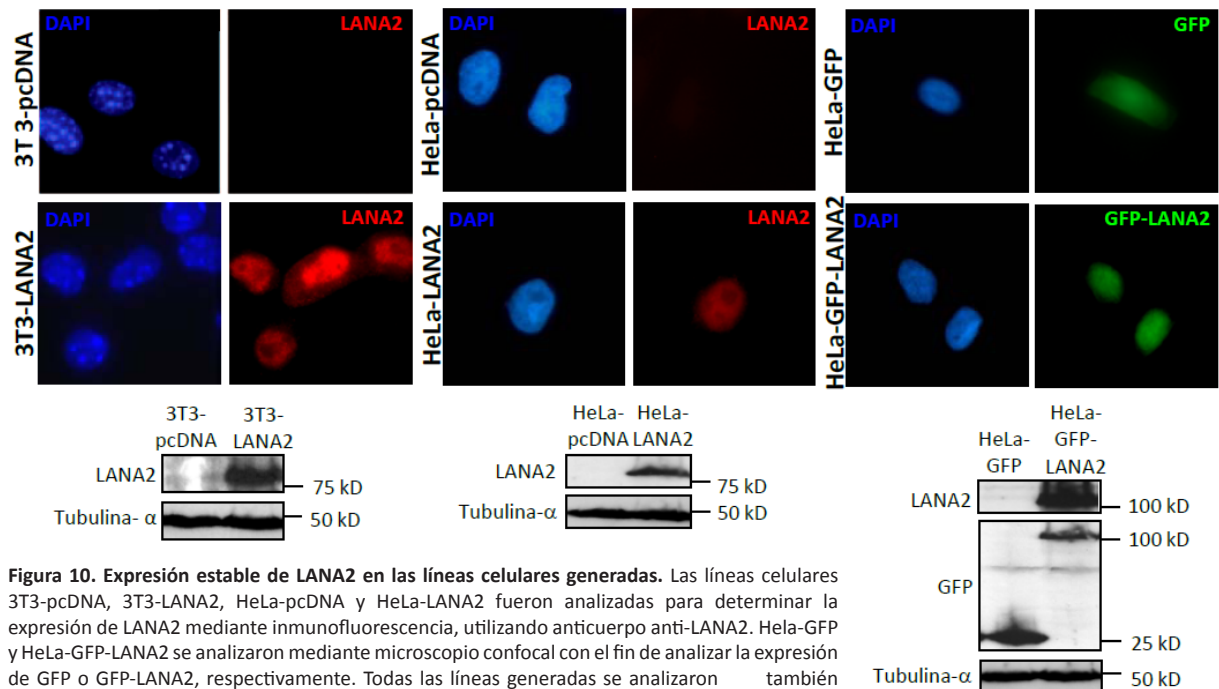


Figura 10. Expresión estable de LANA2 en las líneas celulares generadas. Las líneas celulares 3T3-pcDNA, 3T3-LANA2, HeLa-pcDNA y HeLa-LANA2 fueron analizadas para determinar la expresión de LANA2 mediante inmunofluorescencia, utilizando anticuerpo anti-LANA2. HeLa-GFP y HeLa-GFP-LANA2 se analizaron mediante microscopio confocal con el fin de analizar la expresión de GFP o GFP-LANA2, respectivamente. Todas las líneas generadas se analizaron también mediante WB empleando anticuerpo anti-LANA2, anti-GFP o anti-tubulina- α , como se indica.

Cuando visualizamos las células al microscopio de contraste de fases no se observaron cambios aparentes en la morfología de las células HeLa independientemente de la expresión de LANA2, pero observamos que existían diferencias morfológicas significativas entre las células 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2, tanto en los cultivos de origen multiclonal como en los clones (Figura 11). Las células que expresaban LANA2 eran más pequeñas y presentaban una morfología más fusiforme que las que no expresaban LANA2. Esta morfología nos hizo sospechar que LANA2 podría estar induciendo la transformación de las células 3T3.

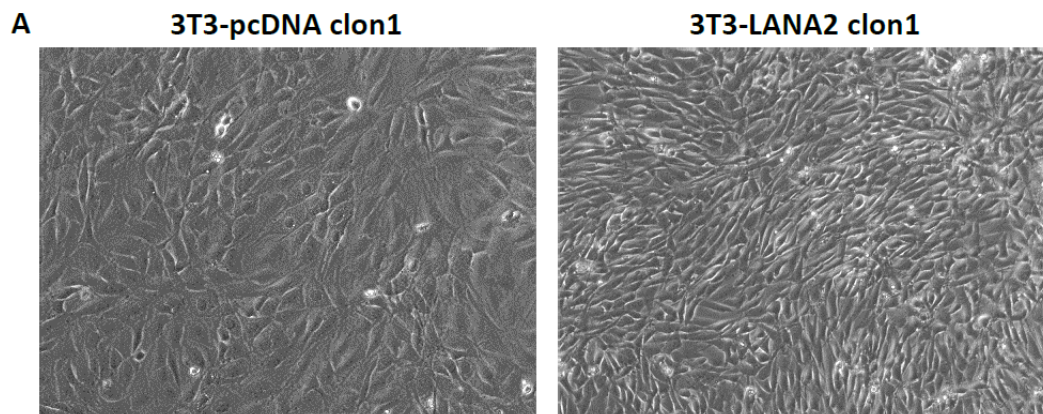


Figura 11. La expresión estable de LANA2 induce cambios en la morfología de las 3T3. Clones de células 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2, fueron fotografiados al microscopio de contraste de fases para evaluar la morfología celular.

Con el fin de evaluar si LANA2 ejercía algún efecto sobre la proliferación celular procedimos a realizar ensayos MTT y recuentos de células vivas de las líneas celulares generadas. Estos ensayos se hicieron empleando tanto pases tempranos (comprendidos entre 1 y 10) como tardíos (posteriores a 10) de las líneas celulares. Los resultados de los ensayos de MTT llevados a cabo con las líneas 3T3 multiclones (3T3-LANA3 y 3T3-pcDNA) mostraban que la incorporación del MTT era mucho mayor en las células 3T3-LANA2 que en las 3T3-pcDNA, a los distintos tiempos analizados y esto ocurre tanto cuando se emplearon pases tempranos (Figura 12, A) como tardíos de dichas células (Figura 12, B). Estos resultados indicaban que LANA2 favorecía la proliferación de las células 3T3. Resultados similares se observaron en el análisis de los clones de células 3T3 (3T3-pcDNA-clon1 y 3T3-LANA2-clon1) (Figura 12, C y D). Sin embargo, no observamos diferencias en la proliferación de células HeLa-GFP-LANA2 en comparación con las HeLa-GFP en pases tempranos (Figura 12, E). Por el contrario, cuando este análisis lo llevamos a cabo empleando células que habían sido sometidas a un mayor número de pases, de nuevo observamos que las células que expresaban LANA2 proliferaban más rápidamente que las que no lo expresaban (Figura 12, F).

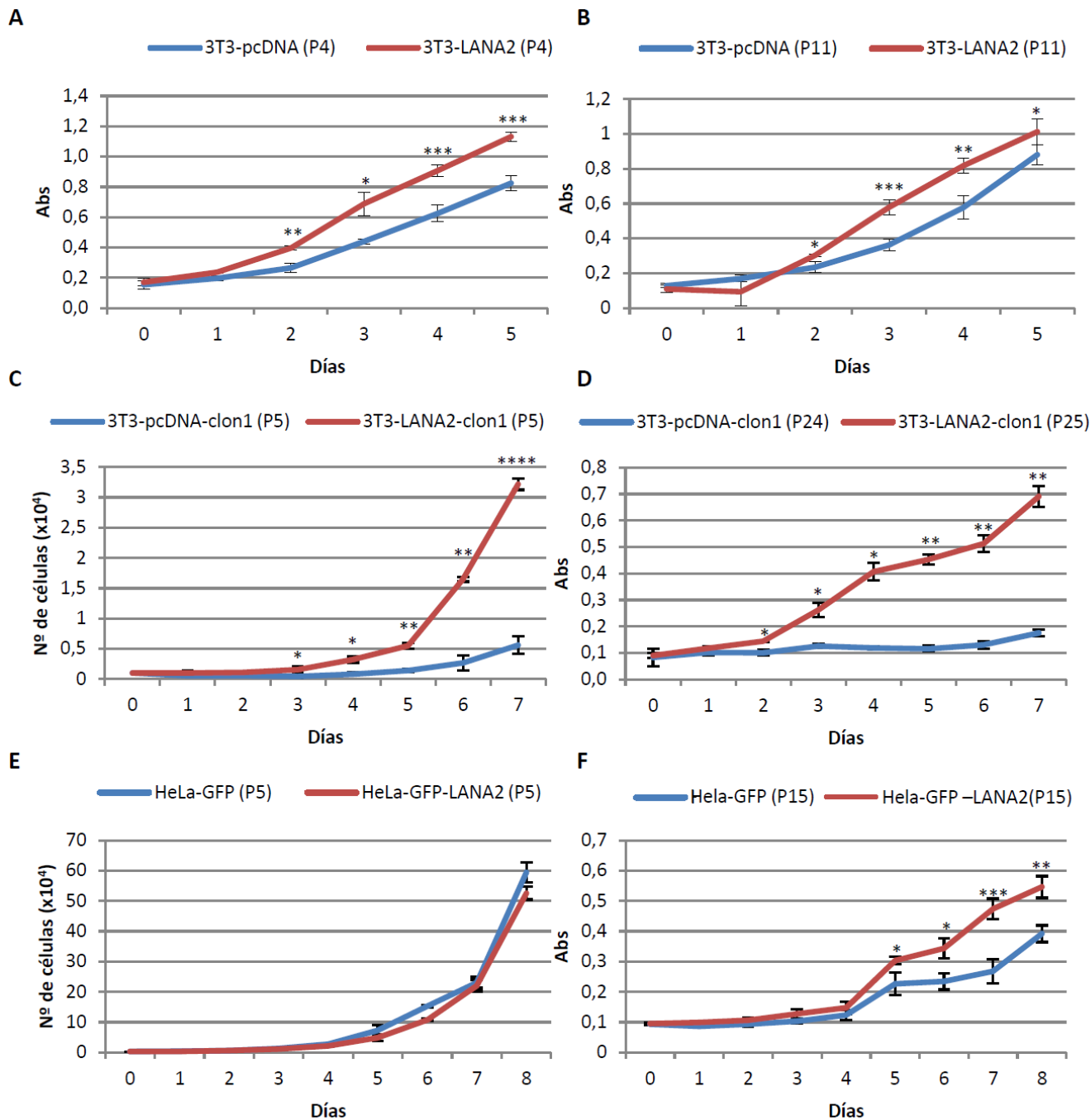


Figura 12. Proliferación de líneas celulares que expresan establemente LANA2. Se muestra el número de células detectado tras recuentos o la absorbancia (Abs) a 550 nm resultante del análisis por MTT, a distintos días. Se estudió la proliferación de las líneas celulares 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2 multiclonales (A y B), de un clon de la línea 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2 (C y D) y de las líneas celulares HeLa-GFP y HeLa-GFP-LANA2 multiclonales (E y F). Además analizamos pases tempranos (A, C y E) y tardíos (B, D y F). Se indica el número de pases exacto entre paréntesis, al lado del nombre de la línea celular (Px). El número de células de que se plaquearon por pocillo fue el siguiente: en A y B, 100 células; en C y F, 1000 células; en D, 300 células y en E, 3000 células. Mediante la prueba t de Student se analizó si la diferencia existente en el número de células detectadas en cada tiempo analizado entre líneas celulares eran significativas, y el resultado se indica con asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$; ****, $p < 0,00005$).

2. LANA2 no causa transformación celular.

Las alteraciones morfológicas y la ventaja proliferativa que LANA2 confiere a las células 3T3 sugerían que LANA2 podría estar favoreciendo la transformación celular de las células 3T3. Con el fin de evaluar dicha hipótesis, se realizaron experimentos de formación de focos. Las células 3T3 se transfectaron con pcDNA, LANA2, la proteína con capacidad transformante Ras, o con una combinación

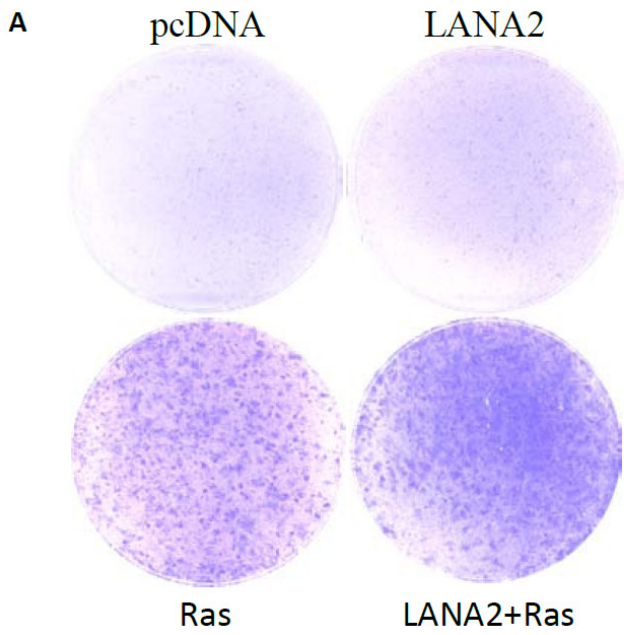
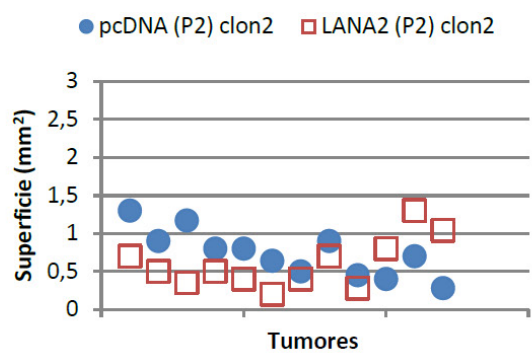
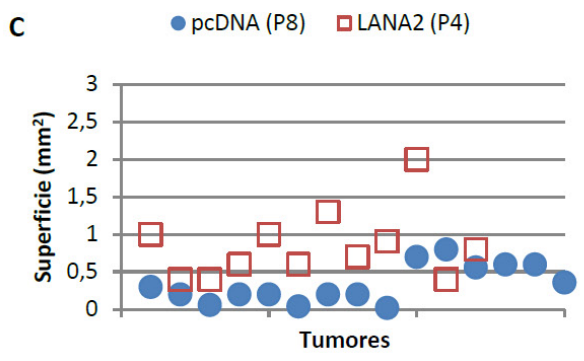
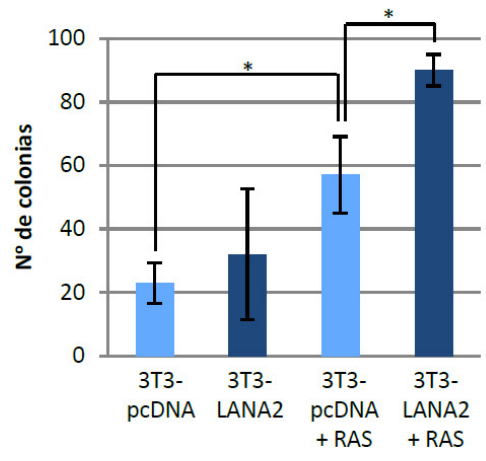
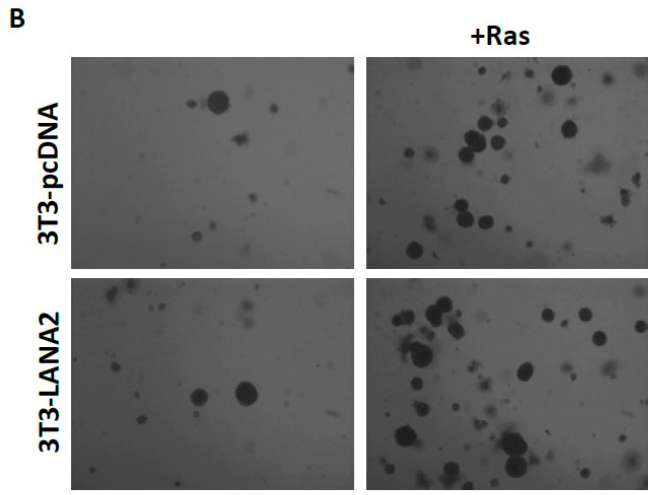


Figura 13. Evaluación de la actividad transformante de LANA2. Se muestra el resultado del ensayo de formación de focos empleando células 3T3 transfectadas con pcDNA o LANA2, y en presencia o ausencia de Ras, como se indica (A). También se analizó la formación de colonias en agar blando comparando las líneas celulares 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2 y en presencia o ausencia de Ras, como se indica. La gráfica de la derecha muestra el resultado del recuento del número de colonias de tamaño representativo (B). Las líneas celulares que se indican fueron inyectadas subcutáneamente en ratones atímicos (5x10⁵ células/inyección) para evaluar su capacidad para formar tumores. Se muestra el tamaño de cada uno de los tumores que aparecen a las dos semanas tras la inyección de las células (C).



de Ras y LANA2, y se evaluó el número de focos resultantes. La expresión de Ras indujo la aparición de focos, como se esperaba (Figura 13, A). Sin embargo, la expresión de LANA2 por sí sola no llevó a la aparición de focos (Figura 13, A). No obstante, la co-expresión de LANA2 con RAS indujo un aumento en el número de focos que se forman tras la transfección de Ras solo. Estos resultados indicaban que

LANA2 no induce la transformación de células 3T3 pero incrementa la actividad transformante de Ras.

A continuación se realizaron ensayos de formación de colonias en agar blando. No se observó formación de colonias por las líneas celulares 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2 (Figura 13, B). Sin embargo, las células 3T3-pcDNA transfectadas con Ras sí formaban colonias (Figura 13, B) y su número se incrementaba significativamente cuando la transfección de Ras se hacía en células que expresan LANA2 establemente (Figura 13, B). Estos resultados indicaban de nuevo que LANA2 sola no era capaz de inducir transformación celular pero potenciaba la transformación inducida por Ras.

El último ensayo realizado para analizar el potencial oncogénico de LANA2, fue evaluar la formación de tumores en ratones atómicos tras la inyección subcutánea de las líneas celulares 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2, tanto mono- como multiclonales. A las dos semanas tras la inyección de las células se procedió a evaluar la aparición de tumores y a determinar el tamaño de los tumores detectados. No hubo diferencias significativas en el número de inoculaciones que dieron lugar a tumores entre las células 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2, y tampoco se observaron diferencias significativas en el tamaño de los tumores formados (Figura 13, C). En su conjunto, estos resultados indicaban que la expresión de LANA2 no induce transformación celular.

Por último, estudiamos la capacidad de LANA2 de alterar el ciclo celular. Para ello llevamos a cabo un análisis por citometría del ciclo celular de las líneas celulares 3T3-pcDNA, 3T3-LANA2, HeLa-pcDNA y HeLa-LANA2 a las 24 horas de ser sembradas a una confluencia del 50%. No se detectaron diferencias significativas entre los perfiles del ciclo celular de las células 3T3 o HeLa en función de la expresión o no de LANA2 (Figura 14).

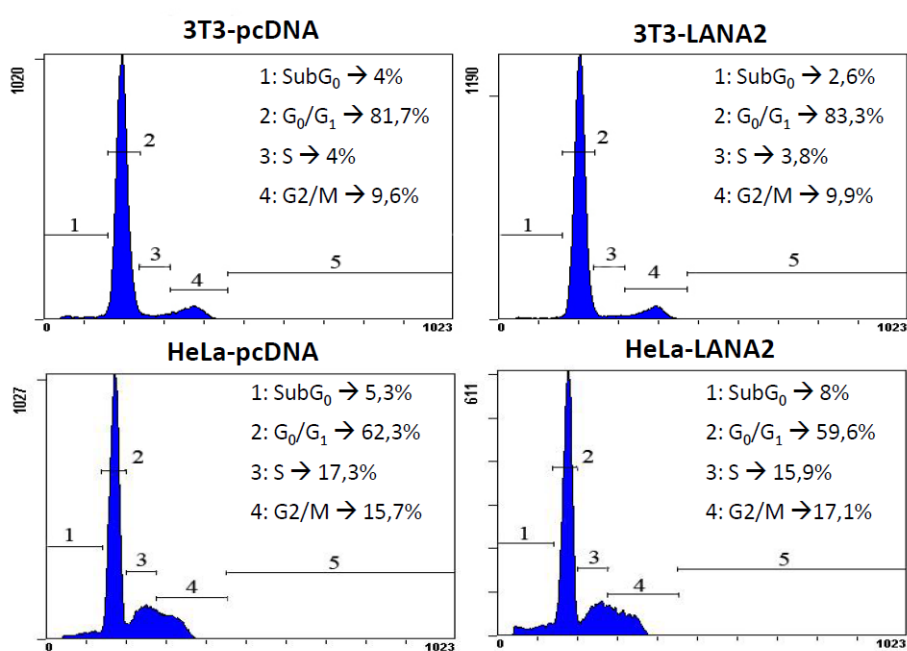


Figura 14. Análisis del ciclo celular de las líneas celulares que expresan LANA2 de forma estable. En las gráficas se representan los ciclos celulares de líneas celulares estables para la expresión de LANA2 generadas en NIH-3T3 y HeLa. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. El análisis se llevó a cabo a las 24 horas de la siembra de las células a una confluencia del 50%. En las gráficas se muestra el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular.

3. LANA2 induce inestabilidad cromosómica.

Con el fin de estudiar si LANA2 era capaz de inducir inestabilidad cromosómica, se analizó la presencia de diversos marcadores asociados con dicha inestabilidad en pases tempranos de las líneas celulares que expresan establemente LANA2 generadas en el laboratorio.

Uno de los marcadores de inestabilidad cromosómica que se analizaron fue la aparición de células polinucleadas. Para ello, las células a analizar se sembraron en cristales a una confluencia del 50% y a las 24 horas de la siembra se tiñeron con tubulina- α y con DAPI. A continuación se procedió a clasificar y hacer recuentos de las células en función de si presentaban dos núcleos (binucleadas) o más de dos núcleos (polinucleadas). En aquellas líneas celulares que expresaban LANA2 de forma estable (3T3-LANA2, HeLa-LANA2 o HeLa-GFP-LANA2), se observó un incremento de células que contenían 2 o más núcleos, respecto a las líneas celulares control correspondientes (Figura 15, A).

Otro marcador de inestabilidad cromosómica que se estudió fue la presencia de micronúcleos. Para ello, las células a analizar se sembraron y tiñeron como se indicó anteriormente. A continuación se llevó a cabo el recuento de la presencia de células con micronúcleos. La expresión de LANA2 tanto en células 3T3 como en HeLa, inducía un incremento significativo del número de células con micronúcleos (Figura 15, B).

A continuación, analizamos el número de centrosomas presentes en aquellas células que expresaban establemente la proteína LANA2 en comparación con aquellas que no la expresaban. Para ello, las células sembradas en cristales como se indicó anteriormente se tiñeron con anticuerpos anti-tubulina- γ , que es un marcador de centrosomas y con DAPI. Este análisis sólo lo pudimos llevar a cabo en células 3T3 ya que en células HeLa no pudimos visualizar los centrosomas a pesar de probar distintos anticuerpos anti-tubulina- γ . Se detectó un incremento significativo en el número de células que presentan más de dos centrosomas cuando estas expresaban LANA2 (Figura 15, C).

Todos estos resultados sugieren que la expresión de LANA2 de forma estable induce inestabilidad cromosómica tanto en células 3T3 como en HeLa. Por último, con la finalidad de poder corroborar los resultados obtenidos hasta el momento, se analizó la presencia de células polinucleadas, con micronúcleos y con más de dos centrosomas en clones de células 3T3 que expresan establemente la proteína viral. De nuevo se volvió a observar que los cultivos que expresaban LANA2 presentaban un mayor porcentaje de células polinucleadas, con micronúcleos y con más de dos centrosomas, confirmando que LANA2 induce inestabilidad cromosómica.

La inestabilidad cromosómica suele ir asociada a la presencia de aberraciones mitóticas. Decidimos entonces evaluar la existencia de dichas aberraciones en las células que expresan de forma

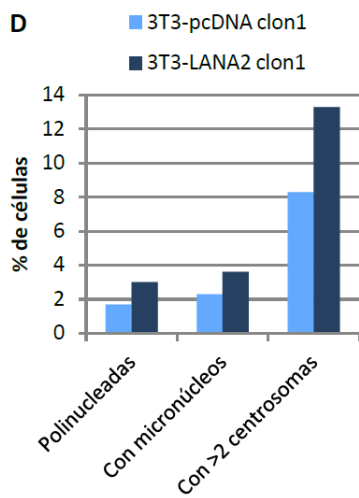
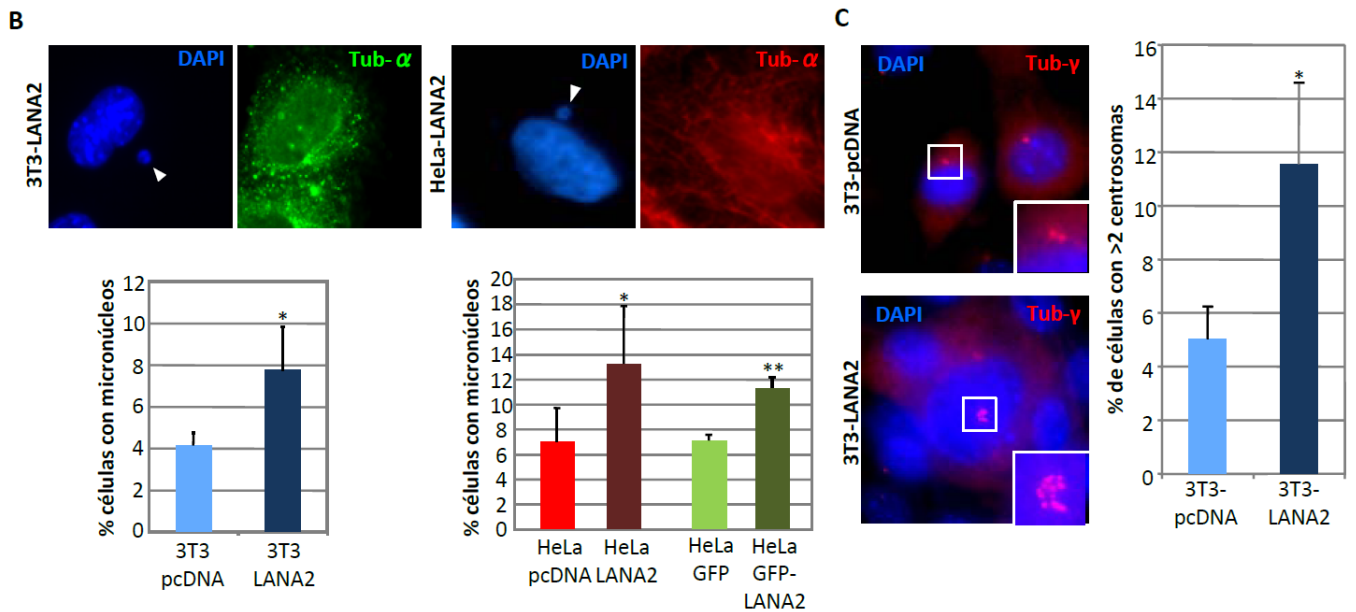
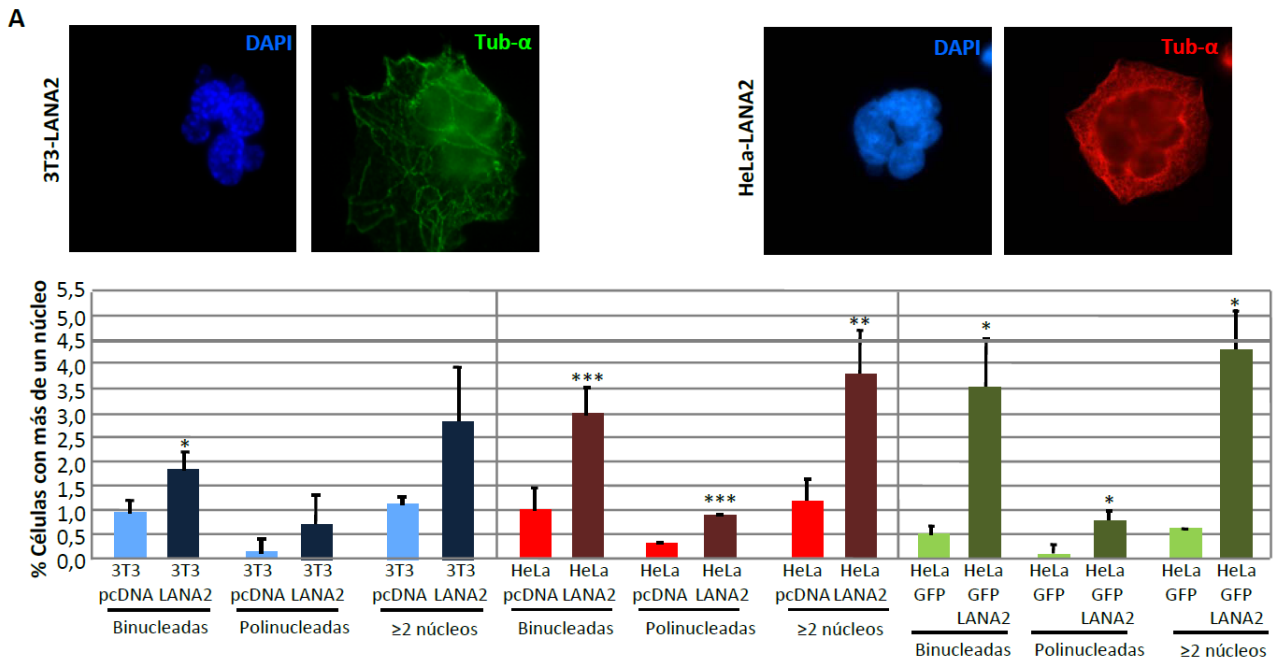


Figura 15. LANA2 induce inestabilidad cromosómica. Las células 3T3-pcDNA, 3T3-LANA2, HeLa-pcDNA, HeLa-LANA2, HeLa-GFP y HeLa-GFP-LANA2 se sembraron en cristales, se tiñeron con DAPI y con anti-tubulina- α o anti-tubulina- γ , y se analizaron al microscopio de fluorescencia. Se hizo el recuento de células que presentaban más de un núcleo (A), con micronúcleos (B) y con más de dos centrosomas (C). Dichos análisis se repitieron en uno de los clones de 3T3 (D). En todos los casos los recuentos se realizaron en al menos 300 células de pases tempranos y se repitieron varias veces para comprobar su reproducibilidad. Los resultados obtenidos se analizaron empleando el parámetro t de Student y en los gráficos se señala si las diferencias son significativas (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$).

estable LANA2. Para ello sincronizamos las células con nocodazol durante 16 horas y a distintos tiempos tras la liberación del tratamiento, fijamos las células y las teñimos con anticuerpo anti-tubulina- α y DAPI. Observamos que poco tiempo después de la liberación del tratamiento con nocodazol (5-10 minutos), gran parte de las células se encontraba en mitosis. Mientras que las células que no expresaban LANA2 presentaban por lo general husos mitóticos normales (Figura 16, A, B, C y D), muchas de las células que expresaban LANA2 mostraban divisiones asimétricas (Figura 16, E, y G) o la formación de tres husos centrales (Figura 16, H). Además, a los 10-15 minutos tras la liberación del nocodazol se encontró que en un gran número de células que expresaba LANA2 la segregación de los cromosomas no era simétrica (Figura 16, I). Por último, las células que se fijaron a los 30 minutos tras la liberación del nocodazol estaban todas en interfase y un gran número de las que expresaban LANA2 mostraban micronúcleos posiblemente formados a partir de los cromosomas rezagados tras la reorganización de la envuelta nuclear (Figura 16, J). Es también importante resaltar que LANA2 se detectó en dichos micronúcleos.

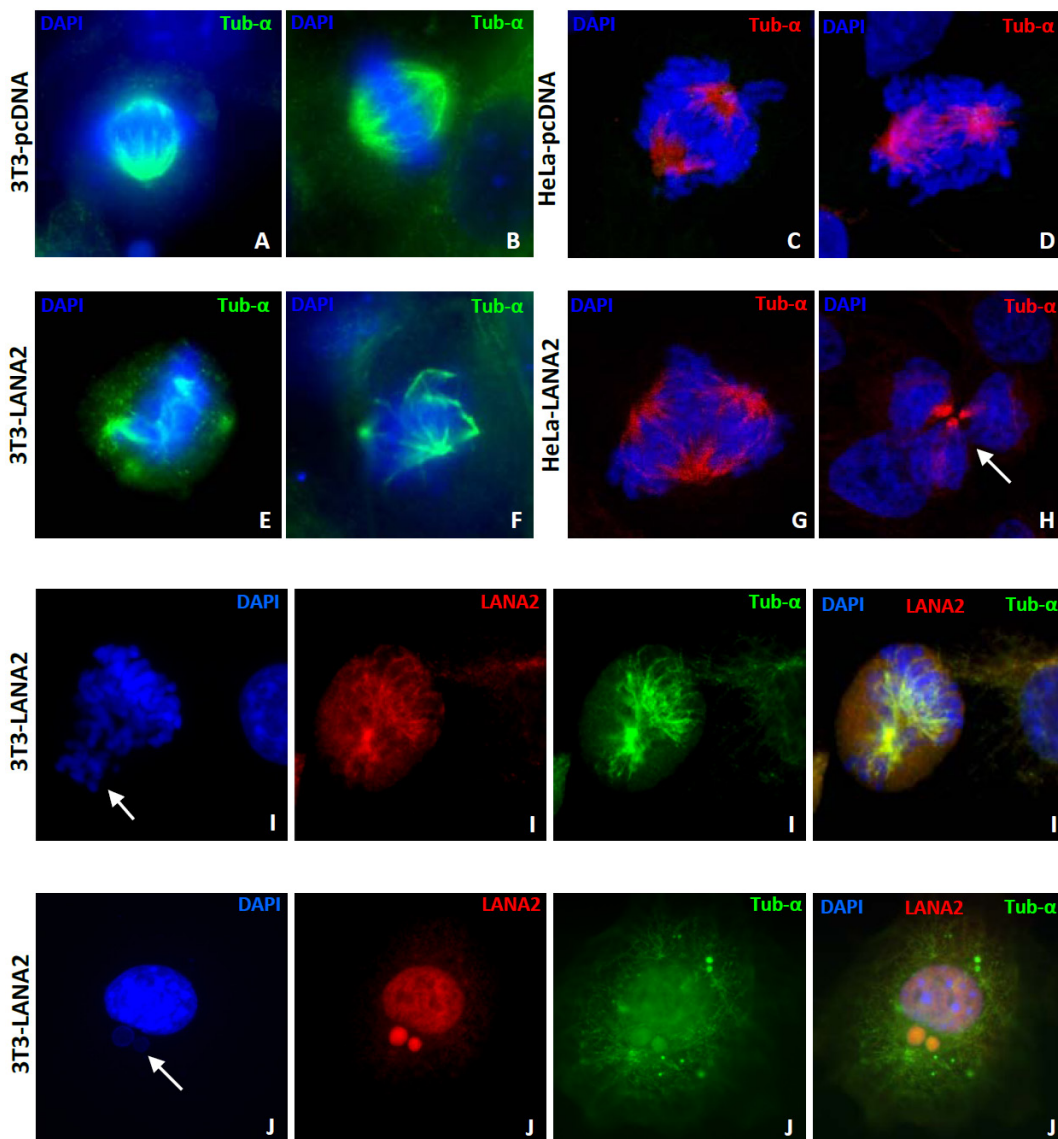


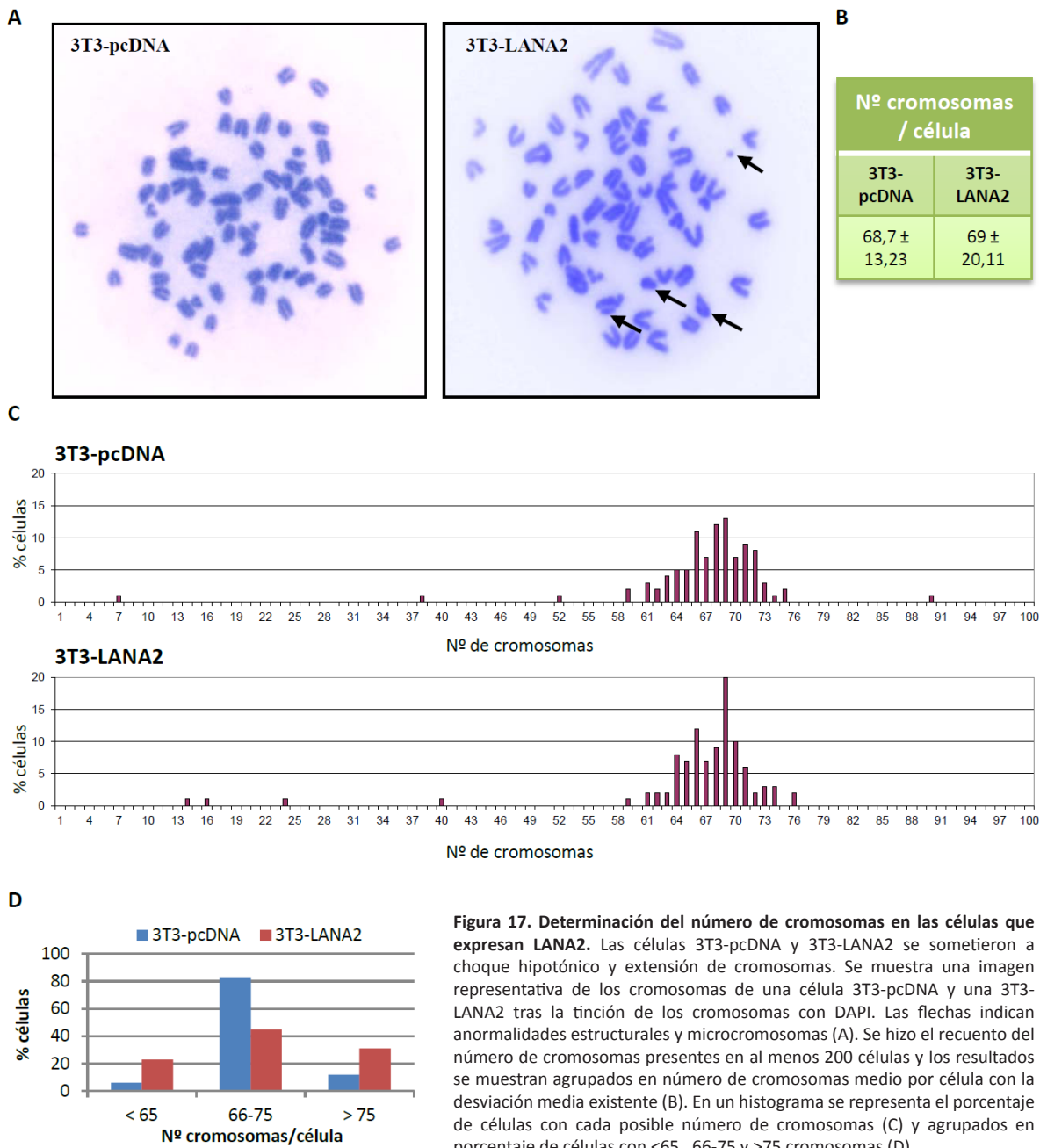
Figura 16. Mitosis aberrantes en células que expresan LANA2. Líneas celulares 3T3-pcDNA, 3T3-LANA2, HeLa-pcDNA y HeLa-LANA2, fueron arrestadas mediante tratamiento con 100 ng/ml de nocodazol. Transcurridas 16 horas las células se liberaron del arresto. A distintos tiempos tras la liberación (5-10 minutos (A-H), 10-15 minutos (I) y 30 minutos (J)), se fijaron las células y se teñieron utilizando anticuerpos anti-LANA2, anti-tubulina- α y DAPI. Las flechas indican la presencia de divisiones asimétricas (H), segregación aberrante de cromosomas (I) y pareja de micronúcleos que expresan LANA2 con bajo contenido en ADN (J).

4. Alteraciones cromosómicas en células que expresan LANA2.

La inestabilidad cromosómica suele ir acompañada de la presencia de alteraciones cromosómicas que pueden ser estructurales o de número. Con el fin de determinar si la expresión de LANA2 conduce a la aparición de dichas alteraciones cromosómicas, hicimos extensión de cromosomas de las células 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2, y se procedió a su análisis. Los cromosomas de las células que expresaban LANA2 contenían numerosas alteraciones estructurales tales como la aparición de microcromosomas (Figura 17, A). Una vez hecho el recuento del número de cromosomas presente en al menos 200 células, analizamos los resultados obtenidos. Las células 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2 tenían un número medio de cromosomas similar, sin embargo, la dispersión de los datos era mucho mayor en las células 3T3-LANA2 que en las 3T3-pcDNA (Figura 17, C). Para hacer más visible la dispersión de los datos se representaron gráficamente el porcentaje de células que mostraban un determinado número de cromosomas (Figura 17, B). Por último, los datos se reagruparon en tres categorías en función del número de cromosomas por célula, de modo que se pudo visualizar mejor el resultado (Figura 17, D). Hay que destacar que, sin embargo, no se observó un aumento en el número de células con un número muy elevado de cromosomas, normalmente asociado a procesos de endorreduplicación.

5. LANA2 inhibe el arresto inducido por nocodazol y por agua oxigenada.

Las células tratadas con nocodazol entran en mitosis pero no proceden a formar husos mitóticos porque el nocodazol impide la polimerización de los microtúbulos. La falta de interacción de los microtúbulos con el cinetocoro activa el punto de control del ensamblaje del huso mitótico y provoca el arresto de las células en prometafase. Como se observa en la Figura 18, y como se esperaba, el tratamiento durante 24 horas con nocodazol de las células 3T3-pcDNA o HeLa-pcDNA indujo el arresto en G2/M. Sin embargo, este arresto fue inhibido en las células que expresan LANA2 (Figura 18). Estos resultados sugerían que LANA2 podría estar inactivando el punto de control del ensamblaje del huso mitótico. Esta hipótesis parece sustentarse al comparar el porcentaje de células apoptóticas que se detectaban tras el tratamiento con nocodazol. Tanto en 3T3 como en HeLa la expresión de LANA2 inducía un aumento del porcentaje de células que entraban en apoptosis, probablemente debido a la entrada en ciclo de células que presentaban defectos en el proceso de replicación (Figura 18). Decidimos entonces evaluar el efecto que la expresión de LANA2 ejerce sobre el arresto celular en G2/M producido como consecuencia del tratamiento con otro agente, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las líneas celulares 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2 se trataron con H_2O_2 a una concentración de 150 μM



durante 2 horas y a continuación se cambió el medio, se incubaron en medio fresco con 10% SBF y se llevó a cabo la observación de las células al microscopio. Mientras que las células que no expresan LANA2 se arrestaban tras el tratamiento con H_2O_2 , de forma que a los cinco días del tratamiento, muy pocas células parecían haber escapado del arresto; las células que expresaban establemente LANA2 escapaban del arresto y seguían proliferando, como lo demuestra el alto número de células observadas a los cinco días del tratamiento (Figura 19, A). Se realizaron entonces ensayos de proliferación de las células tratadas o no con H_2O_2 como se describió previamente mediante el uso del MTT. En el caso de las células 3T3, aquellas que expresaban establemente LANA2 proliferaban significativamente más rápido que las que no la expresaban, como habíamos visto anteriormente (Figura 19, B). Además, aunque en general se ve un retraso en el crecimiento de las células tratadas con H_2O_2 , las células 3T3-LANA2

	Sub G0	G0/G1	S	G2/M	> 4n
3T3-pcDNA 0h	2,4	83,3	3,9	9,9	1
3T3-LANA2 0h	1,3	84,4	3,5	10,0	1
3T3-pcDNA 24h	3,7	11,0	4,5	79,6	8,3
3T3-LANA2 24h	6,5	20,7	8,6	62,9	2,2
3T3-pcDNA 48h	16,5	17,3	9,6	36,5	21,7
3T3-LANA2 48h	21,8	19,1	23,6	25,5	12,5
3T3-pcDNA 72h	20,8	17,0	17,4	18,4	28,2
3T3-LANA2 72h	17,7	18,1	9,7	27,8	27,9
HeLa-pcDNA 0h	2,6	64,1	17,4	17,2	0,3
HeLa-LANA2 0h	3,7	62,4	16,3	19,0	0,4
HeLa-pcDNA 24h	4,1	8,9	10,1	74,7	3,6
HeLa-LANA2 24h	18,5	28,7	24,4	31,9	0,3
HeLa-pcDNA 48h	10,4	21,0	38,4	33,3	0,7
HeLa-LANA2 48h	8,6	18,8	40,5	34,9	0,9
HeLa-pcDNA 72h	7,6	22,3	41,5	29,7	2,6
HeLa-LANA2 72h	7,8	24,9	42,8	26,9	2,2

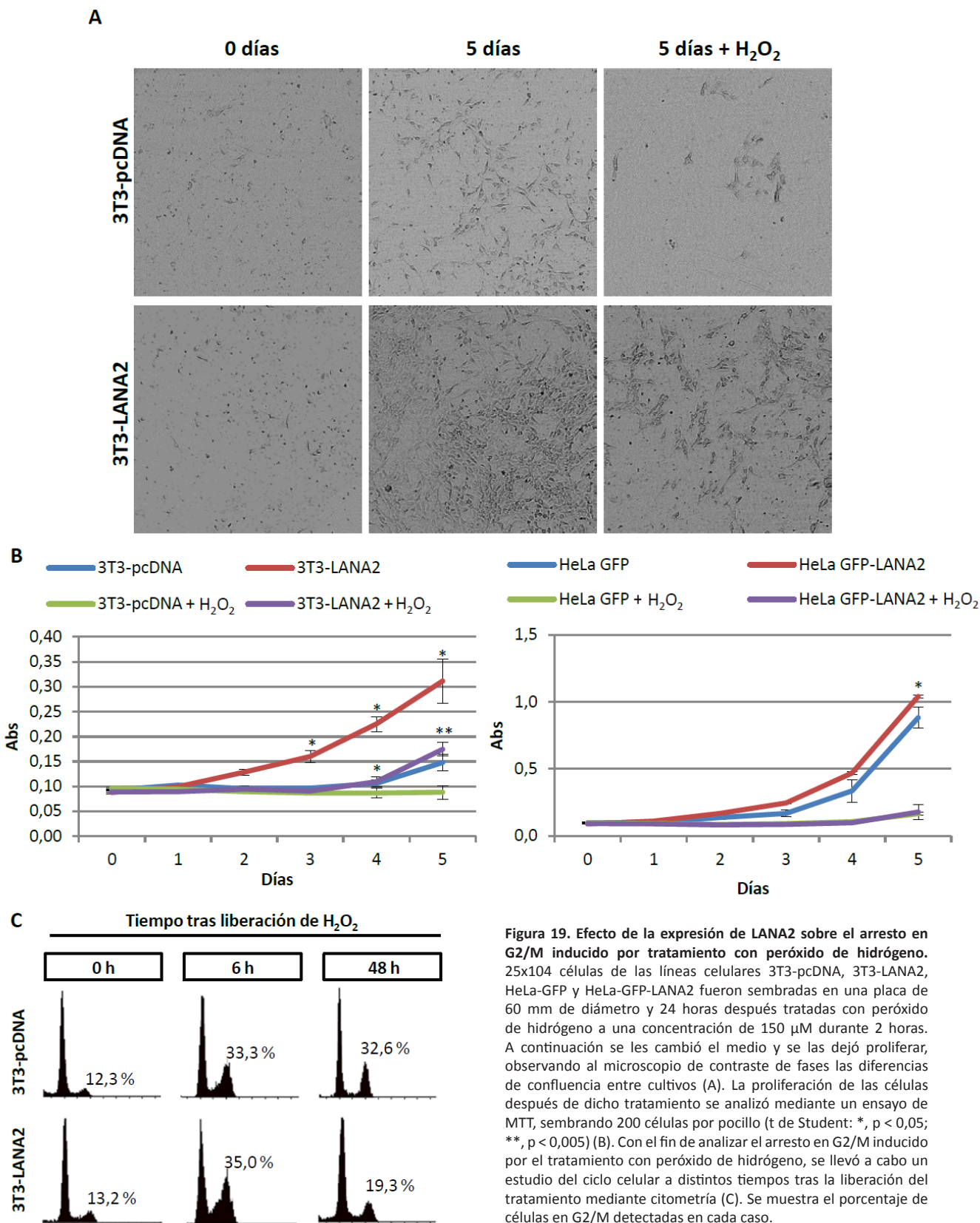
Figura 18. LANA2 impide el arresto en G2/M producido tras el tratamiento con nocodazol. Células 3T3-pcDNA, 3T3-LANA2, HeLa-pcDNA y HeLa-LANA2 se trataron con 100 ng/mL de nocodazol durante los tiempos indicados; momento en que las células se recogieron y se procesaron para análisis del ciclo celular por citometría. En la tabla se muestra el porcentaje de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular tras el tratamiento con nocodazol.

seguían proliferando más que las 3T3-pcDNA de una manera significativa. Sin embargo, esta mayor proliferación sólo la observamos en células 3T3 ya que cuando este experimento se realizó en células HeLa no observamos diferencias entre la proliferación de las HeLa-pcDNA y HeLa-LANA2 tras tratar con H_2O_2 (Figura 19, B). Por último, se analizó mediante citometría el ciclo celular de las células 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2 a distintos tiempos tras el tratamiento con H_2O_2 . A las 6 horas tras el tratamiento con H_2O_2 , ambas líneas celulares presentan un porcentaje similar de células arrestadas en G2/M, pero cuando este análisis se lleva a cabo a las 48 horas del tratamiento se observa que mientras que las células 3T3-pcDNA siguen arrestadas, las que expresan LANA2 parecen haber entrado de nuevo en ciclo ya que el porcentaje de células arrestadas en G2/M se reduce de forma significativa (Figura 19, C).

Estos resultados indican que LANA2 inhibe el arresto del ciclo celular inducido por el tratamiento con nocodazol en 3T3 y HeLa, y el que induce el H_2O_2 en 3T3.

6. La proteína LANA2 co-localiza con los microtúbulos e interacciona con la tubulina- γ , pero no se asocia a los cromosomas.

Previamente habíamos demostrado que la proteína LANA2 interacciona con los microtúbulos in vitro y altera la polimerización de los microtúbulos (Munoz-Fontela, Marcos-Villar et al. 2008).



Especulamos entonces con la posibilidad de que LANA2 interaccionara con la tubulina- γ . Para evaluar esta posibilidad, primero analizamos si la co-localización entre la tubulina- α y LANA2 ocurría de forma estable a lo largo de todo el ciclo celular. Para ello analizamos 3T3-LANA2 mediante inmunofluorescencia a distintos tiempos tras la liberación del arresto con nocodazol. El análisis con

microscopio confocal reveló que LANA2 se localizaba principalmente en el núcleo de las células en interfase (Figura 20, A, panel I). Sin embargo, cuando la célula progresa en el ciclo celular, LANA2 se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, co-localizando con los microtúbulos polimerizados (Figura 20, A, panel II). A continuación, cuando la cromatina comienza a condensarse y se forman los husos mitóticos, LANA2 co-localiza con los microtúbulos polimerizados de los husos y se excluye de la zona donde se encuentran los cromosomas condensados (Figura 20, A, panel III). Una vez acabada la división celular, cuando la tubulina vuelve a un estado menos polimerizado, LANA2 se localiza de nuevo en el núcleo (Fig. 3 A, panel IV). Estos resultados confirmaban que LANA2 co-localiza con la tubulina cuando se encuentra en estado polimerizado, y sugerían que LANA2 co-localizaba con los centrosomas.

Con el fin de determinar si LANA2 interactuaba con la tubulina- γ , se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación entre ambas proteínas. Se prepararon extractos proteicos de células B infectadas latentemente con KSHV y que, por tanto, expresan LANA2 (BC-1); o de células B no infectadas (MHH). Dichos extractos se pusieron a inmunoprecipitar con anticuerpos anti-tubulina- γ , anti-LANA2 o un anticuerpo control. El análisis de los inmunoprecipitados mediante WB empleando un anticuerpo anti-LANA2 reveló que existía una co-inmunoprecipitación entre ambas proteínas en aquellos extractos de células BC-1 incubados con anticuerpo frente a tubulina- γ y no en aquellos incubados con el anticuerpo control (Figura 20, B) y solo en las células infectadas con KSHV. Estos resultados confirman, por tanto, la interacción entre las proteínas LANA2 y tubulina- γ in vivo.

Por último, quisimos evaluar la posibilidad de que LANA2 estuviera además interactuando con los cromosomas. Para ello los cromosomas de células HeLa-GFP-LANA2 se extendieron en portas y se tiñeron con yoduro de propidio con el fin de visualizarlos. A continuación se analizó mediante microscopía de fluorescencia si la proteína viral marcada con GFP co-localizaba con los cromosomas. Sin embargo, no se llegó a poder ver co-localización alguna entre LANA2 y los cromosomas (Figura 20, C).

7. La expresión de LANA2 empleando un sistema inducible por doxiciclina favorece la proliferación celular.

Hasta el momento se han ido mostrando los efectos de la expresión estable de LANA2 en distintas líneas celulares. Dichos efectos podrían ser el resultado de la expresión permanente y prolongada de la proteína. Con el fin de evaluar el efecto de la expresión de LANA2 de novo, se generaron líneas celulares de expresión inducible por tetraciclinas de GFP o GFP-LANA2 en MEFs inmortales pTET-ON (3T3 inducibles). Para comprobar la expresión de la proteína analizamos mediante western-blot

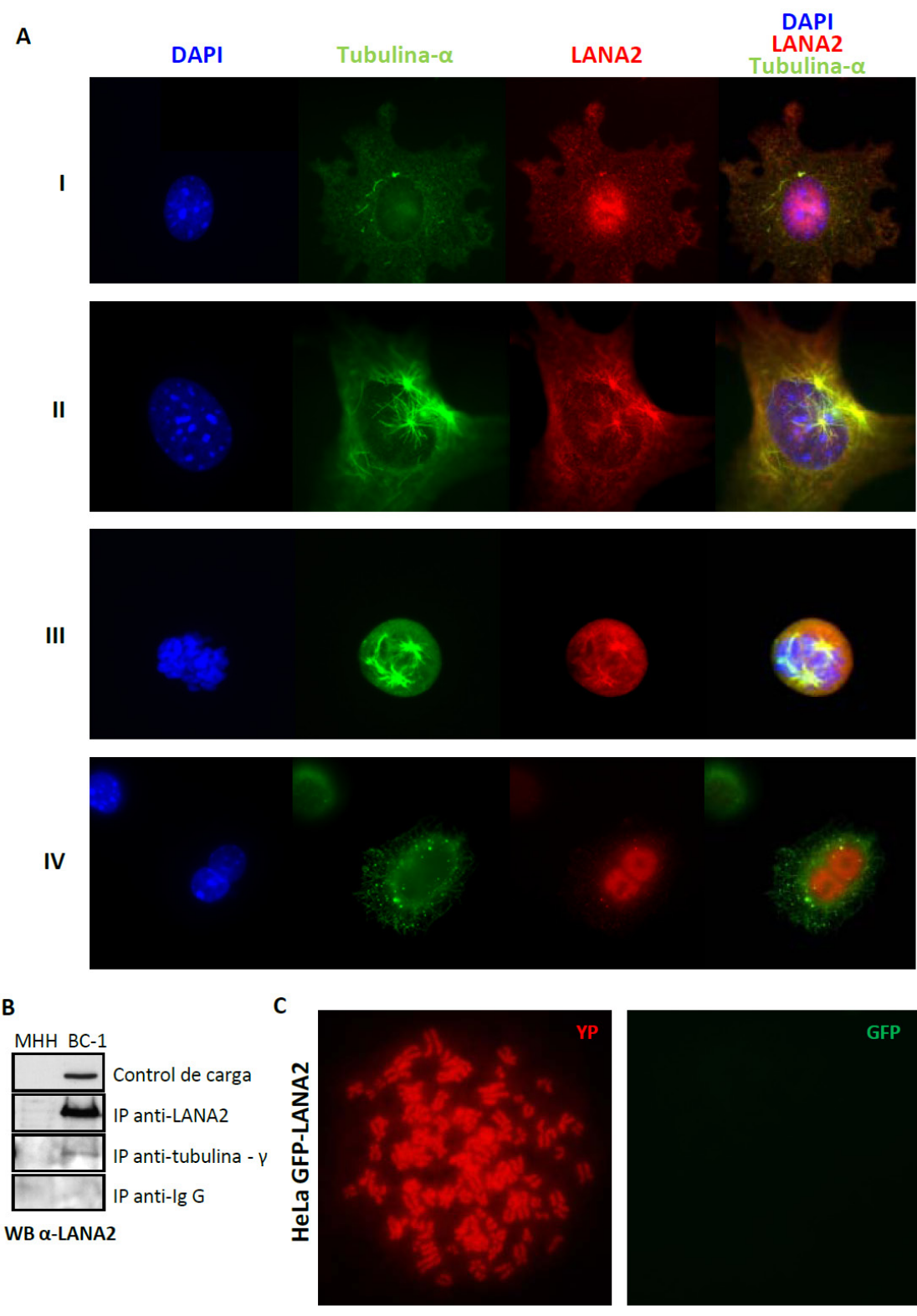


Figura 20. Análisis de la localización sub-celular de LANA2 en distintos estadios del ciclo celular. Las células 3T3-LANA2 fueron tratadas con 100 ng/mL de nocodazol durante 16 horas. Posteriormente, las células fueron liberadas del tratamiento con la droga y fijadas a distintos tiempos de su liberación (I: 0 minutos, II: 10 minutos, III: 15 minutos y IV: 30 minutos). Posteriormente, la localización de LANA2 se determinó mediante la técnica de inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-tubulina- α y anti-LANA2 (A). Extractos proteicos obtenidos a partir de las líneas celulares MHH (no infectadas con KSHV) y BC-1 (infectadas con KSHV) fueron incubados con anticuerpos anti-LANA2, anti-tubulina- γ o un anticuerpo control. Se realizó entonces el análisis de la proteína LANA2 co-inmunoprecipitada en cada caso mediante WB empleando anticuerpo anti-LANA2 (B). Células HeLa-GFP-LANA2 fueron sometidas a un choque hipotónico y se llevó a cabo la extensión de los cromosomas en un porta. Los cromosomas se tiñeron con yoduro de propidio (YP) y la presencia de GFP-LANA2 interaccionando con los cromosomas se evaluó mediante microscopía de fluorescencia (C).

usando anticuerpo anti-GFP, la expresión de GFP o GFP-LANA2 en los extractos de células tratadas con doxiciclina a distintos tiempos del inicio del tratamiento. Comprobamos que a las 4 horas del tratamiento se detectaban niveles bajos de la proteína que iban incrementándose hasta las 24 horas cuando ya los niveles detectados eran muy elevados (Figura 21, A).

Como se hizo inicialmente con las líneas celulares de expresión estable, se analizó si la expresión inducible de LANA2, era capaz de producir una ventaja proliferativa de las células. Mediante ensayos de proliferación con MTT se comprobó que durante los primeros días de expresión de LANA2, no se encontraban diferencias en la proliferación. Sin embargo, a partir del sexto día del tratamiento con doxiciclina, se observó que las células que expresaban GFP-LANA2 proliferaban a una mayor velocidad que las que expresaban GFP (Figura 21, B). Analizamos la morfología de dichas células mediante su visualización al microscopio y observamos que aquellas que expresaban GFP-LANA2 en general parecían más pequeñas y regulares que las que expresaban GFP (Figura 21, C). Además, analizamos el ciclo celular de las células a distintos tiempos tras el tratamiento con doxiciclina mediante citometría. A las 24 horas después del tratamiento con doxiciclina observamos un arresto en G0/G1 de las células que expresaba GFP-LANA2 (Figura 21, D). Este arresto de las células que expresaban GFP-LANA2 no se observó en los análisis realizados en células tratadas durante más tiempo. Estos resultados sugerían que la expresión de novo de LANA2 era capaz de producir un arresto del ciclo celular en G0/G1 a tiempo temprano. Para evaluar esta hipótesis se transfectaron células HeLa con GFP o GFP-LANA2 y a las 24 horas tras la transfección analizamos el ciclo celular de las células seleccionadas por su expresión de GFP. Al igual que ocurrió en las líneas celulares de expresión inducible, LANA2 indujo un arresto del ciclo celular en G0/G1 durante el comienzo de su expresión y un aumento en el porcentaje de células en apoptosis (la fase SubG0 del ciclo celular) (Figura 21, E). Estos resultados sugerían que la expresión de novo de LANA2 de alguna forma ejercía un estrés en la célula que activaba los puntos de control del ciclo celular produciendo un arresto en G0/G1.

8. LANA2 induce inestabilidad cromosómica en líneas celulares de expresión inducible.

Anteriormente vimos que la expresión estable de LANA2 en 3T3 o HeLa, inducía un incremento del número de células polinucleadas, con micronúcleos y células con más de dos centrosomas. Decidimos entonces analizar si la expresión inducible de LANA2 también producía un incremento de los marcadores de inestabilidad cromosómica. Para ello analizamos 3T3 inducibles para la expresión de GFP-LANA2 cultivados en ausencia y presencia de doxiciclina mediante la técnica de inmunofluorescencia, empleando anticuerpos anti-tubulina- α , anti-tubulina- γ y DAPI. Observamos que a las 24 horas del tratamiento con doxiciclina de las células GFP-LANA2 se producía un incremento de

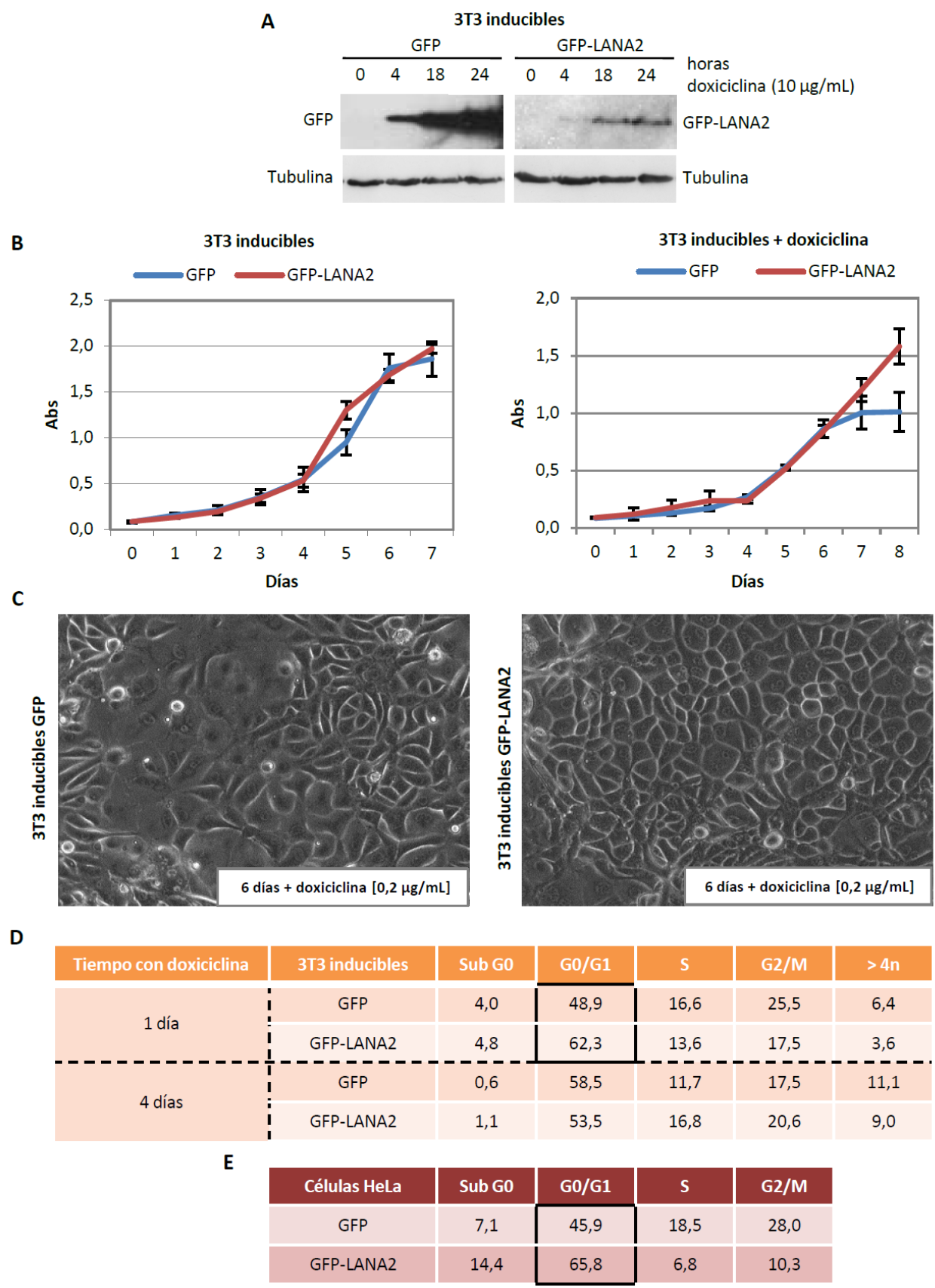


Figura 21. Efectos de la expresión inducible o transitoria de LANA2. Las líneas celulares generadas que expresan GFP o GFP-LANA2 tras el tratamiento con doxiciclina, fueron analizadas mediante western-blot para comprobar la expresión de las proteínas (A). Se cultivaron 1000 células de cada una de estas líneas celulares inducibles en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de doxiciclina (a una concentración de 0,2 µg/mL), y se llevó a cabo un ensayo de proliferación mediante MTT (B). Dichas células también se sembraron a baja confluencia en medio con 0,2 µg/mL de doxiciclina. Se dejaron proliferar a las células, y a distintos días (se muestra día 6), se tomaron fotografías al microscopio en contraste de fases para comparar la morfología celular (C) o se recogieron para analizar el ciclo celular mediante citometría (D). Además, células HeLa se transfectaron con GFP o GFP-LANA2, y a las 24 horas de la transfección se analizó su ciclo celular por citometría de flujo seleccionando las células positivas para GFP (E).

células polinucleadas con contenido irregular de ADN (Figura 22, A). También se observó un aumento del número de centrosomas acompañado de importantes alteraciones en la formación de los husos mitóticos en aquellas células que expresaban LANA2 (Figura 22, B). Por último, también pudimos observar células que parecían sufrir un defecto en la cariocinesis (Figura 23). Así, observamos núcleos con zonas lobulares y estrechamientos, células con varios núcleos lobulares de tamaño homogéneo y núcleos unidos por puentes carioplásmicos (Figura 23). Por último se tiñeron con anticuerpos anti-tubulina- α , anti-tubulina- γ y DAPI, y evaluamos la co-localización entre tubulina y LANA2. Observamos que LANA2 co-localizaba con los microtúbulos del huso mitótico y con los centrosomas en mitosis (Figura 24). En conjunto, todos estos resultados en conjunto indicarían que la expresión inducible de LANA2 produce inestabilidad cromosómica.

9. La expresión de LANA2 en fibroblastos primarios de ratón induce inestabilidad cromosómica y apoptosis.

Nuestros resultados indicaban que aunque LANA2 favorecía la proliferación de las células inmortalizadas 3T3, no inducía su transformación. Especulamos entonces con la posibilidad de que LANA2 pudiera favorecer la inmortalización celular. Para analizar esta posibilidad, nucleofectamos fibroblastos de ratón primarios (MEFs WT) con pEGFP-C1 o pEGFP-LANA2, y analizamos al microscopio de fluorescencia la evolución de las células transfectadas. Sorprendentemente observamos que pocas horas después de ser nucleofectadas las células que expresaban LANA2 se morían (Figura 25, A). Este efecto se comprobó haciendo video-microscopía de las células nucleofectadas con GFP o GFP-LANA2. A partir de las 6 horas de la nucleofección la mayoría de las células que expresaban GFP-LANA2 se morían, mientras que las que expresaban GFP permanecían vivas.

Con el fin de analizar cuál era el efecto de LANA2 a nivel molecular, se recogieron extractos de los MEFs WT nucleofectados con plásmidos de expresión de GFP o GFP-LANA2, y se analizaron mediante western-blot empleando anticuerpos relacionadas con la proliferación y el control del ciclo celular como p53, pRb, AKT-fosforilado o I κ B α . No detectamos diferencias significativas en el nivel de ninguna de las proteínas analizadas (Figura 25, B). Tan sólo al evaluar la inducción de apoptosis mediante análisis por western-blot empleando anticuerpos frente a la proteína PARP, se observó un incremento de los niveles del PARP procesado al expresarse GFP-LANA2 (Figura 25, B). Esto indicaría que la expresión de LANA2 induce la muerte de los fibroblastos primarios de ratón a través de apoptosis.

Decidimos entonces analizar si, previa a la muerte de las células, tienen lugar procesos relacionados con la inducción de inestabilidad cromosómica. Para ello, nucleofectamos MEFs WT

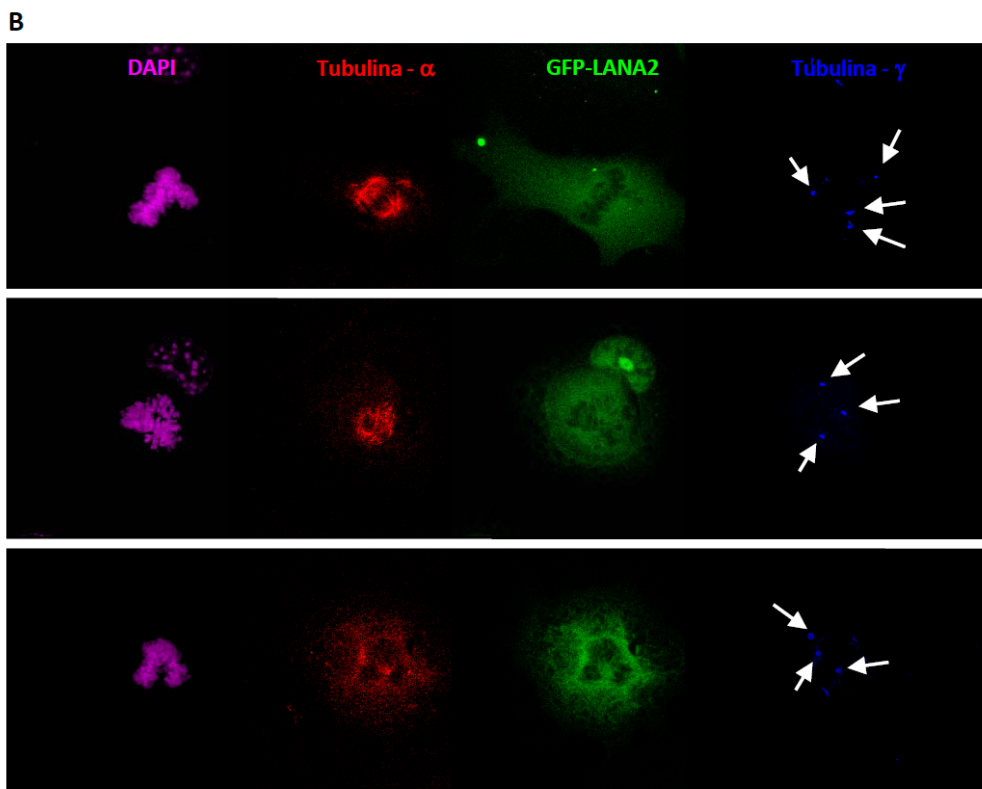
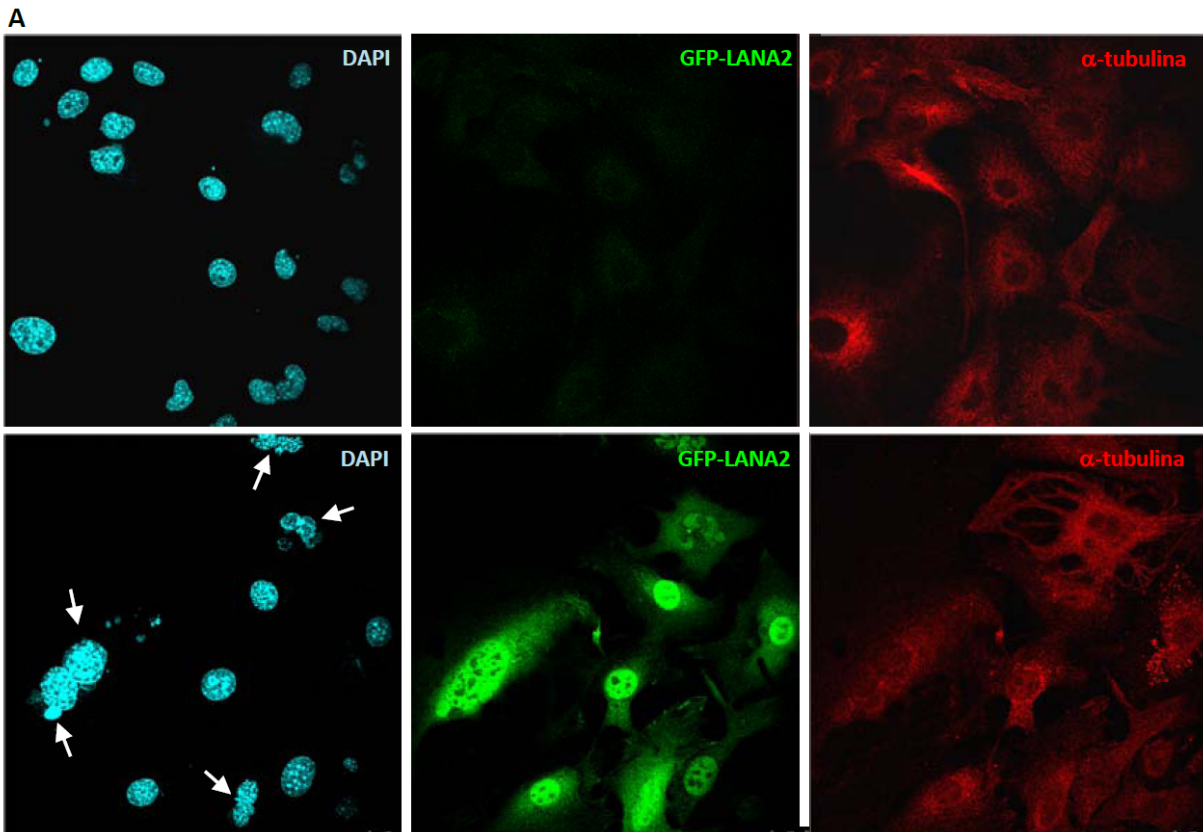


Figura 22. La expresión de LANA2 de manera inducible favorece la aparición de células polinucleadas o con contenido irregular de ADN y alteraciones del huso mitótico con la presencia de más de dos centrosomas. Células 3T3 que expresan induciblemente GFP-LANA2 fueron incubadas en presencia o ausencia de doxiciclina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas, momento en que las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti-tubulina- α y DAPI. En presencia de doxiciclina se comprobó la expresión de GFP-LANA2 y la aparición de células polinucleadas con contenido irregular de ADN (flechas) (A). Estas células tratadas con doxiciclina también se sincronizaron manteniéndolas sin SBF durante la noche y al día siguiente se refrescaron con medio complementado con 10% de SBF en presencia de doxiciclina. Cuando las células se fijaron a las 12 horas tras la reintroducción del SBF, había un número elevado de células en mitosis. Dichas células se tiñeron con anticuerpos anti-tubulina- α , anti-tubulina- γ y DAPI, y se analizaron mediante microscopía confocal. Se observó un número elevado de células con más de dos centrosomas (flechas), husos mitóticos aberrantes y cromosomas mal alineados en la placa ecuatorial (B).

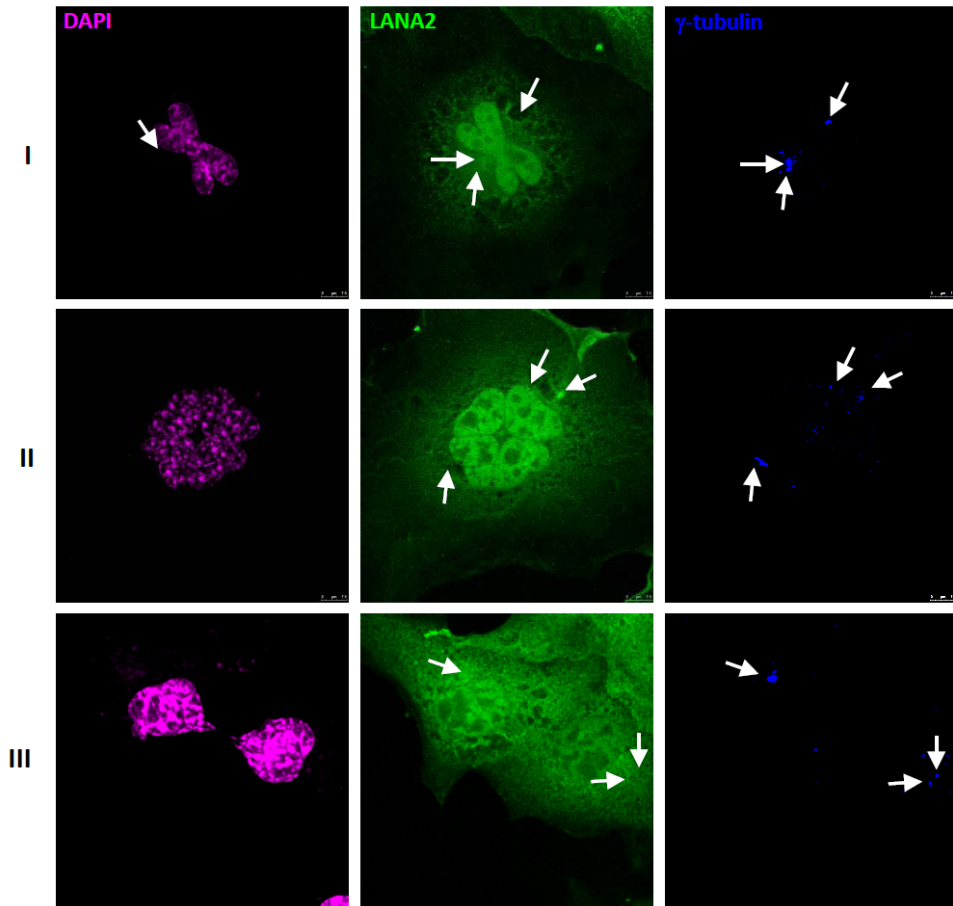


Figura 23. Alteraciones en la cariocinesis tras la expresión de LANA2 de forma inducible. Células 3T3 inducibles GFP-LANA2 se trataron con doxiciclina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se sincronizaron incubándolas en medio sin suero durante 24 horas, tras lo cual se añadió medio con suero al 10%. Después de 18 horas en presencia de SBF y doxiciclina, se realizó tinción de las células con anticuerpo anti-tubulina- γ y DAPI, y se analizaron mediante microscopía confocal. En las imágenes se muestran algunas de las células que expresan LANA2. Con frecuencia se observaron anomalías en la cariocinesis, asociadas normalmente a la presencia de más de dos centrosomas por célula (flechas).

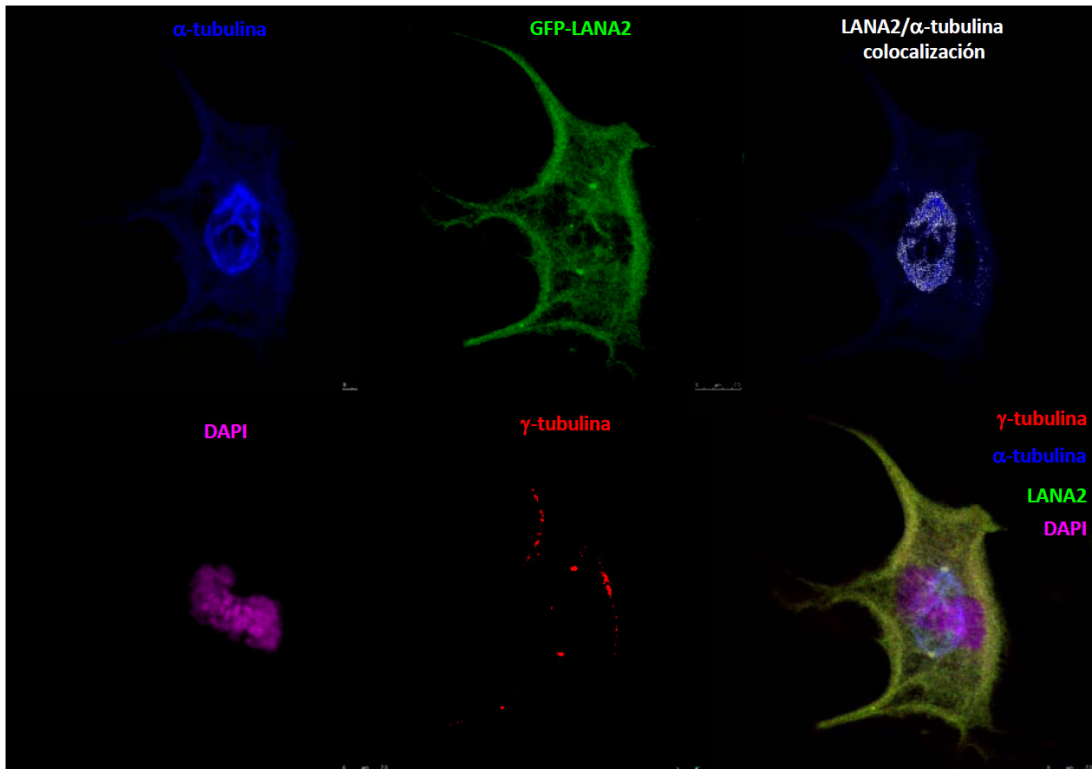


Figura 24. LANA2 co-localiza con los centrosomas y los husos mitóticos. Células 3T3 inmortales GFP-LANA2 se trataron con doxiciclina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y a las 24 horas se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos anti-tubulina- α , anti-tubulina- γ y DAPI. Posteriormente se realizó un análisis de co-localización entre LANA2, tubulina- α y tubulina- γ mediante microscopía confocal.

con GFP o GFP-LANA2 y a las 6 horas de la nucleofección, las fijamos y teñimos con anticuerpos anti-tubulina- α , anti-tubulina- γ y DAPI. El análisis mediante confocal de dichas preparaciones revelaron que el número de células polinucleadas detectadas tras la nucleofección de LANA2 era mayor que las observadas tras la nucleofección de GFP. Detectamos también un aumento significativo en el porcentaje de células que expresaban LANA2 con micronúcleos y con más de dos centrosomas (Figura 25, C). Estos resultados indicaban que la expresión de LANA2 en fibroblastos primarios de ratón inducía inestabilidad cromosómica y la muerte celular por apoptosis.

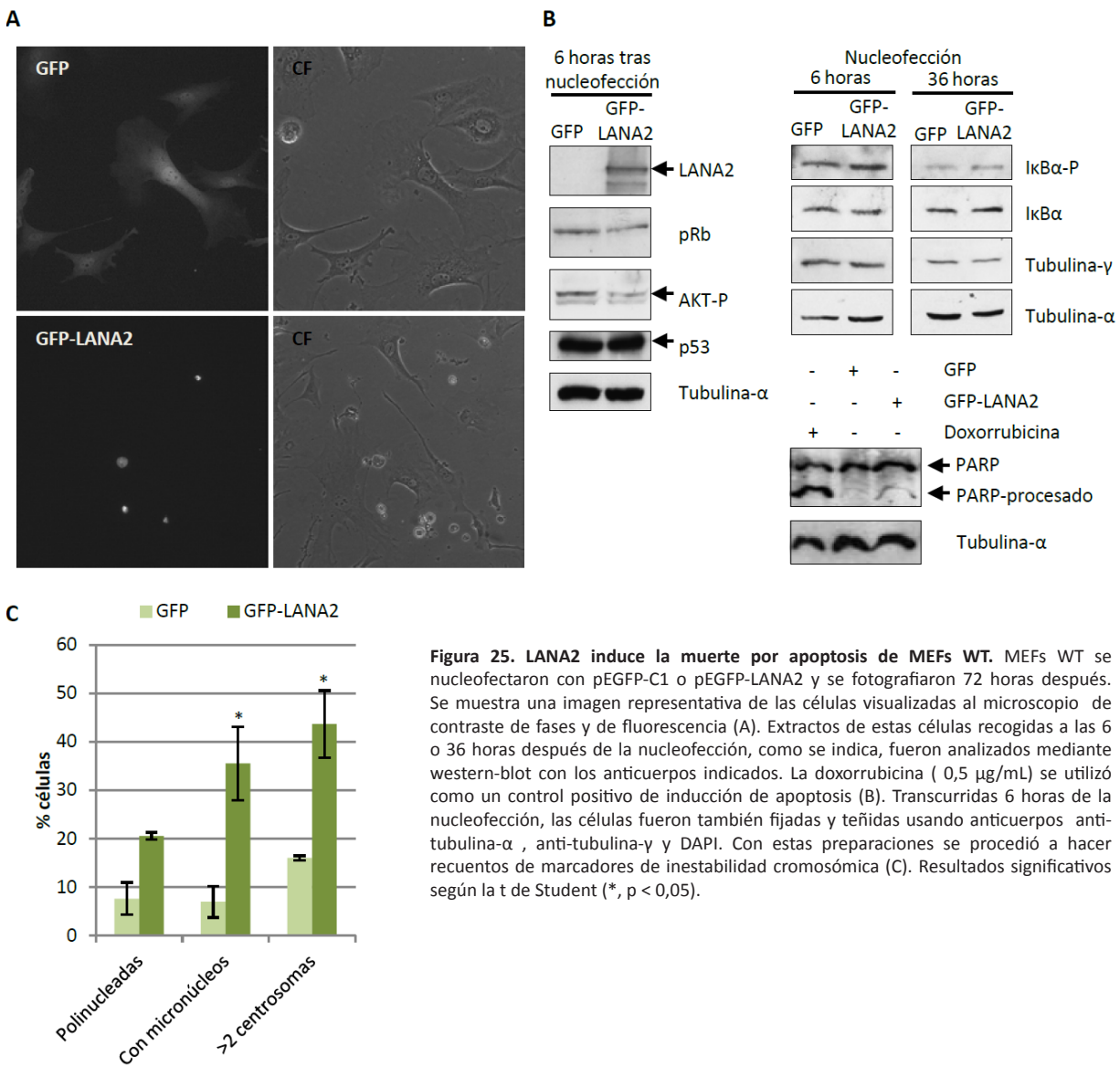


Figura 25. LANA2 induce la muerte por apoptosis de MEFs WT. MEFs WT se nucleofectaron con pEGFP-C1 o pEGFP-LANA2 y se fotografiaron 72 horas después. Se muestra una imagen representativa de las células visualizadas al microscopio de contraste de fases y de fluorescencia (A). Extractos de estas células recogidas a las 6 o 36 horas después de la nucleofección, como se indica, fueron analizados mediante western-blot con los anticuerpos indicados. La doxorrubicina (0,5 μ g/mL) se utilizó como un control positivo de inducción de apoptosis (B). Transcurridas 6 horas de la nucleofección, las células fueron también fijadas y teñidas usando anticuerpos anti-tubulina- α , anti-tubulina- γ y DAPI. Con estas preparaciones se procedió a hacer recuentos de marcadores de inestabilidad cromosómica (C). Resultados significativos según la t de Student (*, $p < 0,05$).

10. La muerte de los fibroblastos primarios de ratón tras la expresión de LANA2 requiere la expresión de pRb.

Los resultados anteriores sugieren que LANA2 podría estar induciendo la muerte de los fibroblastos primarios de ratón como consecuencia del aumento en la inestabilidad cromosómica generada en los mismos. Decidimos entonces evaluar esta hipótesis. Analizamos entonces cuál era el efecto de la expresión de LANA2 en fibroblastos primarios de ratón carentes de pRb o p53 en comparación con fibroblastos WT. Para ello se cultivaron MEFs WT, MEFs p53 KO y MEFs pRb KO, y se nucleofectaron con pEGFP-LANA2 y H2AmCherry, un plásmido que permite la visualización de la cromatina. A partir de las 6 horas tras la nucleofección se hizo video-microscopía de las células transfectadas durante 18 horas. En dichos videos se pudo observar que a las 3 horas de haber comenzado la captación de imágenes, la mayoría de las células MEFs WT que expresaban GFP-LANA2 ya estaban muertas. Sin embargo, es a partir de las 12 horas tras el comienzo de la grabación de los videos, cuando comenzamos a detectar la muerte de los MEFs p53 KO que expresaban GFP-LANA2. El análisis de los MEFs pRb KO reveló que las células que expresan LANA2 permanecían vivas al finalizar el estudio (Figura 26, A). Estos datos indicaban que la inducción de muerte celular por LANA2 en fibroblastos primarios requiere la presencia de pRb. Quisimos entonces estudiar la hipótesis de que la muerte de los fibroblastos primarios de ratón se debía o no a la inestabilidad cromosómica generada por LANA2. Evaluamos entonces si previa a la muerte de los MEFs se detectaban indicadores de inestabilidad en aquellas células que expresaban LANA2. Los MEFs p53 KO que expresaban GFP-LANA2 mostraron un ligero incremento en el porcentaje de células polinucleadas y un aumento significativo de células con más de dos centrosomas en comparación con las células que expresaban GFP. En las células MEFs pRb KO se detectó un ligero aumento del porcentaje de células con micronúcleos y de células con más de dos centrosomas, aunque solo el incremento de células polinucleadas fue significativo (Figura 26, B).

11. La proteína H2AX fosforilada se acumula en células que expresan establemente LANA2 o de forma inducible.

La mayor proliferación de las células 3T3 y HeLa que expresaban LANA2 de forma estable, y la muerte de los fibroblastos primarios de ratón nos llevó a hipotetizar que LANA2 pudiera estar induciendo una respuesta a daño al ADN en las células. Para evaluar esta hipótesis, las líneas celulares 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2, o las células que expresan de forma inducible LANA2 fueron analizadas mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpo frente a la proteína H2AX fosforilada en la serina 139 (H2AX- γ), marcador de daño al ADN. Análisis mediante confocal de las muestras estudiadas revelaron un incremento en la intensidad de la señal de H2AX- γ en las 3T3-LANA2 respecto a las 3T3-

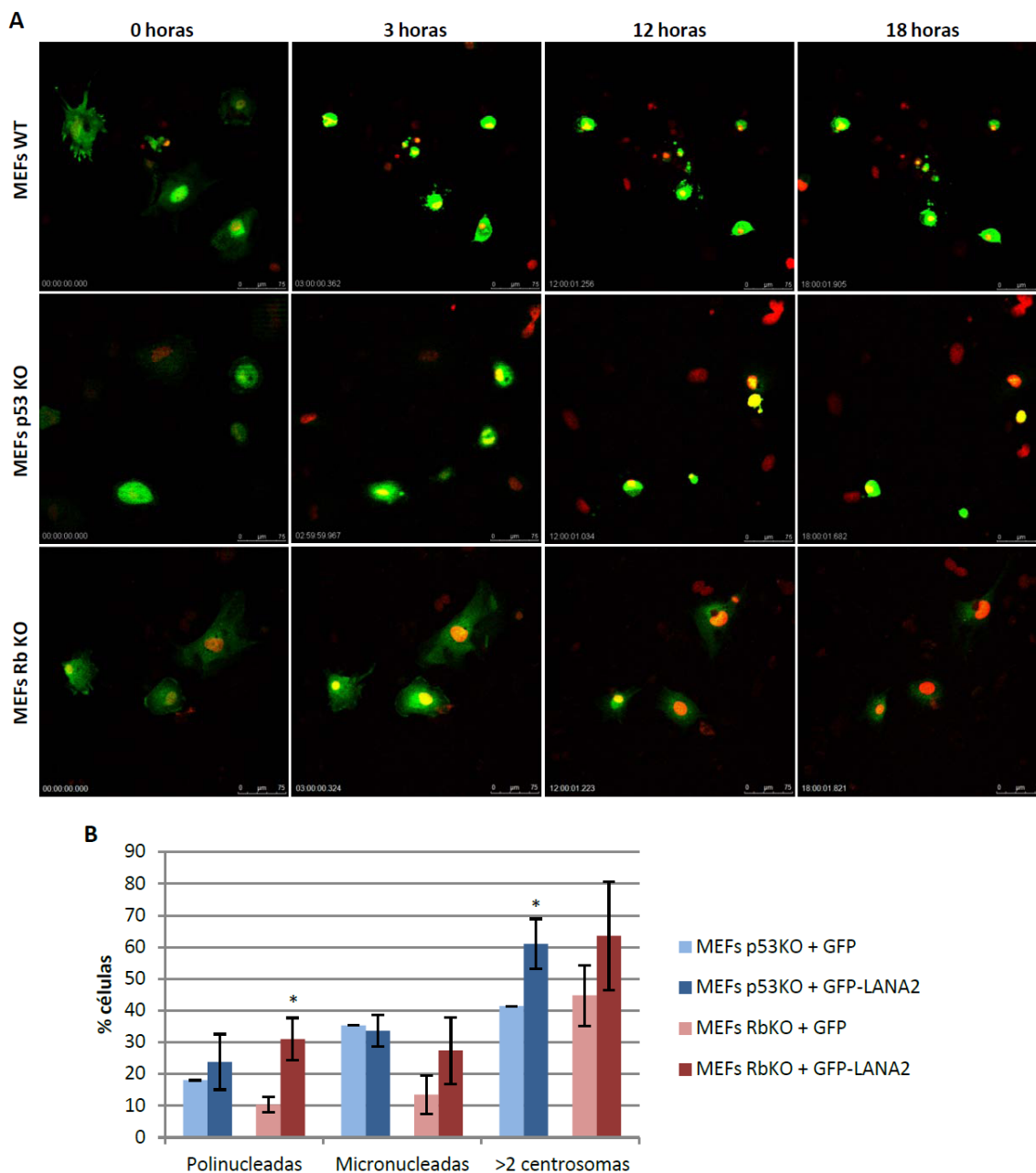


Figura 26. Evaluación de la inestabilidad cromosómica y muerte inducidas por LANA2 en fibroblastos primarios de ratón carentes de p53 o pRb. MEFs WT, p53 KO y pRb KO fueron nucleofectados con GFP-LANA2 y 6 horas después se comenzó a hacer videomicroscopía de las células nucleofectadas durante las 18 horas siguientes. Se muestran instantáneas de muestras visualizadas a distintos tiempos de la nucleofección en las distintas líneas (A). A las 6 horas tras la nucleofección, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos anti-tubulina- γ , anti-tubulina- α y DAPI, para proceder al recuento de células polinucleadas, micronucleadas y con más de 2 centrosomas.

pcDNA, con un patrón punteado disperso en el núcleo en la mayoría de las células. Este patrón se asemejó al producido por el tratamiento con doxorubicina, que es una droga intercalante en el ADN que se utilizó como control positivo de daño al ADN. El experimento se repitió en células 3T3 inmortales de expresión inducible de GFP-LANA2 y se volvió a contemplar el incremento de intensidad de la señal de H2AX- γ respecto a las que expresaban GFP (Figura 27). Estos resultados indicaban que LANA2 estaba induciendo una respuesta a daño al ADN.

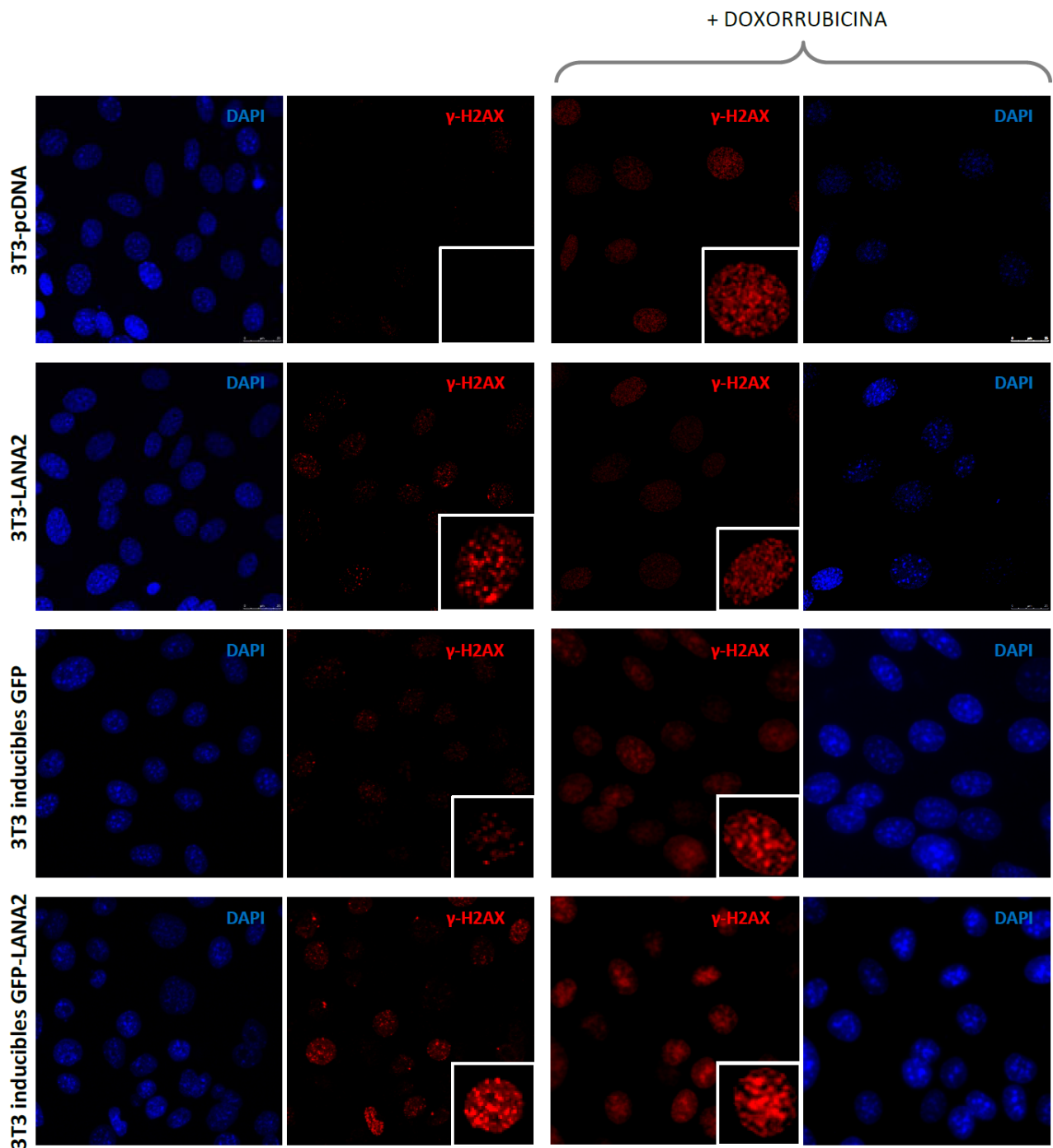


Figura 27. LANA2 produce daño al ADN. Células 3T3-pcDNA, 3T3-LANA2 o 3T3 inducibles para la expresión de GFP o de GFP-LANA2 y cultivadas en presencia de doxiciclina (2 μ g/mL) durante 24 horas sobre cristales, se fijaron y se tiñeron con anticuerpos anti- γ -H2AX fosforilado en la serina 139 y DAPI. Como control positivo del daño al ADN las células se trataron con doxorubicina (0,5 μ g/mL) durante toda la noche. Dentro de las imágenes tomadas del anticuerpo anti- γ -H2AX se encuentra la magnificación de un núcleo celular.

12. LANA2 altera el patrón de fosforilación de p107 y p130.

LANA2 induce la muerte de fibroblastos primarios provenientes de un ratón salvaje (WT), pero no la de los fibroblastos que derivaban de ratones carentes de pRb. Trabajos previos del laboratorio habían demostrado que LANA2 interacciona con las proteínas pRb, p107 y p130, y que la proteína viral contiene un dominio LxCxE. Decidimos entonces analizar en más detalle la relación entre LANA2 y las “pocket proteins”.

La fosforilación supone un mecanismo de control de las “pocket proteins”. Para analizar si LANA2 afectaba a la fosforilación de las “pocket proteins”, las células 3T3-pcDNA o 3T3-LANA2 se cultivaron en placas de 24 pocillos a un 50% de confluencia y transcurridos distintos días tras la siembra, se recogieron extractos para ser analizados mediante western-blot (Figura 28). Análisis de los extractos empleando anticuerpos frente a p130 reveló que LANA2 afectaba al patrón de fosforilación de p130. Específicamente parece que LANA2 favorece su fosforilación ya que aumenta la intensidad de las bandas más fosforiladas aunque también aumenta la intensidad de la banda menos fosforilada, disminuyendo las bandas que se encuentran entre medias (Figura 28). En los análisis mediante western-blot empleando anticuerpos contra la proteína p107 se observó que en las células que no expresaban LANA2 se apreciaba un doblete mientras que en las células que expresaban LANA2, había un enriquecimiento en la banda superior, lo que sugiere que LANA2 favorece la fosforilación de p107 (Figura 28). Sin embargo, no pudimos distinguir diferencias entre los niveles de proteína total o en el patrón de fosforilación de pRb de células que expresaban LANA2 en comparación con las que no la expresaban (Figura 28).

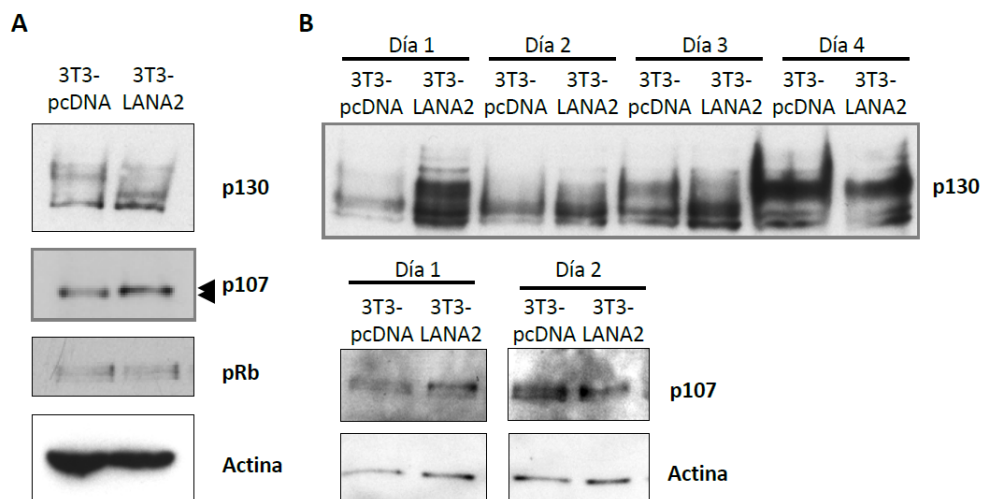


Figura 28. LANA2 altera el patrón de fosforilación de p107 y p130. Células 3T3-pcDNA y 3T3-LANA2 se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia del 25% y 24 horas después (A) o a distintos días tras la siembra (B), se recogieron para realizar western-blot con anticuerpos frente a las “pocket proteins” pRb, p107 y p130.

13. LANA2 inhibe la sumoilación de pRb a través del dominio LxCxE.

La actividad de la proteína pRb se regula también mediante su conjugación a SUMO. pRb se sumoila y esta modificación es inhibida por proteínas que contienen un dominio LxCxE de interacción con el dominio "pocket" de pRb. Dado que LANA2 contiene un dominio LxCxE, decidimos evaluar si LANA2 era también capaz de inhibir la modificación por SUMO de pRb. Para ello primero realizamos experimentos de sumoilación in vitro de pRb con SUMO1 y en presencia o ausencia de LANA2. pRb se modifica por SUMO1 in vitro, como se esperaba, y dicha sumoilación se vio reducida cuando se añadió LANA2 a la reacción (Figura 29, A). Decidimos entonces evaluar si LANA2 ejerce este efecto in vivo. Para ello transfectamos células HEK-293 con pRb y His6-SUMO2 en presencia o ausencia de LANA2 y purificamos con resina de Ni²⁺agarosa las proteínas fusionadas a histidina. Análisis de las proteínas purificadas por western-blot empleando anticuerpo anti-pRb, evidenció que la expresión de SUMO2 daba lugar a la aparición de bandas que se corresponden con pRb-SUMO2 (Figura 29, B). Dichas bandas se ven significativamente reducidas en las células transfectadas con LANA2 (Figura 29, B). Estos resultados indican que LANA2 inhibe la sumoilación de pRb.

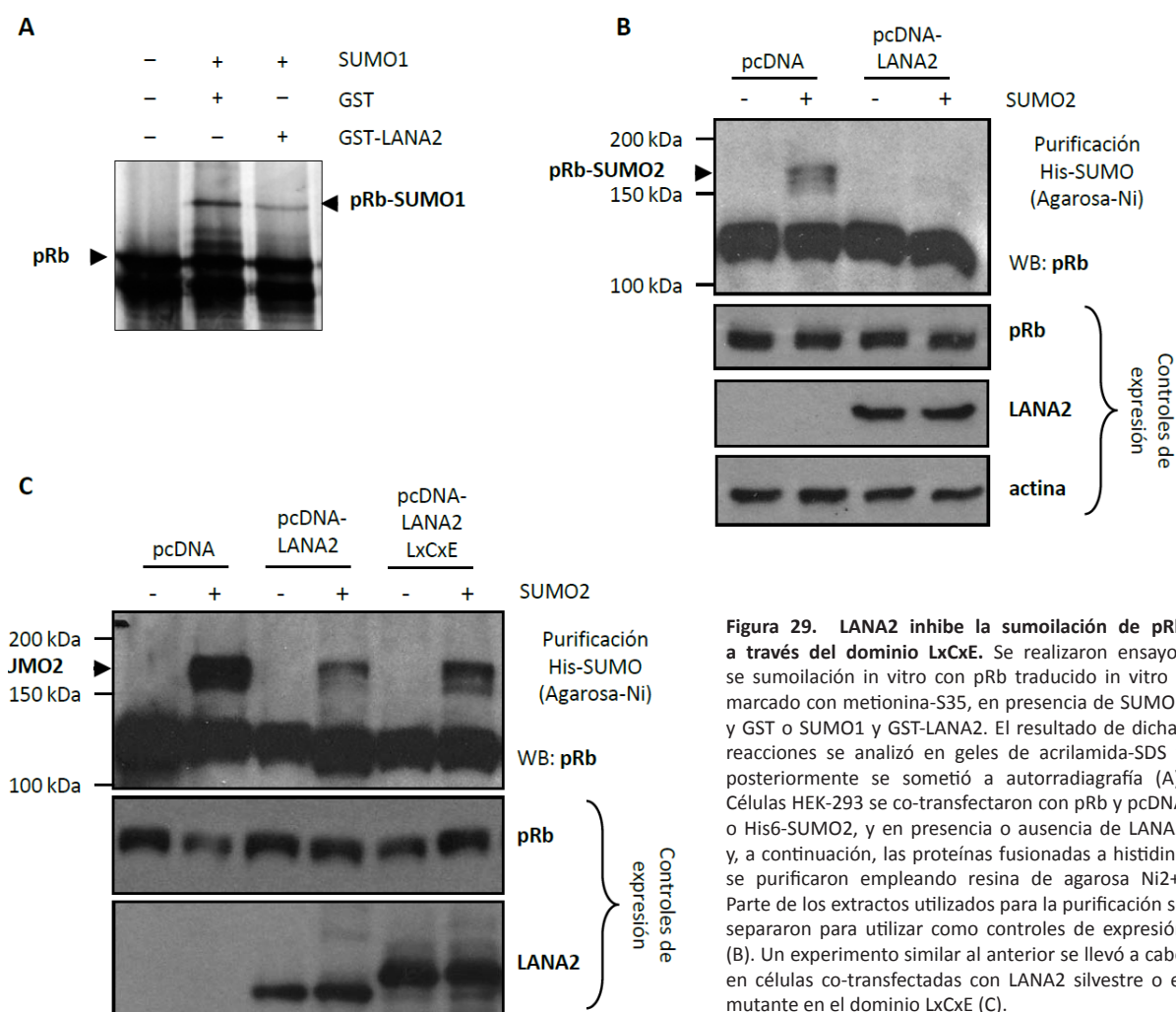


Figura 29. LANA2 inhibe la sumoilación de pRb a través del dominio LxCxE. Se realizaron ensayos de sumoilación in vitro con pRb traducido in vitro y marcado con metionina-S35, en presencia de SUMO1 y GST o SUMO1 y GST-LANA2. El resultado de dichas reacciones se analizó en geles de acrilamida-SDS y posteriormente se sometió a autorradiografía (A). Células HEK-293 se co-transfectaron con pRb y pcDNA o His6-SUMO2, y en presencia o ausencia de LANA2 y, a continuación, las proteínas fusionadas a histidina se purificaron empleando resina de agarosa Ni²⁺. Parte de los extractos utilizados para la purificación se separaron para utilizar como controles de expresión (B). Un experimento similar al anterior se llevó a cabo en células co-transfectadas con LANA2 silvestre o el mutante en el dominio LxCxE (C).

A continuación quisimos determinar si LANA2 necesita al dominio LxCxE para inhibir la sumoilación de pRb. Para ello co-transfectamos células HEK-293 con pRb y pcDNA o His6-SUMO2, y en presencia o ausencia del plásmido de expresión de la proteína LANA2 silvestre o la proteína mutada en el dominio LxCxE. El análisis de las proteínas fusionadas a histidina obtenidas mediante purificación empleando columnas de Ni²⁺agarosa reveló que de nuevo, la expresión de LANA2 disminuía claramente la sumoilación de la proteína pRb (Figura 29, C). Este efecto de LANA2 se vio claramente reducido, aunque no totalmente bloqueado, tras la expresión del mutante de LANA2 en el dominio LxCxE (Figura 29, C). Estos resultados indicaban que LANA2 inhibía la sumoilación de pRb y que este efecto era parcialmente dependiente del dominio LxCxE.

14. El dominio LxCxE de LANA2 es necesario para su interacción con p107, pero no con pRb o p130.

Como vimos en el apartado anterior, la inhibición de la sumoilación de pRb por LANA2 depende del dominio LxCxE, pero no totalmente ya que un mutante en dicho dominio bloquea parcialmente la sumoilación de pRb. Por ello decidimos evaluar si el dominio LxCxE en LANA2 es totalmente necesario para la interacción con pRb y el resto de “pocket proteins”. Para ello se llevaron a cabo experimentos de interacción in vitro con las “pocket proteins” marcadas radiactivamente y LANA2 silvestre o un mutante de LANA2 en el dominio LxCxE, fusionadas a GST. Este ensayo demostraba que LANA2 silvestre interactuaba con las tres “pocket proteins”, como se esperaba (Figura 30, A). Además observamos que el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE seguía interactuando con pRb aparentemente con la misma afinidad que la proteína silvestre. También detectamos interacción entre el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE y p130, aunque parece que con menos afinidad (Figura 30, A). Sin embargo, no detectamos interacción in vitro entre la proteína mutante en el dominio LxCxE y p107 (Figura 30, A). Estos resultados sugerirían que el dominio LxCxE en LANA2 es necesario para la interacción con p107 pero no con pRb o p130.

Con el fin de determinar si esto ocurre también in vivo, evaluamos la capacidad de co-inmunoprecipitar entre LANA2 o el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE y las tres “pocket proteins” (Figura 30, B). Co-transfectamos células HEK-293 con LANA2 o su mutante en el dominio LxCxE junto con cada una de las “pocket proteins”. Análisis de los extractos inmunoprecipitados con anti pRb, p107 o p130 mediante western-blot con anti-LANA2 reveló que la proteína LANA2 silvestre interactuaba con las tres “pocket proteins” mientras que la proteína LANA2 mutada en el dominio LxCxE solo interactuaba con pRb y con p130 (en este último caso mucho más débilmente que lo proteína WT) (Figura 30, B). Análisis de las inmunoprecipitaciones con anti-LANA2 y reveladas con anti-pRb, p107 o p130 confirmó estos resultados. El dominio LxCxE en LANA2 es necesario para su interacción con p107 pero no para su interacción con pRb o p130 (Figura 30, B).

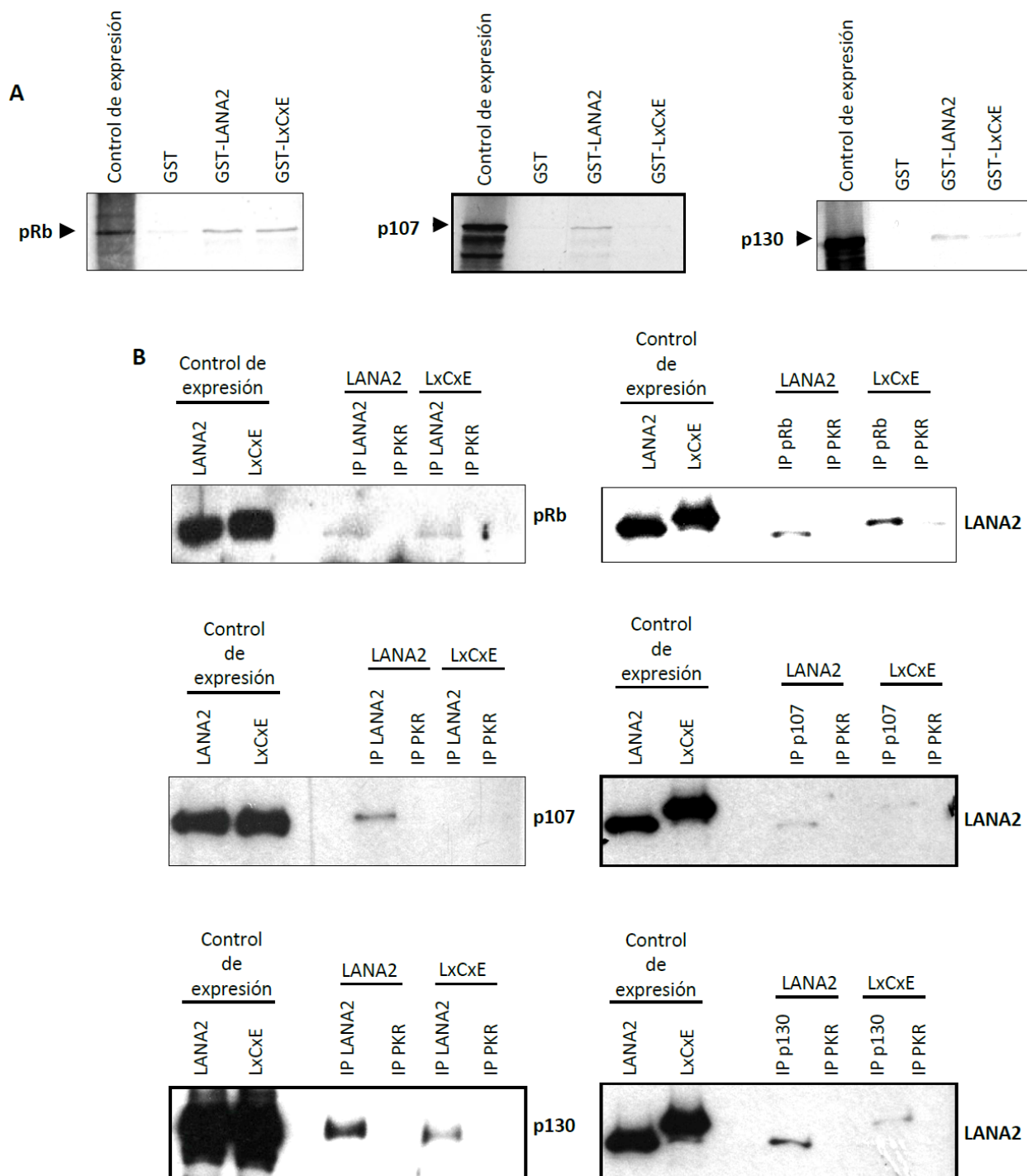


Figura 30. El dominio LxCxE de LANA2 es necesario para su interacción con p107 pero no con pRb o p130. Se realizaron ensayos de interacción in vitro con las "pocket proteins" marcadas con metionina-S35 y las proteínas LANA2 silvestre o su mutante en el dominio LxCxE, fusionadas a GST (A). Células HEK-293 se transfectaron con LANA2 silvestre o el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE junto con cada una de las "pocket proteins". Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con los anticuerpos indicados (PKR como control negativo) y a continuación se analizaron mediante western-blot empleando los anticuerpos anti-LANA2, pRb, p107 o p130 (B).

15. LANA2 inhibe el arresto de las células mediado por pRb, independientemente de su dominio LxCxE.

Dado que un mutante de LANA2 en el dominio LxCxE no inhibe la sumoilación de pRb como lo hace la proteína silvestre pero interacciona con pRb con la misma intensidad que la proteína silvestre, decidimos evaluar cual es el efecto de dichas proteínas (LANA2 silvestre o mutante en el dominio LxCxE) en una de las funciones más características de pRb, la inhibición de la proliferación celular. La reintroducción de pRb en células carentes de ella (como por ejemplo las células SAOS-2), bloquea la proliferación celular. Co-transfectamos células SAOS-2 con un plásmido de expresión de pRb, junto con un plásmido que codifica para LANA2 silvestre o el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE y a las 48 horas de la transfección las células se tripsinizaron y se incubaron en presencia del agente G418 con el fin de seleccionar las células transfectadas. A las 2 semanas de la selección hicimos un recuento del número de colonias crecidas. Como era de esperar, el número de colonias formadas tras la transfección de pRb se redujo significativamente (Figura 31). La expresión de LANA2 inhibió parcialmente el efecto de pRb como se demuestra por el aumento en el número de colonias (Figura 31). El mutante LxCxE fue también capaz de bloquear el efecto de pRb (Figura 31). Estos resultados sugerían que el efecto de LANA2 sobre la inhibición de la proliferación por pRb no dependen del dominio LxCxE; lo que nos lleva a suponer que la función de la sumoilación de pRb no está relacionada con el bloqueo de la proliferación celular detectado en este ensayo.

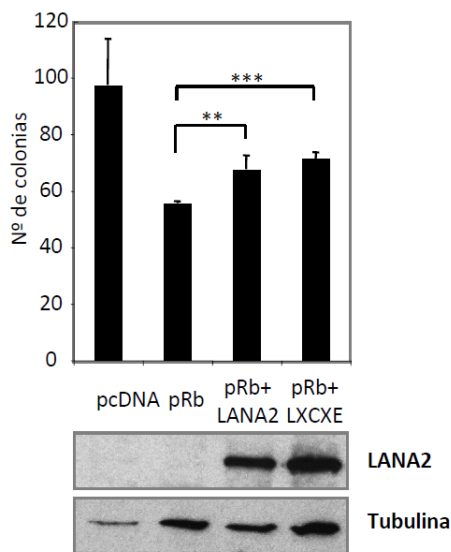


Figura 31. LANA2 bloquea la inhibición de la proliferación celular mediada por pRb independientemente de su dominio LxCxE. Células SAOS-2 fueron transfectadas con los plásmidos que se indican y 48 horas después se incubaron en presencia de G418 (600 µg/mL) con el fin de seleccionar las células transfectadas. Después de dos semanas de proliferación se contó el número de colonias por placa. A las 48 horas tras la transfección se analizó la expresión de las proteínas por western-blot empleando los anticuerpos que se indican. Mediante la prueba t de Student se analizó si la diferencia existente en el número de colonias eran significativas, y el resultado se indica con asteriscos (**, p < 0,005; ***, p < 0,0005).

16. Las “pocket proteins” p107 y p130 se sumoilan, y LANA2 reduce la sumoilación de ambas proteínas gracias a su dominio LxCxE.

Hasta el momento no se sabía si las otras “pocket proteins”, p107 y p130, se sumoilaban. El análisis de la secuencia aminoacídica de ambas proteínas reveló la existencia de tres sitios conservados de sumoilación tanto en p107 como en p130. Con el fin de saber si p107 y p130 también son susceptibles de sumoilarse, se llevaron a cabo ensayos de sumoilación in vitro con SUMO1 y SUMO2, y empleando p107 o p130 traducida in vitro y marcadas con metionina-S³⁵ como sustratos. Al adicionar SUMO1 a la reacción de sumoilación de p107, se observó la aparición de una banda correspondiente con p107 conjugado a SUMO1 (Figura 32, A). En el caso de SUMO2, aparecieron diversas bandas debido a la capacidad de SUMO2 de formar cadenas (Figura 32, A). Sin embargo, en la sumoilación in vitro realizada con la proteína p130, no fuimos capaces de distinguir bandas de sumoilación claras de la proteína (Figura 32, A). La sumoilación conlleva la interacción de la proteína sustrato con la enzima E2 sumo ligasa Ubc9. Con el fin de analizar si p107 o p130 interactuaban in vivo con Ubc9, transfectamos células HEK-293 con un vector de expresión de Ubc9 fusionada a la etiqueta SV5 junto con p107 o p130, y los extractos proteicos obtenidos de dichas células se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-SV5 o anticuerpo control. El análisis de los extractos inmunoprecipitados con anti-SV5 mediante western-blot usando anticuerpo anti-p107 o anti-p130, reveló que ambas proteínas interactuaban in vivo con Ubc9 (Figura 32, B).

Ello nos llevó a evaluar si existía sumoilación de ambas proteínas in vivo. Para ello co-transfectamos células HEK-293 con p107 o p130 junto con pcDNA o His6-SUMO2. A continuación se purificaron las proteínas unidas a histidina y se analizaron mediante western-blot empleando anticuerpos anti-p107 o anti-p130. Observamos que únicamente tras la co-transfección de SUMO2 se inducía la aparición clara de bandas que se corresponden con las proteínas p107 o p130 modificadas por SUMO (Figura 32, C). Estos resultados indicaban que tanto p107 como p130 se sumoilan in vivo.

Por último evaluamos si LANA2 era capaz de inhibir la sumoilación de p107 o p130 y si el dominio LxCxE era necesario para dicha inhibición. Para ello co-transfectamos células HEK-293 con p107 o p130, pcDNA o His6-SUMO2 y en presencia o ausencia de LANA2 silvestre o el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE. Tras analizar las proteínas purificadas fusionadas a histidina mediante WB empleando anticuerpos anti-p107 o anti-p130, observamos que la proteína LANA2 silvestre reducía la sumoilación de p107 y de p130, y que este efecto se veía reducido cuando se transfectaba el mutante en el dominio LxCxE. Por tanto, el dominio LxCxE de LANA2 es importante para la inhibición de la sumoilación de p107 y p130.

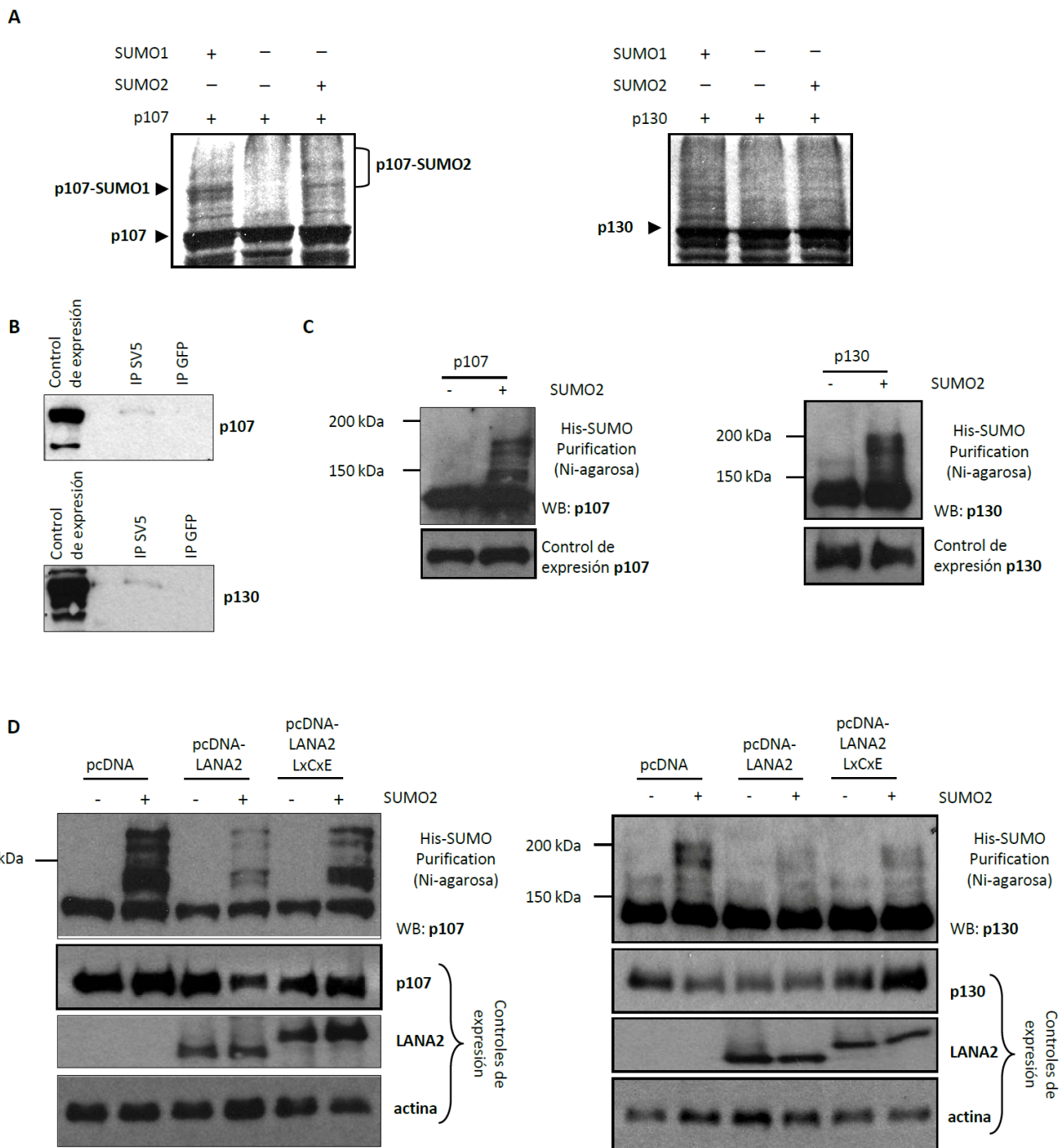


Figura 32. LANA2 inhibe la sumoilación de p107 y p130 a través de un dominio LxCxE. Se llevaron a cabo ensayos de sumoilación in vitro empleando como sustrato p107 o p130 y en presencia de SUMO1 o de SUMO2 (A). Células HEK-293 se co-transfectaron con un vector de expresión de Ubc9-SV5 y p107 o p130. Los extractos proteicos obtenidos de dichas células se inmunoprecipitaron con anticuerpo frente a SV5 o GFP (control negativo) y se analizaron mediante western-blot empleando los anticuerpos anti-p107 o anti-p130 (B). Células HEK-293 fueron transfectadas con pcDNA o His6-SUMO2 y p107 o p130. A las 48 horas de la transfección se recogieron los extractos y las proteínas fusionadas a histidinas se purificaron mediante columnas de agarosa Ni²⁺ y posteriormente se analizaron mediante western-blot usando anticuerpos frente a p107 o p130 (C). Un experimento similar al anterior se llevó a cabo en células HEK-293 co-transfectadas con LANA2 silvestre o el mutante de LANA2 en el dominio LxCxE (D).

17. Evaluación de la regulación transcripcional de LANA2

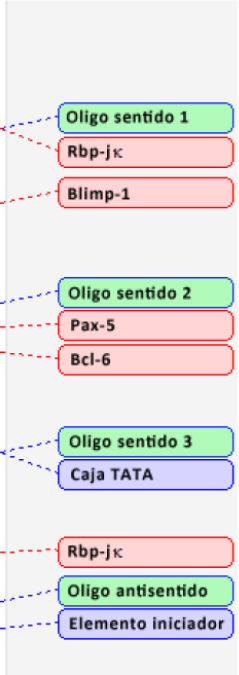
El gen ORF K10.5 que codifica para la proteína LANA2 se encuentra en una región que codifica para genes con homología a IRFs celulares. Además, su expresión ocurre de forma exclusiva en células B. Nuestro objetivo era identificar algún elemento que regulase a nivel transcripcional la expresión de la proteína LANA2. Para ello introdujimos la secuencia que se encuentra por delante de la región codificante de LANA2 en el programa informático Genomatix Software Suite. Con este programa localizamos posibles elementos reguladores de la expresión de la proteína LANA2 (Figura 33, A). A continuación clonamos dicha región completa o fragmentos de la misma por delante del gen que codifica para la luciferasa, empleando para ello el vector pGL3. Generamos así tres plásmidos que codifican para luciferasa bajo la regulación de tres fragmentos que contienen distintos elementos localizados por encima de la secuencia codificante de LANA2: pGL3-Frg1 (conteniendo los hipotéticos elementos de regulación típicos de células B RBP-Jκ, Blimp-1, Pax-5 y Bcl-6), pGL3-Frg2 (con Pax-5, Bcl-6 y RBP-Jκ) y pGL3-Frg3 (solo con RBP-Jκ) (Figura 33, B). Como la expresión de LANA2 solo tiene lugar en células B, decidimos evaluar la actividad de las tres construcciones en células B y no B. Transfectamos las construcciones mencionadas en células KARPAS y en células HEK-293 y a las 48 horas de la transfección analizamos la producción de luciferasa. Ninguno de los fragmentos evaluados fue capaz de inducir la expresión de luciferasa en las células HEK-293; al contrario, la producción de luciferasa a partir de cualquiera de las construcciones fue significativamente inhibida (Figura 34, A). Sin embargo, en las células KARPAS observamos que el nivel de luciferasa obtenido a partir del fragmento 1 era significativamente mayor que el obtenido con el vector vacío. Por el contrario, la construcción con el fragmento 2 inhibió significativamente la producción de luciferasa (Figura 34, B). Estos resultados sugerían que existe algún factor común a los tres fragmentos que modulaba negativamente la transcripción del gen en células HEK-293, y que dentro del fragmento 1 existe algún factor que favorece la transcripción del gen en células B.

Con el fin de evaluar si el factor de transcripción RBP-Jκ podía estar modulando la transcripción de LANA2, llevamos a cabo ensayos de co-transfección de las construcciones que expresan luciferasa en presencia o ausencia de dicho factor. La co-transfección de RBP-Jκ reguló negativamente la expresión de la luciferasa sintetizada a partir de las tres construcciones (Figura 34, C). Esto sugiere que LANA2 podría estar regulada a nivel transcripcional por elementos RBP-Jκ.

A

Promotor de LANA2:

```
GATGGTGGATCACATTGAGGGGTGTTTGTAGATCTCTGTGCAGATGTTGGCCAGGAGCTTCTGACTTAG
GCGACCTGGGTGAACTTCTGTGTGAACTGCGAGCCCTCAGGCCCCGATGCAGTCCGAGGGAGGTGAGGAG
GGGTCCACGGAGAGTGTCTCAGTACTTCCCGCCACGCATCCCCTTGAGAGTTCGGCACCTGGGGCCCTCTGT
CATGGGTTCCAGGCCAGGAGCTTCCCTGACTTAGGGCAGCTGAGTGAACCTCTGTGTGAAACTCCGAGCCCTC
AGGGCCCCGATGCAGTCCGAGGGGAGGTGAGGAGGGGTCCACGGAGAGTGTCTCAGTACTTCCCGCCACGCAT
CCCCTTGAGAGTTCGGCACCTGGGGCCCTCTGTGCATGGGTTTCTTTCCAAGCTTCCGACAATGTGGATGA
TTTTATTGATTGTATTCCACCGTTGTGTGATGACCGGGACGTGAGGACCAAGAGAAAGCTGACCAGA
CATTCTACTGGTATGGAAGCGACATGAGGCCCAAGGCTTAAACCGCCACCCAATCCGTGGCAGCATACCTG
AGTAAGAACAACAGGCTATTTACAAGTGGGTGACAAGCTTGTGCCCTAGTGGTGAAGTGTATTATTTCGG
AGAAAAGTGAAGACCCACTTTGATTTAACGGGGGGCATCGTTATTTGCTCCCAGTCCCAGAGGCTCCC
CTSAAACACATATGTCAGACGGTACCCCCGTATAAATGCTTACTTCCCAGAAACGGCCCACTGTAGTGTGGAC
GCAAAACCGAACTTTGGAACAGACGCTGGACAGGTTTTCCATGGGAGTTGTGGCCATCCGTACAAACATGGG
CATTCTTCTGAAGGATTATTTGAAATACCCAGCATACTTTGTGTGAAATGCATCGCGAAGAAGAAATAGGCA
AATGTAGGCCCTGTCCACCGCCACGAGATCCAACAAGCTTTGACGTGGAGCGACATAATCGAGAACCT
GAAGGGTCCCGGTACGCGTCCCTGTTTCTGGGCCCGCCGGCTCGCCTGAATATGACTGGGATCACTATCC
AGTCATTTGACATTTACCTTGCCTTACCTTACCACAGAGACTAAAATTTGACLAGTCTTCTTGTCACT
CTGTCCGGCTACCTCCCTTGTCTTACCGCCCTCCGTTTTGCACTATAAATATCATTGCCGTTAGAAACCA
GGCTCTATCCGCAACTTCTATGTTTCCCTGTTATAGTAGGCCCATGTGGGCTTGGGAGTGGCCAAACTCACT
GAGTGGGACATCATTAAGGTTAGCGCCACCGTGTGGCTGCAAAATAAAGTCTGAGTGGTTATTTTTTTTCC
TAGGCGGTTGGGATCACTCAGCTGCCAAGCAAGGGGTGTCCCTGCAATGCAAGGTAATGAGGTTAGT
AAAGTAAGACAAACATGTGGGCTTCAATATGCATGCAATACCTGTTTCAAAGCTGGTCCGGGGCAGCATC
ACCCAGATGTTCTTGCAGCGCTGGAGAACAGATTCATAGTGAGAAACACATGTGTCTAATACAGGCAA
TGCTTTTTGACCCGTGACTGAAGGTTAAGCTGCAGGAAGCATGTTGTGGTTTCCGTAGTAGATTACTTCT
GTTGAGGTGGGTAATGCTCGGAGCAGACCATTCTGACAGGTCAAC (ATG) (Codón iniciador)
```



B

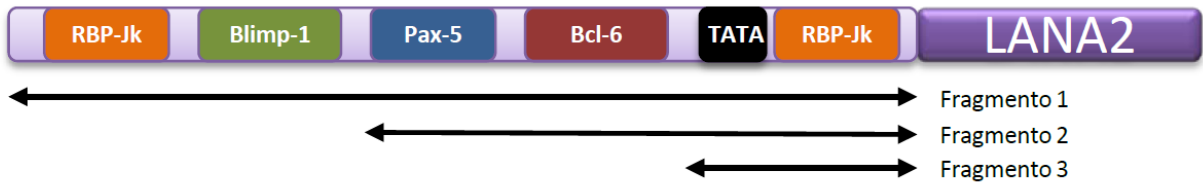
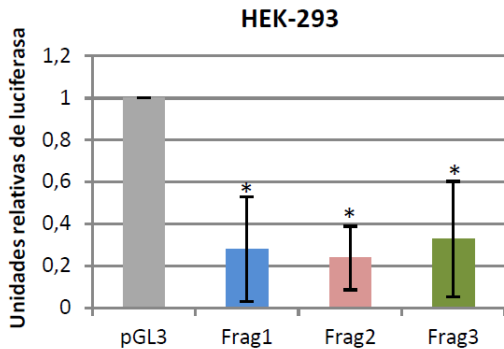
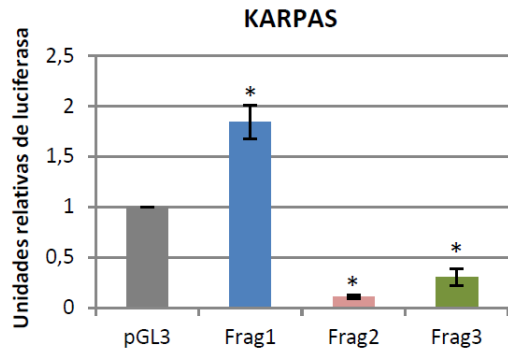


Figura 33. Identificación de elementos implicados en la regulación transcripcional de LANA2. En este esquema se muestra la secuencia de ADN que se encuentra por encima de la región que codifica LANA2, identificando los posibles elementos del promotor (azul), los elementos reguladores que pueden estar implicados en la regulación de la expresión de LANA2 (rojo) y las secuencias que tomamos para generar los oligos (verde) (A). Se representan los elementos presentes en cada uno de los fragmentos clonados en pGL3 (B).

A



B



C

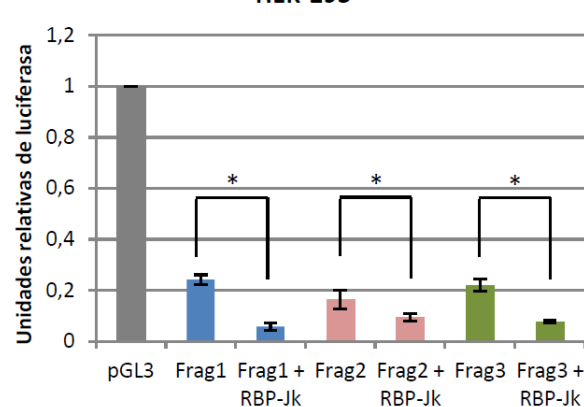
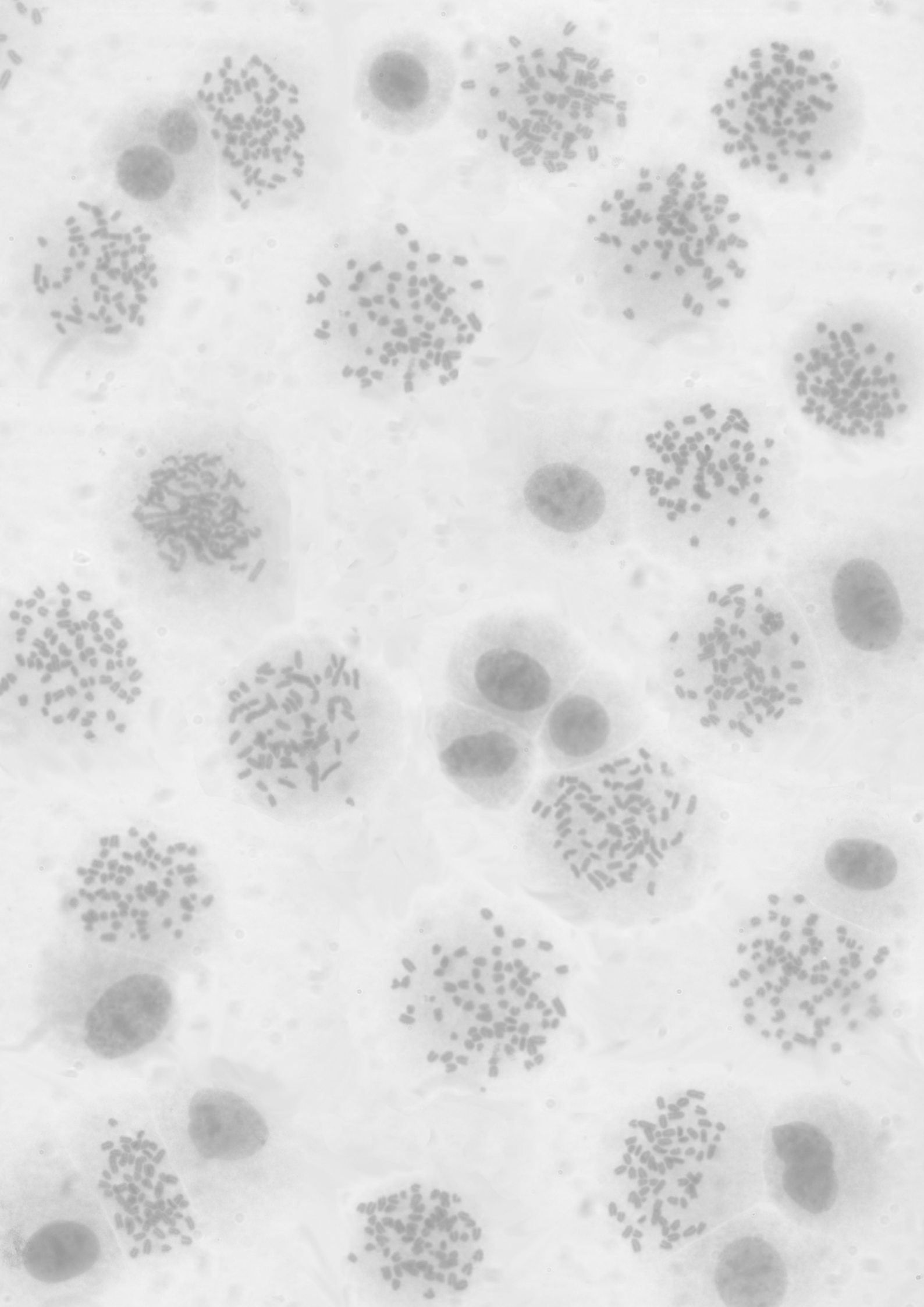
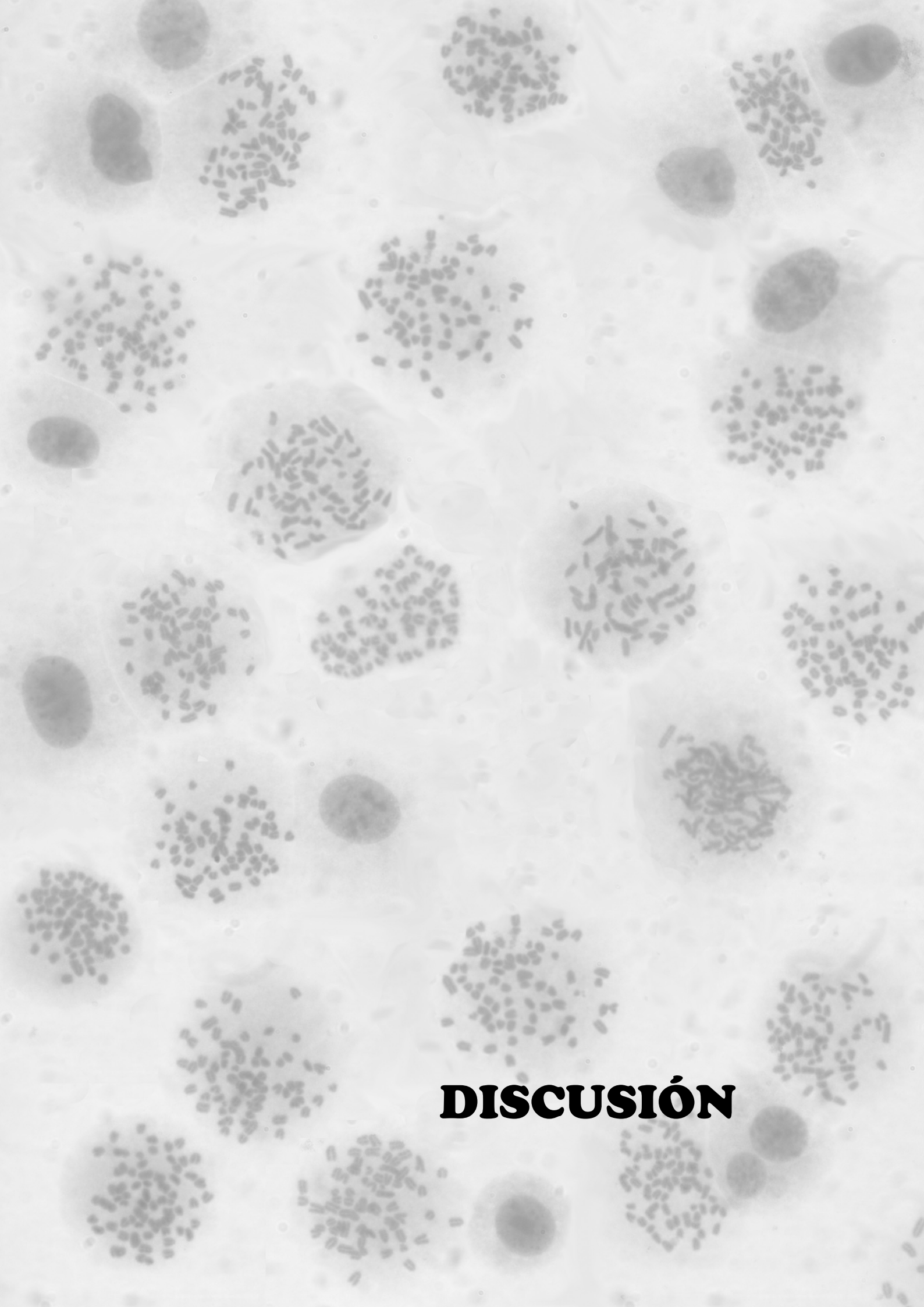


Figura 34. Evaluación de la transcripción de LANA2. Células HEK-293 (A) o Karpas (B), fueron transfectadas empleando JetPEI o FuGene con los distintos fragmentos clonados en pGL3 y el plásmido de expresión de renilla pRLTK. Extractos de estas células se recogieron dos días después de las transfección y se analizaron los niveles de expresión de luciferasa y renilla. Se llevó a cabo un experimento similar en HEK-293 co-transfectando además pcDNA o RBP-Jκ (C). En las gráficas se representan los niveles de luciferasa obtenida en cada muestra relativo al valor detectado tras la transfección del vector pGL3 control, al que se le da un valor relativo de 1. Valores significativos, con una $p < 0,05$ (*) según la prueba t de Student.





DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La proteína latente de KSHV LANA2 es una proteína multifuncional con capacidad de interferir en vías moleculares que juegan un importante papel en el control del ciclo celular. Así por ejemplo, se ha demostrado que LANA2 inhibe la apoptosis inducida tras la activación de PKR (Esteban et al., 2003) y regula la apoptosis y el sistema inmune del huésped al inhibir la activación de la vía de NF- κ B inducida por TNF- α , promoviendo de este modo la supervivencia celular, y posiblemente, la replicación viral (Seo et al., 2004). Además, LANA2 inhibe la activación transcripcional del promotor IFNA (Lubyova and Pitha, 2000) y bloquea la transducción de señales de la vía del interferón mediante su interacción con IRF-3 (Joo et al., 2007), con IRF-7 (Lubyova et al., 2004) y con IRF-5 (Wies et al., 2009). Otras actividades de LANA2 estrechamente relacionadas con el control del ciclo celular son, por ejemplo, la inhibición de la apoptosis y de la activación transcripcional mediadas por p53 (Rivas et al., 2001) o su interacción con la proteína 14-3-3 y la inhibición de la activación transcripcional mediada por FOXO3a (Munoz-Fontela et al., 2007). LANA2 es capaz de inducir la activación transcripcional de c-Myc y de bloquear la acción de su inhibidor (MM-1 α), al interactuar con él. LANA2 también interactúa con el factor de hipoxia-1, promoviendo su estabilización y activación transcripcional, lo que implica a LANA2 en procesos de angiogénesis (Shin et al., 2008). Por último, se ha descrito que LANA2 modula la dinámica microtubular mediante su interacción con los microtúbulos (Munoz-Fontela et al., 2008) y favorece la degradación del supresor de tumores PML (Marcos-Villar et al., 2009). En conjunto estas actividades de LANA2 favorecerían la progresión del ciclo celular.

Junto con estas funciones de LANA2 sobre el ciclo celular, también se ha demostrado que la expresión de LANA2 es necesaria para la viabilidad de las células B infectadas con KSHV, lo que sugiere que esta proteína juega un papel vital en el mantenimiento del fenotipo transformado de las células infectadas con KSHV. No se ha descrito hasta el momento, sin embargo, cuáles son las consecuencias de la expresión de LANA2 de forma estable en células. Con este objetivo generamos líneas celulares inmortalizadas (NIH-3T3) o transformadas (HeLa) que expresan de forma estable la proteína LANA2, y estudiamos cualquier alteración en el comportamiento de dichas células. Este análisis reveló que la expresión de LANA2 favorece la proliferación celular pero no induce la transformación de las células 3T3, aunque sí potencia la actividad transformante de Ras en dichas células, al igual que ocurre con las proteínas LANA1 o v-Cyc de KSHV (Koopal et al., 2007; Watanabe et al., 2003)

Observamos además que LANA2 induce la inestabilidad cromosómica de las células en las que se expresa ya que promueve la aparición de células polinucleadas, con micronúcleos y con un mayor número de centrosomas. La inestabilidad cromosómica es una característica de la mayoría de cánceres humanos (Nowak et al., 2002). Los mecanismos que pueden llevar a la inestabilidad cromosómica de las células que expresan LANA2 son múltiples.

La amplificación centrosómica tiene consecuencias tales como la aparición de divisiones mitóticas multipolares. Al aparecer varios polos de atracción de los cromosomas, éstos se segregan de una forma inadecuada, que lleva a la aparición de cromosomas rezagados que quedan aislados del resto, y que al entrar la célula en telofase, la membrana nuclear los envuelve de forma individual generando los llamados micronúcleos, generándose así inestabilidad genómica (Emdad et al., 2005). Estas consecuencias de la amplificación centrosómica también fueron observadas durante las mitosis de células en las que se expresó LANA2, apareciendo mitosis aberrantes con varios polos mitóticos y, en consecuencia, disposición inadecuada de los cromosomas en la placa ecuatorial.

LANA2 es capaz de interactuar con la tubulina polimerizada (Munoz-Fontela et al., 2008) y en el trabajo actual demostramos que co-localiza con los centrosomas y co-inmunoprecipita con la tubulina- γ . En base a estos resultados, un posible mecanismo podría ser que a través de la interacción con la tubulina- γ , LANA2 alterara la correcta regulación de la duplicación de los centrosomas llevando a una alteración en dicho proceso. De hecho, se ha descrito que una de las proteínas implicadas en el ensamblaje del centrosoma es la dineína (Young et al., 2000) y que una inhibición de la dineína puede aumentar enormemente la multipolaridad resultante de la amplificación centrosómica (Quintyne et al., 2005). Se ha identificado una secuencia consenso R/KR/KxxR/K como motivo de interacción con Tctex-1, una cadena ligera de la dineína citoplásmica (Mok et al., 2001). El análisis de la secuencia aminoacídica de LANA2 reveló la presencia de cuatro motivos consenso de interacción con la dineína entre los residuos aminoacídicos 86-90, 152-156, 367-371 y 440-444 de LANA2, reforzando esta hipótesis.

Otros mecanismos que, además de generar un número extra de centrosomas también conducen a la adquisición de material genético adicional, son los fallos en la citocinesis y la fusión celular (Anderhub et al., 2012), como por ejemplo la fusión relacionada con la infección por diversos virus tales como EBV y KSHV (Gao and Zheng, 2011). Sin embargo, y dado que no observamos procesos de endoreduplicación en las células que expresan LANA2, no parece que este sea el mecanismo que lleva a la adquisición de un número extra de centrosomas en las células que expresan LANA2.

Existen además otros posibles mecanismos que podrían contribuir a la inducción de inestabilidad cromosómica por LANA2. Así, se ha descrito que la inhibición de pRb o de p53 tiene como consecuencia la inducción de inestabilidad cromosómica (Hernando et al., 2004; Tainsky et al., 1995). Se sabe que LANA2 inhibe la apoptosis y la actividad transcripcional de p53 (Rivas et al., 2001) e interactúa con pRb. Ambos procesos podrían además jugar un papel importante en esta inestabilidad.

Los resultados presentes en este trabajo muestran, además, que LANA2 inhibe el arresto del ciclo celular en G2/M producido tras el tratamiento con nocodazol. Una hipótesis para explicar este

resultado es la interacción de LANA2 con los microtúbulos (Munoz-Fontela et al., 2008). La actividad del nocodazol consiste en impedir la polimerización de los microtúbulos, de forma que aunque las células entran en mitosis, no pueden formar husos mitóticos. Por tanto, como los microtúbulos no se pueden unir al cinetocoro al estar despolimerizados, se activa el punto de control del ensamblaje del huso mitótico causando el arresto de las células en prometafase. Al interaccionar con los microtúbulos, LANA2 podría ocupar la zona de unión del nocodazol no permitiéndole interferir en la polimerización microtubular, del mismo modo que ocurre con el paclitaxel (Munoz-Fontela et al., 2008). Sin embargo, sí observamos despolimerización de la tubulina de las células que expresan LANA2, tras el tratamiento de nocodazol, lo que sugiere que la droga sí está ejerciendo su actividad sobre los microtúbulos. Otra posible explicación sería que LANA2 este impidiendo la activación del punto de control del ensamblaje del huso mitótico, y consecuentemente, las células no se arreten en G2/M, y continúen en ciclo. Observamos que los cultivos tratados durante 24 o 48 horas con nocodazol muestran un elevado porcentaje de células que expresan LANA2 que entran en apoptosis. Esto sugiere que muchas de las células que han progresado en el ciclo en estas condiciones han entrado en crisis lo que las ha llevado a su posterior muerte por apoptosis. Estos datos de nuevo sugieren que LANA2 impide la activación del punto de control del ensamblaje del huso mitótico. Esta hipótesis también se ve reforzada por los resultados obtenidos tras el tratamiento con otro agente que arresta las células en la fase G2/M del ciclo celular, el agua oxigenada. En estos estudios observamos que de nuevo, la expresión de LANA2 fue capaz de inhibir el arresto del ciclo celular en G2/M causado por el tratamiento, lo que también sugiere que el bloqueo del arresto por nocodazol ejercido por LANA2 no se debe a la interferencia en la interacción del nocodazol con los microtúbulos. La existencia de un defecto en el punto de control del ensamblaje del huso mitótico puede resultar en aneuploidía e inestabilidad cromosómica (Gao et al., 2011). Esto, por tanto, abre la posibilidad de que éste sea otro mecanismo mediante el que LANA2 induce la inestabilidad cromosómica de las células en las que se expresa.

La inducción de inestabilidad cromosómica puede ser la razón por la que cuando expresamos LANA2 en células primarias, estas células entren rápidamente en apoptosis. Se ha descrito que cuando no existen puntos de control del ciclo celular en mitosis, esto puede llevar a la muerte de las células, mientras que si este punto de control es “débil”, conduciría a aneuploidía (Schvartzman et al., 2010). Esta aneuploidía es un proceso negativo para la viabilidad celular, y sólo en el caso de que alguna célula sobreviva, parece que ésta sería más resistente a la apoptosis y acumularía más inestabilidad cromosómica (Schvartzman et al., 2010). Nuestros resultados en células primarias revelan que la expresión de LANA2 induce la muerte rápida de las células y que ésta es posterior a la inducción de inestabilidad cromosómica. Esto sugeriría que la inducción de inestabilidad cromosómica por LANA2 en células primarias induce la muerte de las mismas. De esta forma, si alguna sobreviviera a dicha

inestabilidad, acumularía más inestabilidad cromosómica. Esto es exactamente lo que detectamos en las células inmortalizadas que expresan LANA2. Entonces, ¿por qué las células primarias se mueren cuando se expresa LANA2 y las células pertenecientes a líneas celulares inmortalizadas o transformadas sobreviven? Estas diferencias podrían deberse a que, a diferencia de las células primarias, las células inmortalizadas tienen alteradas vías moleculares importantes para el control del ciclo celular, y se sabe que la capacidad de las células de tolerar la aneuploidía depende en gran medida de la presencia de mutaciones adicionales en estas vías, tales como la inactivación de p53 o de pRb (Manning and Dyson, 2012). Nuestros resultados también indican que, a pesar de se observa un aumento en alguno de los marcadores de inestabilidad cromosómica en células primarias carentes de pRb, LANA2 no induce la muerte de estas células como sí ocurre con las células WT o p53 KO, lo que apunta a que la falta de pRb favorece la viabilidad de las células que expresan LANA2.

Existe una clara relación entre la inestabilidad cromosómica y el daño al ADN. Por un lado, se ha descrito que la segregación inadecuada de los cromosomas puede ser la causa del daño al ADN (van Gent et al., 2001). Además, se sabe que un fallo en el mecanismo de reparación del ADN puede ser el origen de la inestabilidad cromosómica (van Gent et al., 2001). Las células sobrellevan pequeños daños en el ADN en procesos tales como su replicación y mantienen la integridad genómica gracias a una compleja red de vías de reparación del ADN (Hoeijmakers, 2001; Wood et al., 2001) y los puntos de control del ciclo celular. Estos últimos son vías de señales bioquímicas que detectan varios tipos de defectos estructurales en el ADN, o en la función de los cromosomas, e inducen una respuesta celular múltiple que activa la reparación del ADN además de retrasar la progresión del ciclo celular (Khanna and Jackson, 2001; Zhou and Elledge, 2000). No obstante, cuando el daño al ADN es demasiado grande e irreparable, la activación de los puntos de control del ciclo celular eliminan dichas células potencialmente peligrosas mediante el arresto del ciclo celular o mediante la inducción de la muerte de las células dañadas (Bartek and Lukas, 2001). Nuestros resultados indican que en las células estables que expresan LANA2 el daño al ADN es mucho más elevado que en aquellas células que no la expresan. Esto podría ser una consecuencia de la inestabilidad cromosómica presente en las células o ser causado por la existencia de fallos en la reparación del daño al ADN. El daño al ADN puede también ser activado como consecuencia del estrés replicativo inducido por un incremento en la proliferación celular (Nikitin and Luftig, 2012). De este modo, es posible que el aumento en la proliferación celular que provoca LANA2, que podría estar relacionado con un aumento en la fosforilación de p107 o p130, esté desembocando en daño al ADN. Esta explicación parece probable porque las células que expresaban LANA2 de forma inducible o las que expresan LANA2 de forma transitoria parecen arrestarse en G0/G1 durante las primeras horas de la expresión. Este arresto permitiría a la célula reparar el daño o inducir la muerte de la célula con el fin de mantener la integridad genómica. Existe otro indicio de

que tras la expresión de LANA2 se están activando mecanismos de respuesta a daño al ADN, y es que al seleccionar las células con G418 para generar las líneas celulares estables, el número de clones obtenidos al transfectar LANA2 fue sensiblemente menor, lo que sugiere que la proteína viral afecta de algún modo a la viabilidad de las células. LANA2 estaría induciendo arresto del ciclo celular a causa del daño al ADN que inflige, pero la selección de aquellas células que consiguen saltarse el arresto acumularían más daño en el ADN e inestabilidad cromosómica, como hemos observado.

La regulación negativa de pRb induce aneuploidía e inestabilidad cromosómica, entre otras causas, debido a la expresión alterada de algunas de las proteínas que intervienen en el punto de control de la mitosis. Numerosos genes se expresan a elevados niveles de una manera dependiente de E2F tras la inactivación de pRb. Entre estos genes se incluye los que codifican para proteínas que participan en la mitosis (Chakraborty et al., 2007; Iovino et al., 2006; Ishida et al., 2001) y han sido relacionados con la inestabilidad cromosómica (Hernando et al., 2004). Uno de los genes diana de E2F más notables es la proteína MAD2, cuya sobreexpresión es suficiente para inducir inestabilidad cromosómica *in vivo* e *in vitro* (Sotillo et al., 2010). Dicha proteína es capaz de inducir al fraccionamiento de las cohesinas afectando la formación de cromosomas rezagados, deleciones y rupturas cromosómicas. Otros genes diana de E2F, incluidos CENPA y HEC1 también tienen un papel en la mitosis y promueven errores en la segregación de los cromosomas cuando se sobre-expresan (Amato et al., 2009; Diaz-Rodriguez et al., 2008). Las vías de E2F regulan además la expresión de numerosos componentes encargados de la respuesta a daño al ADN y las vías de reparación. Cuando dichos puntos de control del daño al ADN están alterados al perder pRb su función, las células entran en mitosis sin ser corregidas las rupturas en el ADN (Bourgo et al., 2011; van Harn et al., 2010). Nuestros resultados muestran que LANA2 interacciona con pRb e inhibe el arresto de la proliferación ejercido por esta “pocket protein”, mecanismo que podría favorecer el daño al ADN observado en las células que expresan la proteína viral.

En base a todo esto es posible que la interacción de LANA2 con las “pocket proteins” pRb, p107 y p130 tenga también un papel en la inestabilidad genómica causada por la proteína viral.

En el laboratorio habíamos observado que LANA2 interaccionaba con pRb, p107 y p130, y presentaba un dominio LxCxE, pero no habíamos evaluado si existía una regulación de las modificaciones post-traduccionales de las “pocket proteins” o si ésta interacción era dependiente del dominio LxCxE. Numerosas proteínas virales interaccionan con las “pocket proteins” a través de dominios LxCxE, como por ejemplo la endoribonucleasa Nsp15 de coronavirus (Bhardwaj et al., 2012), la proteína E7 de HPV (Lee et al., 1998), el antígeno T grande de SV40 (Kim et al., 2001) o la proteína E1A de adenovirus (Ferreon et al., 2009). En el caso de LANA2, se observó que el dominio LxCxE es únicamente necesario

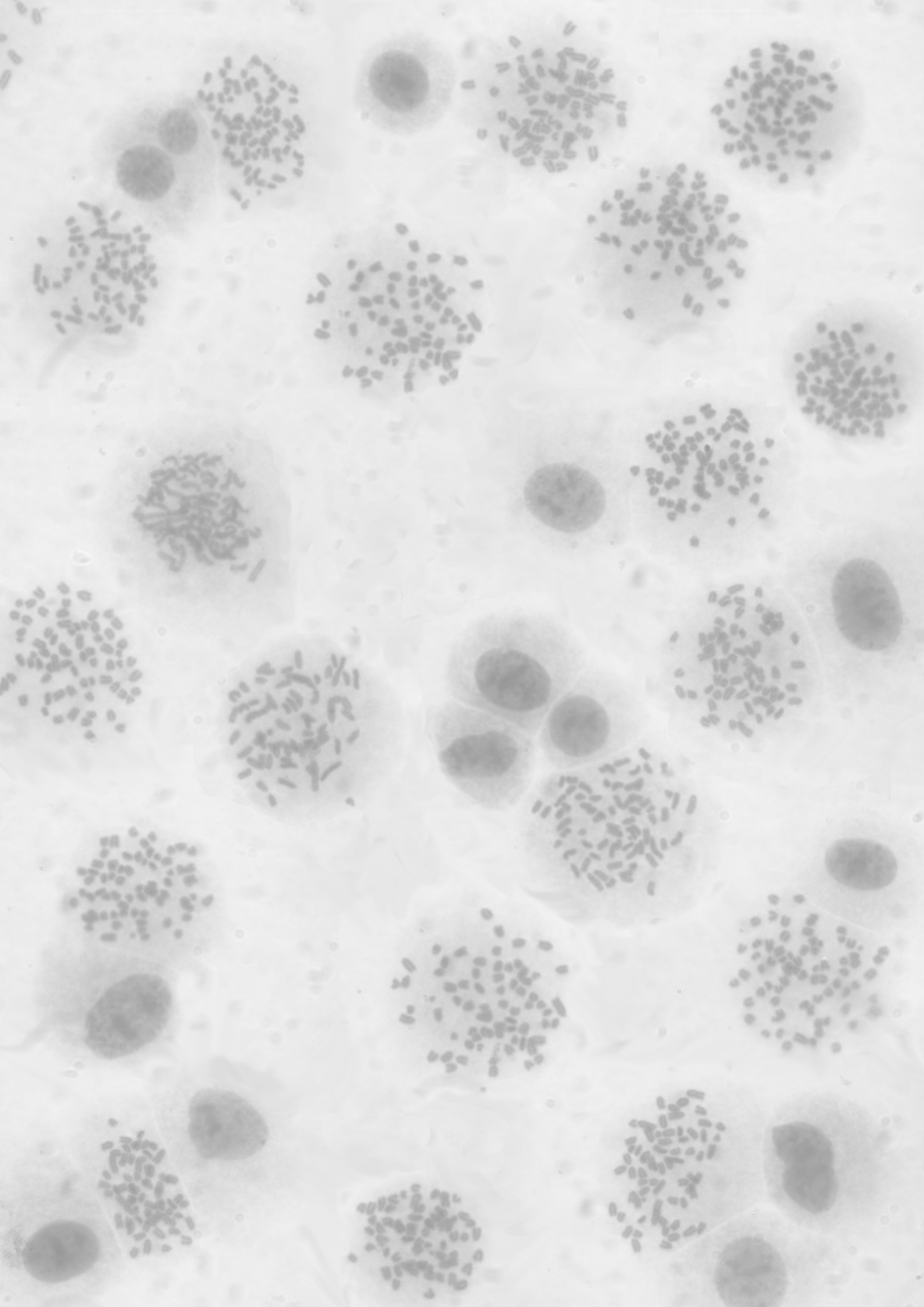
para la interacción de LANA2 con p107, ya que al mutarlo sigue habiendo interacción con p130 (aunque reducida) y con pRb. Esto significa que LANA2 debe interactuar mediante el dominio LxCxE con p107, pero que deben existir otros dominios alternativos para unirse con p130 y pRb, como ocurre con otras oncoproteínas virales tales como el antígeno T grande de SV40 o E1A (Lee and Cho, 2002).

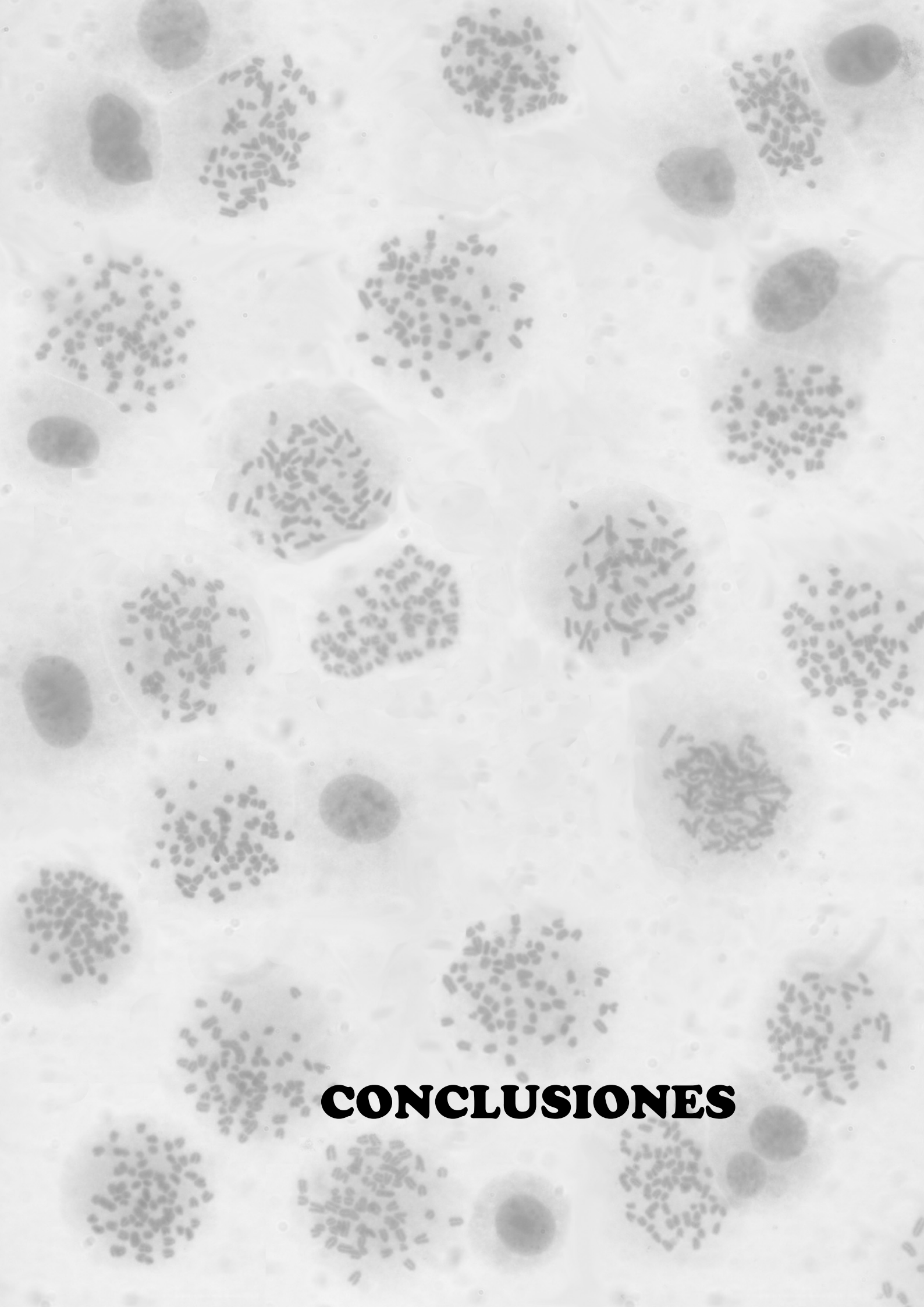
Hace relativamente poco que se descubrió que la proteína pRb sufre modificaciones post-traduccionales por las moléculas SUMO1 (Ledl et al., 2005) y SUMO2/3 (Li et al., 2006). SUMO1 se conjuga a la lisina 720 que se encuentra dentro del dominio “pocket”, entre el segmento A y B de la proteína, y fundamentalmente se conjuga a pRb hipofosforilado. Además se observó que proteínas celulares como EID-1 y oncoproteínas virales como E7 de HPV o E1A de adenovirus, que son capaces de interactuar con el dominio “pocket” de pRb mediante su dominio LxCxE, bloquean su sumoilación. Nosotros observamos que, al igual que otras oncoproteínas virales, LANA2 es capaz de reducir la sumoilación de pRb, lo que demuestra la funcionalidad del dominio LxCxE. Se ha propuesto que la sumoilación de pRb induciría el proceso de senescencia (Li et al., 2006). Estos datos y nuestros resultados que demuestran que LANA2 inhibe el arresto de la proliferación celular provocado por pRb, parecen indicar que LANA2 evita el proceso de senescencia inducido por pRb, favoreciendo así el proceso de transformación celular.

En este trabajo se demuestra por primera vez la sumoilación de las “pocket proteins” p107 y p130 in vivo. Al igual que ocurría con pRb, la proteína LANA2 es, además, capaz de inhibir la sumoilación de p107 y p130, y dicha inhibición es dependiente del dominio LxCxE. Estos datos abren la posibilidad de que la sumoilación de p107 y p130 podría también tener un papel importante en la inducción de senescencia.

Otra modificación post-traducciona que regula las “pocket proteins” es la fosforilación. La fosforilación de pRb, p107 y p130 se relaciona con la inactivación de las “pocket proteins”, favoreciéndose así la progresión del ciclo celular. Se ha visto que la proteína viral E1A es capaz de interactuar con la forma hipofosforilada de las “pocket proteins”, perturbando los complejos “pocket protein”- E2F e incrementando la transcripción dependiente de E2F (Ghosh and Harter, 2003). LANA2 interactúa con pRb pero no parece afectar a su fosforilación. Sin embargo, LANA2 parece favorecer la hiperfosforilación de p107, lo que llevaría a una disminución de su actividad. LANA2 también indujo un cambio en el patrón de fosforilación de p130 incrementando los niveles de p130 hiper- e hipofosforilada. De la misma forma que pRb, la hiperfosforilación de p130 lleva a procesos relacionados con su inactivación. Si como ocurre con pRb, las formas de p107 y p130 que se sumoilasen fueran las hipofosforiladas, la hiperfosforilación de p107 o p130 inducida por LANA2 podría contribuir a la reducción de la sumoilación de p107 y además inhibir la actividad de la proteína.

Mediante este trabajo demostramos, por tanto, que LANA2 es una proteína capaz de inducir inestabilidad cromosómica, mecanismo que podría colaborar para la obtención del fenotipo transformado que se encuentra en las células infectadas con KSHV. LANA2 puede estar actuando en distintas vías moleculares para inducir dicha inestabilidad cromosómica, tales como la alteración de la duplicación de los centrosomas a través de su interacción con la tubulina, la inactivación de las “pocket proteins” pRb, p107 y p130, la inhibición del punto de control de ensamblaje del huso mitótico o la inducción de daño al ADN. Además, hemos visto que LANA2 es capaz de inhibir la sumoilación de las “pocket proteins” por SUMO, que inhibe el arresto de las células mediado por pRb y que altera el estado de fosforilación de p107 y p130, en general aparentemente favoreciendo estados hiperfosforilados (inactivos). Con estas actividades, LANA2 estaría promoviendo la proliferación de las células y colaborando en la transformación celular. Sin embargo, este trabajo también demuestra que la proteína LANA2 no es capaz por sí sola de inducir transformación celular y sugiere que es necesaria su colaboración con otros factores del virus para que esto ocurra. La necesidad de colaboración entre proteínas de KSHV para inducir la transformación de las células infectadas se ve reforzada, además, por los resultados que indican que el factor RBP-Jk modula negativamente la transcripción de LANA2. Se sabe que LANA interacciona con RBP-Jk e inhibe el efecto represor de este factor sobre la transcripción de varios genes de KSHV. Existe, por tanto, la posibilidad de que la expresión de LANA2 se encuentre modulada por alguna otra proteína del virus.

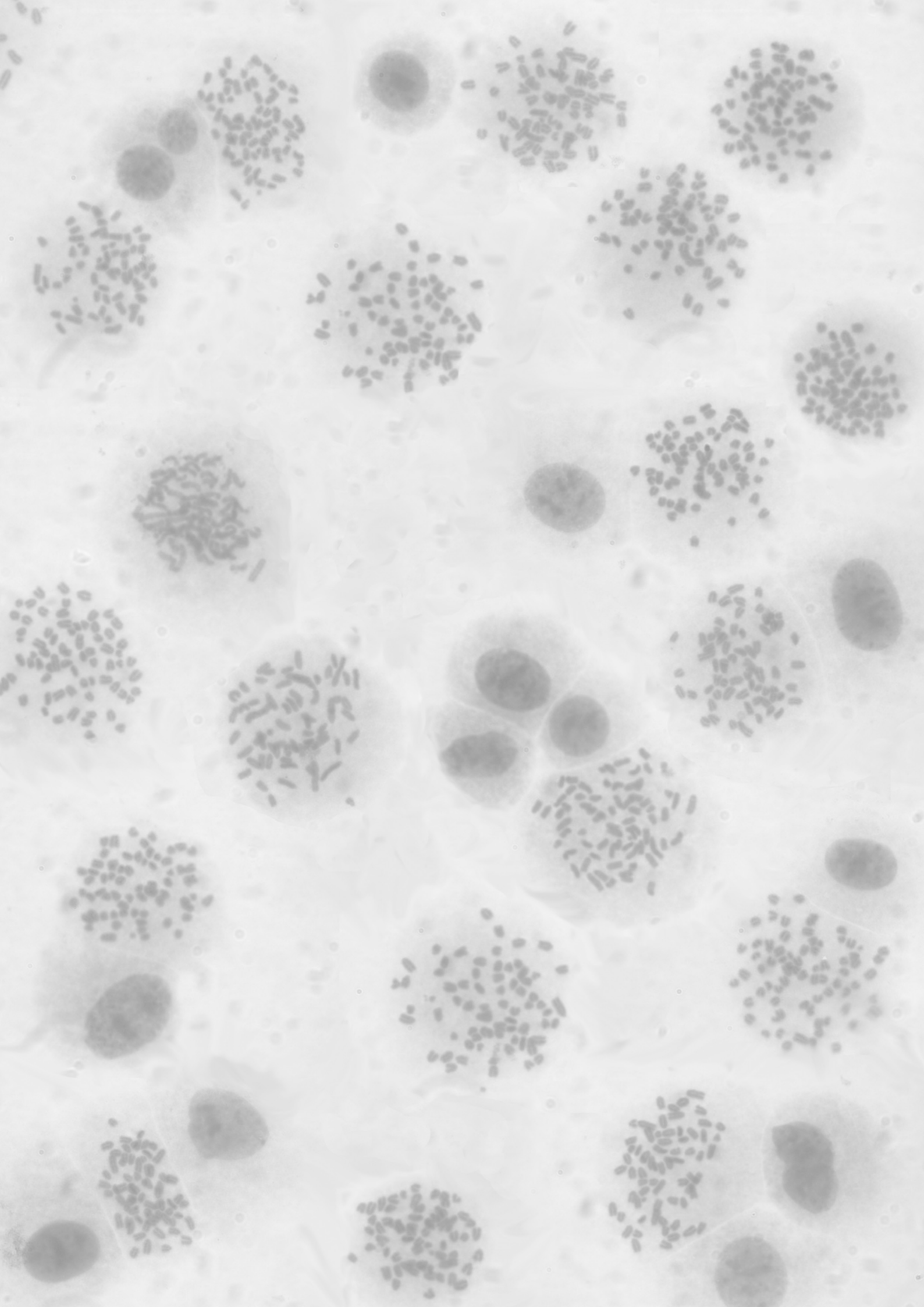




CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. LANA2 activates a DDR and induces chromosome instability.
2. LANA2 interacts with the mitotic machinery and causes mitotic assembly checkpoint defects. Consequently, LANA2 promotes apoptosis in primary cells.
3. LANA2 does not transform cells by itself, but it enhances the transformation activity of Ras, and increases proliferation of immortalized cells.
4. LANA2 requires an LxCxE domain to interact with p107 but the interaction between LANA2 and p130, or pRb occurs in an LxCxE-independent manner.
5. LANA2 alters p107 and p130 phosphorylation patterns.
6. The pocket proteins p107 and p130 are modified by SUMO.
7. LANA2 inhibits SUMOylation of pRb, p107 and p130 in an LxCxE-dependent manner.
8. A region located between 922 and 1472 nucleotides upstream of LANA2 coding region, contains an element that positively modulates the transcription of LANA2 in B cells.
9. The RBP-Jk transcription factor negatively regulates LANA2 transcription.



A black and white micrograph showing numerous plant cells. Each cell contains a large, dark, oval-shaped chloroplast. The cells are arranged in a somewhat regular pattern, and the chloroplasts are densely packed with small, dark granules, likely starch or other photosynthetic products. The cell walls are clearly visible, forming a grid-like structure.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Amato, A., T. Schillaci, et al. (2009). "CENPA overexpression promotes genome instability in pRb-depleted human cells." *Mol Cancer* **8**: 119.
- Anderhub, S. J., A. Kramer, et al. (2012). "Centrosome amplification in tumorigenesis." *Cancer Lett.*
- Atkinson, J., B. R. Edlin, et al. (2003). "Seroprevalence of human herpesvirus 8 among injection drug users in San Francisco." *J Infect Dis* **187**(6): 974-981.
- Baresova, P., P. M. Pitha, et al. (2012). "Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus vIRF-3 Protein Binds to F-box of Skp2 Protein and Acts as a Regulator of c-Myc Protein Function and Stability." *J Biol Chem* **287**(20): 16199-16208.
- Bargonetti, J., I. Reynisdottir, et al. (1992). "Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53." *Genes Dev* **6**(10): 1886-1898.
- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 738-747.
- Bayani, J., S. Selvarajah, et al. (2007). "Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells." *Semin Cancer Biol* **17**(1): 5-18.
- Bayer, P., A. Arndt, et al. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." *J Mol Biol* **280**(2): 275-286.
- Bhardwaj, K., P. Liu, et al. (2012). "The coronavirus endoribonuclease Nsp15 interacts with retinoblastoma tumor suppressor protein." *J Virol* **86**(8): 4294-4304.
- Bourgo, R. J., C. Thangavel, et al. (2011). "RB restricts DNA damage-initiated tumorigenesis through an LXCXE-dependent mechanism of transcriptional control." *Mol Cell* **43**(4): 663-672.
- Bouvard, V., R. Baan, et al. (2009). "A review of human carcinogens--Part B: biological agents." *Lancet Oncol* **10**(4): 321-322.
- Carbone, A., A. Gloghini, et al. (2000). "Expression of MUM1/IRF4 selectively clusters with primary effusion lymphoma among lymphomatous effusions: implications for disease histogenesis and pathogenesis." *Br J Haematol* **111**(1): 247-257.
- Carroll, K. D., W. Bu, et al. (2006). "Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein stimulates DNA binding of RBP-Jk/CSL to activate the Notch pathway." *J Virol* **80**(19): 9697-9709.
- Cesarman, E. and D. M. Knowles (1999). "The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases." *Semin Cancer Biol* **9**(3): 165-174.
- Classon, M. and N. Dyson (2001). "p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets." *Exp Cell Res* **264**(1): 135-147.
- Cobrinik, D. (2005). "Pocket proteins and cell cycle control." *Oncogene* **24**(17): 2796-2809.
- Chadburn, A., E. Hyjek, et al. (2004). "KSHV-positive solid lymphomas represent an extra-cavitary variant of primary effusion lymphoma." *Am J Surg Pathol* **28**(11): 1401-1416.

- Chakraborty, S., S. Khare, et al. (2007). "Identification of genes associated with tumorigenesis of retinoblastoma by microarray analysis." *Genomics* **90**(3): 344-353.
- Chang, P. J., J. Boonsiri, et al. (2010). "Binding of RBP-Jkappa (CSL) protein to the promoter of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF47 (gL) gene is a critical but not sufficient determinant of transactivation by ORF50 protein." *Virology* **398**(1): 38-48.
- Chang, Y., E. Cesarman, et al. (1994). "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." *Science* **266**(5192): 1865-1869.
- Chen, J., K. Ueda, et al. (2001). "Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 4119-4124.
- Child, E. S. and D. J. Mann (2001). "Novel properties of the cyclin encoded by Human Herpesvirus 8 that facilitate exit from quiescence." *Oncogene* **20**(26): 3311-3322.
- Chung, C. N., Y. Hamaguchi, et al. (1994). "Site-directed mutagenesis study on DNA binding regions of the mouse homologue of Suppressor of Hairless, RBP-J kappa." *Nucleic Acids Res* **22**(15): 2938-2944.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, et al. (1998). "SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation." *Mol Cell* **2**(2): 233-239.
- Diaz-Rodriguez, E., R. Sotillo, et al. (2008). "Hec1 overexpression hyperactivates the mitotic checkpoint and induces tumor formation in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(43): 16719-16724.
- Duensing, S., L. Y. Lee, et al. (2000). "The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10002-10007.
- Dyson, N., P. Guida, et al. (1992). "Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins." *J Virol* **66**(12): 6893-6902.
- Emdad, L., D. Sarkar, et al. (2005). "Emerging roles of centrosomal amplification and genomic instability in cancer." *Front Biosci* **10**: 728-742.
- Esteban, M., M. A. Garcia, et al. (2003). "The latency protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits apoptosis induced by dsRNA-activated protein kinase but not RNase L activation." *J Gen Virol* **84**(Pt 6): 1463-1470.
- Fang, W., T. Mori, et al. (2002). "Regulation of PML-dependent transcriptional repression by pRB and low penetrance pRB mutants." *Oncogene* **21**(36): 5557-5565.
- Ferreon, J. C., M. A. Martinez-Yamout, et al. (2009). "Structural basis for subversion of cellular control mechanisms by the adenoviral E1A oncoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32): 13260-13265.
- Flemington, E. K., S. H. Speck, et al. (1993). "E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(15): 6914-6918.
- Gaidano, G., A. Gloghini, et al. (1997). "Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/syndecan-1 antigen." *Blood* **90**(12): 4894-4900.

- Ganem, D. (1997). "KSHV and Kaposi's sarcoma: the end of the beginning?" *Cell* **91**(2): 157-160.
- Gao, P. and J. Zheng (2011). "Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic viruses--related cancers." *Cancer Lett* **303**(1): 1-8.
- Gao, Y. F., T. Li, et al. (2011). "Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability." *Nat Cell Biol* **13**(8): 924-933.
- Garnovskaya, M. N., Y. V. Mukhin, et al. (2004). "Mitogen-induced rapid phosphorylation of serine 795 of the retinoblastoma gene product in vascular smooth muscle cells involves ERK activation." *J Biol Chem* **279**(23): 24899-24905.
- Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12): 947-956.
- Ghosh, M. K. and M. L. Harter (2003). "A viral mechanism for remodeling chromatin structure in G0 cells." *Mol Cell* **12**(1): 255-260.
- Giordano, A., A. Rossi, et al. (2007). "Tumor suppressor pRb2/p130 gene and its derived product Spa310 spacer domain as perspective candidates for cancer therapy." *J Cell Physiol* **213**(2): 403-406.
- Guo, D., M. Li, et al. (2004). "A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes." *Nat Genet* **36**(8): 837-841.
- Hardeland, U., R. Steinacher, et al. (2002). "Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover." *EMBO J* **21**(6): 1456-1464.
- Harrington, E. A., J. L. Bruce, et al. (1998). "pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20): 11945-11950.
- Hecker, C. M., M. Rabiller, et al. (2006). "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs." *J Biol Chem* **281**(23): 16117-16127.
- Hein, J., S. Boichuk, et al. (2009). "Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding." *J Virol* **83**(1): 117-127.
- Hernando, E., Z. Nahle, et al. (2004). "Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control." *Nature* **430**(7001): 797-802.
- Hietakangas, V., J. Ankar, et al. (2006). "PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(1): 45-50.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-374.
- Iarmarcovai, G., A. Botta, et al. (2006). "Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy." *Toxicol Lett* **166**(1): 1-10.
- Iovino, F., L. Lentini, et al. (2006). "RB acute loss induces centrosome amplification and aneuploidy in murine primary fibroblasts." *Mol Cancer* **5**: 38.
- Ishida, S., E. Huang, et al. (2001). "Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4684-4699.
- Jefford, C. E. and I. Irminger-Finger (2006). "Mechanisms of chromosome instability in cancers." *Crit Rev Oncol Hematol* **59**(1): 1-14.

- Jenner, R. G., K. Maillard, et al. (2003). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18): 10399-10404.
- Ji, P., H. Jiang, et al. (2004). "An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant." *Mol Cell* **16**(1): 47-58.
- Johnson, E. S., I. Schwienhorst, et al. (1997). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." *EMBO J* **16**(18): 5509-5519.
- Joo, C. H., Y. C. Shin, et al. (2007). "Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3." *J Virol* **81**(15): 8282-8292.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet* **27**(3): 247-254.
- Kim, H. Y., B. Y. Ahn, et al. (2001). "Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen." *EMBO J* **20**(1-2): 295-304.
- Kondo, T., H. Higashi, et al. (2001). "Involvement of pRB-related p107 protein in the inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress." *J Biol Chem* **276**(20): 17559-17567.
- Koopal, S., J. H. Furuhi, et al. (2007). "Viral oncogene-induced DNA damage response is activated in Kaposi sarcoma tumorigenesis." *PLoS Pathog* **3**(9): 1348-1360.
- Lan, K., D. A. Koppers, et al. (2005). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway." *J Virol* **79**(6): 3468-3478.
- Ledl, A., D. Schmidt, et al. (2005). "Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor." *Oncogene* **24**(23): 3810-3818.
- Lee, C. and Y. Cho (2002). "Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor." *Rev Med Virol* **12**(2): 81-92.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2007). "Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks." *Oncogene* **26**(56): 7741-7748.
- Lee, J. O., A. A. Russo, et al. (1998). "Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7." *Nature* **391**(6670): 859-865.
- Li, T., R. Santockyte, et al. (2006). "Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways." *J Biol Chem* **281**(47): 36221-36227.
- Liang, Y., J. Chang, et al. (2002). "The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway." *Genes Dev* **16**(15): 1977-1989.
- Liang, Y. and D. Ganem (2003). "Lytic but not latent infection by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus requires host CSL protein, the mediator of Notch signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8490-8495.
- Lin, J. Y. and J. A. DeCaprio (2003). "SV40 large T antigen promotes dephosphorylation of p130." *J Biol Chem* **278**(47): 46482-46487.

- Liu, Y., Y. Cao, et al. (2008). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA activates the processivity factor ORF59 through interaction with RBP-Jkappa and a cis-acting RTA responsive element." *Virology* **380**(2): 264-275.
- Lu, F., J. Zhou, et al. (2003). "Chromatin remodeling of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 promoter correlates with reactivation from latency." *J Virol* **77**(21): 11425-11435.
- Lubyova, B., M. J. Kellum, et al. (2004). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vIRF-3 stimulates the transcriptional activity of cellular IRF-3 and IRF-7." *J Biol Chem* **279**(9): 7643-7654.
- Lubyova, B., M. J. Kellum, et al. (2007). "Stimulation of c-Myc transcriptional activity by vIRF-3 of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus." *J Biol Chem* **282**(44): 31944-31953.
- Lubyova, B. and P. M. Pitha (2000). "Characterization of a novel human herpesvirus 8-encoded protein, vIRF-3, that shows homology to viral and cellular interferon regulatory factors." *J Virol* **74**(17): 8194-8201.
- Ludlow, J. W., C. L. Glendening, et al. (1993). "Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein." *Mol Cell Biol* **13**(1): 367-372.
- Lukac, D. M., R. Renne, et al. (1998). "Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein." *Virology* **252**(2): 304-312.
- Manning, A. L. and N. J. Dyson (2012). "RB: mitotic implications of a tumour suppressor." *Nat Rev Cancer* **12**(3): 220-226.
- Marcos-Villar, L., M. Campagna, et al. (2011). "Covalent modification by SUMO is required for efficient disruption of PML oncogenic domains by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA2." *J Gen Virol* **92**(Pt 1): 188-194.
- Marcos-Villar, L., F. Lopitz-Otsoa, et al. (2009). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein LANA2 disrupts PML oncogenic domains and inhibits PML-mediated transcriptional repression of the survivin gene." *J Virol* **83**(17): 8849-8858.
- Matolcsy, A., R. G. Nador, et al. (1998). "Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation." *Am J Pathol* **153**(5): 1609-1614.
- McGivern, D. R. and S. M. Lemon (2009). "Tumor suppressors, chromosomal instability, and hepatitis C virus-associated liver cancer." *Annu Rev Pathol* **4**: 399-415.
- Mok, Y. K., K. W. Lo, et al. (2001). "Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain." *J Biol Chem* **276**(17): 14067-14074.
- Moore, P. S., S. J. Gao, et al. (1996). "Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae." *J Virol* **70**(1): 549-558.
- Munoz-Fontela, C., M. Collado, et al. (2005). "Identification of a nuclear export signal in the KSHV latent protein LANA2 mediating its export from the nucleus." *Exp Cell Res* **311**(1): 96-105.
- Munoz-Fontela, C., L. Marcos-Villar, et al. (2007). "Latent protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with 14-3-3 proteins and inhibits FOXO3a transcription factor." *J Virol* **81**(3): 1511-1516.
- Munoz-Fontela, C., L. Marcos-Villar, et al. (2008). "Induction of paclitaxel resistance by the Kaposi's

sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA2." *J Virol* **82**(3): 1518-1525.

- Nair, P., H. Pan, et al. (2006). "Recurrent genomic imbalances in primary effusion lymphomas." *Cancer Genet Cytogenet* **171**(2): 119-121.
- Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, et al. (1998). "Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication." *Mol Cell Biol* **18**(1): 629-643.
- Nikitin, P. A. and M. A. Luftig (2012). "The DNA damage response in viral-induced cellular transformation." *Br J Cancer* **106**(3): 429-435.
- Nikitin, P. A., C. M. Yan, et al. (2010). "An ATM/Chk2-mediated DNA damage-responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells." *Cell Host Microbe* **8**(6): 510-522.
- Norbury, C. and P. Nurse (1992). "Animal cell cycles and their control." *Annu Rev Biochem* **61**: 441-470.
- Nowak, M. A., N. L. Komarova, et al. (2002). "The role of chromosomal instability in tumor initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16226-16231.
- Parravicini, C., B. Chandran, et al. (2000). "Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease." *Am J Pathol* **156**(3): 743-749.
- Pihan, G. A. and S. J. Doxsey (1999). "The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer." *Semin Cancer Biol* **9**(4): 289-302.
- Plug-DeMaggio, A. W., T. Sundsvold, et al. (2004). "Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6." *Oncogene* **23**(20): 3561-3571.
- Quintyne, N. J., J. E. Reing, et al. (2005). "Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering." *Science* **307**(5706): 127-129.
- Radkov, S. A., P. Kellam, et al. (2000). "The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells." *Nat Med* **6**(10): 1121-1127.
- Ren, S. and B. J. Rollins (2004). "Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit." *Cell* **117**(2): 239-251.
- Reverter, D. and C. D. Lima (2005). "Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex." *Nature* **435**(7042): 687-692.
- Rivas, C., A. E. Thlick, et al. (2001). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53." *J Virol* **75**(1): 429-438.
- Rogoff, H. A., M. T. Pickering, et al. (2004). "Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2968-2977.
- Russo, J. J., R. A. Bohenzky, et al. (1996). "Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14862-14867.
- Saitoh, H. and J. Hinchev (2000). "Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3." *J Biol Chem* **275**(9): 6252-6258.
- Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). "The role of PML in tumor suppression." *Cell* **108**(2): 165-170.

- Sarge, K. D. and O. K. Park-Sarge (2009). "Sumoylation and human disease pathogenesis." *Trends Biochem Sci* **34**(4): 200-205.
- Sarid, R., O. Flore, et al. (1998). "Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1)." *J Virol* **72**(2): 1005-1012.
- Saunders, W. S., M. Shuster, et al. (2000). "Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1): 303-308.
- Scott, P. H., C. A. Cairns, et al. (2001). "Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry." *J Biol Chem* **276**(2): 1005-1014.
- Schulz, T. F. (2001). "KSHV/HHV8-associated lymphoproliferations in the AIDS setting." *Eur J Cancer* **37**(10): 1217-1226.
- Schvartzman, J. M., R. Sotillo, et al. (2010). "Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modeling of the human disease." *Nat Rev Cancer* **10**(2): 102-115.
- Seo, T., J. Park, et al. (2004). "Inhibition of nuclear factor kappaB activity by viral interferon regulatory factor 3 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Oncogene* **23**(36): 6146-6155.
- Shin, Y. C., C. H. Joo, et al. (2008). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IFN regulatory factor 3 stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha to induce vascular endothelial growth factor expression." *Cancer Res* **68**(6): 1751-1759.
- Si, H. and E. S. Robertson (2006). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen induces chromosomal instability through inhibition of p53 function." *J Virol* **80**(2): 697-709.
- Sodhi, A., S. Montaner, et al. (2004). "Does dysregulated expression of a deregulated viral GPCR trigger Kaposi's sarcomagenesis?" *FASEB J* **18**(3): 422-427.
- Song, J., Z. Zhang, et al. (2005). "Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation." *J Biol Chem* **280**(48): 40122-40129.
- Sotillo, R., J. M. Schvartzman, et al. (2010). "Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal." *Nature* **464**(7287): 436-440.
- Tainsky, M. A., F. Z. Bischoff, et al. (1995). "Genomic instability due to germline p53 mutations drives preneoplastic progression toward cancer in human cells." *Cancer Metastasis Rev* **14**(1): 43-48.
- Toth, Z., D. T. Maglinte, et al. (2010). "Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes." *PLoS Pathog* **6**(7): e1001013.
- van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers, et al. (2001). "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection." *Nat Rev Genet* **2**(3): 196-206.
- van Harn, T., F. Foijer, et al. (2010). "Loss of Rb proteins causes genomic instability in the absence of mitogenic signaling." *Genes Dev* **24**(13): 1377-1388.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." *Cell Prolif* **36**(3): 131-149.
- Verschuren, E. W., J. G. Hodgson, et al. (2004). "The role of p53 in suppression of KSHV cyclin-induced lymphomagenesis." *Cancer Res* **64**(2): 581-589.

- Verschuren, E. W., J. Klefstrom, et al. (2002). "The oncogenic potential of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin is exposed by p53 loss in vitro and in vivo." *Cancer Cell* **2**(3): 229-241.
- Watanabe, T., M. Sugaya, et al. (2003). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen prolongs the life span of primary human umbilical vein endothelial cells." *J Virol* **77**(11): 6188-6196.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." *Cell* **81**(3): 323-330.
- Wies, E., A. S. Hahn, et al. (2009). "The Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus-encoded vIRF-3 Inhibits Cellular IRF-5." *J Biol Chem* **284**(13): 8525-8538.
- Wies, E., Y. Mori, et al. (2008). "The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells." *Blood* **111**(1): 320-327.
- Williams, J. P., T. Stewart, et al. (2006). "The retinoblastoma protein is required for Ras-induced oncogenic transformation." *Mol Cell Biol* **26**(4): 1170-1182.
- Wood, R. D., M. Mitchell, et al. (2001). "Human DNA repair genes." *Science* **291**(5507): 1284-1289.
- Young, A., J. B. Dictenberg, et al. (2000). "Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes." *Mol Biol Cell* **11**(6): 2047-2056.
- Yu, Y., J. B. Black, et al. (1999). "Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells." *J Gen Virol* **80** (Pt 1): 83-90.
- Zalvide, J. and J. A. DeCaprio (1995). "Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-T-antigen-mediated transformation." *Mol Cell Biol* **15**(10): 5800-5810.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature* **408**(6811): 433-439.
- Zhou, S., M. Fujimuro, et al. (2000). "SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2400-2410.
- Zhou, S. and S. D. Hayward (2001). "Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex." *Mol Cell Biol* **21**(18): 6222-6232.
- Zhu, L., E. Harlow, et al. (1995). "p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F." *Genes Dev* **9**(14): 1740-1752.

