



## ХАВДАР ЭСИЙН ҮЙЛ АЖИЛЛАГААНД JSAP (JNK/STRESS- ACTIVATED PROTEIN KINASE-ASSOCIATED PROTEIN) УУРГИЙН ОРОЛЦОО

П.Эрдэнэбаатар<sup>1,2</sup>, Н.Риота<sup>2</sup>, Ё. Кацүжү<sup>2</sup>

1 Ерөнхий болон сорилын биологийн хүрээлэн, ШУА, Монгол улс  
2 Хавдар Судлалын Хүрээлэн, Японы Каназавагийн Их сургууль, Япон улс  
Цахим шуудан: [pureverdenebaatar@gmail.com](mailto:pureverdenebaatar@gmail.com)

### Abstract

*JSAP1 and JSAP2 are structurally close related family proteins and originally have been identified as scaffold proteins of the JNK and p38 MAPK modules. The specificity of MAPK cascades is regulated, at least in part, by scaffold proteins, such as JSAPs[1-7].*

*Some studies showed [7-12] that JSAPs function as adaptor proteins which link cargoes to kinesin-1, the cellular cargo transporter along with microtubules. Also JSAPs regulate certain crucial neuronal processes, particularly axon elongation, branching and neurite outgrowth[13-22].*

*Interestingly, in recent studies it was reported that an elevated expression of JSAP2 protein in various cancers, including breast, colorectal cancer and hepatocellular carcinoma, might be proposed as a biomarker for diagnosis of cancers at early stage[25-28]. However, roles of JSAP in cancer cells and their underlying molecular mechanisms are not known well at present.*

*Within our project which aims to clarify potential roles of JSAPs in cancers, in the present study an overexpression of JSAPs in HeLa cells using lentiviral vectors were performed and immunocytochemical analyses focused on centrosomes at mitotic stage of dividing cells were done.*

*In results, in HeLa dividing cells, which overexpress the wild type of JSAPs or their substitution mutant forms a multiple centrosome at mitotic stage of cells were found. However, in case of overexpression of the deletion mutant JSAP proteins in cancer cells a multi-centrosome abnormality were not observed, as well as in control cells.*

**Key words:** JSAP, overexpression, mitotic stage, multi-centrosome abnormality

### ОРШИЛ

Эукариот организмын эсийн дотор явагдах процессын мэдээлэл дамжуулдаг Митоген-идэвхжүүлэгч протеин киназа буюу MAPK (Mitogen-activated protein kinase) уургуудын бүрдэл нь MAPK, MAPK киназа (МАРКК) болон МАРКК киназа (МАРККК) гэсэн үндсэн бүрэлдэхүүнтэй бөгөөд эволюцийн явцад харьцангуй сайн хадгалагдаж тогтворжсон байдаг. MAPK сигнал нь үр хөврөлийн хөгжил, эсийн хуваагдал, ялгаран хөгжил, апоптози гэх мэт олон нарийн үйл ажиллагааг

зохицуулах мэдээлэлийг эс дотор болон эс хооронд дамжуулдаг[1-4].

МАРК сигналын оролцоотойгоор мэдээлэл оновчтой, үр ашигтай дамжих үйл ажиллагааг JIP1 (c-Jun NH2-terminal kinase(JNK)-interacting protein 1), JSAP1(JIP3,Sunday Driver) зэрэг угсрагч скаффолдын уургууд нөхцөлдүүлдэг[5-7]. JSAP/JIP бүлгийн JSAP1 болон JSAP2 (JLP, JIP4, SPAG9) уургууд нь бүтэц, функциональ домэйний хувьд хоорондоо төстэй бөгөөд эдгээр нь JNKMAPK,



p38MAPK-аар сигнал дамжих үед угсрагч скаффолдын үүрэг гүйцэтгэдэг. Харин JSAP1 нь JNK-д, JSAP2 нь p38-д илүү өвөрмөцөөр харилцан үйлчилдэг байна[7-12]. Мөн JSAP уургууд нь эсийн дотор карго зөөвөрлөдөг мотор уураг болох кинезин-1 -тэй (kinesin-1) харилцан үйлчилж улмаар каргог мотор уурагтай холбодог болохыг судлаачид тогтоожээ [13-16]. Сүн нар [17] болон Ватт нар [18] JSAP нь мотор уургийн идэвх ба хөдөлгөөнийг зохицуулдаг болохыг харуулсан[13-18]. Мэдрэлийн эсийн аксоны уртсах, салаалах, мэдрэлийн ширхэг үүсэхэд ч JSAP уургууд чухал үүрэгтэй ажээ[19-22]. Түүнчлэн эсийн митоз хуваагдлын прометафаз үе болон цитокинезийн үед JSAP уургууд чухал үүрэгтэй болох нь тогтоогдоод

байна[23,24].

Хавдрын молекул биологийн сүүлийн үеийн зарим судалгаанууд[25-28] хөхний, бүдүүн гэдэсний, элэгний гэх мэт олон төрлийн хавдрын үед JSAP2 уургийн экспресс нэмэгддэг болохыг тогтоосон нь ихээхэн сонирхол татаж байгаа юм. Одоогоор хорт хавдрын эсэд JSAP уургуудын гүйцэтгэх үүрэг, тэдгээрийн молекул механизм бүрэн тодорхой болоогүй байгаа хэдий ч олон судлаачид JSAP2 уургийг хавдрын оношлогоонд биомаркер болгон хэрэглэхийг санал болгох болов[25-28].

Бидний энэхүү ажлын зорилго нь хавдрын эсийн хуваагдлын үед JSAP уургийн гүйцэтгэх үүргийг судлахад оршсон болно.

## СУДАЛГААНЫ МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ

### Эсийн өсгөвөр

HEK-293T ба HeLa шугаман эсүүдийг DMEM-глюкоз (Sigma) орчинд эсийн өсгөврийн нийтлэг арга зүйн [29] дагуу өсгөвөрлөж сэлгэн суулгалтуудыг хийсэн.

### Плазмид болон лентивирүс үүсгэх

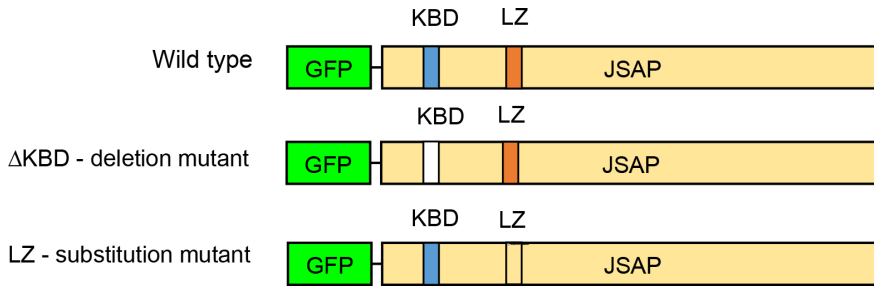
Түвшинтөгс нар [23] болон Сато нарын [30] хөхтөн амьтны эсэд уургийн экспресс явуулахад хэрэглэсэн pCL20c-CMV-GFP, pCL20c-CMV-NA[-JSAP1-WT], -JSAP1-ΔKBD, -JSAP1-LZ, -JLP-WT, -JLP-ΔKBD, -JLP-LZ плазмидуудыг сонгон авсан. Тэдгээр плазмидуудын НА танигчийн генийг ногоон флуоресцент уургийн генээр (Green Fluorescent Protein - GFP) солин угсарч улмаар векторуудын (1-р зураг) нуклеотуудын дарааллыг баталгаажуулж судалгаанд ашигласан. -ΔKBD (Δ kinesin-1 heavy chain binding domain), -LZ (leucine zipper domain) бүхий векторууд дахь JSAP уургуудын генийн функциональ домейнийг кодлогч хэсгийг делецид оруулсан (ΔKBD), мөн нуклеотидийн дараалалд өөрчлөлт оруулсан (LZ) болно[23]. Иймээс функциональ домейн байхгүй (ΔKBD),

амин хүчлийн дараалалд өөрчлөлт орсон (LZ) мутант JSAP уургуудыг экспресслэнэ.

Лентивирүс үүсгэхэд полиэтиленимин (PEI) хэрэглэн pCAGkGP1R, pCAG4RTR2, pCAG-VSV-G (капсидын болон бусад бүтцийн уургуудыг экспресслэдэг) болон pCL20c плазмидуудыг HEK293T котрансфекцийн аргаар эсэд оруулсан. Үүнд:  $2 \times 10^6$  HEK293T эсийг 100-мм өсгөврийн тавганд суулгасны дараах өдөр плазмид болон PEI-ийн холимгийг (плазмид:PEI харьцаа 1:3) өсгөврийн орчинд нэмсэн. 48 цагийн дараа вирүс бүхий орчинг цуглуулан полиэтиленгликол (PEG)-ын уусмалыг 3:1 харьцаагаар нэмэн 4°C-д 16-18 цаг тунадасжуулан концентрацийг нэмэгдүүлсэн. Холимгийг 4700 эрг/мин, 30 мин центрифугидэн тунадасыг цуглуулсан ба PBS (pH 7.4)-д уусган туршилтанд хэрэглэх хүртэл -80°C-д хадгалсан.

### Иммуноцитохимийн шинжилгээ

$4 \times 10^4$  HeLa эсийг 16-18 цаг ургуулж эсийн тэжээлийн орчныг вирүс бүхий шинэ тэжээлт орчингоор сольсон. 48 цагийн



Зураг 1. Ногоон флуоресцент уурагтай холбосон хэвийн болон мутант хэлбэрийн JSAP уургийн бүдүүвч

дараа эсүүдийг цуглуулан урьдчилан бүрхүүл шил байрлуулсан 4 үүрт өсгөврийн хавтанд тарьсан ( $1.5 \times 10^4$  эс/үүр). ДНХ-ийн нийлэгжлийг саатуулагч тимидин болон CDK1-ийн RO-3306 ингибиторыг хэрэглэн туршилтын эсүүдийн хуваагдлыг жигдрүүлсэн. Үүнд: Сэлгэн суулгалтын дараах өдрөөс эсүүдийг 20 цаг тимидин (4 мМ) бүхий орчинд өсгөвөрлөж улмаар энгийн орчин хийсэн. 6 цагийн дараа орчинд RO-3306 ингибитор (9 мкМ) нэмж 11 цаг өсгөвөрлөөд угааж энгийн орчин хийсэн. Үүнээс 30, 60, 90, 120 мин. дараа тус бүр 4%-ийн параформальдегидэд 20-30 мин тасалгааны хэмд бэхжүүлсэн. Иммуноцитохимийн шинжилгээг хийхээс өмнө бэхжүүлсэн эсийн мембранаар эсрэг бие нэвтрэлтийг нэмэгдүүлэхийн тулд бүрхүүл шилийг TBST-д 1 цаг байлгасан.

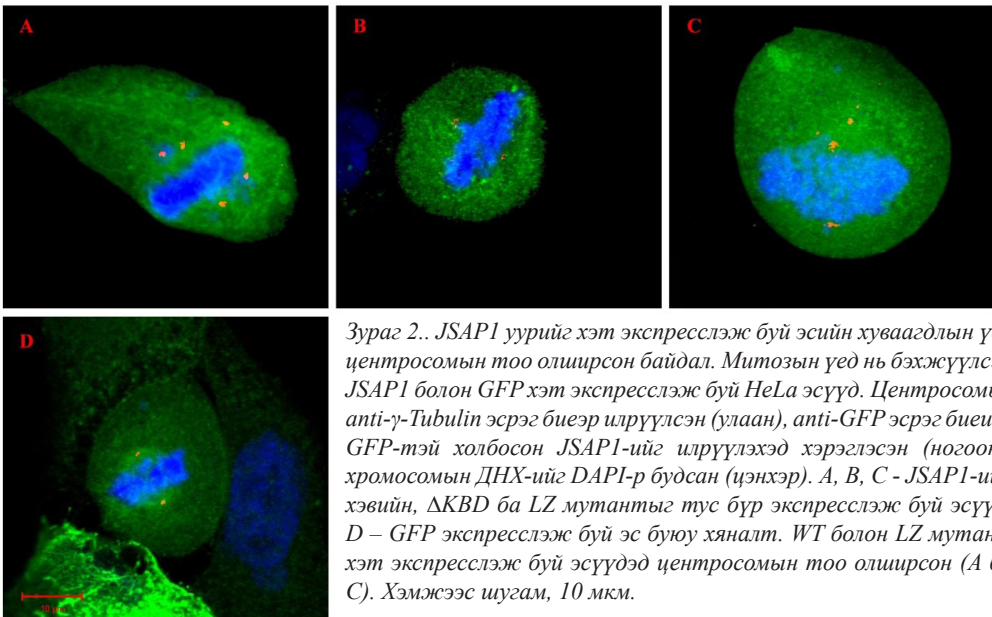
Анхдагч эсрэг биеүүдийг (rat anti-GFP, Molecular Probe ба mouse anti- $\gamma$ -Tubulin, Sigma) TBST-д 1:1000 харьцаагаар шингэлэн бүрхүүл шил дээр хийж 4°C-д шөнийн турш үйлчлүүлсэн. Угаасаны дараа хоёрдогч эсрэг биеийг (anti-mouse IgG, Molecular Probe) TBST-д шингэлэн (1:1000) нэмж тасалгааны хэмд 3 цаг байлгасан. Дараа нь геномын ДНХ-ийг DAPI (1 мкг/мкл)-аар 20 мин будсан. Илүүдэл DAPI будгийг угааж бүрхүүл шилийг 80%-ийн глицерол дусаасантавиур шилэнд байрлуулан ирмэгийг тойруулан лакаар нааж битүүмжилсэн. Эсийн бэлдцийг Конфокол Лазер Микроскоп (LSM510, Carl Zeiss)-ийн тусламжтайгаар шинжилж Z-stack аргаар зургийг авсан.

## Үр дүн, хэлэлцүүлэг

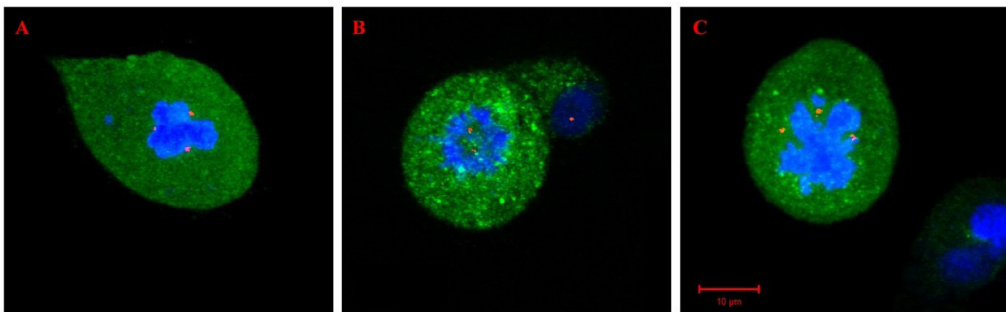
Хавдар дахь JSAP уургуудын оролцоог судлахын тулд GFP-тэй холбосон JSAP1 болон JSAP2 уургуудын хэвийн (WT) ба мутант ( $\Delta$ KBD, LZ нь тус бүр кинезин-1 мотор уургийн хүнд болон хөнгөн гинжтэй харилцан үйлчлэлцэх чадваргүй) уургуудыг хэт экспресслэх конструкцитай векторын тусламжтайгаар HeLa эсэд трансдукци хийсэн.

Энэхүү хэт экспресс явуулж буй эсүүдийн хуваагдлыг жигдрүүлээд иммуноцитохимийн аргаар митозын үеийн чухал бүтэц болох centrosомын судлагаа хийв. Гамма-тубулиний эсрэг бие (anti- $\gamma$ -Tubulin)-ийг митоз хуваагдлын үеийн centrosомыг, харин ногоон флуоресцент уургийн эсрэг биеийг (anti-GFP) GFP-JSAP уургийг хэт экспресслэж буй эсүүдийг танихад тус тус ашигласан.

Хэвийн эсийн хуваагдлын үед 2 centrosом үүсэн эсийн хоёр туйлд тус бүр байршиж улмаар хромосомууд centrosом бүрт татагдан салж хроматидууд эн тэнцүү хувиарлагддаг. Гэвч WT ба LZ мутант хэлбэрийн JSAP1 (Зураг 2.. А ба С) болон JSAP2 (Зураг 3. А ба С) уургийг хэт экспресслэж буй эсүүдийн хуваагдлын үед centrosомын тоо нэмэгдсэн байв. Хяналтын (зөвхөн GFP экспресслэж буй эсүүд. Зураг 2.. Д) болон  $\Delta$ KBD мутант хэлбэрийн JSAP1, эсвэл JSAP2-ыг хэт экспресслэж буй эсүүдэд centrosомын тоо нэмэгдээгүй буюу хэвийн (2, Зураг 3. В) байв.



Зураг 2.. JSAP1 уурийг хэт экспресслэж буй эсийн хуваагдлын үед centrosомын тоо олишрсон байдал. Митозын үед нь бэхжүүлсэн JSAP1 болон GFP хэт экспресслэж буй HeLa эсүүд. Centrosомыг anti- $\gamma$ -Tubulin эсрэг биеэр илрүүлсэн (улаан), anti-GFP эсрэг биеийг GFP-тэй холбосон JSAP1-ийг илрүүлэхэд хэрэглэсэн (ногоон), хромосомын ДНХ-ийг DAPI-р будсан (цэнхэр). А, В, С - JSAP1-ийн хэвийн,  $\Delta$ KBD ба LZ мутантыг тус бүр экспресслэж буй эсүүд. D – GFP экспресслэж буй эс буюу хяналт. WT болон LZ мутант хэт экспресслэж буй эсүүдэд centrosомын тоо олишрсон (А ба С). Хэмжээс шугам, 10 мкм.



Зураг 3. JSAP2 уургийг хэт экспресслэж буй эсийн хуваагдлын үед centrosомын тоо олишрсон байдал. Митозын үед нь бэхжүүлсэн JSAP2 уургийг хэт экспресслэж буй HeLa эсүүд. Centrosомыг anti- $\gamma$ -Tubulin эсрэг биеэр илрүүлсэн(улаан), anti-GFP эсрэг биеийг GFP-тэй холбосон JSAP2-ийг илрүүлэхэд хэрэглэсэн (ногоон), хромосомын ДНХ-ийг DAPI-р будсан (цэнхэр). А, В, С – JSAP2-ийн хэвийн,  $\Delta$ KBD ба LZ мутантыг тус бүр хэт экспресслэж буй эсүүд. WT болон LZ мутант хэт экспресслэж буй эсүүдэд centrosомын тоо олишрсон (А ба С). Хэмжээс шугам, 10 мкм.

Энэхүү үр дүн нь JSAP уургуудын KBD домейн нь эсийн хуваагдлын үед centrosомын зохицуулагчидтай харилцан үйлчлэлцэхэд чухал үүрэгтэй байж болохыг харуулж байна.

Хавдрын бус эсэд centrosомын тоо маш нарийн хянагдсан байх бөгөөд эсийн хуваагдлын үед ДНХ-ийн репликацитай зэрэгцэн нэг удаа хоёрчлогддог.

Centrosомын тоо олшрох нь полиплоид эс үүсэх нэгэн шалтгаан болдог ба энэ нь улмаар геномын, цаашлаад эсийн тогтворгүй байдлыг үүсгэдэг. Геномын тогтворгүй байдал нь ихэвчлэн хожуу үедээ байгаа хавдрын эдэд ажиглагддаг шинж тэмдэг юм. Энэ нь хавдрыг молекул түвшинд оношлоход хүндрэл үүсгэдэг нэгэн шалтгаан болдог. Centrosомын биогенез

нь нарийн зохицуулагатай, шат дараалласан процесс бөгөөд центриоль (центросомын цөм бүтэц) хоёрчлогдох үйл ажиллагаагаар эхэлдэг[31-33]. Зарим судлаачид[24, 34, 35]. митозын үед ихээр идэвхиждэг бөөмийн киназа Plk1(polo like kinase) уураг нь центриоль хөгжиж бүрэн функциональ болоход чухал үүрэгтэй ба JSAP2-той митозын үед харилцан үйлчлэлдэг болохыг тогтоожээ

Хэдийгээр JSAP1, JSAP2 нь бүтэц үүргийн хувьд ихээхэн төстэй уургууд боловч JSAP1 уураг нь Plk1 уурагтай харилцан үйлчилдэггүйг дээрх судалгаа харуулсан. Гэвч бидний судалгааны үр дүнд JSAP1, эсвэл JSAP2 уургийг хэт экспресслэж буй эсүүдэд центросомын тоо нэмэгдсэн нь дээрх 2 уураг ижил үүрэгтэй болохыг харуулж байна.

Үүнээс үндэслэж JSAP уургуудын экспресс нэмэгдэх нь центросомын тоо олширох, улмаар хроматидуудын хэвийн салалт алдагдах нэг шалтгаан байж болох талтай юм.

JSAP уургуудын угсрагч скаффолдын үүрэг нь анх цитоплазм дахь MAPK-

ууд (JNK болон p38) болон тэдгээрийн дараалласан каскадын уургуудтай (MAPKK болон MAPKKK) нэгэн зэрэг харилцан үйлчилж байснаар тогтоогдсон[7-12]. Угсрагч скаффолдын уургийн тоо нэмэгдэхэд тухайн сигнал дамжуулж буй дараалласан каскадын оновчтой байдал буурдаг талаар судлаачид тэмдэглэсэн байдаг[1,3]. Тиймээс JSAP уургуудыг хэт экспресслэж буй бидний туршилтанд JNK болон p38 сигналын дараалласан каскадын оновчтой байдал буурсан байх магадлалтай.

Иймээс бидний судалгааны үр дүнд центросомын тоо олширсон нь МакКоркле нарын [36] JNK-ийн идэвхийг дарангуйлахад хавдрын эсийн хуваагдлын үед центросом үүсэх процесс хэвийн бус болж, улмаар анафазын үед хромосомууд жигд бус салж охин эсүүдэд харилцан адилгүй хувиарлагдаж байсан үр дүнтэй тохирч байна. Гэвч Саго нарын [29] судалгааны дүнд хулганы тархины эсийн өсгөвөрт JSAP1-ийг хэт экспресслэхэд JNK-ийн идэвх нэмэгддэг болох нь ажиглагджээ. Энэ нь судалгаанд хэрэглэсэн хавдрын эсийн төрлөөс хамаарсан байж болох юм.

## ДҮГНЭЛТ

Хэт экспресслэгдсэн JSAP уургууд нь HeLa эсийн хуваагдлын үед центросомын тоо олширох процессыг өдөөх ба эдгээр уургууд нь хавдрын эсийн хуваагдлын үед центросомтой холбоотой үйл ажиллагааг

зохицуулагч уураг/ фактортой харилцан үйлчилдэг бөгөөд үүнд тэдгээрийн KBD домейн чухал үүрэгтэй байж болох юм гэж үзэж байна.

### Ашигласан бүтээлийн жагсаалт

1. Yoshioka, K. (2004) Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *J. Biochem.* 135, 657-661.
2. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M.H. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 26, 22, 3100-3112.
3. Morrison, D.K. & Davis, R.J. (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19, 91-118.
4. Dhanasekaran, D.N., Kashef, K., Lee, C.M., Xu, H. & Reddy, E.P. (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene.* 26, 3185-3202.
5. Whitmarsh, A. J., Kuan, C. Y., Kennedy, N. J., Kelkar, N., Haydar, T. F., Mordes, J. P., Appel, M., Rossini, A. A., Jones, S. N., Flavell, R. A., Rakic, P. & Davis, R. J. (2001) Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev.* 15, 2421-2432.
6. Nihalani, D., Wong, H.N. & Holzman, L.B. (2003). Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-

- dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J. Biol. Chem.* 278, 31, 28694-28702.
7. Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T. & Yamamoto, K.I. (1999) JSAP1, a novel Jun N-terminal protein kinase (JNK) that functions as scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7539–7548.
  8. Ha, H.Y., Cho, I.H., Lee, K.W., Lee, K.W., Song, J.Y., Kim, K.S., Yu, Y.M., Lee, J.K., Song, J.S., Yang, S.D., Shin, H.S. & Han, P.L. (2005) The axon guidance defect of the telencephalic commissures of the JSAP1-deficient brain was partially rescued by the transgenic expression of JIP1. *Dev. Biol.* 277, 184–199.
  9. Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M. & Davis, R.J. (2000) Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1030–1043.
  10. Kelkar, N., Delmotte, M.H., Weston, C.R., Barrett, T., Sheppard, B.J., Flavell, R.A. & Davis, R.J. (2003) Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK-interacting protein 3 (JIP3). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 9843–9848.
  11. Kelkar, N., Standen, C.L. & Davis, R.J. (2005) Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2733–2743.
  12. Lee, C.M., Onesime, D., Reddy, C.D., Dhanasekaran, N. & Reddy, E.P. (2002) JLP: a scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 14189-14194.
  13. Verhey, K.J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B.J., Rapoport, T.A. & Margolis, B. (2001) Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J. Cell Biol.* 152, 959–970.
  14. Nguyen, Q., Lee, C.M., Le, A. & Reddy, E.P. (2005) JLP associates with kinesin light chain 1 through a novel leucine zipper-like domain. *J. Biol. Chem.* 280, 30185–30191.
  15. Montagnac, G., Sibarita, J.B., Loubery, S., Daviet, L., Romao, M., Raposo, G. & Chavrier, P. (2009) ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Curr. Biol.* 19, 184-195.
  16. Suzuki, A., Arikawa, C., Kuwahara, Y., Itoh, K., Watanabe, M., Watanabe, H., Suzuki, T., Funakoshi, Y., Hasegawa, H. & Kanaho, Y. (2010) The scaffold protein JIP3 functions as a downstream effector of the small GTPase ARF6 to regulate neurite morphogenesis of cortical neurons. *FEBS Lett.* 584, 2801–2806.
  17. Sun, F., Zhu, C., Dixit, R. & Cavalli, V. (2011) Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. *EMBO J.* 30, 3416-3429.
  18. Watt, D., Dixit, R., Cavalli, V. (2015) JIP3 Activates Kinesin-I Motility to Promote Axon Elongation. *J Biol Chem.* 290, 15512-15525.
  19. Bilimoria, P.M., de la Torre-Ubieta, L., Ikeuchi, Y., Becker, E.B., Reiner, O. & Bonni, A. (2010) A JIP3-regulated GSK3b/DCX signaling pathway restricts axon branching. *J. Neurosci.* 30, 16766–16776.
  20. Sun, T., Yu, N., Zhai, L.K., Li, N., Zhang, C., Zhou, L., Huang, Z., Jiang, X.Y., Shen, Y. & Chen, Z.Y. (2013) c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)-interacting protein-3 (JIP3) regulates neuronal axon elongation in a kinesin- and JNK-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 288, 14531–14543.
  21. Sato, S., Ito, M., Ito, T. & Yoshioka, K. (2004) Scaffold protein JSAP1 is transported to growth cones of neurites independent of JNK signaling pathways in PC12h cells. *Gene* 329, 51–60.
  22. Xu, H., Dhanasekaran, D. N., Lee, C. M. & Reddy, E. P. (2010) Regulation of neurite outgrowth by interactions between the scaffolding protein, JNK-associated leucine zipper protein, and neuronal growth-associated protein superior cervical ganglia clone 10. *J. Biol. Chem.* 285, 3548-3553.



23. Tuvshintugs, B., Tokiharu, S., Enkhtuya, R., Katsumi, Y. & Yoshioka K. (2014) JSAP1 and JLP are required for ARF6 localization to the midbody in cytokinesis. *Genes to Cells*.19, 692–703.
24. Ramkumar, P., Lee, C.M., Moradian, A., Sweredoski, M.J., Hess, S., Sharrocks, A.D., Haines, D.S. & Reddy, E.P. (2015) JNK associated leucine zipper protein functions as a docking platform for Polo like kinase 1 and regulation of the associating transcription factor Forkhead box protein K1. *J. Biol. Chem.* 290, 49, 29617–29628.
25. Kanojia, D., Garg, M., Gupta, S., Gupta, A. & Suri, A. (2009) Sperm- associated antigen 9, a novel biomarker for early detection of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 18, 2, 630-639.
26. Kanojia, D., Garg, M., Gupta, S., Gupta, A. & Suri, A. (2011) Sperm- Associated Antigen 9 Is a Novel Biomarker for Colorectal Cancer and Is Involved in Tumor Growth and Tumorigenicity. *Am J Pathol.* 178, 3, 1009-1020.
27. Baser, E., Togrul, C., Ozgu, E., Ayhan, S., Caglar, M., Erkaya, S. & Gungor, T. (2013) Sperm-associated antigen 9 is a promising marker for early diagnosis of endometrial cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14, 12, 7635-7638.
28. Xie, C., Fu, L., Liu, N. & Li, Q. (2014) Overexpression of SPAG9 correlates with poor prognosis and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 35, 8, 7685-7691.
29. John, M. D., *MAnimal cell culture: essential methods 2<sup>nd</sup> ed* (2011), Wiley-Blackwell.
30. Sato, T., Torashima, T., Sugihara, K., Hirai, H., Asano, M. & Yoshioka, K. (2008) The scaffold protein JSAP1 regulates proliferation and differentiation of cerebellar granule cell precursors by modulating JNK signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 569–578.
31. S. A. Godinho, S. A & Pellman, D. (2014) Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130467.
32. Nigg, E. A. & Stearns, T. (2011) The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries *Nature Cell Biol.* 13, 1154–1160.
33. Fu, J., Hagan, I. M. & Glover, D. M. (2015) The Centrosome and Its Duplication Cycle. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7, a015800.
34. Kong, D., Farmer, V., Shukla, A., James, J., Gruskin, R., Kiriyama, S. & Loncarek, J. (2014) Centriole maturation requires regulated Plk1 activity during two consecutive cell cycles. *J. Cell Biol.* 206, 855–865.
35. Shukla, A., Kong, D., Sharma, M., Magidson, V. & Loncarek, J. (2015) Plk1 relieves centriole block to reduplication by promoting daughter centriole maturation. *Nat Commun* 6, 8077.
36. MacCorkle, R. A. & Tan, T. H. (2004) Inhibition of JNK2 Disrupts Anaphase and Produces Aneuploidy in Mammalian Cells. *J Biol Chem*, 17, 279, 38, 40112-40121.
37. Wong, H. W. S., Shaukat, Z., Wang, J., Saint, R. & Gregory, S. L. (2014) JNK signaling is needed to tolerate chromosomal instability. *Cell Cycle* 13, 4, 622–631.