

Identificació d'un nou mecanisme de regulació de l'estabilitat de p27^{kip1}

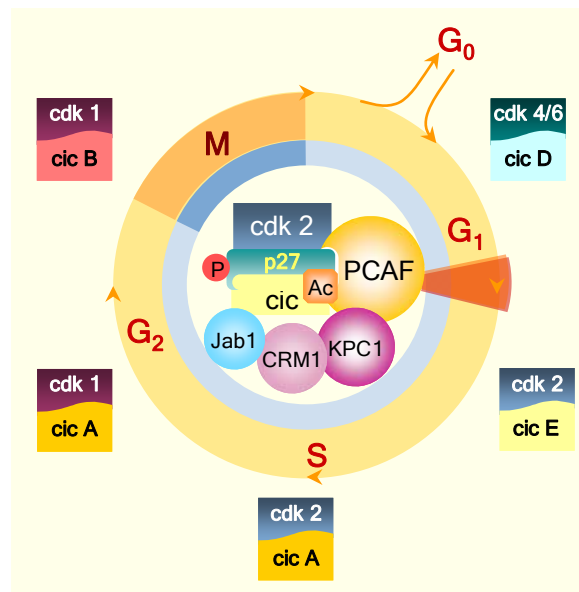
Marta Agasca i Marsà

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Identificació d'un nou mecanisme de regulació de l'estabilitat de p27^{kip1}.



Marta Agasca i Marsà.
Barcelona, Octubre 2005.

Departament de Biologia Cel·lular
i Anatomia Patològica
Facultat de Medicina.

**IDENTIFICACIÓ D'UN NOU MECANISME DE
REGULACIÓ DE L'ESTABILITAT DE p27^{kip1}**

Tesi presentada per
Marta Aguiasca i Marsà
per optar al grau de Doctora en Biologia

Barcelona, Octubre del 2005.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Doctor Oriol Bachs i Valldenuu al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat de Biologia i Patologia Cel·lulars,
Bienni 2000-2002, de la Universitat de Barcelona

Als meus pares

A l'Albert

Tant de temps pensant que algun dia escriuria la tesi i avui, gaire bé sense adonar-me'n, us estic escrivint per donar-vos les gràcies a tots i agrair-vos el vostre recolzament i amistat durant aquests 5 anys. El temps ha passat volant!

Tot va començar a la Facultat de Biologia acabant l'examen de Biologia Molecular del Càncer, on la Montse Coromines ens va dir que l'Oriol Bachs del Departament de Biologia Cel·lular de la Facultat de Medicina estava interessat en algun estudiant per començar la Tesi Doctoral. Dit i fet! Vam tenir la primera reunió amb el que seria el meu director de tesi i s'ha de dir que la primera impressió va resultar un tant curiosa: un catedràtic amb unes ulleres enganxades amb un imperdible que penjava, aconsellant-me que portes una tassa perquè a l'endemà hi havia seminari...(una tassa?, aquell dia no ho vaig acabar d'entendre). Ben aviat, vaig veure que formava part d'un departament diferent, amb un sentit de l'humor peculiar, amb tradicions i, sobretot, moltes celebracions.

En primer lloc vull agrair a l'Oriol Bachs la seva confiança en mi des del primer dia. M'has fet sentir segura com a persona i transmès seguretat en cada cosa que he fet. Gràcies pels bons moments compartits (amb aquell "venceremos", que no sempre funciona) i pels dolents, en els que només tu, davant d'un mal resultat dius: "això fa que la ciència sigui interessant!". Gràcies per tantes coses apreses, per les nostres xerrades i reunions científiques, i per aquest sentit de l'humor simple que en el fons compartim.

Gràcies als altres "jefes": al Carles Enrich i la Rosa Aligué, per les converses i cerveses compartides i per la vostra ajuda científica i no tan científica. A la Neus Agell, gràcies per tenir sempre un moment, per escoltar les meves històries de la p27, per tants consells donats i ensenyar-me que tot no és blanc o negre, si no que hi ha una escala de grisos.

Gràcies a l'Eulàlia i al nostre grup de tècnics (Sònia Brun, Jaumet, Alba i Maria). Gràcies per la vostra organització a cultius, a pràctiques, amb els reactius, el material, les comandes...molta feina i un gran departament amb molts doctorands que coordinar. Gràcies també a la Carmen Díaz per la seva ajuda i amistat.

Gràcies a les "Secres" per la vostra ajuda amb tants papers i tràmits que sovint se'm fan una muntanya!, a la Carme, a la Núria Morante (por tu paciencia y por tener siempre una palabra amable) i a la Maria José (gracias por nuestras conversaciones siempre tan divertidas).

Gràcies als "postDocs" de l'Oriol: al Josep Maria (gràcies pels meus inicis al laboratori, per ensenyar-me com es treballa (mai oblidaré el mètode de Bradford!), per la primera proteïna identificada per MALDI, per aquelles converses i moments divertits); a la Montse (gràcies per escoltar-me tantes vegades, pels consells donats (sempre adequats!) i pel teu recolzament); a la Marta Bosch (gràcies per tenir sempre un moment per ajudar i escoltar, per la teva manera de riure que ens contagia, i per les nostres converses una mica "dislèxiques" sobre l'acetilació de NFκB, algun dia ho entendre!); a la Xus; a la Núria Canela, gràcies a tots per la vostra ajuda i col·laboració en aquesta tesi i us desitjo molta sort a tots amb les noves generacions.

Gràcies als meus companys del grup de l'Oriol. Als més antics: a mi companyera Sonia Carujo, ja ho deies tu..."que son muchos años y nos tenemos que llevar bien Marta Aguasca!", jo crec que així ha sigut. Gràcies per les teves històries, per les converses, per escoltar-me i per aconsellar-me. Molta sort Doctora! Y a mis dos compañeros Jorge y Elson, gracias por tantos momentos divertidos no siempre científicos!. Als companys de grup més nous: a l'Albert Lu, la Mireia, la Paky, l'Ignasi i la Patri; crec que sou una gran generació i que les coses us aniran molt bé, molta sort amb les vostres tesis!.

Gràcies als del grup del Carles, i en especial al Siscu, per tota l'ajuda amb la Biologia Molecular (hem fet molts mutants junts!), per estar sempre disposat a escoltar i ajudar, per les teves bromes (a vegades difícils d'entendre) però que fan que siguis especial. A l'Anna Lladó per ensenyar-me a fer bidimensionals i gradients d'acrilamida, gràcies per aquells temps.

Gràcies a les nenes Pombel!. Maribel, Sandra, i ara Eva, per compartir amb mi tots els moments de la flama (que han sigut molts), per haver estat sempre disposades a ajudar-me, pel vostre sentit de l'humor i les vostres bromes que han fet sortir de mi un somriure inclús picant colònies i fent minis!.

Gràcies a les nenes de la Neus, què hagués fet jo sense vosaltres!. (Ja us aviso que les paraules se'm quedaran curtes). Gracias Vero por estos últimos años, por tu bondad y sencillez, por tu ayuda y tus detalles, por compartir mis momentos "*Rotenmeyer*", por tu sonrisa y hacerme sonreír. Gràcies a la Neus Abella pels nostres cafès al Rosco i les nostres converses després de dinar, per la teva generositat i per estar sempre pendent. Gràcies a la Blanca, per que encara que només hem compartit aquest últim any, crec que l'hem aprofitat; per la teva amistat, per ser la millor companya de cerveses i "pitis", per recolzar-me en moments tan importants de la meua vida. Molta sort, tot anirà bé.

Vull donar les gràcies de forma especial al Manolo i a la Cheles. Han sido muchos años compartidos, desde la carrera hasta el final de la tesis. Gracias Manolo por ser buen amigo y compañero, por ser fuerte, sencillo y noble, por ser tan detallista. Mucha suerte en Australia!. A Cheles, por apoyarme siempre, desde nuestros días en la Facultad de Biología hasta hoy, por tantas anécdotas vividas, por tu optimismo (que a mi me falta), por hacerme reír, por escuchar, por ser amiga. Gracias.

Gràcies també a les companyes d'inici de tesi, Lúdia, Raquel Lastra i Raquel Batlle. Gràcies per aquells temps, temps molt divertits, temps de cafès i "pitis" que intentàvem compaginar amb la feina,... pels bons records. Han estat moltes coses les que hem viscut juntes, i les que viurem!. Gràcies per tot.

Gràcies a la Raquel Fucho, la teua arribada al laboratori per a mi va ser com un raig d'alegria. Gràcies per les converses *soasinhas*, per la teua ajuda i recolzament, pels bons moments compartits. Segur que tot anirà bé a Boston (tu en Boston y yo en California!).

Aquesta tesi no hagués estat el mateix sense la meua companya per excel·lència, la Cristina. Al laboratori, des del primer dia, ens van batejar com les "pin i pon" i així hem continuat. Hem sigut companyes de laboratori (i gaire bé de poiata!), hem sigut parella de ball (mai oblidaré les nostres experiències flamenques!) i crec que hem sigut gran amigues. Et vull agrair el teu recolzament constant durant aquests 5 anys, en els moments bons i en els dolents. Gràcies per ajudar-me a veure el costat objectiu de les coses, per transmetre la teua il·lusió per les coses i compartir-la, per aguantar els meus "5 minuts" com tu dius, gràcies per tantes vegades que hem rigut juntes. Gràcies per que sense tu aquesta etapa hauria estat més difícil. **MOLTES GRÀCIES.**

Per últim, agrair als meus pares (als qui en part dedico aquesta tesi) fer possible que avui hagi arribat fins aquí. Gràcies pare per fer que sigui treballadora i responsable, i ensenyar-me a ser valenta per plantejar-me i superar grans reptes. Gràcies mare, per la teua paciència i educació, per ensenyar-me a ser organitzada i per tenir-te sempre al costat. Als meus germans, la Núria i el Jordi, per tants anys de convivència, per el vostre recolzament en mal, bons i grans moments de la meua vida, per estimar-nos a la nostra manera. Als meus cunyadets, Marc i Odei, a l'avi Joan, a tots els tiets i cosinets, gràcies a tots per estar al meu costat!.

A la meua nova família, a l'Àngela, als meus cunyats, el Xavier i la Mercè, la M^aÀngels i el Blas, als meus nebots el Francesc i l'Adrianna, al Valero i la Nuri i al Xavi, Sònia i "cigronet" (per que quasi sou de la família): Gràcies a tots per fer-me sentir un més de la família gaire bé des del

primer dia, gràcies a tots pels vostres detalls, pels moments divertits, per recolzar-me i acompanyar-me.

GRÀCIES Albert, gràcies per fer-me veure que les coses no són tan complicades com jo les veig, gràcies per compartir amb mi la teva senzillesa i bon cor, gràcies per transmetre'm tranquil·litat quan creia que tot s'enfonsava, gràcies per estar al meu costat en aquesta tesi i per la teva paciència i comprensió en aquests moments tan especials de la nostra vida. ().



Barcelona, Octubre del 2005.

INTRODUCCIÓ	23
1. El cicle cel·lular	25
1.1. Control de qualitat del cicle cel·lular: Punt de restricció i <i>Checkpoints</i>	26
1.2. Maquinària del cicle cel·lular	27
1.3. Substrats de Cdks	28
1.4. Regulació de l'activitat dels complexos Cdk-ciclina	30
2. La proteïna p27^{kip1}	37
2.1. Funcions de la proteïna p27^{kip1}	40
2.1.1. p27 ^{kip1} i el cicle cel·lular	40
2.1.2. p27 ^{kip1} i diferenciació	41
2.1.3. p27 ^{kip1} i apoptosi	43
2.1.4. p27 ^{kip1} i transcripció	45
2.1.5. p27 ^{kip1} i migració cel·lular	45
2.2. p27^{kip1} i càncer	48
2.3. Regulació dels nivells d'expressió de la proteïna p27^{kip1}	50
2.3.1. Regulació transcripcional dels nivells de p27 ^{kip1}	51
2.3.2. Regulació de l'expressió de p27 ^{kip1} a nivell de traducció	53
2.3.3. Regulació dels nivells proteics de p27 ^{kip1} per proteòlisi	54
2.4. Localització subcel·lular de p27^{kip1}	60
2.4.1. Importació de p27 ^{kip1} al compartiment nuclear	61
2.4.2. Exportació de p27 ^{kip1}	62
2.4.3. Regulació de la localització subcel·lular de p27 ^{kip1}	66
OBJECTIUS	69

MATERIALS i MÉTODES	73
Capítol I: Èines i tècniques generals	75
1. Plasmidis	75
2. Cultius cel·lulars	77
2.1. Manteniment de les cèl·lules en cultiu	77
2.2. Sincronització de cèl·lules en G ₀	77
2.3. Transfecció de cèl·lules	78
2.4. Obtenció de lisats cel·lulars i quantificació proteica	78
3. Cultius bacterians	79
3.1. Soques i medis	79
3.2. Transformació bacteriana	80
3.3. Expressió i purificació de proteïnes de fusió	80
4. Electroforesi, Transferència i Immunodetecció	82
4.1. Electroforesi de proteïnes en una dimensió	82
4.2. Electroforesi bidimensional	83
4.3. Tinció de gels d'electroforesi	85
4.4. Electrotransferència i <i>Western-blot</i>	86
Capítol II: Tècniques <i>in vitro</i>	88
5. Anàlisi de complexos proteics per cromatografia d'afinitat	88
5.1. Preparació de mostres	89
5.1.1. Genotipatge de ratolins p27 ^{kip1} ^{-/-} i obtenció d'homogenats de fetge	89
5.1.2. Obtenció d'extractes de la línia cel·lular HCT116	95
5.1.3. Proteïnes recombinants purificades	95
5.2. Estudi de les proteïnes eluïdes obtingudes	96
6. Acetilació d'histones <i>in vitro</i>	98
7. Acetilació de substrats no-histona <i>in vitro</i>	99
8. <i>Spot Mapping</i>	101
9. Assaig d'ubiquitinització <i>in vitro</i>	102
Capítol III: Tècniques <i>in vivo</i>	104
10. Immunoprecipitació	104
10.1. Anàlisi dels complexos <i>in vivo</i>	104
10.2. Anàlisi de l'acetilació i ubiquitinització de p27 ^{kip1}	105
10.3. Anàlisi d'activitat acetilasa	106
10.4. Anàlisi de l'activitat cinasa de Cdk2	107
11. Anàlisi de la vida mitja de la proteïna p27 ^{kip1}	108
12. RT-PCR	109

RESULTATS	111
1. Noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}	113
2. Unió de p27^{kip1} a l'oncoproteïna Set	118
3. Identificació de PCAF com a proteïna d'unió de p27^{kip1}	121
4. Acetilació de p27^{kip1} per PCAF	128
5. PCAF acetila la lisina K100 de p27^{kip1}	132
6. L'acetilació de p27^{kip1} promou la seva degradació	135
7. La degradació de p27^{kip1} acetilada és dóna via proteasoma	139
8. Regulació dels nivells de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular	143
9. La sobreexpressió de PCAF regula l'activitat de Cdk2	147
DISCUSSIÓ	151
CONCLUSIONS	171
BIBLIOGRAFIA	175

INTRODUCCIÓ

1. EL CICLE CEL·LULAR

La reproducció cel·lular consisteix en la replicació del DNA, seguida de la divisió del nucli i la partició del citoplasma per tal de donar lloc a dues cèl·lules filles. Aquesta rutina seqüencial es coneix com el cicle cel·lular.

El cicle cel·lular està dividit en quatre fases. Durant dues d'aquestes fases, les cèl·lules executen els dos esdeveniments bàsics de la divisió cel·lular: la generació d'una nova còpia del seu material genètic (fase S o de síntesi de DNA) i la partició del seu contingut cel·lular entre dues cèl·lules filles idèntiques (fase M o mitosi). Les altres dos fases anomenades G_1 i G_2 , representen períodes durant els quals la cèl·lula es prepara per a la síntesi de DNA i per a la correcta duplicació cel·lular, respectivament. Quan les cèl·lules aturen la seva proliferació, degut a senyals antimitogèniques específiques o a l'absència de senyals mitogèniques apropiades, surten del cicle cel·lular i entren en un estat de "no-divisió" o estat de quiescència conegut com G_0 .

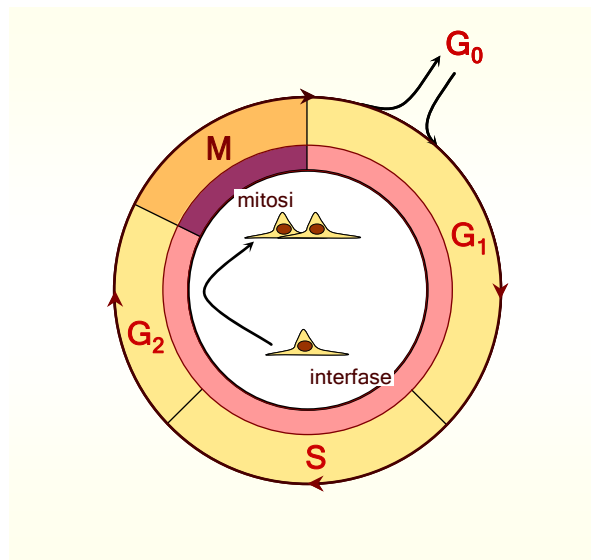


Fig 1.1: Fases del cicle cel·lular.

1.1. Control de qualitat del cicle cel·lular: punt de restricció i

Checkpoints.

El terme “punt de restricció” (R) es defineix com el punt de “no retorn” durant la fase G_1 , a partir del qual, la cèl·lula continua en el cicle cel·lular independentment dels estímuls mitogènics. Experiments demostren que si s’elimina el sèrum del medi de cultiu, les cèl·lules que es troben abans del punt de restricció aturen el seu cicle cel·lular i entren en una fase similar a la de G_0 , en canvi, les cèl·lules que es troben després d’aquest punt “R”, continuen el cicle cel·lular fins a la mitosi (Pardee, 1974).

Existeixen controls addicionals o *checkpoints* al llarg del cicle cel·lular, que assegurin que les diferents fases del cicle es desenvolupin correctament i de forma ordenada. Actualment, es coneixen un nombre important de *checkpoints* entre els quals destaquem:

- El *checkpoint* de dany al DNA (fase G_1). És un *checkpoint* que es dona durant la fase G_1 . En resposta a dany al DNA, aquest *checkpoint* aturarà el cicle per tal de donar temps per a la reparació del DNA. L’aturada del cicle en aquest punt es dona de forma dependent de l’acumulació de la proteïna p53 (Levine, 1997). Quan el problema s’hagi solucionat es donarà pas a la progressió del cicle permetent l’entrada a la fase S.
- El *checkpoint* de dany al DNA (fases G_2 -M). Aquest *checkpoint* es dona després de la replicació del DNA durant les fases G_2 i M i s’assegura de la correcta integritat del DNA per tal de permetre l’entrada en mitosi i donar lloc a dos cèl·lules filles. Si hi hagués dany del DNA en aquest punt, el cicle s’atura i no entra en mitosi mantenint inhibint el complex Cdk1-ciclina B (Zeng et al., 1998) (veure apartat 1.2.).
- El *checkpoint* del fus mitòtic. Aquest *checkpoint* detecta si hi ha hagut algun error a l’hora de separar les cromàtides germanes en el fus mitòtic. Si és així, atura el cicle a la metafase impedit l’entrada a l’anafase (Fang et al., 1998).

1.2. Maquinària del cicle cel·lular.

La transició d'una fase del cicle cel·lular a una altra, és un procés altament ordenat i regulat gràcies a la presència d'una família de serin-treonin cinases anomenades cinases dependents de ciclina (Cdk). Durant el cicle cel·lular les Cdks són processadors d'informació capaços d'integrar senyals extracel·lulars i intracel·lulars, i asseguren una acurada coordinació del cicle cel·lular fent front als canvis de l'entorn o a possibles errades que es produeixen (Morgan, 1997).

Però, les Cdks no actuen soles. La seva capacitat de governar les diferents fases del cicle cel·lular és completament dependent de la seva associació a una subunitat reguladora anomenada ciclina. Així doncs, la progressió del cicle cel·lular està regulada per uns complexos heterodimèrics actius, formats una subunitat reguladora anomenada ciclina i una subunitat catalítica anomenada Cdk.

Complexes Cdk-ciclina

Per definició, per a l'activació de la Cdk es requereix l'associació de la seva subunitat ciclina.

Els nivells proteics de les Cdk es mantenen constants durant el cicle cel·lular, a diferència de les subunitats reguladores, les ciclines. Els nivells proteics de les ciclines augmentaran i disminuiran al llarg del cicle cel·lular i d'aquesta manera, activaran de forma periòdica les diferents Cdks. Cada Cdk pot associar-se amb diferents ciclines, i la ciclina associada determina quines proteïnes seran fosforilades pel complex.

Actualment s'han identificat onze Cdks, de les quals només cinc són actives durant el cicle cel·lular: durant el G₁ (Cdk4, Cdk6 i Cdk2), a la fase S (Cdk2) i a les fases G₂ i M (Cdk1). Es requereixen diferents ciclines per a cada fase del cicle cel·lular: per exemple tres tipus de ciclina D (ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3) que s'uneixen a Cdk4 i Cdk6 i

són necessàries per a l'entrada en G_1 . Aquestes tres ciclins, a diferència de la resta, no s'expressen de forma periòdica, si no que es sintetitzen sempre i quan persisteixin els estímuls mitogènics. Una altra ciclina expressada durant la fase G_1 , és la ciclina E la qual s'uneix a la Cdk2 i juntes regulen la progressió de la fase G_1 i l'entrada a la fase S. La ciclina A, s'associa a Cdk2 i formen un complex necessari per a la fase S. Al final de la fase G_2 , la ciclina A s'uneix a la Cdk1 i promouen l'entrada a mitosi. La mitosi també serà regulada pel complex ciclina B-Cdk1. (revisat a (Morgan, 1997); (Vermeulen et al., 2003))

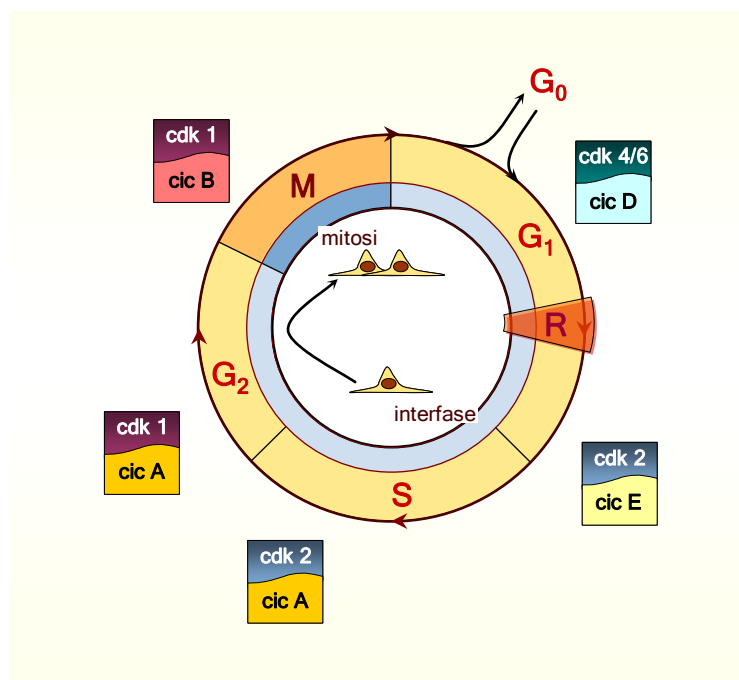


Fig 1.2: Maquinària reguladora del cicle cel·lular.

1.3. Substrats de les Cdks.

Quan les Cdks són actives, els seus substrats són fosforilats, i com a conseqüència es donen canvis que són fisiològicament rellevants per a la progressió del cicle cel·lular.

El principal substrat durant la fase G_1 , i més estudiat, és el producte del gen del retinoblastoma (pRb), un gen que pertany a la família de les proteïnes *pocket* (pRb, p107 i p130) (Weinberg, 1995). Durant l'inici de la fase G_1 , després de l'estímul mitogènic, els

complexes actius Cdk4/6-ciclina D fosforilen les proteïnes *pocket*. Aquesta fosforilació, altera la seva associació amb els membres de la família de factors de transcripció E2F i DP i amb la histona deacetilasa (HDAC). Aquests factors de transcripció es separen de pRb i una vegada lliures, regularan positivament la transcripció de gens com per exemple la ciclina E, ciclina A o Cdc25, que són productes necessaris per a la progressió del cicle i l'entrada a la fase S. L'activitat de pRb es modulada mitjançant la fosforilació seqüencial pels complexes Cdk4/6-ciclina D i Cdk2-ciclina E ja que, per tal de que el cicle cel·lular progressi, pRb s'ha de mantenir en un estat d'hiperfosforilació (Harbour and Dean, 2000).

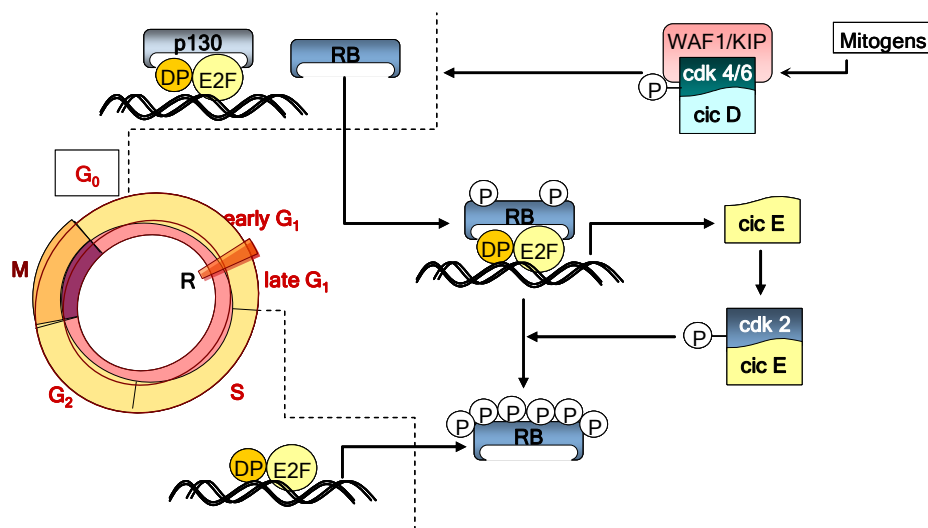


Fig 1.3: Regulació de la fase G₁ i de la transició G₁/S. Durant el G₀, els factors de transcripció E2F-DP es troben units a la proteïna pocket p130 que els manté inactius. A la fase G₁, predominen els complexos pRb-E2F-DP. L'estímul mitogènic induïx la síntesi de la ciclina D permetent la formació dels complexos Cdk4/6-ciclina D actius que fosforilen pRb. La fosforilació parcial de pRb permet l'activació del factor de transcripció E2F el qual induïx l'expressió de gens com ciclina E. Ciclina E s'uneix i activa Cdk2. (Malumbres and Barbacid, 2001).

Durant les fases S i G₂ els complexos Cdk2-ciclina E/A actius fosforilen p27^{kip1} (veure apartat 2.3.3.) induïnt la seva degradació via proteasoma (Montagnoli et al., 1999). A més, el complex Cdk2-ciclina E també fosforila altres substrats com per exemple la proteïna NPAT (proteïna molt important per l'entrada en fase S) o la histona H1 (essencial per a la condensació cromosòmica durant la replicació del DNA). Les Cdks dependents de

la ciclina A regulen la iniciació de la replicació del DNA mitjançant la fosforilació de la DNA polimerasa alfa-primasa. El complex Cdk1-ciclina B també es capaç de fosforilar la histona H1. Pel correcte desenvolupament de la mitosi, es fosforilen altres substrats com els propis reguladors de Cdk (Wee1 i Cdc25) i proteïnes del citoesquelet (com microtubuls o vimentina) (revisat a (Vermeulen et al., 2003).

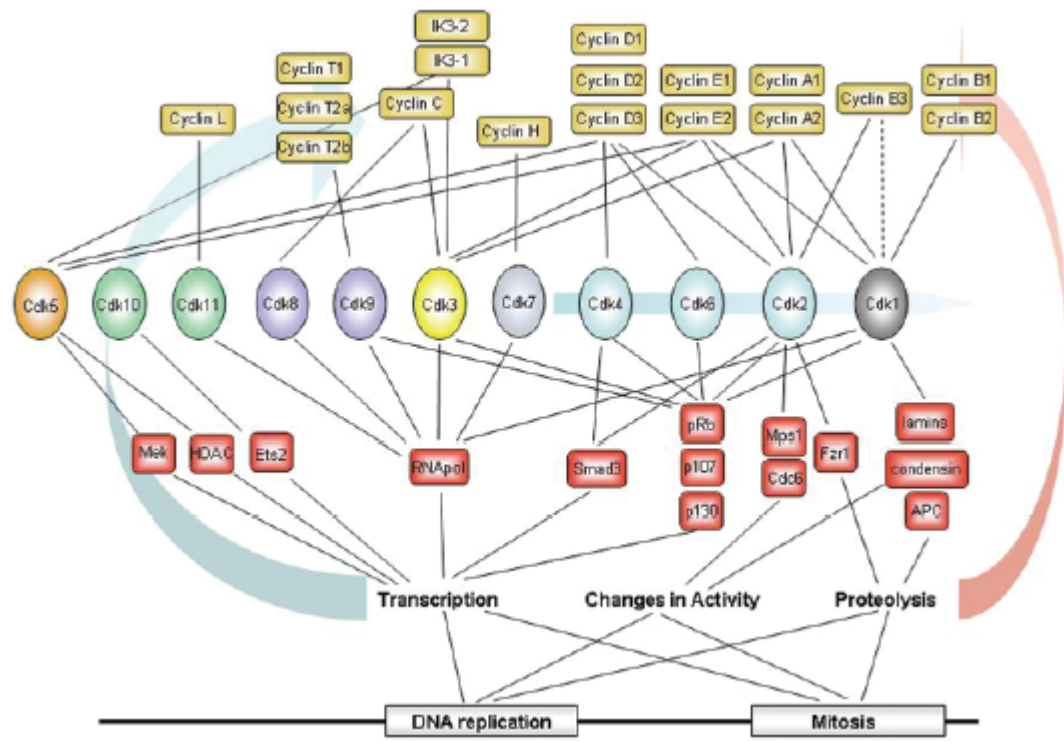


Fig 1.4: Xarxa funcional dels complexos Cdk-ciclina del cicle cel·lular de mamífers. La família de les Cdk (Cdk1-11), està involucrada en la majoria dels processos relacionats amb el cicle cel·lular gràcies a la unió amb les seves subunitats activadores (les cyclines, color groc) i a les funcions dels seus substrats (en color vermell). (Malumbres, 2005).

1.4. Regulació de l'activitat dels complexos Cdk-ciclina.

L'activitat Cdk regula i coordina les diferents fases del cicle cel·lular però, a la vegada, els nivells d'activitat Cdk estan altament regulats per diversos mecanismes com la

fosforilació o la unió a proteïnes reguladores activadores, principalment les ciclines, o proteïnes inhibidores, generalment conegudes com CKIs (*Cdk kinase inhibitors*).

Unió a la subunitat ciclina

Com ja hem comentat abans, l'activació de les Cdk requereix la unió de la seva subunitat reguladora, la ciclina. Gràcies a l'obtenció de l'estructura tridimensional del complex humà Cdk2-ciclina A, s'han pogut entendre els mecanismes implicats en l'activació de la subunitat Cdk quan aquesta s'uneix a la subunitat ciclina. Quan les dues subunitats s'uneixen, es produeixen canvis conformacionals a la Cdk:

- El lloc d'unió al substrat deixa d'estar obstruït pel “*T-loop*” de la Cdk i permet l'accés al substrat.
- La unió de l'hèlix PSTAIRE de la Cdk amb l'hèlix del domini *cyclin box* de la ciclina, també és necessària per a l'activació de la Cdk.
- La treonina 160 de la Cdk (localitzada en el *T-loop*), al unir-se amb la ciclina queda exposada i podrà ser fosforilada.
- En el lloc d'unió a l'ATP es produeixen reorientacions de diferents residus, permetent el correcte posicionament dels grups fosfat perquè es produeixi la transferència dels mateixos (revisat a (Morgan, 1997)).

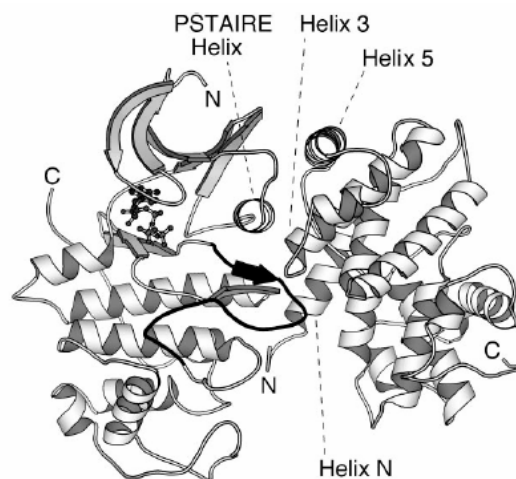


Fig 1.5: Estructura del complex Cdk2-ciclina A humà. Cdk2 és la proteïna de l'esquerra i el domini *T-loop* està ressaltat en color negre. La ciclina A és la proteïna de la dreta. Per a la unió de Cdk2 i ciclina A es necessita la interacció entre l'hèlix PSTAIRE de Cdk2 i les helix 3 i 5 de la ciclina A (Morgan, 1997).

Nivells de la subunitat ciclina

Els nivells de les ciclines oscil·len al llarg del cicle cel·lular. Augmenten de forma específica en fases concretes del cicle, regulant així l'activitat dels complexos Cdk-ciclina. Els nivells de les ciclines es regulen principalment mitjançant dos mecanismes: la transcripció gènica i la degradació proteica.

Se sap que els nivells de RNA missatger i els nivells proteics de les ciclines varien de forma paral·lela durant el cicle cel·lular. S'ha descrit que la síntesi de la ciclina D s'indueix per factors de creixement, i que la síntesi de les ciclines E i A depèn de l'activació de la seva transcripció per part de la família de factors de transcripció E2F. A la vegada, aquests factors de transcripció s'activen pels complexos Cdk-ciclina de les fases G₁ i G₁-S. En el cas d'eucariotes superiors, es desconeixen els mecanismes de regulació de la transcripció de les ciclines mitòtiques (revisat a (Morgan, 1997).

Les ciclines es degraden com a conseqüència d'una proteòlisi dependent d'ubiquitina. La ciclina A i la ciclina B contenen una seqüència anomenada *destruction box* i les ciclines D i E contenen una seqüència PEST (domini ric en prolina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T)). Aquestes seqüències aminoacídiques són essencials per a la proteòlisi de les ciclines mediada per ubiquitinització (Vermeulen et al., 2003). Cal afegir que la ciclina E requereix una fosforilació per part de la seva pròpia subunitat Cdk. També les ciclines D s'han de fosforilar per acció de la glicògen sintasa cinasa-3β (GSK-3β) per degradar-se (Diehl et al., 1997) o bé, en situacions d'estrès per acció de la p38^{SAPK2} (Casanovas et al., 2000; Casanovas et al., 2004).

Per a la destrucció de les ciclines mitòtiques es requereix el complex anomenat ciclosoma o complex APC (*Anaphase Promoting Complex*). Aquest complex actua com un enzim ubiquitin·l·ligasa E3, transferint molècules d'ubiquitina als diferents substrats mitòtics, incloses les ciclines. Se sap que l'APC es activat per Cdk1 i que degrada als seus substrats al final de la mitosi, mantenint-se actiu durant el inici del G₁ fins que apareixen les ciclines d'aquesta fase (King et al., 1996).

Activació de les Cdks per fosforilació

A més de la unió a la subunitat ciclina, l'activitat Cdk també està regulada per fosforilació a residus treonina i tirosina conservats. Per tal que Cdk1 s'activi de forma completa, ha de ser fosforilada a la treonina T161, en el cas de Cdk4 s'ha de fosforilar a la treonina T172 i Cdk2, a la treonina T160. Aquestes fosforilacions estan catalitzades pel complex CAK (*Cdk-Activating-kinase*, format pel complex Cdk7-ciclina H i la proteïna Mat1) i indueixen un canvi conformacional de la Cdk que facilita la interacció amb el seu substrat (Vermeulen et al., 2003).

L'activitat de les Cdks pot ser inhibida per fosforilació. Per exemple, en el cas de Cdk1, les cinases Wee1 i Myt1 la fosforilen a la tirosina Y15 i/o a la treonina T14 inactivant-la. La defosforilació d'aquests residus per part de la família de fosfatases Cdc25, serà necessària per a l'activació de Cdk1 i per tant, per a la progressió del cicle cel·lular.

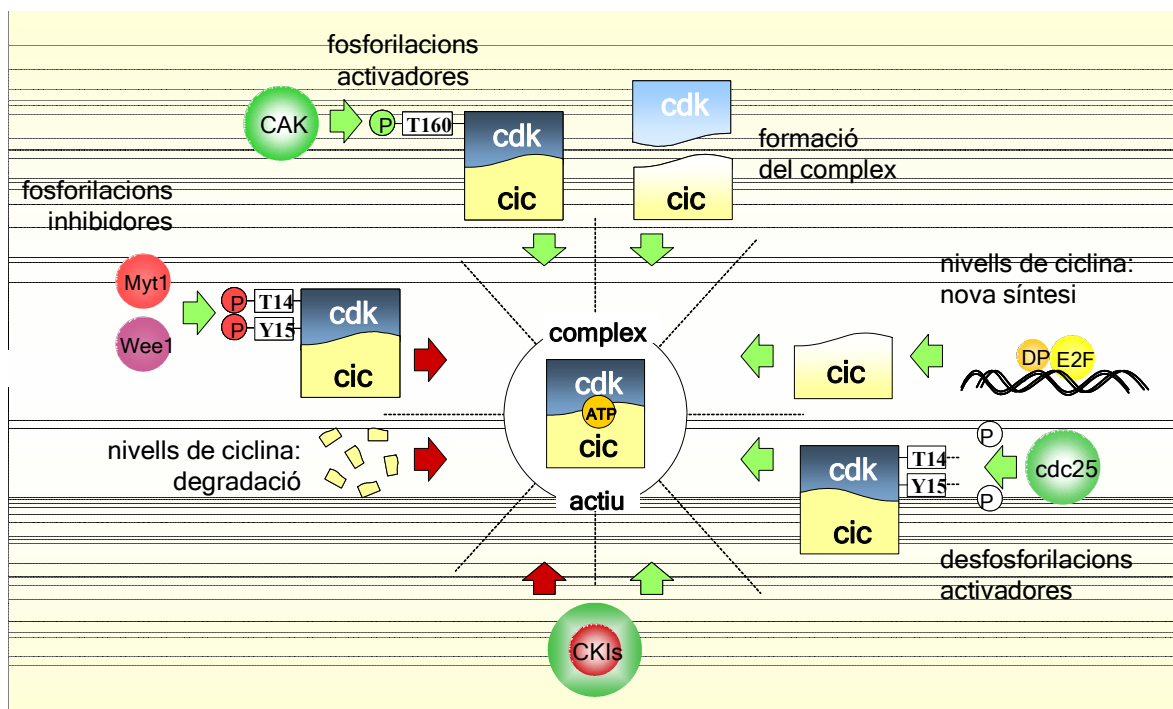


Fig 1.6: Regulació de l'activitat dels complexos Cdk-ciclina.

Proteïnes inhibidores de Cdk

L'activitat Cdk pot ser controlada mitjançant l'associació a les proteïnes CKIs. Aquests inhibidors actuaran de diferent manera sobre els complexos actius Cdk-ciclina, unint-se només a la Cdk o bé, al complex, depenent del tipus d'inhibidor. S'han descrit dos famílies d'inhibidors (Sherr and Roberts, 1995).

- Família INK4 (*Inhibitors of CDK4*)

Aquesta família esta formada per p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d}. Aquests inhibeixen únicament i de forma específica les Cdk de la fase G₁, Cdk4 i Cdk6, i formaran complexos estables amb la Cdk abans de que s'uneixi a la subunitat ciclina, impedit així l'associació a la ciclina D (Carnero and Hannon, 1998).

L'expressió dels gens dels inhibidors INK4 és clarament diferent: els gens que codifiquen per p18^{INK4c} i p19^{INK4d} s'expressen durant el desenvolupament embrionari de forma específica de teixit, mentre que l'expressió de p15^{INK4b} i p16^{INK4a} només es detecta en estadis post-natals i la seva expressió augmentarà amb l'edat. Encara es desconeixen els factors que directament s'uneixen als promotors dels gens INK4 i regulen l'expressió d'aquests inhibidors (Pei and Xiong, 2005). En particular, se sap que l'expressió de p16^{INK4a} augmenta durant la senescència cel·lular i en resposta a estímuls oncogènics (per exemple, Ras oncogènic) i a la inactivació de la proteïna pRb. El promotor de p15^{INK4b} s'activa en resposta al factor d'inhibició del creixement TGFβ. En els casos de p18^{INK4c} i p19^{INK4d}, la seva expressió està regulada de forma periòdica durant el cicle cel·lular (Serrano, 1997; Pei and Xiong, 2005).

En els càncers humans, només p16^{INK4a} es troba freqüentment alterada a diferència de la resta dels membres de la família INK4. Els ratolins *Knock-out* per p15^{INK4b} presenten un fenotip aparentment normal (Latres et al., 2000), els ratolins p19^{INK4d} (-/-) pateixen una hipertròfia testicular (Zindy et al., 2000), els ratolins p18^{INK4c} (-/-) presenten una hiperplàsia generalitzada dels teixits, organomegàlia, i tumor de pituitària (Latres et al., 2000) i els ratolins *Knock-out* per p16^{INK4a} desenvolupen sarcomes, limfomes i melanomes (Sharpless et al., 2001).

- Família CIP/KIP

Les proteïnes que formen part de la família Cip/Kip (*Cdk interacting protein/Kinase inhibitory protein*) són p21^{Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}. Aquests inhibidors actuen sobre els complexos Cdk-ciclina (Polyak et al., 1994; Harper et al., 1995; Lee et al., 1995; Lee et al., 1995). Els membres d'aquesta família s'uneixen a gran varietat de complexos Cdk-ciclina a través del seu domini amino terminal, molt conservat en els tres inhibidors. Són potents inhibidors del complexos Cdk2-ciclina E i Cdk2-ciclina A i també inhibeixen, però amb menys afinitat, altres complexos com Cdk1-ciclina B (Hengst and Reed, 1998).

A la literatura és consistent que els tres membres de la família inhibeixen l'activitat Cdk2-ciclina E/A però, l'efecte d'aquestes proteïnes sobre els complexos Cdk4/6-ciclina D, no està del tot clar. Alguns estudis indiquen que les proteïnes Cip/Kip afavoreixen l'ensamblatge d'aquests complexos afavorint la seva translocació cap al nucli, la seva acumulació i estabilització, i per tant, la seva activació (Cheng et al., 1999). Per una altra banda, en diferents estudis, es demostra clarament com p21^{cip1}, p27^{kip1} i p57^{kip2} inhibeixen aquests complexos *in vitro* (Polyak et al., 1994; Lee et al., 1995) i es postula que aquest inhibidors s'uneixen als complexos estabilitzant-los i provocant la seva inhibició (Bagui et al., 2003).

La proteïna p21^{Cip1} va ser el primer inhibidor descobert de la família Cip/Kip. Es va identificar per primera vegada en un estudi, on es van utilitzar tècniques de *two-hybrid*, com una proteïna associada a Cdk2 (Harper et al., 1993). Es va veure com l'expressió d'aquest inhibidor estava regulada a nivell transcripcional a través del factor de transcripció p53. En resposta a dany del DNA, els nivells de p53 augmenten i s'activa l'expressió de p21^{Cip1} provocant, com a conseqüència, l'aturada del cicle cel·lular (el Deiry et al., 1993). També es va descriure que p21^{Cip1} era capaç d'inhibir la síntesi de DNA mitjançant la unió i inhibició del PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Pan et al., 1995). Però, malgrat la seva importància en la progressió del cicle cel·lular, no es tracta d'una proteïna essencial, ja que els ratolins *Knock-out* de p21^{Cip1} són viables i no presenten nivells més alts de desenvolupament de tumors (Brugarolas et al., 1995).

La proteïna p27^{kip1} va ser identificada inicialment com a inhibidor dels complexos Cdk-ciclina en resposta a la inducció per TGF- β (Polyak et al., 1994). Posteriorment, s'ha vist que es tracta d'un gen supressor de tumors, molt vinculat a diversos càncers humans i amb la capacitat d'exercir altres funcions independents de la regulació del cicle cel·lular. El nostre treball s'ha centrat en la identificació de noves funcions d'aquest inhibidor. A continuació, mostrem una ampla descripció de la proteïna p27^{kip1} (veure apartat 2).

En quan a la proteïna p57^{kip2}, va ser l'últim membre de la família Cip/Kip en ser identificat (Lee et al., 1995). La disminució dels nivells d'expressió d'aquest inhibidor, s'ha relacionat amb la tumorigènesi. Els ratolins *Knock-out* per p57^{kip2} desenvolupen hiperplàsia i citomegàlia del cortex adrenal. En adenomes i carcinomes del cortex adrenal, s'han trobat els nivells de RNA missatger de p57^{kip2} disminuïts (Lloyd et al., 1999). També, està molt relacionat amb el tumor de Wilm i amb la síndrome de Beckwith-Wiedemann. p57^{kip2} es troba implicada en processos d'apoptosi i diferenciació de diferents teixits. De manera similar a p21^{cip1}, s'ha descrit que p57^{kip2}, a més d'inhibir complexos Cdk-ciclina, inhibeix la replicació del DNA *in vitro* mitjançant la seva unió al PCNA (Watanabe et al., 1998).

2. LA PROTEÏNA p27^{kip1}

La proteïna p27^{kip1} va ser inicialment descoberta com un inhibidor dels complexos Cdk2-ciclina E i Cdk2-ciclina A, a cèl·lules on s'havia induït una aturada del cicle cel·lular per TGF- β (*Transforming growth factor- β*), per inhibició per contacte o per lovastatina (revisat a (Kudo et al., 2005;Koff et al., 1993).

El gen que codifica per a la proteïna p27^{kip1} es troba localitzat al cromosoma 12p13. Aquest gen va ser clonat per primera vegada a l'any 1994 (Polyak et al., 1994;Toyoshima and Hunter, 1994;Slingerland et al., 1994).

A l'any 1996 es van obtenir els primers ratolins *Knock-out* per p27^{kip1} (Fero et al., 1996). Aquests ratolins deficients en p27^{kip1} mostraven gigantisme, les femelles eren estèrils i presentaven hiperplàsia d'òrgans com el timus, retina, pituitària, glàndules adrenals, i gònades, indicant un paper anti-proliferatiu molt important de p27^{kip1} durant el desenvolupament. A més, aquests ratolins desenvolupaven adenomes de pituitària, a la pròstata i tumors a les tiroides, relacionant la pèrdua de p27^{kip1} amb la tumorigènesi.

També va ser a l'any 1996 quan Russo et al., van cristal·litzar 69 aminoàcids de la regió amino terminal de p27^{kip1} unida al complex Cdk2-ciclina A. En aquesta regió, es van descriure els dominis d'unió a la subunitat ciclina (27-43 aa) i a la Cdk (60-79 aa). El domini amino terminal es troba molt conservat entre els membres d'aquesta família Cip/Kip. La proteïna p27^{kip1} presenta un 42% d'homologia amb p21^{cip1} i un 47% amb p57^{kip2} gràcies a la seqüència aminoacídica dels seus dominis amino terminals, on resideix la seva capacitat, i principal funció, d'inhibir l'activitat Cdk (revisat a (Lloyd et al., 1999). Aquest estudi va demostrar com p27^{kip1} exerceix la seva funció anti-proliferativa unint-se a les ciclins i a les Cdks, impeding la unió de l'ATP i bloquejant la seva activitat catalítica (revisat a (Besson et al., 2004a)



Fig 1.7: Estructura del complex Cdk2-ciclina A-p27^{kip1}. El pèptid de la proteïna p27^{kip1} (25-93 aa), esta marcat en color negre. p27^{kip1} interacciona amb Cdk2 (esquerra) i ciclina A (dreta) (Morgan, 1997)

Aquests inhibidors es diferencien en els seus dominis carboxi terminal mitjançant el qual poden interaccionar amb altres proteïnes i per tant, realitzar diferents funcions relacionades o no, amb el cycle cel·lular. Recentment, s'han trobat noves proteïnes d'unió al domini carboxi terminal de p27^{kip1} (veure pàgina 40) tot i que encara les funcions d'aquest domini són bastant desconegudes. La p27^{kip1} conté un domini de localització nuclear (NLS, *Nuclear Localitation Signal*) (151-169 aa), una seqüència NES (*Nuclear Export Sequence*) (32-45 aa) i un domini ric en prolines (88-96 aa) que serà un lloc d'interacció amb altres proteïnes.

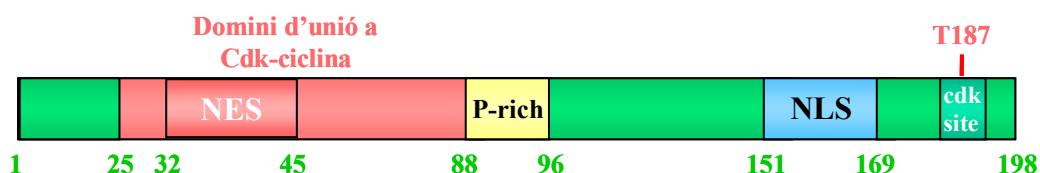


Fig 1.8: Dominis de la proteïna p27^{kip1}.

Proteïnes d'unió a p27^{kip1}

En els últims anys s'han identificat noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}, moltes d'elles relacionades amb la regulació de l'exportació de p27^{kip1} de nucli a citoplasma. Per exemple, la proteïna del por nuclear NPAP60 interacciona amb p27^{kip1} (69-94 aa) i participa en el transport de la proteïna a través de l'embolcall nuclear (Muller et al., 2000). Més endavant es va identificar que l'exportina CRM1 interaccionava amb p27^{kip1} pels residus (32-45 aa) afavorint l'exportació de la proteïna cap al citoplasma (Connor et al., 2003). La proteïna Jab1 també s'uneix a p27^{kip1} (96-151 aa) i promou l'exportació nuclear de la proteïna accelerant la seva degradació al citoplasma (Tomoda et al., 1999). A l'any 2002, s'identificava PKB/Akt com a proteïna d'unió a p27^{kip1}. PKB/Akt interacciona amb la seqüència NLS de p27^{kip1} (151-169 aa), fosforilant-la i provocant la seva exportació al citoplasma (Viglietto et al., 2002; Shin et al., 2002; Liang et al., 2002). El mateix any, Boehm et al. descobrien una cinasa activada via MAPK anomenada hKIS. Aquesta interaccionava amb el domini carboxi terminal de l'inhibidor (144-198 aa) i el fosforilava al residu serina 10 (Boehm et al., 2002). (Veure apartat 2.4.2.).

Mitjançant tècniques de *Two-hybrid* es va identificar GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) com a proteïna d'interacció amb el domini ric en prolines de p27^{kip1} (88-96 aa). GRB2 és una proteïna adaptadora, altament conservada, que ajuda a l'activació de la via de transducció de senyal Ras/MAPK. p27^{kip1} inhibeix GRB2 impedit la seva unió a la proteïna SOS i per tant, regulant la via de Ras/MAPK (Moeller et al., 2003). Estudis recents, descriuen la unió del domini carboxi terminal de p27^{kip1} (86-198 aa) a la proteïna RhoA inhibint-la, i per tant inhibint la formació de fibres d'estrès i adhesions focals i afavorint la migració cel·lular (Besson et al., 2004b). (Veure apartat 2.1.5).

Recentment s'han descrit altres proteïnes que també interaccionen amb p27^{kip1}, la proteïna RSK (veure apartat 2.4.2.), la proteïna de papilomavirus E7 (que se sap que interacciona amb el domini carboxi de p27^{kip1}) i l'enzim amb activitat E3 ubiquitin lligasa KPC-1 (25-101 aa) (veure apartat 2.3.3.)

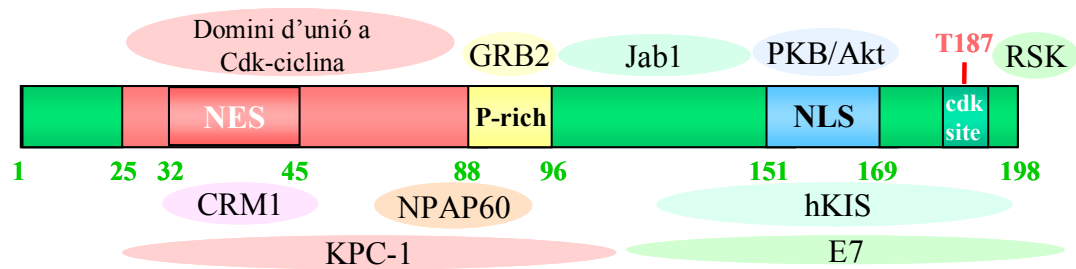


Fig 1.9: Proteïnes d'unió a p27^{kip1}.

2.1. Funcions de la proteïna p27^{kip1}

Descobriments recents suggereixen noves funcions de la proteïna p27^{kip1} no relacionades amb la seva funció d'inhibir complexos Cdk-ciclina i regular el cicle cel·lular. S'ha relacionat p27^{kip1} com un possible regulador de l'apoptosi, com un regulador de la migració cel·lular o inclús, com un cofactor transcripcional. p27^{kip1} pot realitzar diferents funcions dependent de la seva localització subcel·lular i de les diferents dianes amb les quals interaccioni, presents al citoplasma, al nucli o al DNA.

2.1.1. p27^{kip1} i el cicle cel·lular

p27^{kip1}, en resposta a senyals anti-mitogèniques es localitza en el nucli i s'uneix als complexos Cdk-ciclina inhibint la seva activitat catalítica i induint l'aturada del cicle cel·lular. Per tal d'inhibir els complexos Cdk2-ciclina E/A, p27^{kip1} ha de ser importada al nucli. Gràcies a estudis d'estructura de la proteïna, s'ha descrit que una helix- α de la proteïna p27^{kip1} inicia un primer contacte amb la ciclina i a continuació, una segona helix- α s'inserta en el centre catalític de la subunitat Cdk impedit la unió de l'ATP. Com a conseqüència es donaran importants canvis conformacionals de Cdk2 inhibint la seva activitat (Sherr and Roberts, 1999).

Durant el G₀, p27^{kip1} presenta una localització exclusivament nuclear, mentre que en resposta a l'estímul mitogènic una fracció de p27^{kip1} serà exportada al citoplasma. Es postula, que l'exportació d'aquesta fracció de p27^{kip1} al citoplasma és necessària per

alliberar complexos Cdk2-ciclina E els quals, ara actius, podran fosforilar p27^{kip1} a la treonina T187 i portar-la a degradar via proteasoma. Aquesta cadena d'esdeveniments activa un *feed-back* positiu en el qual, la degradació de p27^{kip1}, facilita l'activitat del complex Cdk2-ciclina E que mantindrà baixos els nivells proteics de p27^{kip1} durant la resta de les fases del cicle cel·lular (Viglietto et al., 2002; Boehm et al., 2002; Fujita et al., 2003). En estudis recents, s'ha observat que p27^{kip1} es capaç d'aturar el cicle en ratolins *Knock-out* per Cdk2, demostrant que p27^{kip1} pot regular el cicle durant la fase G₁ a través de mecanismes independents de la cinasa Cdk2, la qual sembla dispensable per a la inhibició del cicle cel·lular (Martin et al., 2005).

Els nivells de la proteïna p27^{kip1} seran crítics per regular la durada de la fase G₁ i s'ha vist que són capaços de determinar el moment exacte d'entrada en la fase S. Els nivells de p27^{kip1} estaran regulats mitjançant diferents mecanismes i sota la influència de diversos factors fins el moment d'entrada en la fase de síntesi de DNA en la qual els nivells de p27^{kip1} disminuiran dràsticament fins l'anafase (Sa et al., 2005).

Un estudi recent, descriu una nova funció de p27^{kip1} inhibint l'activitat cinasa de Cdk1 durant les fases G₂/M. S'ha vist que en ratolins *Knock-out* per Skp2 (*S phase kinase associated*) hi ha un increment de p27^{kip1} associada a complexos Cdk1-ciclina A i Cdk1-ciclina B. En aquestes condicions, l'activitat Cdk1 és massa baixa i no és suficient per a l'entrada en mitosi (Pagano, 2004).

2.1.2. p27^{kip1} i diferenciació

p27^{kip1} juga un paper important en la diferenciació cel·lular i el desenvolupament. S'ha observat que els nivells d'expressió de p27^{kip1} són elevats en diferents tipus de cèl·lules diferenciades (Harvat et al., 1998; Hauser et al., 1997). En un principi, es pensava que p27^{kip1} només era la responsable de l'aturada del cicle en la fase G₁ que es dona abans d'iniciar els programes de diferenciació. Ara, se sap que el paper que juga p27^{kip1} en la diferenciació és molt més sofisticat.

Per exemple, l'expressió constitutiva de p27^{kip1} en cèl·lules NT2/D1 no només indueix una disminució del potencial de creixement d'aquestes cèl·lules sinó que també activa l'aparició d'alguns marcadors de diferenciació (Baldassarre et al., 1999). A més, la sobreexpressió de p27^{kip1} en una línia cel·lular de càncer de colon provoca una inhibició parcial del creixement i un increment en la sensibilitat per induir la diferenciació (Yamamoto et al., 1999). S'ha comprovat, que només l'aturada de proliferació cel·lular resulta insuficient per induir la diferenciació de diferents tipus cel·lulars.

La funció de p27^{kip1} durant el procés de diferenciació, s'ha establert en diferents models fisiològics i cel·lulars. El factor G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating-factor*) regula la diferenciació de granulòcits mitjançant la inducció de l'activador transcripcional STAT3 (Tian et al., 1994). G-CSF indueix l'expressió dels nivells de RNA missatger de p27^{kip1}, i el promotor de p27^{kip1} conté una regió d'unió per STAT3. El fet de que cèl·lules progenitores mieloides de ratolins *Knock-out* per p27^{kip1} presentin un augment de proliferació i una reduïda diferenciació en resposta a G-CSF, ens indica que STAT3 controla la diferenciació mioide a través de l'augment dels nivells d'expressió de p27^{kip1} (de Koning et al., 2000). Un altre estudi demostra com l'àcid retinoic provoca l'augment dels nivells proteics de p27^{kip1} i la seva unió a Cdk2 durant la diferenciació de cèl·lules de neuroblastoma (Matsuo and Thiele, 1998).

p27^{kip1} també està implicada en la diferenciació de queratinòcits i cèl·lules epitelials de l'intestí. Mentre que durant la diferenciació de queratinòcits p27^{kip1} s'acumula, cèl·lules tractades amb oligonucleòtids *antisense* de p27^{kip1} impedeixen la seva diferenciació (Hauser et al., 1997). La sobreexpressió de p27^{kip1} a cèl·lules epitelials de intestí humà, indueixen l'augment tant de nivells de RNA missatger com de proteïna de diferents marcadors de diferenciació (Quaroni et al., 2000). p27^{kip1} també és important per a la diferenciació de cèl·lules musculars. p27^{kip1}, mitjançant la inhibició de l'activitat Cdk2, impedirà la fosforilació al residu serina 200 del factor de diferenciació MyoD i per tant, augmentaran els nivells proteics de MyoD i s'induirà la diferenciació de les cèl·lules musculars (Messina et al., 2005).

Recentment, s'ha descrit que la sobreexpressió de p27^{kip1} en cèl·lules de leucèmia mieloide (K562) indueix la seva diferenciació a eritròcits, a diferència de l'altre inhibidor de la família Cip/Kip, p21^{Cip1}, el qual la seva sobreexpressió provoca la diferenciació d'aquesta línia cel·lular a megacariòcits (Munoz-Alonso et al., 2005).

El paper de p27^{kip1} durant la diferenciació en diferents teixits ajudarà a entendre el perquè la disminució dels nivells de p27^{kip1} en alguns càncers humans es correlaciona amb el desenvolupament de tumors poc diferenciats, suggerint que estratègies per tal d'augmentar els nivells de p27^{kip1} seran de gran utilitat per dissenyar teràpies contra el càncer.

2.1.3. p27^{kip1} i apoptosi

L'homeòstasi d'un teixit depèn d'un perfecte equilibri entre la proliferació i la mort cel·lular. El balanç entre senyals positius i negatius determina la decisió entre la vida o la mort cel·lular programada (apoptosi). Diferents reguladors del cicle cel·lular com Wee1, cdc27, pRb, Cdk1, p21^{Cip1} i p27^{kip1}, són substrats de les caspases, enzims amb activitat proteolítica que s'activen durant el procés d'apoptosi.

La primera vegada que es va relacionar p27^{kip1} amb el procés de l'apoptosi, va ser en experiments en els quals la sobreexpressió de p27^{kip1} en línies cel·lulars cancerígenes induïa apoptosi. A la vegada, en altres experiments amb cèl·lules normals i *in vivo*, semblava que p27^{kip1} tenia un paper anti-apoptotic.

La sobreexpressió de p27^{kip1} mitjançant adenovirus promou, no només l'aturada del cicle i la pèrdua de l'activitat Cdk-ciclina, sinó que també indueix l'apoptosi en línies cel·lulars de càncer de mama humana (Craig et al., 1997; Katayose et al., 1997). Naruse et al., van trobar que p27^{kip1} necessitava la presència de pRb per induir l'apoptosi en línies cel·lulars de càncer de pulmó (Naruse et al., 2000). En aquest estudi no s'activava l'apoptosi en tota la població de cèl·lules, indicant que les cèl·lules que es trobaven en la fase G₁ del cicle cel·lular semblaven protegides en front l'apoptosi. L'apoptosi induïda per

inhibidors del proteasoma, en línies cel·lulars de diferents tumors sòlids, està correlacionada amb l'augment dels nivells d'expressió de la proteïna p27^{kip1} (An et al., 1998). Un estudi més recent, mostra com p27^{kip1} és capaç d'induir l'apoptosi en una línia cel·lular de càncer de pròstata (PC3) mitjançant dos mecanismes, un dependent i l'altre independent de caspases. Aquest efecte dual de p27^{kip1} sembla dependre de la fase del cicle cel·lular en la que es trobin les cèl·lules (Jaruga-Killeen and Rayford, 2004). Aquests treballs ens mostren un paper pro-apoptòtic de p27^{kip1} en cèl·lules tumorals, ja que l'efecte de p27^{kip1} és clar en les tumorals però no en les normals.

Altres estudis ens mostren efectes anti-apoptòtics de p27^{kip1}. S'ha vist com p27^{kip1} es capaç de protegir línies cel·lulars de carcinoma i de leucèmia contra l'apoptosi induïda per drogues (St Croix et al., 1996; Eymin et al., 1999). La transfecció estable de p27^{kip1} en cèl·lules de leucèmia dóna lloc a la inhibició de l'apoptosi induïda per diferents estímuls de dany al DNA. Eymin et al., mostren com la protecció en front l'apoptosi és deguda a l'obtenció dels productes de degradació de p27^{kip1} per les caspases, principalment la caspasa 3. Aquests productes de degradació, p23 i p15, impedeixen l'activació de la procaspasa 3. A diferència de p21^{cip1}, la degradació de p27^{kip1} induïda durant l'apoptosi no es correlaciona ni amb un increment de l'activitat de Cdk2 ni amb una localització citoplasmàtica de p27^{kip1}. Els fragments de p27^{kip1} obtinguts de la proteòlisi actuen al principi de la via d'activació de les caspases impeding l'eliminació del citocrom c des del mitocondri (Li et al., 1997). p27^{kip1} és la primera proteïna cel·lular en la que el seu propi tall per una caspasa genera pèptids que regulen negativament el procés de mort cel·lular.

Si p27^{kip1} promou o inhibeix l'apoptosi depèn, en part, del grau de la seva proteòlisi, del tipus cel·lular, i de l'estat cel·lular, transformat o no transformat. Les línies cel·lulars cancerígenes són aberrants en la seva regulació del cicle cel·lular i és per això, que no és sorprenent que els efectes de p27^{kip1} descrits en aquestes cèl·lules siguin diferents dels resultats obtinguts de cèl·lules normals. Certes cèl·lules tumorals tenen un mecanisme per el qual s'indueix la lisi de p27^{kip1} per caspases i això implica una disminució de l'apoptosi. Aquest mecanisme podria ser una de les explicacions del perquè nivells baixos d'expressió de p27^{kip1} es correlacionen amb una baixa supervivència dels pacients.

2.1.4. p27^{kip1} i transcripció

Diversos estudis suggereixen la capacitat de les proteïnes de la família Cip/Kip1 per actuar com a coactivadors transcripcionals. p21^{cip1} regula l'activitat de NFκB, STAT3, Myc, C/EBP i E2F i la seva expressió inhibeix l'expressió de diferents gens involucrats amb la progressió del cicle cel·lular com per exemple el gen que codifica per la DNA Polimerasa α, Topoisomerasa II, ciclina B1 i Cdk1 (revisat a (Coqueret, 2003).

Hi ha menys evidències sobre la funció de p27^{kip1} com a regulador transcripcional. Durant l'inici de la fase G₁, p27^{kip1} inhibeix l'activitat del factor de transcripció AP-1 a través de la *down*-regulació del seu cofactor Jab1 (*Jun Activating binding protein*) (Chamovitz and Segal, 2001). Encara que Jab1 transloqui al citoplasma amb l'objectiu d'augmentar la degradació de la proteïna p27^{kip1}, la seva funció principal és la de coactivar el factor de transcripció AP-1 en el nucli. També s'ha vist, que p27^{kip1} és capaç de regular l'expressió del gen de la telomerasa transcriptasa reversa humana (hTERT). Aquest efecte inhibitori sobre els nivells transcripcionals de hTERT, son deguts a que p27^{kip1} impedeix la interacció dels factors de transcripció MYC i Sp1 amb el seu promotor (Kanzawa et al., 2003)

Aquests resultats ens indiquen que p27^{kip1}, al igual que p21^{Cip1}, regulen i actuen sobre factors de transcripció involucrats en l'activació de l'expressió de gens activadors de la proliferació cel·lular.

2.1.5. p27^{kip1} i migració cel·lular

La migració cel·lular és un fenomen complex que juga un paper central en una gran varietat de processos fisiològics i patològics com el desenvolupament embrionari, la resposta immunitària, l'angiogènesi i la metàstasi tumoral. Un tumor progressa adquirint un fenotip agressiu quan es torna invasiu i les seves cèl·lules són capaces de migrar a altres teixits. La motilitat d'una cèl·lula està governada pels reguladors de la dinàmica del citoesquelet, en particular, per la família de GTPases Rho.

Rho, Rac i CDC42 controlen la reorganització del citoesquelet necessària per a la migració cel·lular, que inclou processos com la polarització cel·lular, la formació de lamel·lopodis i filopodis, la formació de noves adhesions cel·lulars, la translocació del cos de la cèl·lula i l'eliminació de fibres d'estrès i d'adhesions focals. RhoA promou la formació de fibres d'estrès i adhesions focals a través del reclutament i activació dels seus efectors i de les cinases de Rho, ROCK1 i ROCK2. Per una altra banda, RAC1, promou la formació de lamel·lopodis i la formació de nous contactes focals, així com l'eliminació de fibres d'estrès i adhesions focals. Per tant, Rho i RAC tenen funcions antagòniques i complementàries durant el procés de la migració. El balanç adequat entre les seves activitats és necessari per a una migració cel·lular eficient.

S'ha vist que els tres membres de la família Cip/Kip, poden regular la via de senyalització de Rho actuant sobre diferents proteïnes de la via i com a conseqüència alterar l'organització del citoesquelet i regular la migració cel·lular. $p57^{kip2}$ interacciona amb LIMK, $p21^{Cip1}$ inhibeix la cinasa ROCK1 i $p27^{kip1}$ inhibeix RhoA. (Veure figura 1.10.).

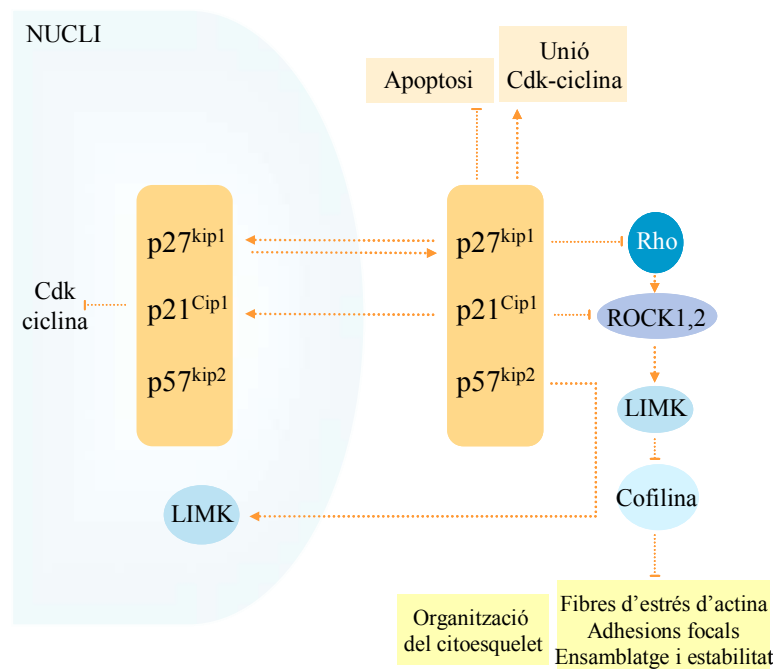


Fig 1.10:Regulació de la via de Rho pels inhibidors de la família Cip/Kip. Quan aquests inhibidors es localitzen en el citoplasma inhibeixen la via de Rho afectant l'organització del citoesquelet i la migració (Besson et al., 2004a).

p27^{kip1} es va relacionar amb la regulació de la migració cel·lular en un estudi amb cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular, en el que la sobreexpressió de la proteïna de fusió TAT-p27 induïa la migració cel·lular. En aquest model, la migració induïda pel factor de creixement d'hepatòcits (HGF) es correlacionava amb l'exportació de p27^{kip1} fosforilada al residu serina 10 al citoplasma (veure apartat 2.4) on colocalitzava amb F-actina (McAllister et al., 2003).

En un treball posterior, es va descriure com p27^{kip1} citoplasmàtica s'uneix pel seu domini carboxi terminal a la proteïna RhoA inhibint-la. p27^{kip1} impedeix que RhoA s'uneixi a les proteïnes GEF i per tant, impedeix la seva activació. Aquests resultats van ser contrastats en cèl·lules p27^{-/-}, les quals no migraven i formaven fibres d'estrès i adhesions focals (segurament degut a un augment de l'activitat de RhoA). Aquests resultats ens indiquen que p27^{kip1} regula la migració cel·lular impedit l'activació de Rho (Besson et al., 2004b). L'efecte de p27^{kip1} en la via de Rho és independent del seu paper en la regulació de la proliferació cel·lular, ja que la interacció amb RhoA es dona a través del seu domini carboxi terminal. Aquesta regió constitueix un domini d'unió a diferents proteïnes amb diferents funcions.

Per una altra banda, se sap que Rho es capaç de regular negativament els nivells de p27^{kip1} (Weber et al., 1997; Hu et al., 1999; Vidal et al., 2002). Així doncs, Rho i p27^{kip1} participen en un *feed-back* negatiu, en el que p27^{kip1} regula negativament la via de Rho i la senyalització de Rho disminueix els nivells de p27^{kip1}. Aquesta relació entre els CKIs i la via de Rho, suggereix l'existència d'un mecanisme per coordinar les funcions del citoesquelet i la divisió cel·lular. La capacitat d'invasió d'un tumor i la metàstasi depenen de la regulació alterada de la migració cel·lular. Per tant, la desregulació d'aquests reguladors del cicle cel·lular (com per exemple, la deslocalització citoplasmàtica de p27^{kip1}) donaria lloc a una senyalització de Rho i a una dinàmica del citoesquelet anormals.

2.2. p27^{kip1} i càncer

Les cèl·lules cancerígenes sovint mostren alteracions en les vies de transducció de senyals que permeten la proliferació cel·lular en resposta a estímuls externs. Molts factors de creixement i els seus receptors, efectors nuclears i citoplasmàtics, han estat identificats com a oncògens o com a gens supressors de tumors. Hi ha altres gens mutats en càncer que provoquen la inactivació de vies apoptòtiques, indueixen inestabilitat genòmica o bé indueixen angiogènesi. Les mutacions associades a tumors, en moltes d'aquestes molècules, donen lloc a l'alteració dels mecanismes bàsics reguladors que controlen el cicle cel·lular de mamífers.

Els ratolins deficients en p27^{kip1} (p27^{-/-}), presenten gigantisme, hiperplàsia en diversos òrgans i les femelles són estèrils. Aquests ratolins desenvolupen freqüentment adenomes de pituïtària, implicant la pèrdua d'expressió de p27^{kip1} amb la tumorogènesi. Aquests resultats qualifiquen p27^{kip1} com a gen supressor de tumors. A més, p27^{kip1} és un gen supressor de tumors per haploinsuficiència, ja que la pèrdua de només un al·lel del gen de p27^{kip1} dona predisposició a l'aparició de tumors de diferents teixits quan aquests son exposats a factors que provoquen dany al DNA (Fero et al., 1998).

Els CKIs com p15^{INK4b} i p16^{INK4a} es troben freqüentment inactivats degut a diverses mutacions o alteracions genètiques en nombrosos càncers humans. Quan el gen de p27^{kip1} va ser clonat (Polyak et al., 1994), els científics van investigar l'existència d'alteracions en aquest gen a tumors de diferents teixits. Es van analitzar més de 500 tumors però molt poques mutacions somàtiques van ser detectades. La majoria de mostres de moll de l'os, provinents de pacients amb leucèmies limfoblàstiques, mostraven deleccions del gen de p27^{kip1}, però no es va observar cap mutació que l'inactives. Després de l'anàlisi de 66 tumors de mama, només un cas d'inactivació del gen de p27^{kip1} va ser detectat (una mutació al codó 104 creava un codó *STOP* que generava una proteïna truncada). Es van detectar deleccions homozigotes del gen de p27^{kip1} en un cas de limfoma immunoblàstic-B i en un de leucèmia/limfoma aguda de cèl·lules T adultes, indicant la implicació de p27^{kip1} en el desenvolupament de malalties hematològiques. En resum, les mutacions de p27^{kip1}, per inserció, per delecció o bé per mutacions puntuals són realment infreqüents i difícils de

detectar en la majoria dels càncers humans (revisat a (Philipp-Staheli et al., 2001). Així doncs, a diferència dels gens supressors de tumors clàssics, el gen de p27^{kip1} rarament conté mutacions somàtiques i una baixa freqüència de pèrdua al·lèlica.

Hi ha diverses explicacions del perquè de l'absència de mutacions del gen de p27^{kip1} en els càncers humans. Una podria ser que p27^{kip1} no és una diana pel càncer humà i no pot ser considerat un gen supressor de tumors (però existeix una llarga llista de casos i de diferents tipus de càncer, en els que la pèrdua de p27^{kip1} es correlaciona amb un mal pronòstic dels pacients). Una segona explicació podria ser l'existència d'un mecanisme alternatiu per a la inactivació del segon al·lel de p27^{kip1}. Una alteració genètica molt comú observada en càncer, és l'existència de patrons aberrants en la metilació del DNA. S'han realitzat diversos treballs sobre l'estat de metilació del gen de p27^{kip1} en teixits humans normals i transformats. En línies cel·lulars de pituitària de rata i ratolí, s'ha observat que l'expressió de p27^{kip1} estava regulada pel grau de metilació del DNA (revisat a (Jones and Laird, 1999). La tercera possibilitat es que p27^{kip1} fos regulada a nivell post-transcripcional. Existeix una discordança entre els nivells de RNA missatger i els nivells de proteïna en els càncers humans de mama, colon i pituitària. Recentment, s'ha descrit un element a l'extrem 5' UTR del RNA missatger de p27^{kip1} que és necessari per a una traducció eficient de la proteïna en cèl·lules quiescents i proliferants (Millard et al., 2000). Les proteïnes que s'uneixen *in vitro* a aquest element 5' UTR de p27^{kip1}, HuR, hnRNPC1, estan regulades de forma dependent del cicle cel·lular. Per tant, la traducció del RNA missatger de p27^{kip1} depèn de factors específics que a la vegada son regulats pel cicle cel·lular.

p27^{kip1} ha estat identificada com a factor de mal pronòstic dels pacients en la majoria dels càncers humans. Per tal de ser un marcador tumoral, s'han de complir tres criteris: 1) donar resultats reproduïbles, 2) aportar informació sobre el diagnòstic, independent d'altres diagnòstics o criteris patològics i 3) proporcionar informació que justifiqui l'alteració del protocol del tractament clínic a seguir. Encara que p27^{kip1} només complexi els dos primers criteris, el que es necessita saber és com es poden controlar o modificar els nivells de p27^{kip1} mitjançant un tractament. Actualment, existeixen resultats prometedors en diferents

tipus de càncer en els quals es relaciona $p27^{kip1}$ amb la supervivència del pacient després del tractament dels malalts amb radioteràpia.

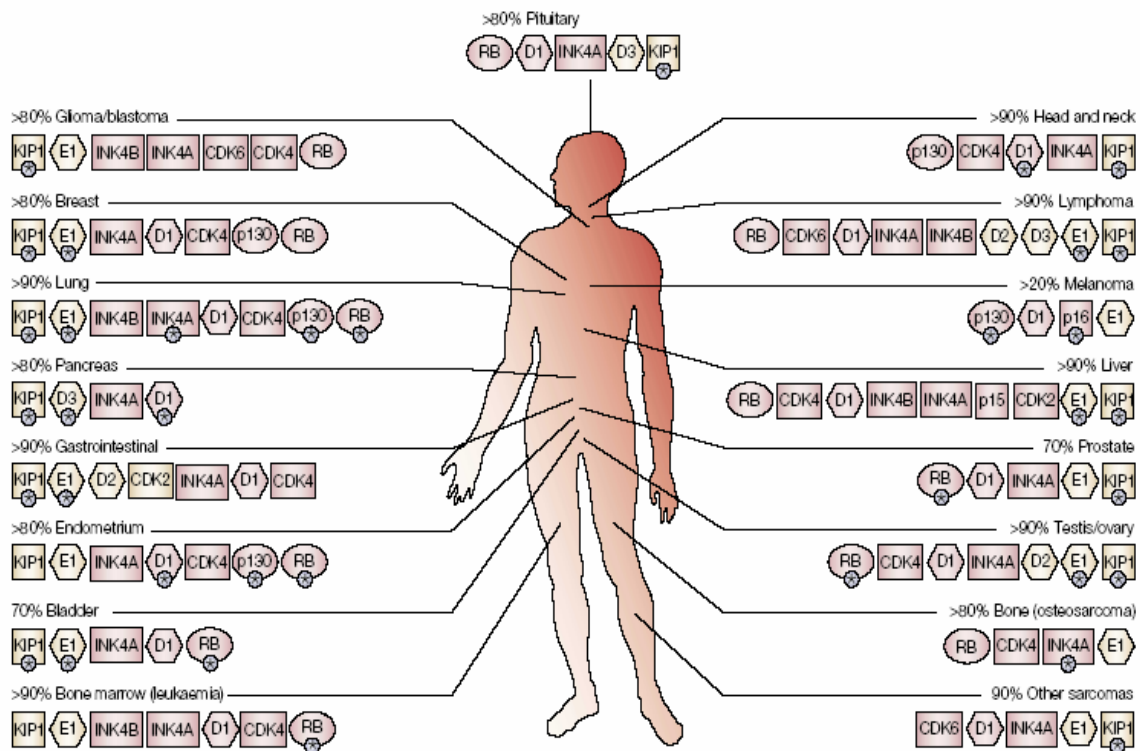


Fig 1.11: Alteració dels reguladors de la transició G1/S en els càncers humans. Els números representen el percentatge de tumors amb alteracions en qualsevol de les proteïnes indicades. Les alteracions rellevants pel pronòstic de tumors estan marcades amb asterisc (*). ($p27^{kip1}$ està marcada en color groc com a “KIP1”). (Malumbres and Barbacid, 2001).

Però, els dos processos majoritaris i més comuns implicats en la inactivació de $p27^{kip1}$ durant el desenvolupament de la carcinogènesi humana són: la disminució dels seus nivells d'expressió proteics (veure apartat 2.3.) i la seva exclusió del compartiment nuclear (veure apartat 2.4.).

2.3. Regulació dels nivells d'expressió de la proteïna $p27^{kip1}$

La reducció dels nivells proteics de $p27^{kip1}$ s'ha associat amb l'aparició de nombrosos càncers epitelials humans com per exemple de pulmó, mama, colon, ovari, esòfag, tiroides

i pròstata. La pèrdua d'expressió de p27^{kip1} també s'ha detectat en càncers originats al sistema nerviós central i al teixit limfàtic (revisat a (Motti et al., 2004)). Per tant, la disminució o l'absència d'expressió de p27^{kip1} s'ha convertit en un marcador tumoral i factor de mal pronòstic en els càncers humans. De fet, la reducció dels nivells proteics de p27^{kip1} anuncia l'aparició de metàstasi i una baixa supervivència dels pacients afectats per diferents tipus de càncer.

Generalment, l'expressió de p27^{kip1} és molt elevada en cèl·lules quiescents i disminueix després de l'estímul mitogènic. La majoria de factors anti-mitòtics i agents estimuladors de diferenciació augmenten els nivells intracel·lulars de p27^{kip1}, mentre que l'exposició de cèl·lules limfocítiques o epitelials a factors de creixement o a citoquines provoca la pèrdua o reducció dels nivells de p27^{kip1} (Sherr and Roberts, 1999).

L'expressió de p27^{kip1} està regulada per mecanismes transcripcionals, traduccionals i de proteòlisi:

2.3.1. Regulació transcripcional dels nivells de p27^{kip1}

A l'any 1999 es va realitzar un treball en cèl·lules musculars en el que s'observava que, en resposta a diferents estímuls, els nivells de p27^{kip1} disminuïen mitjançant tres mecanismes: per inhibició de la seva transcripció, per desestabilització del RNAm i per tant disminució de la síntesi proteica, i per degradació de la proteïna. Aquests resultats demostraven les primeres evidències sobre l'existència de regulació a nivell transcripcional de p27^{kip1} (Servant et al., 2000).

A cèl·lules quiescents, la inducció del factor de transcripció MYC impedeix la transcripció de p27^{kip1} provocant una disminució dels seus nivells proteics i com a conseqüència, l'entrada a la fase G₁ degut a l'activació dels complexos Cdk2-ciclina E (Steiner et al., 1995; Vlach et al., 1996). Per una altra banda, Kamiyama et al. van descriure una regió de 39 parells de bases (bp), entre les posicions -549 i -511 del promotor del gen de p27^{kip1}, essencial per a l'activació de la seva transcripció i que era un lloc d'unió al

factor de transcripció NF-Y (Kamiyama et al., 1999). Al mateix temps, es va descriure com en resposta al tractament amb Vitamina D3, s'activava la transcripció de p27^{kip1} mitjançant el reclutament dels factors de transcripció Sp1 i NF-Y en el seu promotor durant la diferenciació de línies cel·lulars de leucèmia mieloide a monòcits/macròfags (Inoue et al., 1999).

Més endavant, es va veure que el factor de transcripció de la família *Forkhead* AFX, regulat via PI3K, era capaç d'activar la transcripció gènica de p27^{kip1} resultant en un increment dels seus nivells proteics i com a conseqüència en l'aturada del cicle cel·lular (Medema et al., 2000).

Recentment, s'ha descrit que el factor de transcripció E2F1 s'uneix al promotor del gen de p27^{kip1} i activa la seva transcripció augmentant els nivells de RNAm i de proteïna (Wang et al., 2005). La inducció de p27^{kip1} actua com un mecanisme de *feed-back* negatiu amb E2F1, ja que E2F1 provoca l'augment dels nivells de p27^{kip1}, i la mateixa p27^{kip1} impedeix l'activació de E2F1 mantenint la proteïna pRb hipofosforilada. Per una altra banda, el regulador transcripcional Hes1 és capaç de reprimir la transcripció de p27^{kip1} amb l'objectiu d'activar la proliferació cel·lular endocrina i de cèl·lules progenitores de limfòcits T (Murata et al., 2005).

Finalment, un altre mecanisme per regular els nivells de p27^{kip1} és la metilació de determinats dominis del gen de p27^{kip1}. Utilitzant varies línies cel·lulars de càncer de pituïtària, Qian et al., van veure com dos de les línies cel·lulars presentaven baixos nivells de RNAm i expressaven poca p27^{kip1}. Van observar que en aquestes dues línies cel·lulars (GH₃ i GHRH-CL1), l'exò 1 i part de l'exò 2 del gen de p27^{kip1} es trobava hipermetilat a diferència de les cèl·lules control no transformades on aquestes regions del DNA es trobaven hipometilades (Qian et al., 1998).

2.3.2. Regulació de l'expressió de p27^{kip1} a nivell de traducció

Els nivells de RNAm de p27^{kip1} són constants al llarg del cicle cel·lular. No obstant, quan la cèl·lula surt de l'estat de quiescència els nivells de proteïna de p27^{kip1} disminueixen dràsticament fonamentalment per dos motius: per una activació de la seva proteòlisi (veure apartat 2.4.3.) i per una disminució de la seva traducció. La traducció de p27^{kip1} és màxima en quiescència i decau ràpidament després de la sortida de G₀. Hengst i Reed ho van demostrar per primera vegada a l'any 1996, en cèl·lules HeLa aturades amb lovastatina i en fibroblastes aturats per confluència (Hengst and Reed, 1996). El mateix any, Agrawal et al. va observar el mateix fenomen en cèl·lules BALB/c 3T3 aturades per l'absència de factors de creixement (PDGF) (Agrawal et al., 1996). Millard et al., demostraven que els canvis produïts en els nivells de síntesi de p27^{kip1} eren dependents de l'estat proliferatiu de la cèl·lula i del grau d'associació del RNAm de p27^{kip1} als poliribosomes (Millard et al., 1997).

Més endavant, es va demostrar que un dels mecanismes que provocava l'acumulació dels nivells de p27^{kip1} durant la quiescència és la inhibició de la via de Rho. L'activitat de RhoA regula la síntesi de p27^{kip1} en cèl·lules no ciclants a través d'un element de 300 bp de l'extrem 3' del RNAm de p27^{kip1}. La inactivació de la via de Rho, mitjançant un tractament amb lovastatina, indueix la traducció de p27^{kip1} (Vidal et al., 2002). Un altre mecanisme de regulació de la traducció de p27^{kip1} ha estat observat en cèl·lules pRb^{-/-}, on l'activitat cinasa de Cdk4 provoca l'acumulació de nivells de p27^{kip1} activant la seva traducció en cèl·lules portades a quiescència (Gonzalez et al., 2003).

La traducció de p27^{kip1} està regulada per un element anomenat IRES (*internal ribosomal entry site*) localitzat en la regió 5'UTR del seu RNA. En un treball recent, s'ha descrit que la proteïna de la família de les hnRNPs, PTB (*Polypyrimidine Tract-binding protein*), regula la traducció de p27^{kip1} augmentant l'activitat IRES del seu RNAm (Cho et al., 2005).

2.3.3. Regulació dels nivells proteics de p27^{kip1} per proteòlisi

Encara que l'expressió de p27^{kip1} està regulada a nivell transcripcional i traduccional, els nivells de p27^{kip1} son regulats principalment per mecanismes de proteòlisi dependents d'ubiquïtina.

El sistema ubiquïtin-proteasoma, marca les proteïnes a destruir mitjançant la unió d'unes cadenes de poli-ubiquïtina i la subseqüent degradació a través d'un complex enzimàtic multi-catalític anomenat proteasoma 26S. La ubiquïtina, en forma monomèrica, és una proteïna de 76 aminoàcids. La unió d'una cadena de molècules d'ubiquïtina a una proteïna substrat, requereix l'acció de tres enzims: E1 (enzim activador), E2 (enzim conjugant d'ubiquïtina) i l'enzim E3 (ubiquïtin lligasa). L'enzim E1 s'uneix, mitjançant un potent enllaç tioester, a una molècula d'ubiquïtina en una reacció dependent d'ATP. A continuació, la molècula d'ubiquïtina es transfereix de l'enzim E1 al E2. L'enzim E2 uneix, de forma covalent, múltiples unitats d'ubiquïtina a la proteïna diana amb l'ajut de l'enzim E3. L'especificitat de substrat ve determinada per una ampla varietat d'enzims E2 i E3 que reconeixen diferents proteïnes sota determinades condicions (revisat a (Kudo et al., 2005). La proteïna diana, un cop unida a una cadena d'ubiquïtines, serà finalment degradada mitjançant el complex proteasoma 26S.



Fig 1.12: Mecanisme d'ubiquïtinització. Passos bàsics i enzims necessaris per a la modificació d'un substrat per ubiquïtina (Pickart and Eddins, 2004).

El principal mecanisme de degradació de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular és la proteòlisi via proteasoma (Pagano et al., 1995). p27^{kip1} es fosforilada a la treonina 187 (T187) pel complex Cdk2-ciclina E. Aquesta fosforilació a la T187 és necessària per a la ubiquïtinització i conseqüent degradació de p27^{kip1}. La ubiquïtinització de p27^{kip1} es dona

quan aquesta es troba formant complex amb Cdk2-ciclina E (la degradació via proteasoma de p27^{kip1}, en estat lliure, és molt menys eficient) (Montagnoli et al., 1999). La fosforilació de p27^{kip1} a la T187 i posterior ubiquïtinització de la mateixa, es dona al nucli i és dependent de la regulació pel cicle cel·lular. Aquest mecanisme de degradació de p27^{kip1} és inexistent durant el G₀ i principis del G₁, s'inicia a la transició G₁/S i es manté fins a la mitosi.

Es va identificar SCF^{Skp2}, com l'enzim E3 ubiquïtin lligasa que reconeix p27^{kip1} fosforilada a la T187 per ubiquïtinitzar-la (Carrano et al., 1999). Els complexos SCF representen una classe, conservada evolutivament, d'enzims E3 que contenen quatre subunitats: Skp1, Cull1, una proteïna F-box i Roc1/Rbx1 (Bloom and Pagano, 2003).

Skp2 és una proteïna F-box i és la subunitat del complex ubiquïtin lligasa SCF^{Skp2} encarregat de reconèixer la proteïna substrat. Skp2 va ser originalment identificada com a proteïna d'unió a la ciclina A (Zhang et al., 1995). Posteriorment, es va veure que oligonucleòtids *antisense* de Skp2 estabilitzaven la proteïna p27^{kip1}. Skp2 s'uneix de forma directa a p27^{kip1} fosforilada a la T187 induint la seva ubiquïtinització (Carrano et al., 1999). Els ratolins *Knock-out* per Skp2 presenten nivells elevats de p27^{kip1} i ciclina E, poliploïdia i múltiples centrosomes, indicant que es tracta d'una proteïna important per a la replicació cromosòmica i la duplicació dels centrosomes (Nakayama et al., 2000). Els nivells d'expressió de Skp2 varien durant el cicle cel·lular. Skp2 no s'expressa durant el G₀, la seva expressió a principis del G₁ és gaire bé nul·la, es comença a acumular a finals de la fase G₁ i és màxima durant les fases S i G₂/M. La localització de Skp2 és estrictament nuclear (Miura et al., 1999).

Recentment, s'ha descrit que la proteïna Cks1 (*Cdc kinase subunit 1*) també és necessària per a la ubiquïtinització de p27^{kip1}. Cks1 pertany a una família de proteïnes de baix pes molecular (9-18 kDa) Cks/Suc1 (*suppressor of cdc2*), conservada en eucariotes al llarg de l'evolució. Les proteïnes Cks es poden unir al complex Cdk1-ciclina B i a Cdk2-ciclina B. A més, Cks1 és capaç de promoure la mitosi modulant l'activitat transcripcional del complex APC/C (*Anaphase Promoting Complex/cyclosome*). S'ha demostrat que Cks1 és necessària per a la maquinaria d'ubiquïtinització de SCF^{Skp2} (Ganoth et al., 2001). Per

una altra banda, s'ha vist que els ratolins *Knock-out* per Cks1 contenen nivells elevats de $p27^{kip1}$ degut a problemes en la seva ubiquïtinització i degradació (Bartek and Lukas, 2001). Es postula que Cks1 funciona com una proteïna adaptadora per fer de pont entre Skp2 i el grup fosfat de la T187 de $p27^{kip1}$ o bé, provocant un canvi de conformació de Skp2 per tal d'afavorir la unió a $p27^{kip1}$ fosforilada (veure figura 1.13).

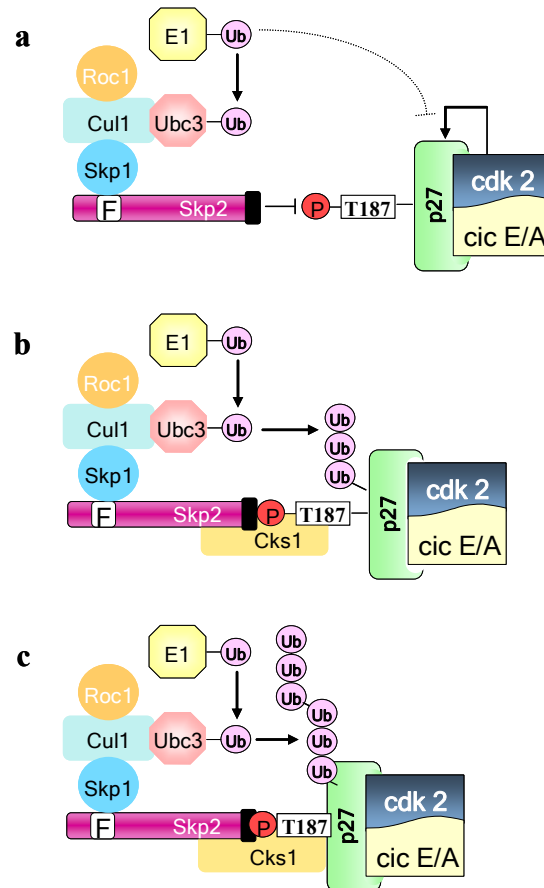


Fig 1.13: Requeriments per a la ubiquïtinització de $p27^{kip1}$ fosforilada a la T187. a) En absència de Cks1, SCF^{Skp2} no reconeix de forma eficient $p27^{kip1}$. **b)** Cks1 provoca canvis al·lostèrics en la proteïna Skp2 necessaris i suficients pel reconeixement i ubiquïtinització del substrat. **c)** Cks1 facilita el reclutament de $p27^{kip1}$ fosforilada en el complex SCF^{Skp2} i estabilitza la unió entre $p27^{kip1}$ i Skp2. (Bartek and Lukas, 2001).

Així doncs s'ha postulat que la principal funció de SCF^{Skp2} hauria de ser la d'activar les cèl·lules en estat de quiescència i provocar la re-entrada en el cicle mitjançant la degradació de $p27^{kip1}$. Però existeixen varies discordances amb aquesta idea. Skp2 i ciclina E no s'expressen fins la transició G_1/S del cicle cel·lular, per tant, més tard que la degradació de $p27^{kip1}$ observada durant la fase G_1 (Hara et al., 2001; Malek et al., 2001). A

més, p27^{kip1} es exportada al citoplasma durant la transició G₀/G₁ (Tomoda et al., 2002; Ishida et al., 2002; Connor et al., 2003), mentre que la localització de Skp2 és únicament nuclear (Miura et al., 1999).

Les discrepàncies entre els patrons d'expressió de p27^{kip1} amb els de Skp2, a nivell temporal i de localització, suggereixen l'existència d'una via de degradació de p27^{kip1} independent de la ubiquitin lligasa Skp2. Hara et al., van observar la degradació de p27^{kip1} via proteasoma en ratolins *Knock-out* per Skp2 durant la transició G₀-G₁. La ubiquitinització de p27^{kip1} es donava al citoplasma i era independent de la fosforilació a la T187, requisit indispensable per a la degradació a través de Skp2. En canvi, la degradació de p27^{kip1} en ratolins Skp2^{-/-} estava inhibida durant les fases S i G₂/M (Hara et al., 2001).

En estudis recents, Nakayama i col·laboradors, han identificat una nova ubiquitin lligasa citoplasmàtica que sembla ser la responsable d'aquesta activitat d'ubiquitinització de p27^{kip1} durant el G₀ i el G₁. A partir d'extractes de reticulòcits i per espectrometria de masses, van identificar un complex proteic amb activitat E3 lligasa al que van anomenar KPC (*Kip ubiquitination-promoting complex*). Està format per dues subunitats: KPC-1 (140 kDa) i KPC-2 (50 kDa). KPC-1 conté un domini SPRY en el seu extrem amino terminal, necessari per a la interacció amb KPC-2 i amb p27^{kip1} i en el seu extrem carboxi terminal, conté un domini *RING-finger*, necessari per a la seva activitat E3 ubiquitin lligasa. KPC-1 ubiquitiniza p27^{kip1} *in vitro* i *in vivo* gràcies a l'acció del seu domini *RING-finger*. Van testar set enzims E2 diferents i només dos: Ubc4 i UbcH5A, cooperaven amb KPC-1 per a la ubiquitinització de p27^{kip1}. La segona subunitat KPC-2, té un domini UBL (*ubiquitin-like*) a l'extrem amino i dos dominis UBA (*Ubiquitin-associated*) a l'extrem carboxi. Es creu que KPC-2 col·labora a l'hora de reclutar p27^{kip1} poli-ubiquitinitzada i portar-la al proteasoma 26S per ser degradada (Kamura et al., 2004).

Kotoshiba et al., descriu que la subunitat KPC-2 s'uneix a l'extrem amino (1-399 aa) de KPC-1, regió que inclou el domini SPRY. Per una altra banda, p27^{kip1} també interacciona pel domini amino terminal de KPC-1 (1-766 aa) i posteriorment és poliubiquitinitzada pel domini *RING-finger* situat en el seu extrem carboxi. També descriu, que el domini inhibidor de Cdks de p27^{kip1} (1-101 aa) és necessari per a la seva unió amb

KPC-1 i que el complex Cdk2-ciclina E competeix amb KPC-1 per unir-se a p27^{kip1} per aquesta regió. Aquests resultats suggereixen que es tracta d'una p27^{kip1} "lliure" la que s'associa a KPC-1 (Kotoshiba et al., 2005).

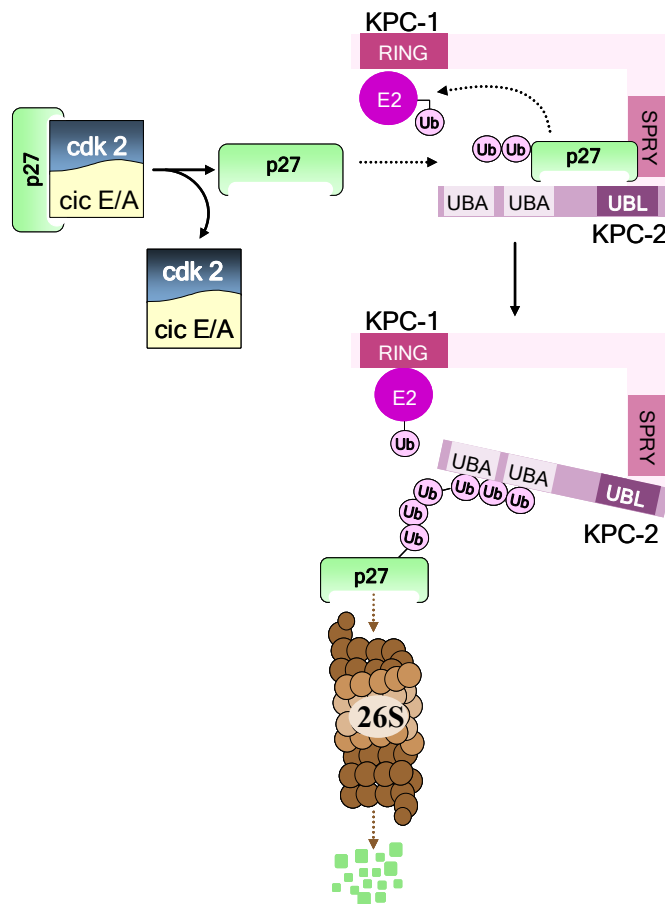


Fig 1.14: Model de la degradació de p27^{kip1} regulada per KPC. L'extrem amino de KPC-1, associat a KPC-2, s'uneix a p27^{kip1} lliure. Seguidament, p27^{kip1} s'uneix al domini *RINGfinger*, situat a l'extrem carboxi de KPC-1, i es poliubiquitiniza. KPC-2 funcionarà com a proteïna adaptadora entre p27^{kip1} poliubiquitinizada i el proteasoma 26S per tal de degradar-la (Kotoshiba et al., 2005).

La localització de KPC-1 i KPC-2 és citoplasmàtica, i això coincideix amb el fet de que la p27^{kip1} sigui exportada al citoplasma durant la transició G₀/G₁ i amb l'observació de formes poliubiquitinizadas de p27^{kip1} al citoplasma en extractes de cèl·lules Skp2^{-/-}. El tractament amb Leptomycin B (inhibidor de l'exportina de p27^{kip1} CRM1), impedeix la degradació de p27^{kip1} per KPC1 al citoplasma. Aquests resultats suggereixen que després de la translocació de p27^{kip1} de nucli a citoplasma, p27^{kip1} es ubiquitiniza per KPC i a

continuació, degradada via proteasoma 26S al citoplasma. Per tant, KPC regula la transició del cicle cel·lular des del G_0 fins a la fase S mitjançant la degradació de $p27^{kip1}$. L'activitat de KPC sembla ser constitutiva durant el cicle cel·lular (incloent el G_0), però la degradació de $p27^{kip1}$ per KPC només es dona durant la fase G_1 . Aquests resultats suggereixen que l'exportació de $p27^{kip1}$ al citoplasma només succeeix durant la fase G_1 (Hara et al., 2001; Kamura et al., 2004).

Per tant, la degradació de $p27^{kip1}$ està regulada per dos mecanismes diferents: la translocació i ubiquïtinització citoplasmàtica de $p27^{kip1}$ per KPC durant la fase G_1 i la ubiquïtinització nuclear de $p27^{kip1}$ per Skp2 durant les fases S i G_2/M .

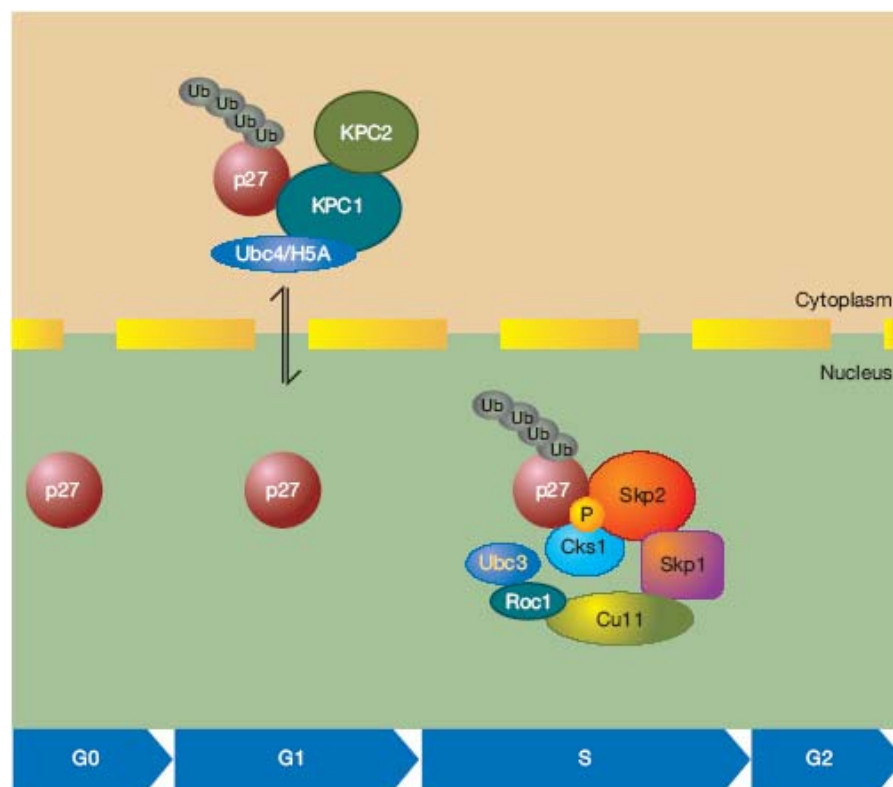


Fig 1.15: Dues vies consecutives d'ubiquïtinització i degradació de $p27^{kip1}$, abans i després de la transició G1/S. En aquests dos mecanismes de degradació hi estan involucrats dos complexos proteics amb activitat E3 ubiquïtin lligases: KPC i SCF^{Skp2} , els quals actuen amb enzims E2 diferents per tal d'ubiquïtinitzar $p27^{kip1}$. Durant el G_1 , la via de KPC requereix l'exportació de $p27^{kip1}$ al citoplasma però és independent de la fosforilació a la T187. Durant la fase S, la via de SCF^{Skp2} es desenvolupa en el nucli i requereix la fosforilació de $p27^{kip1}$ a la T187 (Hengst, 2004).

En paral·lel, existeix un mecanisme de degradació de p27^{kip1} independent d'ubiquitinització. Durant la transició G₁/S, p27^{kip1} es proteolisada pel seu domini amino terminal mitjançant el proteasoma 26S, reduint la seva massa molecular de 27 kDa a 22 kDa i posteriorment degradada, en forma de petits pèptids, per unes proteases anomenades calpaines (Shirane et al., 1999). Les calpaines regulen varies proteïnes involucrades en el cicle cel·lular com p53, ciclina D1, p21^{Cip1} i p27^{kip1}. Pertanyen a una família de proteases no lisosomals dependents de calci i entre elles hi ha proteïnes com la Calpaïna I i la Calpaïna II que són ubiques o també, isoformes que són específiques de teixit. L'activitat d'aquestes proteases està altament regulada per un inhibidor endogen anomenat Calpastatina. És un mecanisme independent d'ubiquitina però dependent d'ATP. El reconeixement de p27^{kip1} per calpaines impedeix la seva unió a la ciclina, formant una p27^{kip1} truncada de 22 kDa que no té la capacitat d'inhibir l'activitat cinasa de Cdk2. Aquests resultats indiquen l'existència de dos mecanismes de degradació de p27^{kip1}, un dependent d'ubiquitina i l'altre independent d'ubiquitina. En un estudi més recent, es demostra la degradació citoplasmàtica de p27^{kip1} mitjançant calpaines, gràcies a l'activació de la via de MAPK en cèl·lules transformades de melanoma (Delmas et al., 2003).

2.4. Localització subcel·lular de p27^{kip1}

Recentment s'ha identificat el segrest citoplasmàtic de p27^{kip1} en tumors, com un mecanisme de les cèl·lules canceroses implicat en la carcinogènesi en humans. S'ha observat una localització subcel·lular alterada de la proteïna p27^{kip1} en el 35% de casos de càncer de colon, en càncer de pròstata, esòfag, tiroides, ovari i carcinomes de mama (Viglietto et al., 2002; Shin et al., 2002).

En cèl·lules normals, durant el G₀, els nivells de p27^{kip1} són elevats i la seva localització és nuclear. Els nivells de p27^{kip1} disminuiran ràpidament després de l'activació mitogènica i la re-entrada de les cèl·lules a la fase G₁ del cicle cel·lular. Com hem comentat abans (veure apartat 2.3.3.), la degradació de p27^{kip1} durant la transició G₀/G₁, és independent de la fosforilació a la T187 per Cdk2 i de Skp2, i es dona al citoplasma (Hara et al., 2001). Aquestes observacions suggereixen que l'exportació de p27^{kip1} del nucli al

citoplasma és un esdeveniment crític per a la disminució dels seus nivells proteics i per tant, per a l'entrada al cicle cel·lular de cèl·lules quiescents.

2.4.1. Importació de p27^{kip1} al compartiment nuclear

El tràfic de macromolècules, entre nucli i citoplasma, es dona a través dels poros localitzats a l'embolcall nuclear. El complex del por nuclear (NPC: *Nuclear Pore Complex*), està format per un gran nombre de proteïnes anomenades nucleoporines. Molècules amb un pes molecular inferior a 40 kDa podran passar per difusió passiva a través del por nuclear. Les molècules que superin aquest pes, seran transportades de forma activa, regulada i selectiva.

La majoria de les proteïnes nuclears contenen un senyal de localització nuclear NLS (*Nuclear Localization Signal*), existeixen dos tipus de NLS: el tipus clàssic de NLS (seqüències compostes per aminoàcids bàsics, bastant conservades) i les NLS no clàssiques (que no presenten cap tipus d'homologia entre elles). Les seqüències NLS clàssiques són reconegudes per les importines α i β , les quals formen un complex entre elles. A mamífers existeixen al menys 6 isoformes d'importina α que reconeixen diferents substrats i els transporten selectivament cap al nucli.

La proteïna p27^{kip1} conté una seqüència NLS clàssica i bipartida en el seu domini carboxi terminal (152-168 aa). Aquesta seqüència es reconeguda per les importines $\alpha 3$ i $\alpha 5$ que, juntament amb la importina β , transportaran p27^{kip1} al nucli (Sekimoto et al., 2004).

Müller et al., van descriure la NPAP60, una proteïna associada al por nuclear, com una proteïna d'unió al domini amino terminal de p27^{kip1} (69-94 aa). Aquesta proteïna permet la difusió passiva de p27^{kip1} a través del por nuclear, facilitant tant la seva entrada com la seva sortida del nucli. Per tant, la fracció de p27^{kip1} lliure entrarà o sortirà del nucli gràcies a la interacció amb NPAP60 i en canvi, p27^{kip1} formant complexes, serà transportada cap al nucli gràcies a la unió de les importines α i β . També s'ha vist que NPAP60 és necessària per a la correcta exportació i degradació de p27^{kip1} al citoplasma (Muller et al., 2000).

2.4.2. Exportació de p27^{kip1}

L'exportació de la proteïna p27^{kip1} del nucli al citoplasma, està regulada de forma activa mitjançant la unió a l'exportina CRM1 i és dependent d'ATP (Connor et al., 2003). CRM1 s'uneix al domini amino terminal de p27^{kip1} (32-45 aa), on resideix la seva seqüència NES (*Nuclear Export Signal*). La unió entre aquestes dues proteïnes és dependent de cicle cel·lular. La localització de p27^{kip1} durant el G₀ i principis del G₁ és nuclear, és durant la progressió de la fase G₁, que la seva localització és més citoplasmàtica i la seva unió a CRM1 augmenta.

Una altra proteïna d'unió a p27^{kip1} que participa en la seva exportació, és la proteïna Jab1 que s'uneix al domini carboxi terminal de p27^{kip1} (97-151 aa). Jab1 és el cinquè component (CSN5) del complex del signalosoma (CSN) COP9 (Seeger et al., 1998). Jab1 interacciona amb moltes proteïnes (ex: p53, c-jun, Hif1α...) i controla les seves funcions. A més, Jab1 conté una seqüència NES a través de la qual s'uneix a l'exportina CRM1. Se sap que Jab1 és un regulador negatiu de p27^{kip1}, fent d'adaptador entre p27^{kip1} i CRM1, induint la seva exportació al citoplasma i accelerant la seva degradació (Tomoda et al., 1999; Hwang et al., 2004; Tomoda et al., 2002).

En els últims anys, s'han identificat tot un conjunt de modificacions post-traduccionals de p27^{kip1} que controlen la seva localització subcel·lular i la seva estabilitat:

A l'any 2001, es va demostrar que la fosforilació de p27^{kip1} al residu serina 10 (S10), era necessària per a la unió amb l'exportina CRM1 i que regulava la seva estabilitat (Ishida et al., 2002). Si aquest residu era substituït per alanina, p27S10A, es reduïa la seva exportació. Posteriorment, es va identificar la cinasa hKIS (*human Kinase Interacting Stathmin*), com la responsable de la fosforilació de p27^{kip1} a la S10 durant la fase G₁ del cicle cel·lular (Boehm et al., 2002). La cinasa hKIS s'uneix a l'extrem carboxi de p27^{kip1} (144-198 aa). En cèl·lules quiescents, hKIS es localitza al nucli i, després de l'estímul mitogènic, s'activa i fosforila la S10 de p27^{kip1} induint la seva exportació al citoplasma de forma dependent de CRM1.

Un treball posterior, identifica la cinasa Mirk/dyrk1B com la responsable de la fosforilació a la S10 de p27^{kip1} però durant el G₀ (Deng et al., 2004). Aquesta fosforilació, estabilitza la proteïna p27^{kip1} durant la quiescència. Així doncs, Mirk és activa durant el G₀, i quan arriben les primeres senyals proliferatives la seva activitat es perd i comença la translocació de p27^{kip1} al citoplasma.

Amb l'objectiu d'investigar la rellevància fisiològica d'aquesta fosforilació *in vivo*, Kotake et al., van generar un ratolí *Knock-in* amb la mutació p27S10A. Els ratolins p27^{S10A/S10A}, presentaven baixos nivells de p27^{kip1} a diferents òrgans com cervell, timus, testicles i melsa. L'estabilitat de p27^{kip1} durant la quiescència era inferior en limfòcits, mentre que l'estabilitat a la fase S era la mateixa que a ratolins normals. Però varen observar, que l'exportació de p27^{kip1} es donava amb normalitat durant la transició G₀/G₁ a ratolins p27^{S10A/S10A}, indicant que la fosforilació a la S10 és dispensable per a l'exportació de p27^{kip1} al citoplasma (Kotake et al., 2005).

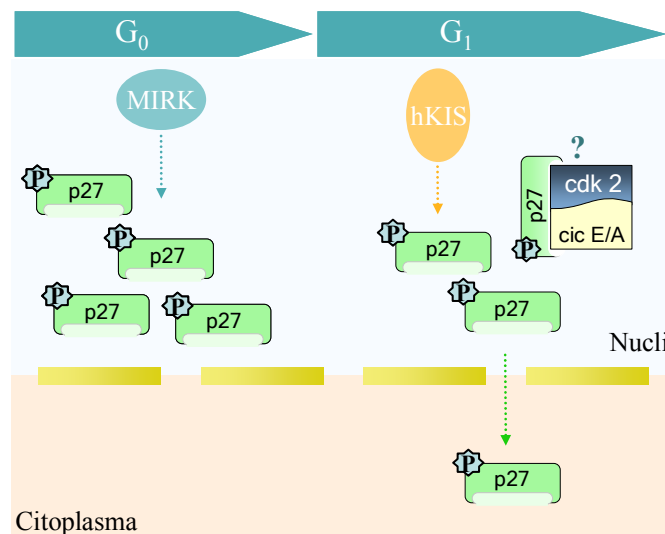


Fig 1.16: Durant la quiescència p27^{kip1} es fosforilada a S10 (P) per la cinasa Mirk/dyrk1B provocant la seva estabilització. Després de l'estímul mitogènic, Mirk/dyrk1B s'inactiva i serà la cinasa hKIS la que fosforilarà p27^{kip1} a la S10 durant el G₁, permetent la seva exportació al citoplasma.

A l'any 2002, tres treballs identificaven la fosforilació a la treonina 157 (T157) de p27^{kip1} per la cinasa PKB/Akt (Viglietto et al., 2002; Shin et al., 2002; Liang et al., 2002).

Aquesta fosforilació inactiva p27^{kip1} i la seva principal funció d'inhibir Cdk2, segregant-la al citoplasma i sense variar els seus nivells proteics. PKB/Akt és el principal efector de la via d'activació Ras/PI3K, el qual actua en resposta a l'estímul d'una ampla varietat de factors de creixement. Aquesta via es troba hiperactivada en molts càncers humans degut a la desregulació dels receptors dels factors de creixement, o de Ras, o per la inactivació de la fosfatasa PTEN (antagonista de PKB/Akt) (revisat a (Reed, 2002)). Aquests tres treballs relacionen aquest fenomen amb el desenvolupament de càncer de mama. Anàlisis realitzats en tumors, demostren una correlació molt forta entre l'activació de PKB/Akt i la localització citoplasmàtica de p27^{kip1}. En dos dels estudis (Viglietto et al., 2002;Shin et al., 2002), el 70% dels tumors que presentaven PKB/Akt activada, eren positius per p27^{kip1} citoplasmàtica.

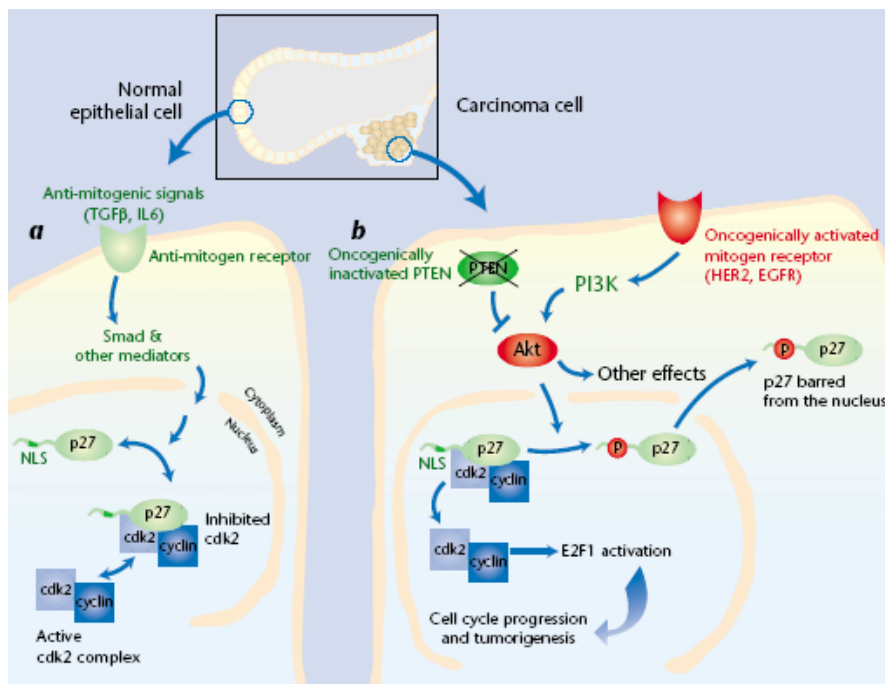


Fig 1.17: **a)** En cèl·lules epitelials normals els senyals antimitogènics aturen el creixement cel·lular induint la inhibició del complex Cdk2-ciclina E per p27^{kip1}. **b)** En moltes cèl·lules tumorals la via de PKB/Akt es troba hiperactivada. L'activació d'aquesta via permet que PKB/Akt fosforil·li a p27^{kip1} a la T157 implicant la seva entrada al nucli i fent que p27^{kip1} sigui incapaç d'inhibir Cdk2 (Blain and Massague, 2002).

La T157 es troba localitzada a la seqüència NLS de p27^{kip1}. Quan PKB/Akt la fosforila, perd la seva senyal de localització nuclear i per tant, la possibilitat d'unir-se al

seu substrat Cdk2 i d'aturar el cycle cel·lular. Posteriorment, es va descriure que p27^{kip1} fosforilada a la T157 i per tant, citoplasmàtica, s'uneix a la proteïna 14-3-3 γ . Les proteïnes 14-3-3 son proteïnes d'unió a fosfopèptids que regulen esdeveniments cel·lulars. La 14-3-3 γ , impedirà la unió de les importines α i β a la seqüència NLS de p27^{kip1} per competència de substrat. Com a conseqüència, p27^{kip1} no podrà ser importada al nucli i romandrà estable al citoplasma (Sekimoto et al., 2004).

p27^{kip1} també és fosforilada a la treonina 198 (T198). Aquest residu pot ser fosforilat per dos cinases: PKB/Akt i RSK (*p90 Ribosomal Protein S6 Kinase*). A través de l'activació de la via de PI3K, p27^{kip1} es fosforilada per PKB/Akt a la T198 resultant en la unió a la proteïna 14-3-3 θ . La unió de la 14-3-3 θ a p27^{kip1} indueix la seva localització citoplasmàtica (Fujita et al., 2002). La cinasa RSK, a través de l'activació de la via de MAPK, també fosforila p27^{kip1} al residu T198 induint la seva unió a 14-3-3 θ i la seva localització citoplasmàtica (Fujita et al., 2003). La fosforilació en aquest residu és un altre exemple d'inactivació de p27^{kip1} provocant la seva deslocalització en el citoplasma.

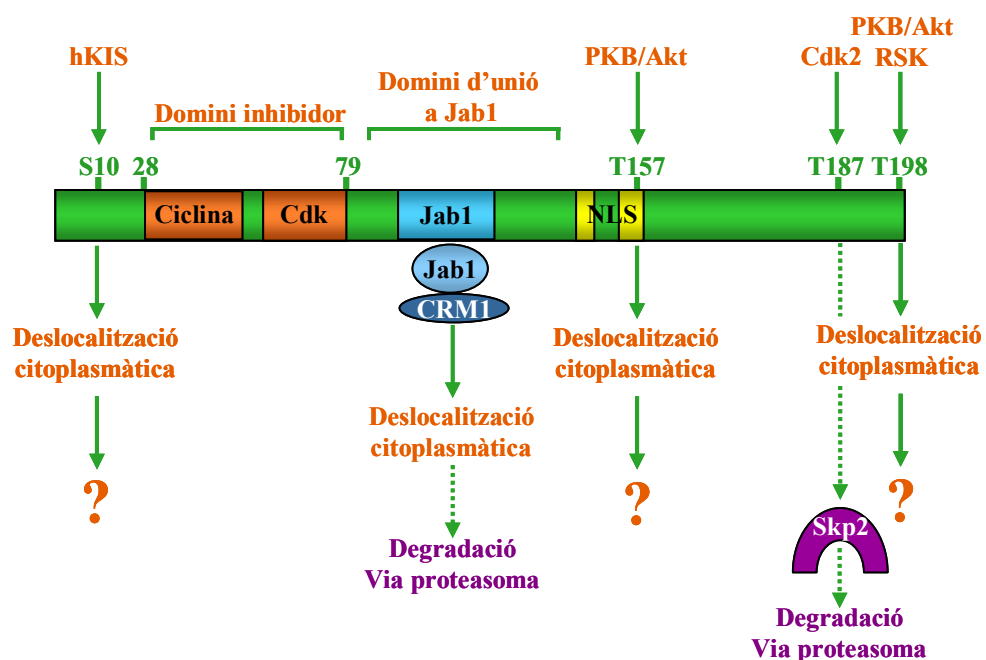


Fig 1.18: Esquema resum de les modificacions post-traduccionals de p27^{kip1}. Diferents dominis de p27^{kip1} i residus fosforilats per diferents cinases i les corresponents conseqüències bioquímiques d'aquestes modificacions.

Una qüestió a plantejar, és si la deslocalització citoplasmàtica de p27^{kip1} observada en els càncers humans té com a conseqüència impedir la seva funció d'inhibidor de Cdk2 i regulador del cicle cel·lular en el nucli o bé, realitzar altres funcions, de moment desconegudes, en el citoplasma.

2.4.3. Regulació de la localització subcel·lular de p27^{kip1}

Un aspecte necessari per tal de comprendre com p27^{kip1} es inactivada en els càncers humans, és la identificació de les vies intracel·lulars oncogèniques que participen en la desregulació dels nivells i la localització de p27^{kip1}.

La senyalització desregulada dels receptors tirosin cinasa, és un tret característic en la majoria càncers. Durant el desenvolupament dels tumors, s'activen de forma constitutiva vies intracel·lulars mitogèniques per amplificació (en el cas del receptor d'EGF (*Epithelial Growth Factor*), ErbB/HER1 o ErbB2/HER2), per translocacions cromosomals (en el cas de RET i TRKA) o per mutacions puntuals dels mateixos receptors (en el cas de RET i MET). Alternativament, hi ha vies mitogèniques que s'activen per mutacions en els seus transductors de senyal citoplasmàtics com és el cas de mutacions en els tres gens de la família Ras, la delecció del gen de la fosfatasa PTEN o de l'amplificació o hiperactivitat de PI3K i PKB/Akt (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

La via de transducció de senyal de PI3K regula els nivells i l'activitat de p27^{kip1} mitjançant diferents mecanismes: En primer lloc, PTEN provoca l'augment del nivells de Skp2 i per tant de la proteòlisi de p27^{kip1}. Per una altra banda, PKB fosforila els factors de transcripció de la família *Forkhead* inhibint-los i com a conseqüència provoca la disminució dels nivells de p27^{kip1}. A més, PKB fosforila TSC2 (tuberina) provocant la translocació de p27^{kip1} al citoplasma i accelerant la seva degradació i també PKB, és capaç de fosforilar p27^{kip1} impedit la seva importació al nucli (Liang and Slingerland, 2003).

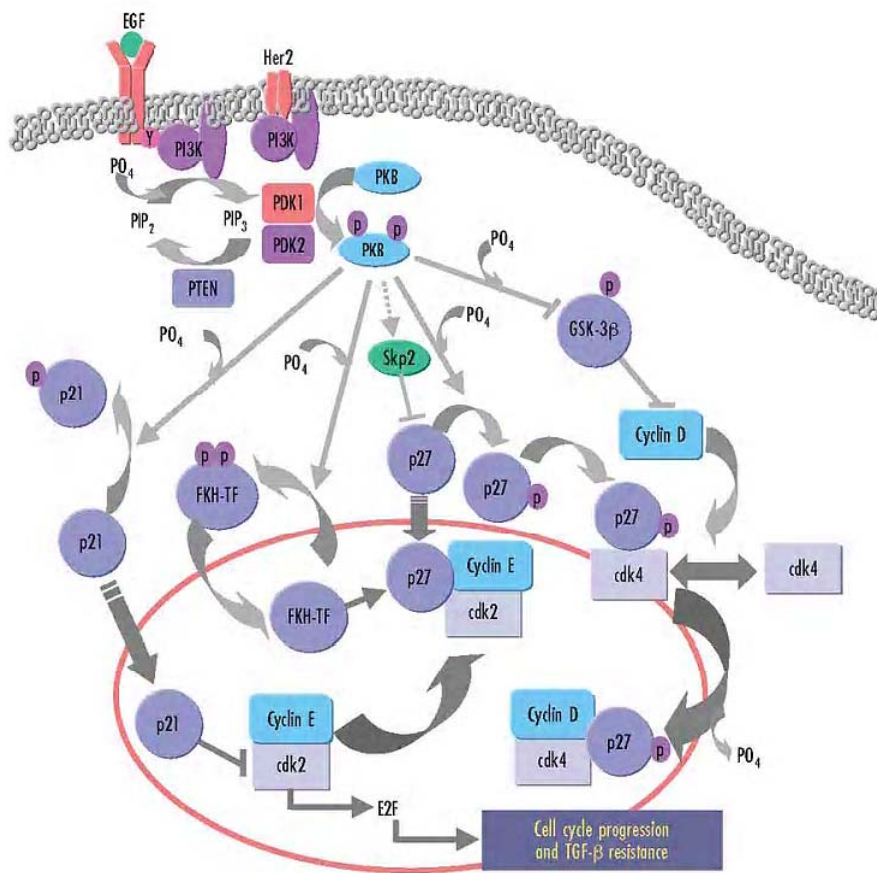


Fig 1.19: Regulació l'activitat i dels nivells proteics de p27^{kip1} mitjançant la via de transducció de senyal de PI3K (Liang and Slingerland, 2003).

La senyalització constitutiva dels receptors de la família Erb (incloent el receptor d'EGF i ErbB2/HER2) promou la proliferació de cèl·lules canceroses mitjançant la disminució dels nivells de p27^{kip1} al nucli, provocant la seva exportació al citoplasma. Aquest fenomen es pot revertir fent un tractament amb trastuzumab (anticòs anti-HER2), el qual inhibeix la via de HER2 (*Human Epidermal growth Factor Receptor 2*) quan aquesta està sobreactivada en casos de càncer de mama (Le et al., 2005). Una de les principals dianes regulada per aquesta via de senyalització, és l'inhibidor p27^{kip1}.

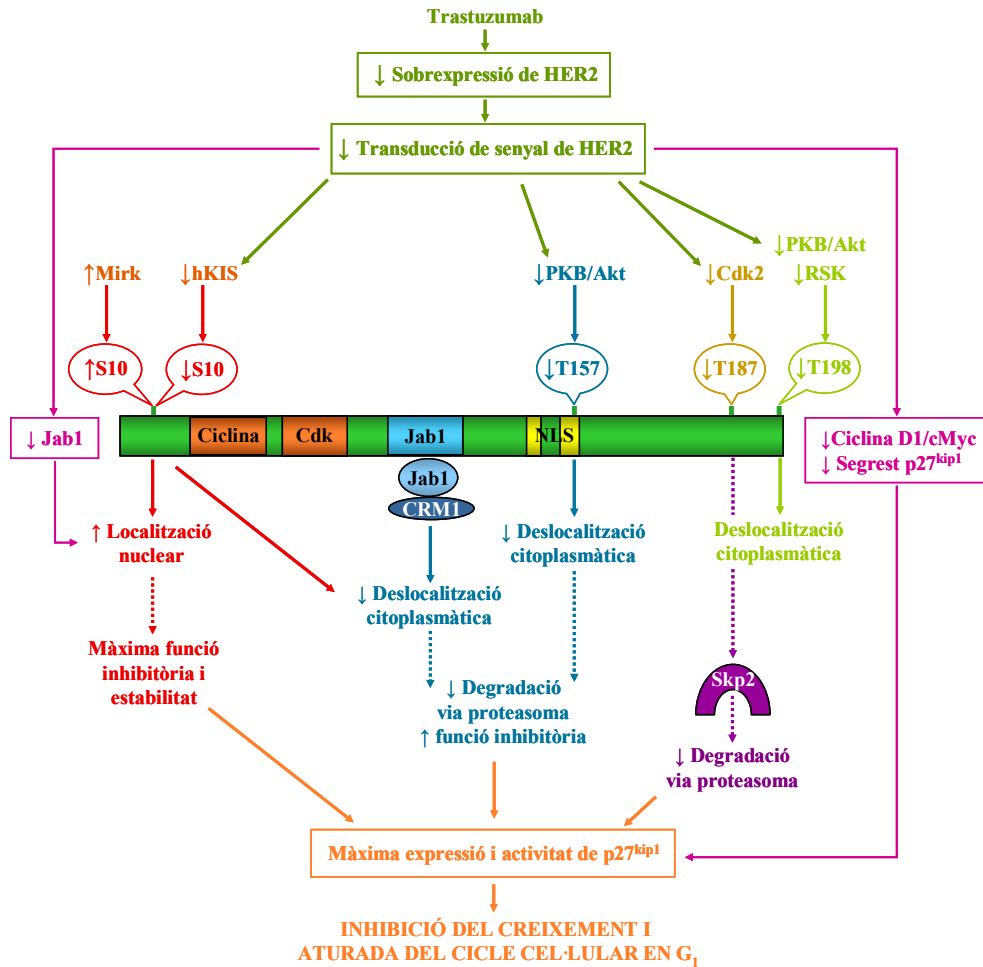


Fig 1.20: Model proposat sobre la regulació de p27^{kip1} mitjançant la via de transducció de senyal de HER2 (Le et al., 2005).

Ras oncogènica també induïx la deslocalització de p27^{kip1} de nucli a citoplasma a través de l'activació de les vies de transducció de senyal de PI3K i MAPK (*Mitogen-Activated-protein kinase*). Les cinases hKIS i Mirk/dyrk1B les quals fosforilen p27^{kip1} a la serina 10 i la cinasa RSK, que fosforila p27^{kip1} a la T198, s'activen via MAPK induint la seva deslocalització al citoplasma (Fujita et al., 2003; Boehm et al., 2002; Deng et al., 2004).

En aquest treball, hem identificat que la histona acetil transferasa PCAF s'uneix a p27^{kip1} i com a conseqüència l'acetila. L'acetilació de p27^{kip1} serà un senyal d'ubiquitinització i de degradació via proteasoma en una via independent a Skp2. Els resultats d'aquest treball descriuen una nova via de regulació dels nivells de la proteïna p27^{kip1} durant la fase G₁ del cicle cel·lular.

OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta tesi van ser plantejats per tal d'aprofundir en l'estudi de la implicació de la proteïna p27^{kip1} en processos de tumorigènesi i metàstasi, donat que els nivells baixos de p27^{kip1} són considerats un factor de mal pronòstic en els càncers humans.

Així doncs, els objectius proposats pel desenvolupament d'aquest treball són els següents:

- Identificació de noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}
- Caracterització funcional de les noves interaccions amb p27^{kip1}
- Implicació d'aquestes noves funcions de p27^{kip1} amb el cicle cel·lular i càncer.

MATERIALS I MÉTODES

Capítol I: Èines i tècniques generals

1. PLASMIDIS

Els plasmidis que hem utilitzat en aquest treball han estat:

-**pGEX-KG** (*Pharmacia Biotech*). Vector d'expressió en procariotes de 5 kb. Conté la seqüència de la proteïna GST a l'extrem 5' del lloc de policlonaatge, un gen que li confereix resistència a l'ampicilina i una diana per a la proteasa trombina, que permet eliminar el GST de la proteïna de fusió quan sigui necessari.

-**pEGFP-C1** (*BD Biosciences Clontech*). Vector d'expressió en eucariotes de 4.7 kb. Conté la seqüència de la proteïna GFP a l'extrem 5' del lloc de policlonaatge i un gen que li confereix resistència a la kanamicina.

-**pCDNA3.1(-)** (*Invitrogen*). Vector d'expressió en eucariotes de 5.4 kb. Conté un gen que li confereix resistència a l'ampicilina.

Plasmidi	cDNA	Dianes de clonatge	Orígen
pGEX-KG p27^{kip1}	GSTp27	NheI- (NheI-XhoI)	Aquesta tesi
pGEX-KG p27(1-110)	GSTp27(1-110)	NheI- (XhoI)	Aquesta tesi
pGEX-KG p27(110-198)	GSTp27(110-198)	NheI- (NheI-XhoI)	Aquesta tesi
pGEX-KG p27-K96R	GSTp27-K96R	NheI- (NheI-XhoI)	Aquesta tesi
pGEX-KG p27-K100R	GSTp27-K100R	NheI- (NheI-XhoI)	Aquesta tesi
pGEX-KG p27-(K96R K100R)	GSTp27-(K96RK100R)	NheI- (NheI-XhoI)	Aquesta tesi

pGEX-KG p27-(K25R K96RK100R)	GSTp27-(K25RK96RK100R)	NheI- (NheI-XhoI)	Aquesta tesi
pGEX-KG p21^{cip1}	GSTp21	NdeI-HindIII	Dr. Estanyol
pGEX-KG Set	GSTSet	EcoRI-HindIII	Dra. Canela
pGEX-KG Set1	GSTSet1	EcoRI-HindIII	Dra. Canela
pGEX-KG Set2	GSTSet2	EcoRI-HindIII	Dra. Canela
pGEX-KG Set3	GSTSet3	EcoRI-HindIII	Dra. Canela
pGEX-4T2 PCAF	GSTPCAF	-	Dra. Martínez-Balbás
pGEX-4T2 PCAF (352-658)	Domini GSTHAT(PCAF)	-	Dra. Martínez-Balbás
pGEX-2T HATCBP2	Domini GSTHAT(CBP)	-	Dra. Martínez-Balbás
pCDNA3FlagPCAF	FlagPCAF	-	Dra. Martínez-Balbás
pCDNA3-GFP-Flag-PCAF(352-832)	GFP-Flag-CtPCAF	-	Dra. Martínez-Balbás
pCDNA3-GFP-Flag-PCAFΔHAT(352-832)	GFP-Flag-CtΔHAT	-	Dra. Martínez-Balbás
pGFPC1 p27^{kip1}	GFPp27	BamHI/BglII-KpnI	Aquesta tesi
DsRED Set	REDSet	BamHI/BglII-HindIII	Dra. Canela
pCDNA3.1(-) p27WT	p27	NheI-XhoI	Aquesta tesi
pCDNA3.1(-) p27K100R	p27K100R	NheI-XhoI	Aquesta tesi

TaulaI: Relació de plasmidis utilitzats en aquest treball.

2. CULTIUS CEL·LULARS

En aquesta tesi s'ha treballat amb la línia cel·lular HCT116, de morfologia epitelial i procedent de carcinoma colorectal humà i amb la línia NIH3T3, procedent de fibroblastes de rata.

2.1. Manteniment de les cèl·lules en cultiu

Aquestes línies s'han mantingut en un incubador a 37°C i a una pressió parcial de CO₂ del 5%. Totes les manipulacions s'han realitzat en condicions estèrils en una campana de flux laminar i tot el material ha estat prèviament esterilitzat.

El medi de cultiu utilitzat per mantenir les cèl·lules HCT116 conté Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) : HAM F12 (1:1) (Biological Industries) suplementat amb 2 mM L-Glutamina (Merck), 1% aminoàcids no essencials (Biological Industries), 1 mM d'àcid pirúvic (Sigma), antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50 µg/ml d'estreptomicina) (Biological Industries) i 10% de sèrum boví (FCS) (Biological Industries). En el cas de la línia NIH3T3, ha estat mantinguda amb DMEM suplementat de la mateixa manera que l'anterior però amb el 10% de sèrum boví (DCS) (Biological Industries).

2.2. Sincronització de cèl·lules en G₀

Per a l'estudi del cicle cel·lular és necessari tenir la població cel·lular en un creixement homogeni. Per aconseguir aquest objectiu hem sincronitzat les cèl·lules en G₀. La sincronització en G₀ s'aconsegueix per inhibició per contacte al fer créixer el cultiu fins a confluència, i per la no aportació de factors de creixement al medi que les manté.

En el cas de la línia HCT116, el cultiu es va mantenir durant 48 h en el medi de sincronització DMEM:HAM F12 0.5% FCS. Per fer que les cèl·lules tornin a entrar en cicle cal diluir-les (1:3) i replantar-les amb un medi fresc suplementat amb 10% FCS. En el cas de la línia NIH3T3, es va mantenir durant 24 h amb el medi de sincronització, DMEM 0.5% FCS, i a continuació, les cèl·lules van ser activades canviant el medi a DMEM 10% FCS.

2.3. Transfecció de cèl·lules

S'han utilitzat els sistemes Polyfect (Quiagen), per a la transfecció de plàsmids de DNA, i Lipofectamina-2000 (Invitrogen), per a la transfecció de RNAs d'interferència de doble cadena. Es basen en la inclusió del DNA o RNA en liposomes que al fusionar-se amb la membrana plasmàtica lliuren l'àcid nucleic a l'interior cel·lular. A l'hora de transfectar DNA amb Polyfect, s'ha seguit estrictament el protocol indicat pel fabricant.

Per a la transfecció de RNA d'interferència de doble cadena, s'ha transfectat durant 96 h, 6 µg de dsRNA de PCAF (PCAFi), per pou de 6 cm. Com a control del mètode s'ha utilitzat un dsRNA de GFP (GFPi). Les seqüències d'aquests RNA són les següents:

- PCAFi: GGCCGAGGAGUCUUGUAAATT (Ambion)
- GFPi: GGCUACGUCCAGGAGCGCAUU (Dharmacon)

En aquest treball també s'han realitzat tècniques de RNA d'interferència per a la proteïna Skp2 (siSkp2). En aquest cas es va utilitzar un *pool* comercial de RNA (SiGENOME SMARTpool #M-003324-03, Dharmacon) i es va seguir el mateix protocol anterior però durant 48 h.

2.4. Obtenció de lisats cel·lulars i quantificació proteica.

El protocol que hem seguit per a l'obtenció de lisats cel·lulars és el següent:

1. Es retira el medi de les plaques i es fa un rentat amb PBS.
2. S'afegeix el volum de PBS necessari per cobrir la superfície de la placa, i sobre una base amb gel, es rasca el cultiu amb un *scraper* fins a desenganxar totes les cèl·lules.
3. Es recullen les cèl·lules en tubs mantinguts en gel i es centrifuga durant 2 min a 10.000 r.p.m en una microfuga d'*ependorfs*. Es descarta el sobrenadant.
4. Es resuspen el sediment de cèl·lules amb un tampó de lisi HAT (50 mM Tris-HCl [pH 8], 50 mM KCl, 5% Glicerol, 0.1 mM EDTA [pH 8]). El volum d'aquest tampó utilitzat per a la lisi dependrà de la quantitat inicial de les cèl·lules.
5. S'incuben aquests lisats durant 30 min en gel i es centrifuguen a 14.500 r.p.m en una microfuga d'*ependorfs* durant 10 min.
6. Posteriorment, es valora la concentració proteica (Bradford, 1976) d'1 µl del sobrenadant pel mètode de Bradford.

3.CULTIUS BACTERIANS

3.1. Soques i medis

Hem utilitzat les següents soques bacterianes de l'espècie *Eschericcia coli*:

- DH5α, per a l'obtenció de DNA plasmídic.
- BL21 pLys, per expressar i, posteriorment, purificar proteïnes de fusió.

El medi de cultiu emprat per fer créixer aquestes dues soques ha sigut un medi ric anomenat LB (Luria-Bertani) que conté, 10 g/L Triptona, 5 g/L d'extracte de llevat i 5 g/L NaCl. S'afegeixen al medi LB els antibiòtics Ampicilina o Kanamicina (1 mg/mL), segons

el tipus de plàsmid que continguin els bacteris o Cloramfenicol si es tracta de la soca BL21 pLyS.

3.2. Transformació bacteriana

El procés de transformació es basa en la incorporació d'un DNA plasmídic dins de cèl·lules competents.

1. Es descongelen els bacteris competents en gel.
2. S'afegeixen 0.5 µg de DNA plasmídic a 100 µl de cèl·lules competents i s'incuba durant 30 min en gel.
3. Es sotmet a un xoc tèrmic de 45 s a 42°C i seguidament es deixa 2 min en gel.
4. S'afegeix 1 ml de medi LB sense cap tipus d'antibiòtic i s'incuba 1 h a 37°C en agitació.
5. Es centrifuga 1 min a 6.000 r.p.m en una microfuga d'*eppendorfs* i s'eliminen 900 µl del sobrenedant.
6. Amb la resta de medi es resuspenen les cèl·lules i es plauegen en LB amb agar i antibiòtic. L'antibiòtic dependrà de la resistència que tingui el plàsmid transformat.
7. S'incuba la placa tota la nit a l'espera de formació de colònies bacterianes.

3.3. Expressió i purificació de proteïnes de fusió

Per a l'expressió i purificació de proteïnes de fusió s'ha seguit el mètode de D.B. Smith, et al (1988) i J.V. Frangioni (1993).

Hem obtingut p27^{kip1}; diversos mutants i fragments de p27^{kip1}: (p27-K96R, p27-K100R, p27-K96RK100R, p27-K25RK96RK100R, p27 (1-110), p27 (110-198)); PCAF i el seu domini catalític HAT (PCAF); CBP; p21^{cip1}; Set i fragments de Set (Set1, Set2 i Set3).

L'expressió de proteïnes en *E.coli* es va fer pel sistema de proteïnes de fusió amb glutatió-S-Transferasa (GST). Aquest sistema d'expressió utilitza els vectors pGEX i permet la purificació ràpida de les proteïnes fusionades amb GST, per l'afinitat de l'enzim a un dels seus substrats, el glutatió reduït. Així doncs, per aïllar la proteïna de fusió amb GST de la resta de proteïnes bacterianes s'utilitza una resina unida de forma covalent a glutatió reduït. Un cop unida, la elució es realitza afegint un excés de glutatió reduït lliure per tal de desfer aquesta unió, quedant la GST-proteïna lliure i en solució.

Aquest mètode d'expressió és molt utilitzat perquè presenta un alt rendiment en l'expressió de proteïnes i una puresa elevada de la proteïna purificada.

El procediment complet fins a l'obtenció de la proteïna recombinant purificada és el següent:

Expressió de proteïnes

El primer pas és la clonació del cDNA de la proteïna que vulguem expressar en un vector d'expressió procariota. En el nostre cas vam utilitzar el vector pGEX (Amersham) (veure apartat 1.). Seguidament es transformen aquests plàsmids a la soca bacteriana BL21(DE3)pLys. Aquesta és defectiva en certes proteases i té una paret menys resistent ja que expressa lisozim pel fet de tenir integrat el plàsmid pLys, la qual cosa facilita la seva lisi i la fa idònia per a l'expressió de proteïnes recombinants.

Una vegada els bacteris estan transformats, es fan créixer en cultius grans, seleccionant-los amb Ampicilina i Cloramfenicol, que són les resistències que confereixen el vector pGEX i el vector pLys respectivament.

Per a la inducció de l'expressió s'utilitza el Isopropil- β -D-tiogalactopirinosid (IPTG). L'IPTG (Genaxis Biotechnology) s'afegeix a una concentració de 1 mM quan el nostre cultiu ha arribat a una O.D_{600nm} de 0.8, i s'incuba a 37°C en agitació durant 5 h. Posteriorment es recull el sediment per centrifugació a 5000 r.p.m en un rotor GSA

(Sorvall), a 4°C i durant 10 min. En aquest punt es pot congelar el precipitat de cèl·lules per a la seva utilització posterior.

Purificació

Es lisen els bacteris amb tampó NETN (20 mM Tris [pH 8], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NonidetP40 (Igepal®, SIGMA)) que conté inhibidors de proteases: 1 mM PMSF, 1 µM Aprotinina, 10 µM Leupeptina. Aquest lisat es sonica en gel 4 vegades durant 20 s i després es centrifuga 20 min a 15000 r.p.m en un rotor SS34 (Sorvall).

S'afegeix resina de glutatió-sefarosa (Gluthatione-Sepharose-4B, Amersham Pharmacia Biotech), aproximadament 1ml per cada 0.5-1 L de cultiu, al sobrenedant obtingut en el pas anterior i s'incuba 1 h a 4°C en agitació.

Es fan 2 rentats de 40 ml de tampó NETN i un de PBS per tal d'eliminar la resta de proteïnes bacterianes no unides a la resina . S'elueix la proteïna de fusió, afegint 5 ml de tampó d'elució (50 mM Tris [pH 9.6], 120 mM NaCl, 20 mM Glutatió reduït) i incubant-ho durant 30 min a 4°C. La proteïna eluïda es recupera per centrifugació (5 min a 3000 r.p.m).

4. Electroforèsi, Transferència i Immunodetecció.

4.1. Electroforèsi de proteïnes en una dimensió.

La separació de proteïnes en funció del seu pes molecular es realitza mitjançant gels de SDS-poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) segons el mètode de Laemmli (Laemmli, 1970).

La tècnica es basa en la diferent migració de les proteïnes desnaturalitzades amb dodecil sulfat sòdic (SDS) a través d'una matriu d'acrilamida i bis-acrilamida sota l'efecte

d'un camp elèctric. Gràcies al SDS, les proteïnes quedaran carregades negativament i migraran cap al pol positiu, separant-se exclusivament pel seu pes molecular.

Les mostres de proteïnes que carregarem en aquests gels resolutius les prepararem amb un tampó que conté: 2% SDS (per desnaturalitzar), 0.5 mg/ml ditiotreitòl (DTT) (per trencar ponts di-sulfur), 10% glicerol i 0.1 mg/ml blau de bromofenol. Just abans de carregar les mostres les bullim 3 min per tal de desnaturalitzar completament les proteïnes i trencar tots els ponts di-sulfur.

4.2. Electroforesi bidimensional

Amb la tècnica d'electroforèsi bidimensional separem les proteïnes d'una barreja segons dues propietats independents: el punt isoelèctric (pI) i el pes molecular. Aquestes propietats combinades ens permeten identificar diferents proteïnes d'igual pes molecular, diferents isoformes d'una mateixa proteïna, així com modificacions post-traduccionals, que en gels convencionals d'una sola dimensió no és possible identificar.

Les electroforèsis bidimensionals consten de dues parts, una primera dimensió on separem les proteïnes segons el seu punt isoelèctric i una segona dimensió on seran separades segons el seu pes molecular (veure apartat 4.1.).

Hi ha dos mètodes per separar les proteïnes segons el seu punt isoelèctric, la diferència entre els dos és el rang de pI que analitzen:

- IEF (Isoelectric focusing): per a proteïnes amb un rang de pI neutre o àcid (entre 4 i 7).
- NEPHGE (nonequilibrium pH gradient electrophoresis) per a proteïnes amb un rang de pI neutre o bàsic (entre 7 i 10).

En aquest treball hem seguit el mètode IEF i el procediment és el següent:

1- Preparació del gel (Sistema MINI PROTEAN II 2D CELL, Bio-Rad).

A un *Erlenmeier* de 25 ml s'afegeix en 9.2 M urea, 1.98 ml aigua destil·lada, 2% Nonidet P-40 (2 ml del 10%), 4% acrilamida (1.258 ml acrilamida, 0.01149 Bis-acrilamida, 70 µl aigua destil·lada). Per a dissoldre la urea, s'agita suaument amb la mà o bé, a un bany a una temperatura inferior a 60°C. Un cop dissolta s'afegeixen 500 µl d'amfòlits [pH 3-10] (Bio-Rad), 15 µl Temed, 15 µl PSA 10%. S'agita de nou i s'emplena el tub suport que conté els capil·lars amb la solució preparada. Es deixa polimeritzar 1 h a temperatura ambient.

2- Preparació dels tampons.

La solució inferior (o positiva) conté 10 mM H₃PO₄ (1.36 ml de H₃PO₄ al 85% en 2 L d'aigua). La solució superior (o negativa) es prepara amb 20 mM NaOH (0.2 g en 250 ml d'aigua). Posteriorment es degassifiquen per tal d'evitar la formació de bombolles.

3- Preparació del suport.

Es seleccionen els capil·lars polimeritzats en els quals no s'hagin format bombolles, es connecten als taps adaptadors. Per evitar de nou la formació de bombolles, amb una pipeta Hamilton es posa una gota de la solució inferior al final del capil·lar i una altra de la solució superior al principi del capil·lar. Un cop preparat el suport, s'omple la cubeta.

4- *Pre-running*.

Per tal de crear un gradient de pH es sotmeten els capil·lars a diferents voltatges: 10 min a 200 V, 15 min a 300 V i 20 min a 400 V. Després del *pre-running* es canvien els tampons superior i inferior.

5- Preparació de les mostres.

Es resuspen la mostra, que en el nostre cas està en forma de sediment, en tampó de lisi (9.8 M urea, 2% Nonidet P-40, 1% amfòlits [pH 3-10], 100 mM DTT). Abans de carregar la mostra es centrifuga 1min a 14500 r.p.m en una microfuga

d'*ependorfs* per descartar qualsevol tipus de precipitat que pogués interferir a l'hora de córrer la mostra.

6- Càrrega de les mostres.

Es carreguen les mostres als capil·lars amb una pipeta Hamilton i s'afegeixen 20 µl de tampó *overlay* (8 M urea, 5% Nonidet P-40, 1% amfòlits [pH 3-10], 100 mM DTT).

7- Córrer el gel.

Finalment, es corre la primera dimensió d'aquesta electroforèsi a 200 V overnight i 30 min a 750 V. Per córrer la segona dimensió s'extreuen els gels dels capilars sobre un tros de parafilm. Es cobreix el gel amb, aproximadament, 1 ml de tampó d'equilibració (0.0625 M TrisHCl [pH 6.8], 2.3% SDS, 10% Glicerol, 100 mM DTT i Blau de Bromofenol) durant 30 min en gel. Després es posa el gel de la primera dimensió sobre un gel de SDS-acrilamida (veure apartat 4.1.).

4.3. Tinció de gels d'electroforesi

Per tal de tenyir les proteïnes dels gels de poliacrilamida i poder visualitzar el patró proteic general, hem utilitzat dos tipus de tincions:

- Tinció de Coomassie Blue, que és la tinció d'elecció per la seva senzillesa i rapidesa però te menys sensibilitat. Per a dur a terme aquesta tinció, s'incuba el gel uns 10 min a temperatura ambient i en agitació amb solució de Coomassie (2.5 g/L Coomassie Brilliant Blue G250, 45% metanol, 10% àcid acètic). A continuació es destenyeix el gel per treure l'excés de colorant afegint una solució destenyidora (10% àcid acètic, 50% metanol) i s'incuba el temps necessari fins a visualitzar bé el patró de bandes.
- Tinció de plata. És una tinció més sensible que l'anterior. Hem seguit el protocol descrit per Blum (Blum et al, Electrophoresis, 1987,8,93-99).

4.4. Electrotransferència i *Western-blot*

És una tècnica d'electrotransferència de proteïnes d'un gel d'acrilamida a membranes de nitrocel·lulosa o PVDF (Immobilon®, Millipore). Es posa en contacte el gel i la membrana en contacte i per acció d'un camp elèctric les proteïnes desnaturalitzades amb el SDS i per tant, carregades negativament, migren cap a la membrana i hi quedaran retingudes. Un cop tinguem les proteïnes exposades en aquestes membranes podrem detectar proteïnes concretes mitjançant l'ús d'anticossos específics.

Per a la detecció de proteïnes, mitjançant anticossos específics, s'utilitza un anticòs primari que s'uneix directament a la proteïna d'interès, i un anticòs secundari, específic contra les immunoglobulines de l'espècie on s'ha produït el primari. L'anticòs secundari utilitzat en aquest estudi està conjugat amb peroxidasa (HRP, *Horseradish peroxidase*) o Fosfatasa alcalina (Promega).

En aquest treball hem realitzat dos tipus de revelats diferents segons l'enzim que estava acoblat a l'anticòs secundari:

- Fosfatasa alcalina (AP), que es basa en afegir el substrat de l'enzim i produir una reacció colorimètrica directa a sobre la membrana que ens permet la visualització proteica. La solució de revelat utilitzada conté 5 ml de CDS (100 mM Tris-HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), 30 µl de NBT (Nitroblue Tetrazolium, Promega) i 15 µl de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt, Promega). Per aturar la reacció s'incuba amb aigua.
- Peroxidasa (ECL). En aquest cas la reacció de l'enzim amb el seu substrat produirà una reacció de luminiscència, la qual podrem detectar mitjançant la impressió en films fotogràfics (Hyperfilm ECL, Amersham) i revelant-ho després. La solució de revelat en aquest cas es basa en la barreja 1:1 de les solucions 1 i 2 d'ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham).

Els anticossos que s'han utilitzat en aquest treball han estat:

Antigen	Casa comercial	Referència	Tècnica
Set	Laboratori	-	WB
PCAF	Upstate	07-141	WB
Flag®M2	Sigma	F3165	IP
p27 (C19-R)	SantaCruz	sc-528	WB
p27 (C19-G)	SantaCruz	sc-528	IP
p27 (F8)	SantaCruz	sc-1641	IP
p27	BD	610241	WB, IP
PCAF	Sigma	P7493	IP, WB
AcLys	Abcam	ab-193	WB
AcLys	Chemicon	AB3879	WB
Ubiquitina	Sigma	U5379	WB
Ubiquitina (P4D1)	SantaCruz	sc-8017	WB
Skp2 (H-435)	SantaCruz	sc-7164	WB
Cdk2	Upstate	06-505	IP

Cdk2 (D-12)	SantaCruz	sc-6248	WB
GFP	Stressgen	SAP-500	WB, IP
Actina	ICN	69100	WB

TaulaII: Anticossos utilitzats en aquesta tesi.

Capítol II: Tècniques *in vitro*

5. Anàlisi de complexos proteics per cromatografia d'afinitat

Per a l'anàlisi de complexos proteics *in vitro* hem utilitzat la tècnica de cromatografia d'afinitat. Es basa en generar una columna formada per una resina que està unida de forma covalent a la proteïna de fusió d'interès. Aquesta columna la incubarem amb diferents tipus de mostres, extractes cel·lulars o bé directament amb proteïnes recombinants purificades o dominis d'aquestes. Com a control negatiu utilitzarem columnes de sefarosa unides al GST sense cap proteïna. Un cop unides les proteïnes a la columna i després dels rentats corresponents, les eluïm en un tampó amb elevades concentracions de KCl que trencarà les unions electrostàtiques entre proteïnes. Aquests eluïts els precipitarem amb TCA i acetona.

En aquest treball, per a la preparació de la columna hem seguit al detall el protocol descrit pel fabricant (Amersham-Pharmacia. CNBr-activated-Sepharose®-4B).

Aquesta tècnica l'hem utilitzat amb diferents finalitats. Una ha estat la d'incubar homogenats de fetge de ratolins p27^{kip1+/-} (veure apartat 5.1.1.) i lisats cel·lulars de la línia HCT116 (veure apartat 2.5.) amb la intenció d'identificar un patró general de proteïnes

d'unió a p27^{kip1}. També hem incubat fraccions nuclears aïllades dels fetges dels ratolins p27^{kip1+/-} per tal d'obtenir més informació sobre les proteïnes de localització nuclear que s'uneixen a p27^{kip1}. I per últim, hem incubat proteïnes recombinants purificades amb la finalitat d'estudiar la interacció directa entre proteïnes *in vitro*.

5.1. Preparació de les mostres.

5.1.1. Genotipatge de ratolins p27^{kip1-/-} i obtenció dels homogenats de fetge

La soca de ratolins p27^{kip1-/-} va ser cedida pel Dr. Manuel Serrano (Fero et al., 1996).

Les femelles dels ratolins *Knock-Out* (KO) de la proteïna p27^{kip1} són estèrils. Per tant, per a l'amplificació de la soca s'han de creuar ratolins mascles homozigots KO (-/-) amb femelles heterozigotes (+/-). És per això, que la descendència que obtindrem haurà de ser genotipada, ja que estarà formada per ratolins KO (-/-) i heterozigots (+/-).

Pel genotipatge obtindrem el DNA tallant uns 5 mm de la cua dels ratolins quan aquests tenen l'edat de 10 dies.

Obtenció del DNA

- 1- A les cues s'afegeix 0.5 ml del tampó PK (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA, 0.3 M Acetat de Sodi [pH 8], 0.2% SDS i Proteinasa K (Boehringer 745723 diluïda en 50 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM CaCl₂ a una concentració de 10 mg/ml) a una concentració final de 400 µg/ml. S'incuba a 55°C tota la nit en rotació vertical (aquesta incubació es pot realitzar amb un bany sec sobre un agitador).
- 2- S'afegeixen 250 µl de Cloroform (Merck) i 250 µl de Phenol. S'agita, mitjançant *vortex*, durant 2 min i es centrifuga durant 5 min a 14500 r.p.m. en una microfuga d'*ependorfs*.
- 3- Es transfereix la fase superior a un tub nou i autoclavat, descartant la interfase i fase inferior.

- 4- S'afegeixen 500 µl de Cloroform, s'agita durant 2 min i es centrifuga uns altres 5 min a 14500 r.p.m. Es transfereix de nou la fase superior a un tub nou.
- 5- El DNA es precipita afegint 500 µl d'etanol absolut i realitzant varies inversions (el precipitat es farà visible immediatament). Es centrifuga 7 min a 14500 r.p.m.
- 6- S'aspira el sobrenedant i s'afegeix 300 µl d'etanol al 70%. Sense barrejar s'aspira el sobrenedant de nou.
- 7- Es deixa assecar el sediment durant 20 min a temperatura ambient amb el tap del tub obert. (Si es vol, es pot deixar assecant tota la nit).
- 8- Finalment, es resuspen el sediment amb 100 µl d'aigua estèril. El DNA obtingut es quantifica mitjançant un espectrofotòmetre.

Protocol de PCR pel genotipatge de ratolins $p27^{kip1-/-}$

Per cada DNA obtingut es fan dues reaccions de PCR. En una s'amplifica l'al·lel WT i a l'altra s'amplifica l'al·lel KO. D'aquesta manera, i depenent del resultat obtingut, es pot saber si el ratolí és salvatge (WT) (si només s'amplifica la reacció per l'al·lel WT), heterozigot (si s'amplifiquen les dues PCRs) o KO (si només es dona la reacció de PCR per l'al·lel KO).

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats per a les reaccions de PCR són les següents:

- Al·lel WT (tamany aproximat 1 kb)
Oligo mgK3: TGG AAC CCT GTG CCA TCT CTA T
Oligo mcK5: GAG CAG ACG CCC AAG AAG C

- Al·lel KO (tamany aproximat 600 bp)
Oligo mgK3: TGG AAC CCT GTG CCA TCT CTA T
Oligo Neo1: CCT TCT ATG GCC TTC TTG ACG

La reacció de PCR que es realitza te cicles “*touch down*”, és a dir, es dona una disminució progressiva de la temperatura d'*annealing* :

Mix:

50 ng DNA genòmic del ratolí (aproximadament)
3 µl MgCl₂ 25 mM
3 µl buffer Ecotaq (10X)
1 µl Ecotaq (Ecogen)
0.5 µl barreja dNTPs 10mM
0.6 µl de cada oligo (100µM stock)
Afegim aigua fins un volum final de 30 µl

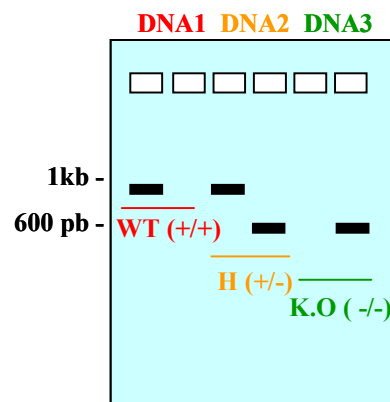
PCR:

- 1: 10 min a 94°C
- 2: 1 min a 94°C
- 3: 30 s a 65°C
- 4: 1 min a 72°C
- 5: anar al pas 2 una vegada (total 2 cicles)
- 6: 1 min a 94°C
- 7: 30 s a 63°C
- 8: 1 min a 72°C
- 9: anar al pas 6 una vegada (total 2 cicles)
- 10: 1 min a 94°C
- 11: 30 s a 61°C
- 12: 1 min a 72°C
- 13: anar al pas 10 una vegada (total 2 cicles)
- 14: 1 min a 94°C
- 15: 30 s a 59°C
- 16: 1 min a 72°C
- 17: anar al pas 14 una vegada (total 2 cicles)
- 18: 1 min a 94°C
- 19: 30 s a 57°C

- 20: 1 min a 72°C
- 21: anar al pas 18 una vegada (total 2 cicles)
- 22: 1 min a 94°C
- 23: 30 s a 55°C
- 24: 1 min a 72°C
- 25: anar al pas 22, 29 vegades (total de 30 cicles)
- 26: 7 min a 72°C

Un cop finalitzada la reacció de PCR es preparen les mostres amb tampó de mostres 6X (Fermentas) i es corren en un gel d'agarosa al 1%. La interpretació del resultat serà la següent, si a un DNA només ha funcionat la PCR amb els oligonucleòtids WT, és a dir veiem una banda del tamany 1 kb, es tracta d'un ratolí salvatge (WT), si veiem dues bandes, una de 1 kb i l'altre de 600 pb, es tractarà d'un ratolí heterozigot o si només visualitzem una banda de 600 pb, aquest DNA provindrà d'un ratolí KO per a la proteïna p27^{kip1}.

Exemple:



Obtenció dels homogenats de fetge dels ratolins p27^{kip1}^{-/-}

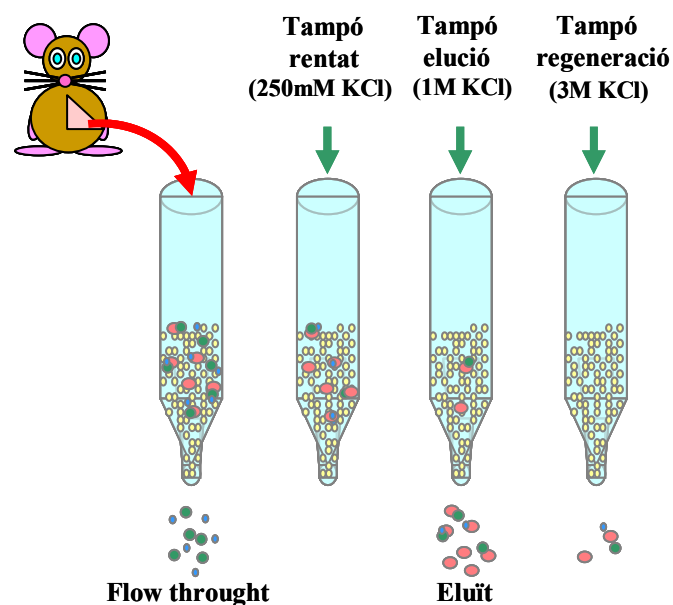
Després del genotipatge s'extreuen els fetges dels ratolins d'interés. Els fetges es trossegen amb un bisturí i a continuació es posen en un homogenitzador *dounce* de 10 ml i s'afegeixen 5 ml de tampó d'homogenització (Hepes [pH 7.6], 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM EGTA [PH: 8], 0.1% Nonidet P-40). S'homogenitza un total de 7 vegades amb

l'èmbol tight. Aquest homogenat es filtra a través d'una gassa estèril de 4 capes. Es reparteix en volums de 1.5 ml en eppendorfs i es centrifuga a 14500 r.p.m durant 10 min. Es descarta el sobrenedant i es torna a centrifugar 10 min més a 14500 r.p.m.

Un cop s'obté la fracció de proteïnes soluble es quantifica mitjançant el mètode Bradford.

Per la columna de GST-p27, així com per la columna control (amb GST), es passen 30 mg d'aquest extracte proteic de fetge. Es recull la fracció de proteïnes no unides a la columna (*Flow through*), i la columna es renta amb 200 ml de tampó d'hogenització (o tampó rentat). Un cop finalitzat el rentat, les proteïnes retingudes a la columna s'elueixen amb el tampó d'elució, que és el mateix tampó rentat però que conte 1 M KCl. L'eluït es recull en un *eppendorf*.

Aquesta columna es pot reutilitzar després de rentar-la amb uns 20 volums de tampó rentat i 3 ml de tampó de regeneració (tampó rentat més 3 M KCl). Es guarda amb PBS i Azida Sòdica a 4°C. Durant l'experiment es guarden mostres d'homogenat, de *Flow through* i els eluïts.



Aïllament de nuclis de fetges dels ratolins p27^{kip1-/-}

- 1- Homogenització. Es posen 10 fetges de ratolins heterozigots p27^{+/-}, sobre una placa de Petri i es tallen del tamany més petit possible amb un bisturí. Es posa en un homogenitzador de 30 ml i s'afegeix el tampó STM (250 mM sacarosa, 50 mM Tris HCl [pH 7.4], 5 mM MgSO₄, més 1:100 PMSF (100 mM) i 1:1000 d'Aprotinina (0.5 mg/ml)) fins a 30 ml. S'homogenitza 4 vegades. L'homogenat es filtra amb una gassa estèril de 4 capes en un embut de boca ample en un matrau de 250 ml (gassa prèviament mullada amb tampó STM). Es reparteix l'homogenat en 4 tubs Sorvall i s'equilibren els tubs fins a 40 ml amb STM.
- 2- Centrifugació. (Sorvall, rotor SS-34). Es centrifuga durant 15 min a 2575 r.p.m a 4°C. Es descarta el sobrenadant i es resuspen el sediment en 80 ml de tampó STM més PMSF i Aprotinina. Es reparteix a 2 tubs Sorvall de 40 ml i es torna a centrifugar 15 min a 2575 r.p.m a 4°C. Es descarta el sobrenadant i els sediments es resuspenen amb tampó DS (2.1 M sacarosa, 50 mM TrisHCl [pH 7.4], 5 mM MgSO₄).
- 3- Gradient de Sacarosa. En 4 tubs de ultracentrífuga (Beckman, rotor SW-28) es posen 28 ml de tampó DS per tub. La mostra s'aboca a una proveta i s'afegeix tampó DS fins a 60 ml. A continuació, s'afegeixen 10 ml de mostra a cada tub.
- 4- Ultracentrifugació. (Beckman, rotor SW-28). Es centrifuga durant 60 min a 20000 r.p.m a 4°C. Treure els tubs i descartar el sobrenadant. Després es resuspenen els sediments amb un homogenitzador petit (10 ml) en 1 ml de tampó STM (més PMSF i Aprotinina). Abocar a una proveta fins obtenir un volum de 20 ml (amb tampó STM) d'homogenat. Per una altra banda, es preparen 2 tubs Beckman amb 28 ml de tampó DS on s'afegeixen 10 ml de l'homogenat.
- 5- Es torna a ultracentrifugar a 20000 r.p.m durant 30 min a 4°C.

El sediment obtingut conté una fracció nuclear crua. Aquests nuclis es resuspenen en 500 µl de tampó STM (més PMSF i Aprotinina) i es congelen a -80°C.

Per a l'obtenció de la mostra, centrifuguem els nuclis amb la centrifuga Sorvall durant 15 min a 5000 r.p.m, es descarta el sobrenedant. Es lisen els pellets en 1 ml de tampó hipotònic (10 mM TrisHCl [pH 7.5], 10 mM NaCl, 250 µg RNAsaA (R-4875, Sigma) i 250 µg DNAsaI (D-4527, Sigma)). S'incuba durant 1 h en gel i es centrifuga durant 15 min a 2600 r.p.m. El lisat nuclear es quantifica pel mètode de Bradford.

Finalment, 2 mg de fracció nuclear es van passar per la columna de GSTp27 o per la columna control seguint el mateix protocol que l'apartat anterior excepte que es va rentar la columna amb només 20 volums de tampó rentat. Es guarden mostres d'homogenat, *Flow through* i eluïts.

5.1.2. Obtenció d'extractes de la línia cel·lular HCT116

Per tal d'ampliar l'estudi del patró de proteïnes d'unio a p27^{kip1}, cèl·lules HCT116 van ser lisades amb el tampó d'homogenització (o tampó rentat), incubades durant 30 min en gel i centrifugades 10 min a 14500 r.p.m. El sobrenadant va ser quantificat per el mètode de Bradford. Seguidament, 10 mg d'aquest lisat van ser carregats a les columnes GST o GST-p27 durant 30 min en agitació. Després de recollir el *Flow through* es va rentar la columna amb 50 volums de tampó rentat que contenia 300 mM KCl (amb l'objectiu d'augmentar l'astringència i retenir a la columna les proteïnes d'unio a p27^{kip1} amb més afinitat). Finalment, les proteïnes unides varen ser eluïdes amb 1 ml de tampó d'elució.

5.1.3. Proteïnes recombinants purificades

Per tal d'analitzar la interacció directa de dues proteïnes *in vitro*, 10 µg de proteïna recombinat purificada es carreguen a les columnes d'afinitat durant 30 min en agitació. Es renta la columna amb 20 volums de tampó rentat (250 mM KCl), s'afegeix 1 ml de tampó d'elució (1 M KCl), s'incuba durant 10 min i finalment es recull l'eluït.

5.2. Estudi de les proteïnes eluïdes obtingudes

Precipitació de proteïnes

- 1- S'afegeix TCA (Àcid tricloracètic) a la mostra fins a una concentració final del 10%. S'agita en un vortex i s'incuba durant 15 min en gel.
- 2- Es centrifuga durant 10 min a 14500 r.p.m. en una microfuga d'*ependorfs*.
- 3- Es descarta el sobrenadant i s'afegeix 1 ml d'acetona freda (-20°C). Seguidament, s'agita fins a trencar el precipitat.
- 4- Es centrifuga durant 10 min a 14500 r.p.m i es descarta el sobrenadant deixant evaporar les restes d'acetona durant uns 20 min.
- 5- Finalment, es resuspenen les mostres amb tampó de mostres (1X) de SDS-PAGE (veure apartat 4.1.).

En aquest treball les mostres obtingudes a partir de columnes de cromatografia d'afinitat van ser carregades en gels SDS-acrilamida d'una dimensió o bidimensional i posteriorment tenyides amb tinció Coomassie o tinció de plata (veure apartat 4.4). Per tal d'analitzar proteïnes concretes es van fer electrotransferències d'aquests gels i es van analitzar amb tècniques de *Western-blot* amb anticossos específics o per espectrometria de masses.

Digestió en gel amb tripsina

Amb l'objectiu d'identificar les proteïnes presents en un gel d'acrilamida mitjançant tècniques d'espectrometria de masses es va seguir el següent protocol:

(Tot el procés es realitza en una campana de flux laminar, per tal d'evitar contaminacions amb queratines, i tot el material utilitzat és químicament estèril, és a dir, rentat prèviament amb acetonitril (Merck) i aigua)

- 1- Es retalla la banda o “*spot*” (en el cas de gel bidimensional) amb un bisturí petit i es posen els trossos en un *ependorf* de 500 µl.
- 2- S’afegeix tampó bicarbonat (25 mM NH₄HCO₃), s’agita en un *vortex* i es manté a temperatura ambient durant 15 min (el volum que s’afegeix pels rentats, per a assecat i per a les extraccions de pèptids del gel serà el doble del volum del gel retallat). Es centrifuga la mostra i es separa el sobrenadant comprovant que el pH sigui de 7-8, si no és així, es fa un altre rentat.
- 3- Per deshidratar el gel es fan dos rentats amb acetonitril. S’afegeix acetonitril a la mostra, s’agita en un *vortex* i s’incuba durant 10 min a temperatura ambient. Es centrifuga la mostra i es retira el sobrenadant.
- 4- Per tal de deshidratar la mostra, es centrifuga en un “*speed-vac*” durant 30 min sense calor.
- 5- Es rehidrata la mostra afegint tampó bicarbonat amb 10 mM DTT (Sigma) (per trencar els ponts disulfur) i s’incuba durant 30 min a 56°C. A continuació es centrifuga i es descarta el sobrenadant.
- 6- Per bloquejar els ponts disulfur trencats anteriorment pel DTT i no es tornin a formar, s’afegeix tampó bicarbonat que conté 55 mM Iodoacetamida (Sigma, ref. I-1149) i s’incuba durant 30 min a temperatura ambient en absència de llum. Es centrifuga la mostra i es descarta el sobrenadant.
- 7- Repetir els passos 2, 3 i 4.
- 8- Preparació de la tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega ref. 5111). La tripsina és una proteasa que talla les proteïnes per l’extrem carboxi de les lisines (K) o arginines (R). Es prepara dissolent-la en tampó bicarbonat a una concentració final de 50 ng/µl (un cop dissolta es guarda a -20°C).
- 9- Digestió amb tripsina. Rehidratar el gel amb la solució de tripsina i incubar durant 30 min. Eliminar el líquid que hagi estat absorbit pel gel i afegir de 5 a 20 µl de tampó bicarbonat, fins que el gel quedi cobert. Incubar tota la nit (12 h) a 30°C sense agitació.
- 10- Centrifugar durant 1 min a 14500 r.p.m i afegir de 10 a 30 µl de tampó bicarbonat (depenent del volum del gel). Sonicar durant 10 min en un bany (afegint gel a l’aigua del sonicador per que no s’escalfin les mostres). Centrifugar a 14500 r.p.m.

i extreure el sobrenadant amb la punta d'una pipeta. Guardar-lo en un *ependorf* net.

- 11- Es fan 3 extraccions de pèptids afegint una solució que conté 50% acetonitril i 0.5% Àcid trifluoroacètic (TFA, Merck ref.1.08262.0025). A continuació s'agita en un *vortex* i es sonica en un bany durant 10 min. Finalment, es centrifuga a 14500 r.p.m. i es guarda el sobrenadant. Els sobrenadants de les extraccions s'ajunten tots en el mateix *ependorf*.
- 12- Per deshidratar el gel es fan 2 extraccions amb acetonitril. S'afegeix l'acetonitril, s'agita en un *vortex* i es sonica en un durant 10 min.
- 13- Tots els sobrenadants (extracte de pèptids) estan en el mateix tub. Aquest conjunt de pèptids es processa de diferent manera segons l'anàlisi a realitzar. Si l'anàlisi no és immediat es poden mantenir a -80°C

En aquest treball els pèptids obtinguts van ser analitzats amb l'espectrometre de masses MALDI-TOF (Voyager-DETM PRO. BioSpectrometryTM Workstation. Perseptive Biosystems).

6. Acetilació d'histones *in vitro*

Per mesurar l'activitat histona-acetil-transferasa (HAT) d'un enzim acetilasa, es fa un assaig *in vitro* en el que s'incuben l'enzim d'interés (en el nostre cas GSTCBP, GSTPCAF o bé, el seu domini catalític GSTHAT/PCAF) prèviament purificat com a proteïna recombinant (veure apartat 3.3) amb les histones H₂A, H₂B, H₃ i H₄ (Sigma) com a substrat.

- 1- Preparació de la reacció. S'afegeix en un *ependorf* 1 µl de la barreja d'histones (dissoltes en aigua a una concentració *stock* de 20 mg/ml), 0.05 µCi de [³H]-AcetilCoA (³H-acetylCoenzymeA, Ref. TRK924-50µCi, Amersham Pharmacia), l'enzim acetilasa i tampó de reacció IPH (50 mM TrisHCl [pH 8], 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) fins a un volum final de 30 µl.

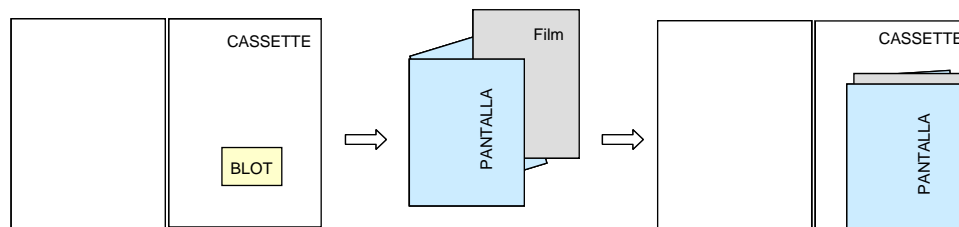
- 2- Per decidir la quantitat d'enzim que s'ha d'afegir a la reacció, es realitza, prèviament, una corba d'activitat enzimàtica. Es prepara una reacció igual a l'anterior amb 0.5, 1, 2, 5 i 10 µl de l'enzim recombinant purificat. La condició que presenti més activitat específica serà la idònia per realitzar l'assaig.
- 3- Un cop preparada la reacció, s'incuba durant 30 min a 30°C en un bany sec o estufa.
- 4- Durant la reacció es preparen trossos de paper *Whatman* P-81, d'una mida aproximada de 2 cm x 2 cm. Aquest paper està carregat negativament i serà perfecte per a unir proteïnes molt bàsiques, com per exemple, les histones.
- 5- Es transfereixen les reaccions al paper *Whatman* P-81 i es deixen assecar a temperatura ambient.
- 6- Es realitzen 3 rentats de 10 min amb una solució de 50 mM NaHCO₃ [pH 9]. Seguidament, un rentat de 10 s amb acetona a temperatura ambient. Finalment, es deixa assecar a l'aire.
- 7- Un cop sec, es posa el paper en vials que contenen 8 ml de líquid de centelleig (National Diagnostics), i es compta en un comptador-*Wallac*.

7. Acetilació de substrats no-histona *in vitro*.

Per a l'estudi de l'acetilació de substrats no-histona, es realitza una assaig *in vitro* alternatiu.

- 1- En primer lloc s'han de tenir purificats i quantificats els substrats a estudiar. Com es tracta de substrats recombinants, es posa com a control negatiu de la reacció GST purificat.
- 2- Es prepara una barreja que contindrà, 3 µl del tampó HAT 10X (500 mM Tris [pH 8], 500 mM KCl, 50% Glicerol, 1 mM EDTA [pH 8]), el volum necessari d'enzim (veure apartat 6), 0.02 µCi [¹⁴C]-acetyl-CoA (¹⁴C-acetylCoenzymeA, Ref. NEC313, PerkinElmer) i 3 µl PBS (4°C).
- 3- S'afegeix a cada *ependorf* 3 µM del substrat que volem estudiar, la barreja i PBS fins a un volum final de 30 µl.

- 4- S'incuba a 30°C durant 30 min en un bany sec o a la estufa. Per ta d'aturar la reacció, s'afegeixen 10 µl de tampó de mostra de SDS-PAGE 4x i es bull durant 2 min a 98°C al bany sec.
- 5- Aquestes mostres es resolen en un gel de SDS-acrilamida del percentatge adequat, en funció del pes molecular del substrat utilitzat.
- 6- Sense deixar escapar el front de proteïnes del gel i descartant-lo després, es prepara la transferència d'aquestes proteïnes a nitrocel·lulosa (BioRad, 0.45Ø), a 70 V, durant 1 h i 15 min a 4°C.
- 7- Es deixa assecar la membrana de nitrocel·lulosa a l'aire i s'enganxa a dins d'un cassette de revelar. Com el ^{14}C és poc penetrant, es necessita una pantalla amplificadora de senyal (Kodak BioMax, Transcreen LE (Low Energy) Intensifying Screen) per poder revelar el film. Així doncs, es posa un film de revelar (Kodak MS) a dins de la pantalla, es tanca el cassette, es protegeix de la llum amb bosses de plàstic opaques, i finalment es deixa exposant a -80°C un mínim de 24 h. Tot aquest procés de posar el film i revelar-lo, es fa en absència total de llum, ja que el film és sensible a la llum vermella.



Les bandes que apareixen en el film revelat són proteïnes que han incorporat ^{14}C , és a dir, acetilades. A més a més, es podrà apreciar en tots els carrils la banda que correspon a l'autoacetilació de l'enzim, indicant que la reacció ha funcionat.

8. *Spot Mapping*

Aquesta tècnica s'utilitza normalment per a l'estudi de l'eficiència de reconeixement d'un anticòs pel seu antígen, tot i que actualment, s'ha utilitzat amb altres finalitats com per exemple l'estudi de fosforilació de pèptids concrets per una cinasa.

Es basa en l'acoblament de pèptids sintètics a una membrana de cel·lulosa- β -alanina. Aquests pèptids, de 10-12 aminoàcids, s'uneixen a la membrana pel seu extrem carboxi.

En aquest treball, l'*Spot Mapping* l'hem utilitzat per estudiar quines lisines de la proteïna p27^{kip1} son acetilades per l'enzim PCAF. Per això, vam dissenyar una bateria de pèptids on cada un contenia una lisina diferent del domini N terminal de p27^{kip1}. Els pèptids ja acoblats a la membrana van ser proveïts per Genosys amb les següents seqüències:

- 1- KSTGGKAPRKQ
- 2- RQAEHPKPSACR
- 3- LTRDLEKHCRDM
- 4- EEASQRKWNFDF
- 5- NFDFQNHKPLEG
- 6- PLEGKYEWQEVE
- 7- WQEVEKGSLEPF
- 8- YRPPRPPKGAC
- 9- GACKVPAQESQD

El pèptid 1 conté la lisina K14 de la histona H3, acetilable per PCAF, i ens servirà de control positiu de la reacció. Són pèptids formats per 12 aminoàcids i acetilats a l'extrem aminoterminal.

Un dels inconvenients d'aquesta tècnica, es la possibilitat d'acetilació química de la cel·lulosa on estan acoblats els pèptids. Per tant, la reacció s'ha de fer amb un tampó de reacció amb un elevat contingut de NaCl el qual bloqueja l'acetilació química inespecífica.

Abans de començar la reacció, fem una corba d'acetilació d'histones amb l'acetilasa PCAF (vegeu apartat 6) a concentracions creixents de NaCl, per tal d'escollir la concentració més alta de sal a la qual l'enzim manté l'activitat màxima.

Per iniciar la reacció d'acetilació de pèptids es posa la membrana en una cubeta de 1.5 cm x 5 cm, aproximadament. És important que la cubeta s'ajusti al tamany de la membrana per tal d'utilitzar el mínim de volum de tampó de reacció possible, en el nostre cas, vam utilitzar un volum final de 2 ml (que equivalen a aproximadament 67 reaccions).

Es prepara una barreja que conté la quantitat d'enzim necessària per a 67 reaccions (vegeu apartat 6), 67 µl [¹⁴C]-acetyl-CoA, i tampó de reacció HAT 1X (50 mM Tris [pH 8], 500 mM NaCl, 5% Glicerol, 0.1 mM EDTA [pH 8]) fins a un volum final 2 ml.

Per tal d'equilibrar la membrana, es fa un rentat durant 10min a temperatura ambient i en agitació amb el tampó de reacció amb 500 mM NaCl. Després s'afegeix la barreja de reacció a la cubeta i s'incuba durant 40 min a 30°C a l'estufa. Cada 10 min s'agita la cubeta per anar homogenitzant la reacció.

Un cop finalitzada la reacció, es fan rentats de 10 min amb el tampó de reacció i aquests rentats es guarden en vials que contenen líquid de centelleig. Quan hagi desaparegut totalment la radioactivitat del tampó de rentat ja es pot aturar la reacció.

Es deixa assecar la membrana a l'aire i s'exposa amb un film i la pantalla amplificadora a -80°C (veure apartat 7). Quan es reveli el film, apareixeran “spots” en els punts on hi hagi un pèptid amb una lisina acetilada.

9. Ubiquitinització *in vitro*

L'assaig d'ubiquitinització *in vitro* permet determinar si una proteïna és substrat dels enzims de transferència d'ubiquitina en una reacció totalment *in vitro*. L'assaig es basa en

incubar la proteïna estudiada amb els enzims d'ubiquitinització i ubiquitina lliure per a permetre la reacció d'ubiquitinització. Normalment com a font dels enzims d'ubiquitinització i ubiquitina s'utilitza un lisat de reticulòcits de conill, ja que estan molt enriquits en aquests components.

En el nostre cas es tractava de determinar si l'acetilació de la p27^{kip1} comportava la seva major ubiquitinització i per tant, es va utilitzar com a substrat de la reacció d'ubiquitinització p27^{kip1} sense acetilar i acetilada en un assaig d'acetilació *in vitro*.

- 1- Es fa un assaig d'acetilació *in vitro* (veure apartat 7) en presència i absència de l'enzim PCAF durant 30 min a 30°C.
- 2- S'afegeixen 30 µl de lisats de reticulòcits de conill (Ref. L4151, Promega) a les reaccions d'acetilació i s'incuba durant 1 h a 37°C.
- 3- Per repurificar els substrats, s'afegeixen 30 µl de resina de glutatió-sefarosa i PBS fins a un volum final de 300 µl. S'incuba un mínim d'una hora a 4°C en agitació. Es fan 3 rentats amb 1ml de PBS.
- 4- S'afeixen 30 µl de tampó de mostres de SDS-PAGE 2x i es resol en un gel d'acrilamida del 8% (per a diferenciar millor les formes poliubiquitinitzades del substrat). Seguidament es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa.

La presència de formes ubiquitinitzades de p27^{kip1} es van analitzar amb tècniques de Western Blot, utilitzant l'anticòs primari anti-Ubiquitina (U-5379, Sigma) i el revelat es va fer amb la reacció de la fosfatasa alcalina (vegeu apartat 4.5). Com a control de la reacció, aquesta membrana s'exposa amb un film i pantalla amplificadora a -80°C (veure apartat 7) per comprovar que el substrat ha estat acetilat.

Capítol III: Tècniques *in vivo*

10. Immunoprecipitació

La immunoprecipitació és una tècnica que ens permet aïllar complexos proteics a partir d'extractes o lisats cel·lulars. Es basa en l'ús anticossos específics contra la proteïna en estudi per tal de formar un immunocomplex que es podrà aïllar i recuperar amb Proteïna A o Proteïna G unida covalentment a sefarosa. La utilització de Proteïna A o G depèn de si l'anticòs emprat ha estat produït en conill(A) o en ratolí(G). En aquest treball hem utilitzat la Proteïna A/G (Pierce), que presenta afinitat per a la majoria d'anticossos.

Les condicions durant tot el procés hauran de ser prou permissives per a no trencar les unions entre les proteïnes que formen els complexos.

10.1. Anàlisi de complexos *in vivo*

El procediment general que hem seguit per l'immunoprecipitació és el següent:

1. Es recullen les cèl·lules i es lisen amb tampó HAT (vegeu apartat 2.5) durant 30 min en gel. El volum de tampó de lisi dependrà de la quantitat inicial de cèl·lules. És important la presència d'inhibidors de proteases, de fosfatases i d'acetilases durant tot el procés, per això es suplementa el tampó HAT amb Aprotinina, Leupeptina i PMSF (inhibidors de proteases), NaF (inhibidor de fosfatases) i TSA (inhibidor d'acetilases)
2. Finalitzada la lisi, es centrifuga a 14500 r.p.m durant 10 min a 4°C en una microfuga d'*ependorfs*.
3. Es quantifica el sobrenadant pel mètode de Bradford.

4. S'incuben 0.5-1 mg de lisat amb 4 µg d'anticòs *overnight* a 4°C i en agitació, en un volum final de 300 µl amb tampó de lisi. La quantitat d'extracte proteic utilitzat per a la immunoprecipitació, així com la quantitat d'anticòs, poden variar dependent de l'experiment.
5. S'afegeixen 35 µl de Proteïna A/G (Pierce) i s'incuba 45 min, a 4°C, en agitació.
6. Es centrifuga a 14500 r.p.m durant 1 min a 4°C per tal de precipitar la Proteïna A/G unida a l'anticòs, que a la vegada uneix la proteïna d'interès i el seu complex proteic associat.
7. Es fan 2 rentats de 1 ml amb el tampó HAT però amb una concentració de sal de 300 mM KCl, amb l'objectiu d'evitar tant les unions inespecífiques a la resina de la Proteïna A/G com les unions febles als complexos proteics. A continuació, es fa un tercer rentat de 1 ml amb tampó HAT. S'aspira el sobrenadant.
8. Per últim, s'afegeixen 35 µl de tampó de mostres de SDS-PAGE 2x al precipitat. La mostra es pot bullir durant 5-10 min per a desnaturalitzar o separar completament les cadenes de l'anticòs o bé, si la proteïna d'interès coincideix en el seu pes molecular amb la cadena pesada (50 kDa) o lleugera (25 kDa) de l'anticòs, no es bull la mostra.
9. Les proteïnes de la mostra es separen electroforèticament en un gel d'acrilamida. Es transfereixen a una membrana de PDVF o nitrocel·lulosa i es realitzen tècniques de *Western-blot* per analitzar els complexos aïllats.

Com a control negatiu de la reacció s'utilitza per immunoprecipitar sèrum normal de conill (NRS), si l'anticòs utilitzat a la immunoprecipitació és policlonal, o sèrum normal de ratolí (NMS) si és monoclonal.

10.2. Anàlisi de l'acetilació i ubiquitinització de p27^{kip1}

Per estudiar si la proteïna p27^{kip1} es acetilada i ubiquitinitzada *in vivo*, en aquest treball hem utilitzat el procediment de la immunoprecipitació (descriu a l'apartat 10.1) però amb alguns canvis.

Es van realitzar immunoprecipitacions en condicions en les que la quantitat d'anticòs era limitant per així assegurar que precipitàvem la mateixa quantitat de p27^{kip1} en tots els casos. Això s'aconseguia mitjançant la incubació de ≥ 1 mg d'extracte cel·lular de la línia HCT116 amb $\leq 4\mu\text{g}$ d'anticòs contra p27^{kip1} (Santa Cruz, C-19 goat).

Per analitzar si la p27^{kip1} immunoprecipitada estava acetilada i ubiquïtinitzada es van utilitzar tècniques de *Western-blot* emprant com a anticossos primaris, anti Acetil Lysina (ab193. Abcam. *Rabbit*. 1:1000, 2h a temperatura ambient) i l'anti Ubiquïtina (Sigma. *Rabbit*. 1:100, incubació *overnight* a 4°C) respectivament, amb la peculiaritat de que totes les solucions del procediment van ser preparades amb PBS-T i BSA pel bloqueig de la membrana de nitrocel·lulosa, ja que a la llet en pols hi ha una elevada presència de proteïnes acetilades i ubiquïtinitzades. Cal afegir, que per l'anticòs anti Acetil Lysina, s'ha de bloquejar la membrana durant tota la nit a 4°C en una solució de PBS-T i 5% de BSA (Sigma).

Per una altra banda, per estudiar l'acetilació de p27^{kip1} al llarg del cicle necessitem immunoprecipitar tota o al menys, la majoria, de p27^{kip1} existent a la mostra. Això s'aconsegueix limitant la quantitat d'extracte proteic i posant en excés la quantitat d'anticòs (per exemple: $\leq 150\mu\text{g}$ de lisat i $\geq 4\mu\text{g}$ d'anticòs).

10.3. Anàlisi de l'activitat acetilasa

Amb l'objectiu d'estudiar l'activitat acetilasa de PCAF al llarg del cicle, es va immunoprecipitar la proteïna PCAF endògena a partir d'extractes de cèl·lules HCT116 sincronitzades en G₀ (vegeu apartat 2.2.). El procediment a seguir és el següent:

- 1- Es sincronitzen les cèl·lules HCT116 i es recullen els punts de les 0 h (G₀), 5 h (fase G₁), 12 h (fase S) i 17 h (fase G₂/M).
- 2- Es lisen les mostres amb 500 μl de tampó de lisi HAT i es quantifiquen pel mètode de Bradford (veure apartat 2.5.).

- 3- S'incuben 3 mg de lisat amb 7 µg d'anticòs anti PCAF (Sigma) durant tota la nit a 4°C en agitació en un volum final de 500 µl. Com a control de la reacció s'incuben 3 mg de lisat amb NRS.
- 4- S'afegeixen 60 µl de Proteïna A/G (Pierce) i s'incuba durant 45 min a 4°C en agitació.
- 5- Es fa 1 rentat amb 1 ml de tampó HAT (300 mM KCl) i 2 rentats amb 1 ml de tampó HAT.
- 6- S'afegeixen al precipitat 60 µl de tampó HAT (que conté 1 mM DTT, Aprotinina, Leupeptina), 2.5 µl de barreja d'Histones (Sigma) i 1.5 µl d'Acetil CoA marcat amb triti (veure apartat 6).
- 7- S'incuba la reacció durant 45 min a 30°C i s'agita en un *vortex* cada 10 min.
- 8- Finalitzada la reacció, es centrifuga 1 min a 14000 r.p.m i es dipositen 60 µl del sobrenadant (on tenim les histones acetilades) sobre paper *Whatman* P-81.
- 9- Fem 3 rentats de 10 min amb el tampó 50 mM NaHCO₃ [pH 9], 1 rentat amb acetona i mesurem les c.p.m. amb un comptador *Wallac*.

A més, s'afegeix un control de la reacció sense substrat.

10.4. Anàlisi d'activitat cinasa de Cdk2

Per analitzar l'activitat cinasa del complex Cdk2 en cèl·lules HCT116, es va seguir el següent protocol.

- 1- S'immunoprecipita 1 mg de lisat cel·lular amb 3 µg d'anticòs anti Cdk2 (06-505. UBI) en un volum final de 300 µl de tampó HAT, durant tota la nit a 4°C i en agitació.
- 2- S'afegeixen 35 µl de Proteïna A/G i s'incuba durant 45 min a 4°C i en agitació.
- 3- Es fan 2 rentats amb tampó HAT 300 mM KCl, i 2 rentats més amb tampó cinasa (20 mM HEPES [pH 7.4], 10 mM Acetat de magnèsi, 0.1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina i 0.5 µg/ml aprotinina).

- 4- Després de l'últim rentat, es retira el sobrenadant i s'afegeix una barreja que conté: 3 µg Histona H1 (Boehringer Mannheim) com a substrat, 3 µl tampó cinasa 10X, 2 mM DTT, 0.1 mMNa₃VO₄, 1 mM NaF, 15 µM ATP (Boehringer Mannheim) i 0.5 µCi [γ -³²P] ATP (Amersham, 3000Ci/mmol, 10mCi/ml) i aigua fins a un volum final de 30 µl.
- 5- S'incuba durant 30 min a 30°C al bany sec o a la estufa.
- 6- Es pot aturar la reacció de dues maneres, o bé afegint 10 µl de tampó de mostres de SDS-PAGE 4x, per a resoldre els precipitats en un gel d'acrilamida i analitzar les bandes de la Histona H1 fosforilada amb films fotogràfics, o bé en el nostre cas vam centrifugar 1 min a 14000 r.p.m i dipositar la reacció en papers *Whatman P-81*.
- 7- Es fan 3 rentats de 10 min amb tampó fosfòric al 1% i un altre rentat de 10 s amb acetona per accelerar l'assecat dels papers.
- 8- Els papers es posen dins un vial amb 8 ml de líquid de centelleig i es mesuren les c.p.m amb un comptador *Wallac*.

11. Anàlisi de la vida mitja de la proteïna p27^{kip1}

S'ha descrit que el temps de vida mitja de la proteïna p27^{kip1}, és a dir el temps que triga a degradar-se el 50% de la quantitat total de la proteïna, és de 2 a 4 h (Malek et al., 2001).

Per tal d'analitzar el temps de vida mitja de p27^{kip1} a les cèl·lules HCT116 en diferents condicions experimentals, aquestes cèl·lules es van incubar amb cicloheximida (Sigma) que inhibeix la traducció de les proteïnes.

La cicloheximida, es prepara a una concentració de 10 mg/ml amb un tampó 25 mM HEPES [pH 7.5], i s'afegeix al medi de les cèl·lules a una concentració final de 10 µg/ml (s'afegeix 1 µl per ml de medi de cultiu). En aquest moment, es recull el primer punt, que anomenem temps "0 h". Incubem les cèl·lules, repartides en diferents plaques, durant 0.5, 1, 2, 4 i 6 h.

Un cop tenim totes les mostres, es lisen i quantifiquen pel mètode de Bradford (vegeu apartat 2.5.). Seguidament, un cop preparades les mostres, es carreguen en un gel d'acrilamida i mitjançant tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-p27^{kip1} estudiem la quantitat de proteïna present en cada mostra.

12. RT-PCR

En aquest treball s'ha realitzat un assaig de *Real Time PCR* amb la finalitat de quantificar la presència de RNA missatger de p27^{kip1} en diferents extractes cel·lulars. Aquests experiments s'han realitzat en col·laboració amb Dra. Armengol.

El RNAm total de p27^{kip1}, va ser quantificat mitjançant tècniques de RT-PCR utilitzant el kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, USA) i els següents primers específics:

- p27^{sense}: 5'-AGGAGAGCCAGGATGGCAGCG-3'
- p27^{antisense}: 5'-ACCGGCATTTGGGGAACCGTC-3'

Per a cada reacció de PCR es va utilitzar un *pool* de cDNA com a curva patró. La quantificació de cada punt es va realitzar amb el programa informàtic *LightCycler* (versió 3.5) (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, USA).

RESULTATS

La proteïna p27^{kip1}, inhibidor dels complexos Cdk-ciclina i regulador de la progressió del cicle cel·lular, ha estat identificada com a factor de mal pronòstic en els càncers humans (Philipp-Staheli et al., 2001). Baixos nivells de p27^{kip1} i la seva deslocalització subcel·lular sovint s'associen a l'aparició de metàstasis (Motti et al., 2004).

Per tant, per tal de caracteritzar els processos que condueixen a la transformació cel·lular és important entendre els mecanismes que regulen els nivells i l'activitat de p27^{kip1}. La regulació de p27^{kip1} ve donada pels seus nivells d'expressió però també per la interacció amb altres proteïnes. Actualment, es coneixen poques proteïnes que interaccionin amb p27^{kip1} i que per tant regulin la seva activitat. És per això, que en aquest estudi hem començat la caracterització de noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}.

1. Noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}.

Per tal d'analitzar els complexos proteics associats a la proteïna p27^{kip1} es van realitzar experiments de cromatografia d'afinitat.

Amb aquest objectiu, vam acoblar la proteïna de fusió GST-p27 o bé, GST com a control, a una reïna per tal de generar columnes d'afinitat per les quals vam passar diferents tipus d'extractes cel·lulars.

En primer lloc, les mostres utilitzades van ser homogenats de fetges de ratolins heterozigots per a la proteïna p27^{kip1} (p27^{+/-}). Aquests extractes presentaven un baix contingut de la proteïna p27^{kip1} la qual cosa afavoria encara més la unió de la resta de proteïnes procedents dels homogenats a la proteïna de fusió GST-p27 de la columna.

A la Figura 3.1 es pot observar el contingut proteic total dels homogenats de fetge que van ser passats per la columna (Precolumna: "Pre"), la fracció de proteïnes que no es

va unir a la columna de GST-p27 ni a la columna control (*Flow-through*: “FT”) i les proteïnes unides a les columnes GST i GST-p27 (Eluïts).

El patró de les proteïnes unides a la columna de p27^{kip1}, de forma específica, va ser analitzat mitjançant tècniques electroforètiques i tinció amb *Coomassie Blue* o bé, tinció amb Plata. Posteriorment, es van identificar algunes de les proteïnes presents en aquests gels de SDS-acrilamida per espectrometria de masses.

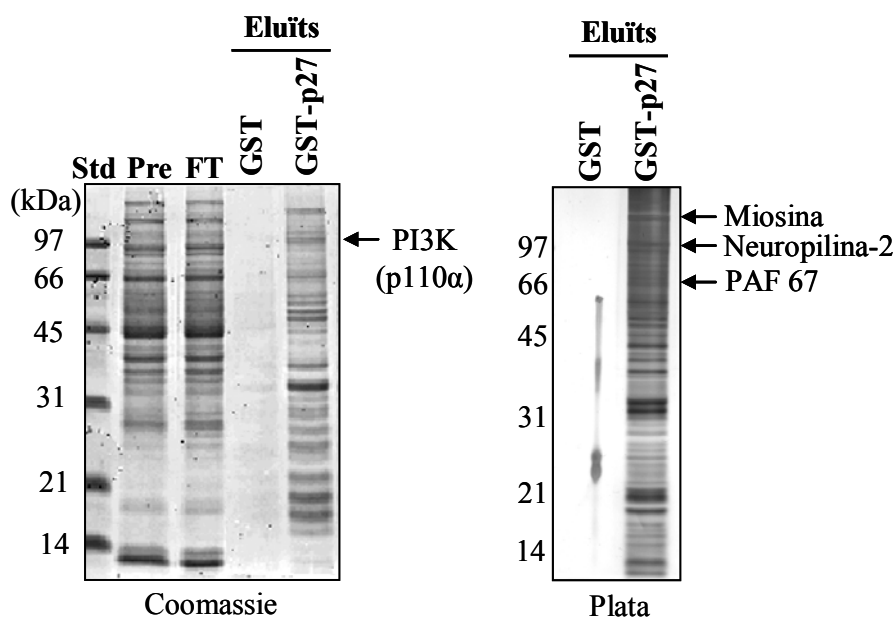


Fig 3.1: Homogenats de fetges de ratolins p27^{+/-} es van passar per una columna de GST-p27 o per una de GST. L'extracte de fetge (Pre), la fracció de proteïnes no unides a la columna (FT) i les proteïnes d'unió a la columna (Eluïts) es van resoldre en gels de SDS-acrilamida. Per visualitzar les proteïnes, es van realitzar tincions de *Coomassie Blue* i de plata.

En els gels de SDS-acrilamida d'una dimensió ens trobem molt sovint la presència de més d'una proteïna amb el mateix pes molecular i per tant, impossible de diferenciar-les. Per això i per tal de simplificar l'anàlisi per espectrometria de masses, vam realitzar gels de SDS-acrilamida de dues dimensions.

Es van realitzar assaigs similars als anteriors, passant homogenats de fetges de ratolins p27^{+/-} per columnes de GST-p27. Els eluïts d'aquestes columnes van ser resoltts

mitjançant tècniques electroforètiques bidimensionals. Com s'observa a la Figura 3.2, aquests gels bidimensionals van ser tenyits amb tinció de *Coomassie Blue* i posteriorment analitzats per espectrometria de masses.

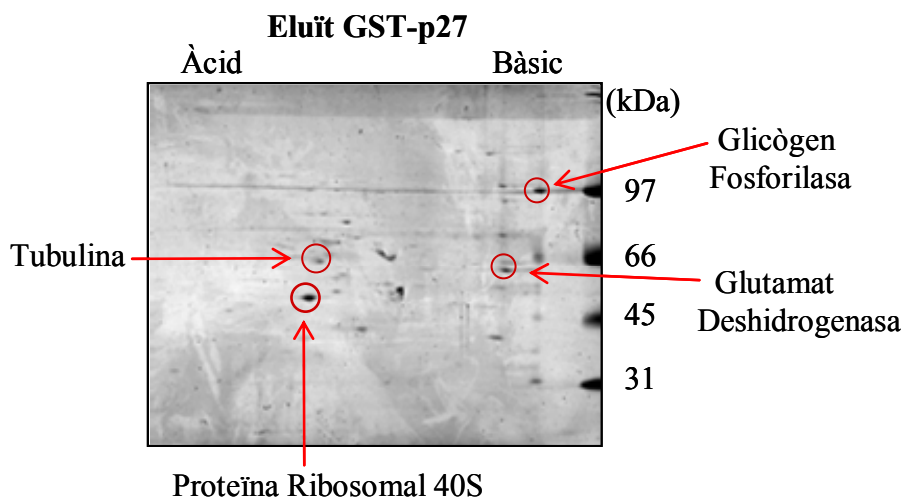


Fig 3.2: La fracció de proteïnes unides a la columna de GST-p27 va ser sotmesa a una electroforesi bidimensional. Per a l'anàlisi de la mostra es va realitzar una tinció de *Coomassie Blue* i seguidament, es van retallar els *spots* i analitzar per espectrometria de masses.

A cèl·lules quiescents, com són els hepatòcits, la localització de la proteïna p27^{kip1} és nuclear. És per això, que vam decidir aïllar els nuclis dels hepatòcits dels fetges p27^{+/-} i enriquir la fracció de proteïnes nuclears capaces d'unir-se de forma directa o indirecta a p27^{kip1}.

Es van realitzar experiments de cromatografia d'afinitat passant extractes nuclears dels fetges p27^{+/-} per columnes acoblades a la proteïna de fusió GST-p27 i columnes control amb GST.

Com es mostra a la Figura 3.3, la fracció de proteïnes no unides a la columna de GST-p27 (FT) i les proteïnes unides (Eluïts), tant a la columna control com a la de GST-p27, van ser resoltes en un gel de SDS-acrilamida i visualitzades gràcies a una tinció amb

plata. A través de l'anàlisi per espectrometria de masses, es van poder identificar un conjunt de proteïnes nuclears capaces d'unir-se a p27^{kip1} de forma directa o indirecta.

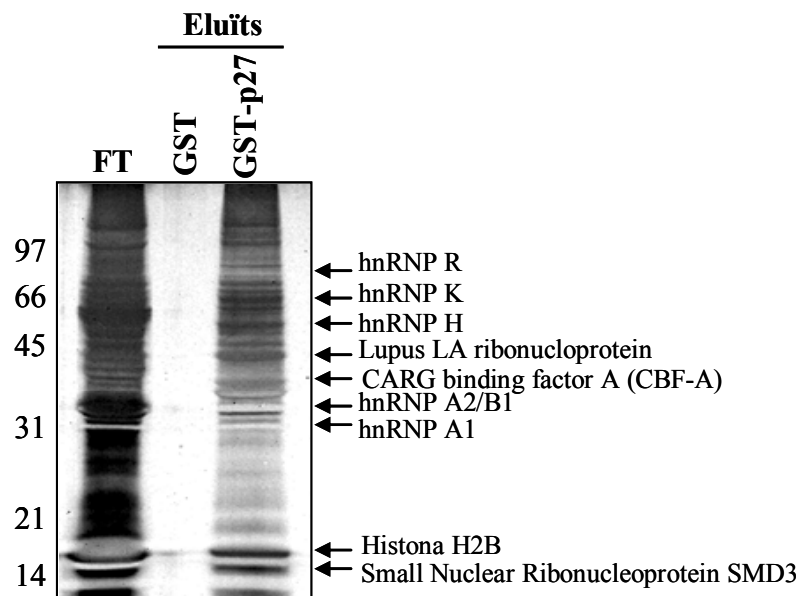


Fig 3.3: Proteïnes d'unió a p27^{kip1} provinents d'extractes nuclears de fetges p27^{+/-}, van ser resoltes en gels d'una dimensió. A continuació, es va realitzar una tinció amb plata i posteriorment, es van retallar les bandes per tal de ser analitzades per espectrometria de masses.

Gràcies a aquesta metodologia hem identificat 20 possibles noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}. Analitzant aquests resultats i gràcies a l'ajuda de programes bioinformàtics, hem agrupat les proteïnes identificades per espectrometria de masses segons les seves funcions.

Com mostrem a la Taula 3.1 p27^{kip1} podria estar formant part de processos com la transducció de senyals, la remodelació de cromatina, el metabolisme glucídic, lipídic o d'aminoàcids, la transcripció, funcions relacionades amb el citosquelet (migració, adhesió, unió cèl·lula-cèl·lula...etc.) i fins i tot, de l'*splicing* diferencial.

PROCÉS CEL·LULAR	PROTEÏNES IDENTIFICADES
Transducció de senyal	PI3K (p110 α) Neuropilina-2
Remodelació de cromatina	Set
Processos relacionats amb el citoesquelet	Tubulina Miosina
Metabolisme	Glicògen fosforilasa Proteïnes de lipogènesi Glutamat deshidrogenasa
Transcripció i <i>Splicing</i> diferencial	hnRNPs (R,K,H, A2/B1, A1) Lupus LA CARG binding factor A

Taula 3.1: Taula resum de proteïnes d'unió a la columna de p27^{kip1} agrupades per funcions.

Per tant, gràcies al descobriment d'aquests nous candidats, hem obert nous camps de treball que ens ofereixen la oportunitat d'aprofundir en noves vies de regulació de p27^{kip1} i noves funcions d'aquesta proteïna relacionades o no amb el cicle cel·lular.

2. Unió de p27^{kip1} a l'oncoproteïna Set

En el nostre laboratori es va identificar la unió de p21^{kip1} (un altre membre de la família Cip/kip) a la proteïna Set/TAF1 β (oncoproteïna associada a un tipus de leucèmia mieloide) (von Lindern et al., 1992; Estanyol et al., 1999). Per aquest motiu, i en paral·lel al treball d'identificació de noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}, vam iniciar un estudi sobre la possible interacció entre p27^{kip1} i Set i l'existència d'un sentit funcional per aquesta interacció.

Per abordar aquest objectiu, en primer lloc vam realitzar tècniques de *Western-blot* amb anticossos específics anti-Set per tal de veure si la proteïna Set formava part de les proteïnes presents a la fracció dels eluïts de la columna GST-p27. Com es mostra a la figura 3.4, la proteïna Set apareix identificada com a proteïna d'unió a p27^{kip1}.

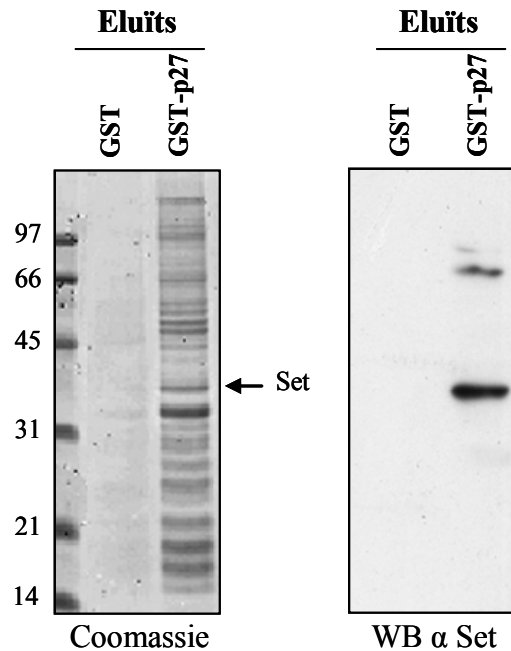


Fig 3.4: Set és una proteïna d'unió a p27^{kip1}. 30 μ g d'extractes de fetge p27^{+/+} van ser carregats a columnes de GST-p27 o columnes control de GST. Els eluïts de les columnes van ser resoltos en gels de SDS-acrilamida 12%. A continuació, el 50% de la mostra va ser visualitzat amb una tinció de *Coomassie Blue* i l'altre 50% va ser analitzat per tècniques de *Western-blot* (WB) amb anticossos específics de Set.

Per tal d'estudiar si la interacció entre p27^{kip1} i Set era directa o indirecta, vam obtenir proteïna Set recombinant a partir de bacteris. Es van realitzar incubacions de 10 µg de Set amb la columna control o bé, amb la columna de GST-p27. A continuació, es va resoldre la fracció no unida a les columnes (FT) i la fracció unida (E) en gels de SDS-acrilamida i es va realitzar una tinció de *Coomassie Blue*.

Com s'observa a la Figura 3.5, Set s'uneix a la columna de GST-p27 i no a la columna control. Així doncs, la interacció de la proteïna Set a p27^{kip1} és directa.

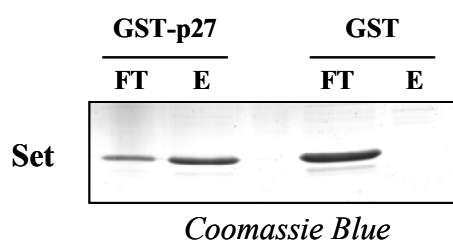


Fig 3.5: Set s'uneix de forma directa a p27^{kip1}. Les mostres obtingudes de la incubació de 10 µg de Set purificada a les columnes GSTp27 o control, van ser resoltes en gels de SDS-acrilamida 12% i visualitzades per tinció de *Coomassie Blue*.

Al nostre laboratori disposàvem de 3 fragments purificats de la proteïna Set (Set 1, Set 2 i Set 3) (Veure figura 3.6). Aquests fragments van ser incubats en columnes de GST-p27 amb l'objectiu d'acotar la regió de la proteïna Set per la qual s'unia a p27^{kip1}.

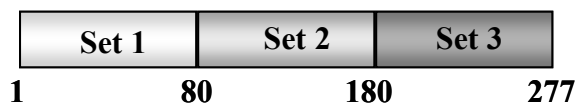


Fig 3.6: Fragments de la proteïna Set. Tres fragments de la proteïna Set, anomenats Set 1 (1-80 aa), Set 2 (80-180 aa) i Set 3 (180-277 aa). Van ser obtinguts com proteïnes recombinants expressades en bacteris.

A la Figura 3.7 es mostren les fraccions no unides i unides (FT i E, respectivament) dels diferents fragments Set 1, Set 2 i Set 3 prèviament incubats amb les columnes de GST-p27 o GST. Com s'observa a la figura, el fragment més carboxi terminal de Set, el fragment Set 3, s'uneix a p27^{kip1} a diferència de la resta de fragments que es presenten majoritaris a les fraccions no unides de la columna GST-p27. Per tant, amb aquests experiments realitzats es pot concloure que p27^{kip1} s'uneix *in vitro* a la proteïna Set per la regió que conté els aminoàcids 180-277.

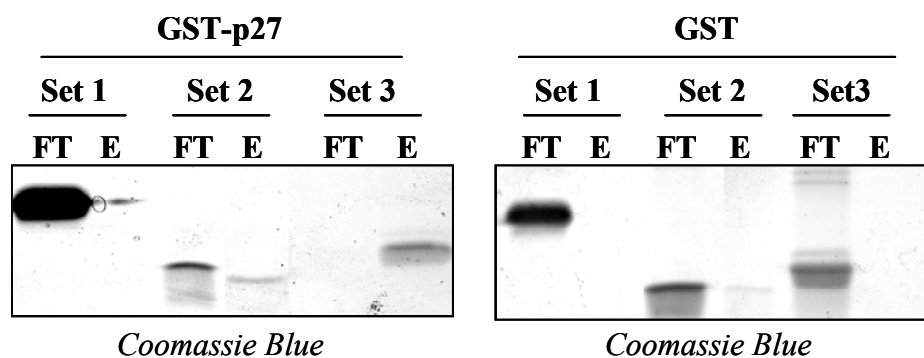


Fig 3.7: p27^{kip1} s'uneix a Set pel domini Set 3 (180-277aa). 10 µg de cada fragment de la proteïna Set van ser incubats durant 15 min amb columnes de GST-p27 o GST, com a control. Les mostres obtingudes després d'eluïr les columnes amb elevades concentracions de sal (1 M KCl), van ser estudiades mitjançant tècniques electroforètiques i tinció de *Coomassie Blue*.

Amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi de la interacció existent entre p27^{kip1} i Set, la seva interacció *in vivo* es va analitzar mitjançant microscòpia de fluorescència.

Per això, vam cotransfectar cèl·lules COS-1 (cèl·lules provinents d'ovari de mico) amb les proteïnes de fusió GFP-p27 (que emet fluorescència verda) i RED-Set (que emet fluorescència vermella). Com es demostra a la Figura 3.8, les proteïnes p27^{kip1} i Set colocalitzen en el nucli, concretament en estructures al voltant del nuclèol, suggerint que existeix una interacció *in vivo*.

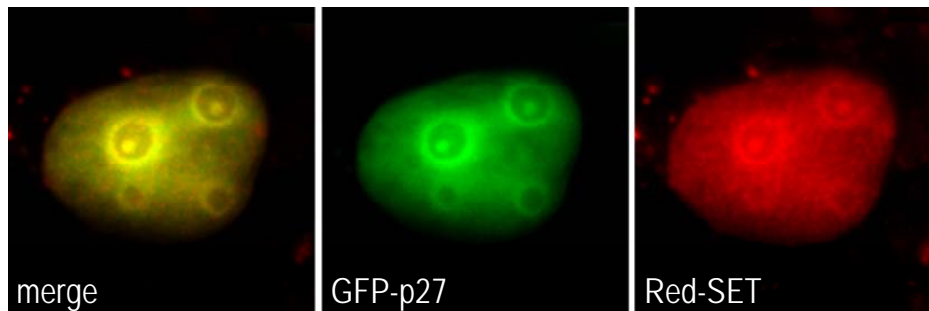


Fig 3.8: p27^{kip1} i Set colocalitzen al nucli. Cèl·lules COS-1 varen ser transfectades amb GFP-p27 i RED-Set i posteriorment fixades amb Paraformaldehid 4%. Mitjançant tècniques de microscòpia òptica s'observa una colocalització de les dues proteïnes. En el nucli.

3. Identificació de PCAF com a proteïna d'unió a p27^{kip1}.

Un cop descrita la interacció entre p27^{kip1} i Set, varem voler estudiar el possible sentit funcional d'aquesta interacció. Se sabia que la proteïna Set/TAF1 β tenia varies funcions, entre elles la de formar part d'un complex anomenat INHAT (Seo et al., 2001). Aquest complex INHAT impedeix que les acetilases, concretament CBP i PCAF (p300/CBP associated Factor), acetilin les histones. Sabent que p27^{kip1} s'unia a la proteïna Set, varem voler estudiar si p27^{kip1} tenia algun efecte sobre aquesta funció coneguda de la proteïna Set.

Ens vam centrar en l'acetilasa PCAF. L'enzim PCAF és una histona acetil transferasa (HAT) de 92 kDa, capaç d'acetilar histones, factors de transcripció i altres proteïnes no-histona. PCAF és un coactivador transcripcional involucrat en vies proliferatives i de diferenciació.

Per tal d'iniciar l'estudi de la relació funcional entre Set, PCAF i p27^{kip1}, vam realitzar assaigs histona acetil transferasa *in vitro* en els quals incubàvem l'enzim

GSTPCAF, un *pool* d'histones com a substrat, i concentracions creixents de la proteïna Set purificada.

Com s'observa a la Figura 3.9, a l'afegir concentracions creixents de la proteïna Set s'inhibeix l'activitat histona acetil transferasa (HAT) de PCAF, com ja estava descrit a la literatura (Seo et al., 2001). A una concentració de 6 μ M de Set l'activitat HAT de PCAF s'inhibeix fins a un 60%.

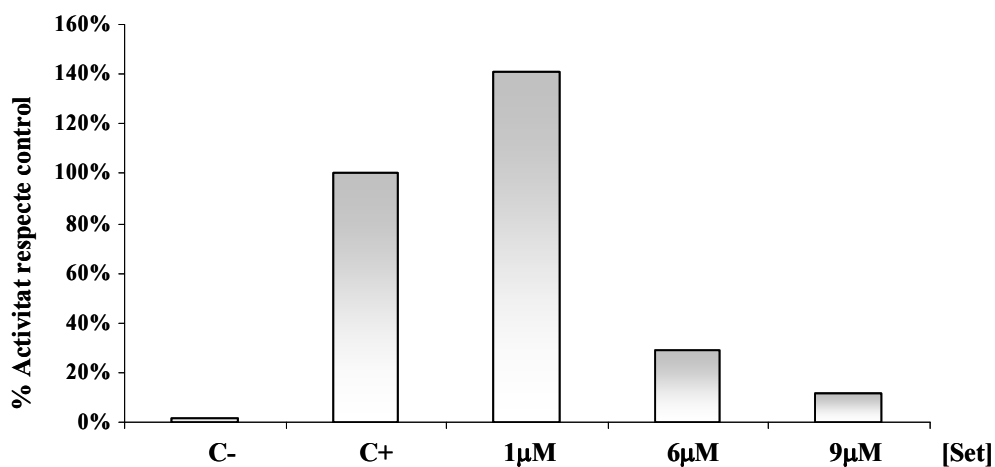


Fig 3.9: Efecte de Set sobre l'activitat HAT de PCAF. Anàlisi de l'activitat histona acetil transferasa de PCAF *in vitro*. Resultats expressats com a percentatge relatiu de la reacció en absència de Set (C+).

Vam repetir els mateixos experiments d'acetilació *in vitro* però utilitzant com a font enzimàtica el domini catalític de PCAF (domini HAT). Al quantificar aquests resultats, vam comprovar que Set també inhibia l'activitat catalítica del domini HAT. Figura 3.10.

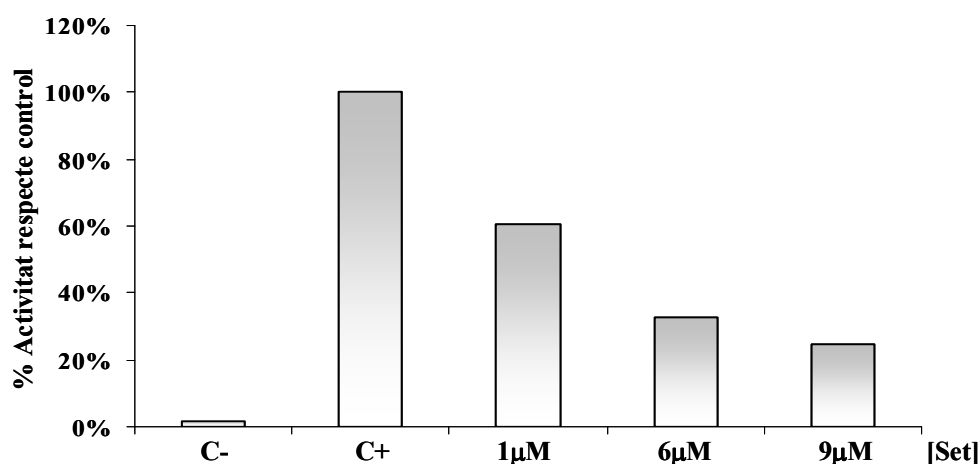


Fig 3.10: Inhibició de l'activitat del domini catalític de PCAF per la proteïna Set. Anàlisi de l'activitat histona acetil transferasa *in vitro*. Resultats expressats com a percentatge relatiu de la reacció en absència de Set (C+).

A continuació, es van realitzar assaigs HAT *in vitro* similars als anteriors però afegint concentracions creixents de la proteïna recombinant GST-p27 i sense la presència de Set. Vam observar que p27^{kip1}, per si sola, era capaç d'inhibir l'activitat acetilasa de PCAF i del seu domini catalític. Com mostrem a les Figures 3.11 i 3.12, la proteïna p27^{kip1} purificada a una concentració de 6 µM és capaç d'inhibir l'acetilació de les histones un 50%, aproximadament, *in vitro*.

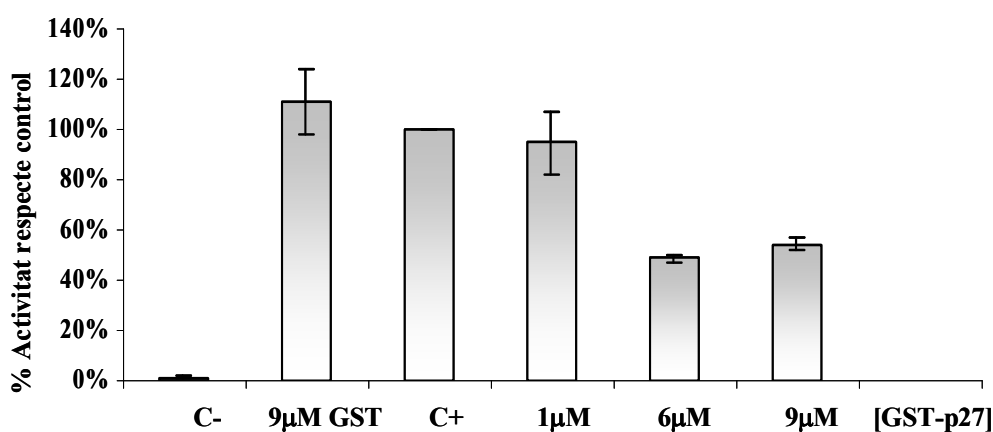


Fig 3.11: Efecte de p27^{kip1} sobre l'activitat enzimàtica de PCAF. Anàlisi de l'activitat acetilasa de PCAF en presència de diferents concentracions de GST-p27. Resultats expressats com a percentatge relatiu de la reacció en absència de GST-p27 (C+).

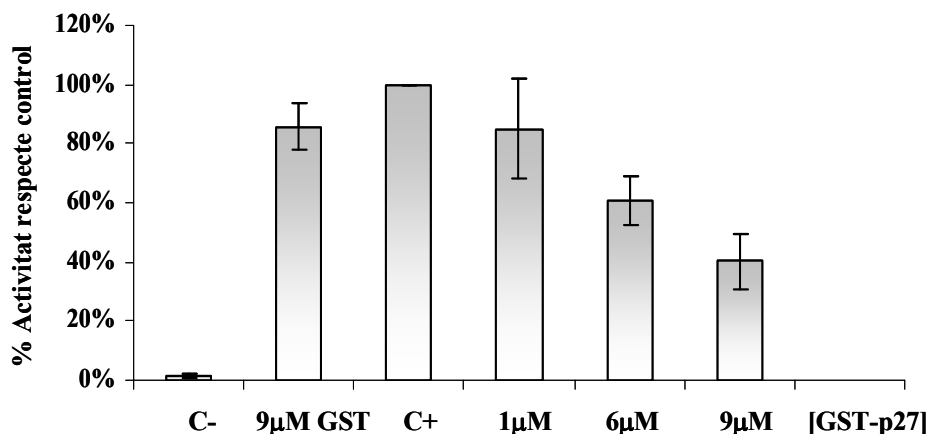


Fig 3.12: Efecte de p27^{kip1} sobre l'activitat del domini catalític de PCAF. Anàlisi de l'activitat del domini HAT de PCAF en presència de diferents concentracions de GST-p27. La mateixa reacció es va realitzar amb GST com a control negatiu de l'experiment. Resultats expressats com a percentatge relatiu de la reacció en absència de GST-p27 (C+).

Després de considerar la possibilitat de que p27^{kip1} fos un regulador del coactivador transcripcional PCAF, vam decidir aprofundir en l'estudi de la relació d'aquestes proteïnes a nivell d'interacció, funcionalitat i sentit fisiològic.

En primer lloc vam realitzar estudis de cromatografia d'afinitat. Es van carregar 10 mg d'extractes de la línia cel·lular HCT116 a columnes acoblades a p27 purificada i a columnes control de sefarosa (C-). Per tal de descartar possibles unions inespecífiques es van realitzar rentats abundants (tampó amb 300 mM KCl). A continuació, es va procedir amb l'elució amb elevades concentracions de sal (tampó 1.5 M KCl).

Les proteïnes procedents de l'extracte cel·lular (*Input*), les fraccions no unides a les columnes (NB) i la fracció unida (B) van ser analitzades mitjançant tècniques electroforètiques i de *Western-blot* (WB).

Com s'aprecia a la Figura 3.13, PCAF s'enriqueix clarament a la fracció unida de la columna de p27 a diferència de la columna control, indicant que PCAF és una proteïna d'unió de p27^{kip1}.

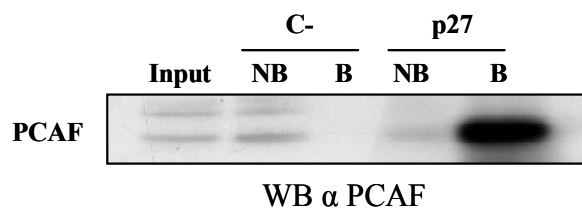


Fig 3.13: Unió de PCAF a una columna de p27^{kip1}. Extractes de cèl·lules HCT116 van ser carregats a columnes de p27 o columnes control. Les proteïnes no unides (NB) i les unides a la columna (B) van ser separades en gels de SDS-acrilamida i a continuació analitzades per *Western-blot* (WB) amb anticossos específics de PCAF.

Per tal d'analitzar si la interacció entre PCAF i p27^{kip1} era directa o indirecta, es van realitzar assaigs de cromatografia d'afinitat *in vitro*. Seguint el protocol anterior (Figura 3.13), es van carregar 10 μ g de proteïna recombinant GSTPCAF per columnes de GST-p27 i de GST, com a control de l'experiment. Tal i com es mostra a la Figura 3.14, GSTPCAF apareix associada a la columna GST-p27 i no a la columna control.

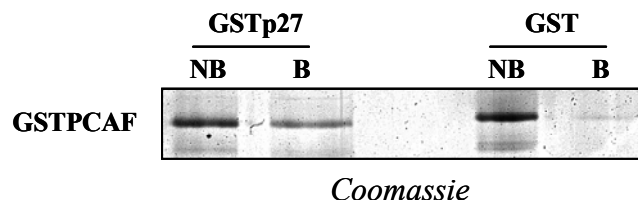


Fig 3.14: Unió directa de PCAF a p27^{kip1}. GSTPCAF purificada va ser carregada a columnes de GST-p27 o GST. Les mostres de les fraccions no unides (NB) i unides (B) van ser resoltes en gels de SDS-acrilamida i posteriorment visualitzades amb tinció de *Coomassie Blue*.

Per tal de conèixer el mecanisme per el qual p27^{kip1} modula l'activitat acetilasa de PCAF, vam estudiar si p27^{kip1} s'unia a PCAF pel seu domini catalític. Per aquest motiu, es van realitzar els mateixos assaigs de cromatografia d'afinitat però incubant les columnes amb el domini catalític de PCAF.

El fragment de PCAF que compren els residus 352-658 (domini HAT) va ser purificat en forma de proteïna de fusió (GSTHAT). Es van passar 10 µg de GSTHAT per columnes de GST-p27 i GST.

Com s'observa a la Figura 3.15, el domini HAT de PCAF s'uneix de forma específica a la columna de GST-p27 i no a la columna control, indicant que p27^{kip1} s'uneix de forma directa a PCAF pel seu domini catalític, domini HAT, *in vitro*.

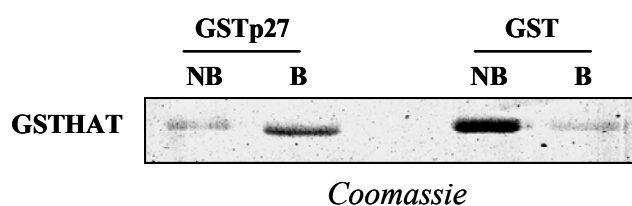


Fig 3.15: p27^{kip1} s'uneix de forma directa al domini HAT de PCAF. Es van carregar 10 µg de GSTHAT a columnes de GST-p27 o GST. Les mostres de les fraccions no unides (NB) i unides (B) van ser resoltes en gels de SDS-acrilamida i posteriorment visualitzades amb tinció de *Coomassie Blue*.

Per tal de determinar si la unió entre p27^{kip1} i PCAF es donava *in vivo*, es van realitzar assaigs de immunoprecipitació (IP).

En primer lloc vam transfectar cèl·lules HCT116 amb el vector d'expressió FlagPCAF. A partir d'aquests extractes cel·lulars es van realitzar immunoprecipitacions amb anticossos anti-Flag. Els nivells de p27^{kip1} associats a PCAF es van analitzar mitjançant tècniques de *Western-blot*. Com es pot apreciar a la Figura 3.16a, p27^{kip1} coimmunoprecipita amb FlagPCAF.

Per estudiar la interacció entre les proteïnes endògenes, PCAF i p27^{kip1}, es van realitzar assaigs de immunoprecipitació utilitzant anticossos específics de PCAF en cèl·lules HCT116. Com s'observa a la Figura 3.16b, p27^{kip1} coimmunoprecipita amb PCAF indicant que p27^{kip1} i PCAF formen part del mateix complex *in vivo*.

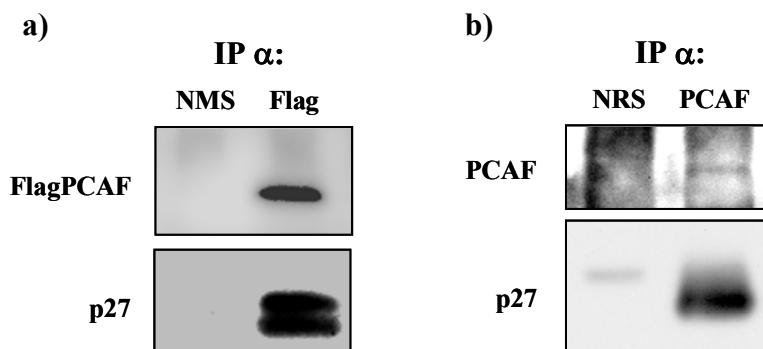


Fig 3.16: Associació *in vivo* de PCAF i p27^{kip1}. a) Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb el vector FlagPCAF durant 24 h. Els extractes cel·lulars van ser immunoprecipitats amb sèrum de ratolí (NMS), com a control negatiu, o amb l'anticòs anti-Flag. Seguidament, les mostres van ser analitzades per tècniques de *Western-blot* amb anticossos específics de PCAF i p27^{kip1}. b) Extractes de cèl·lules assincròniques HCT116 van ser immunoprecipitats amb sèrum de conill (NRS) o bé, amb l'anticòs PCAF. La presència de p27^{kip1} en els precipitats va ser analitzada per tècniques de *Western-blot*.

Després d'aquests resultats, podríem concloure que l'inhibidor de complexes Cdk-ciclina, p27^{kip1}, tindria una nova funció que seria la d'inhibir l'activitat acetilasa de l'enzim PCAF mitjançant la unió, de forma directa, al seu domini catalític. Si aquesta hipòtesi és certa, p27^{kip1} hauria de ser capaç d'inhibir l'autoacetilació de l'enzim PCAF.

Per tal de que PCAF sigui actiu i pugui acetilar els seus substrats, necessita ser acetilat al seu domini catalític (en forma *cis* i *trans*) (Santos-Rosa et al., 2003). Per visualitzar aquest fenomen, varem realitzar assaigs d'acetilació *in vitro*, on durant 30 min posàvem en contacte l'enzim GSTHAT, en presència d'acetil CoA¹⁴C i concentracions creixents de GST-p27.

Com es mostra a la Figura 3.17, no només les diferents concentracions de p27^{kip1} no modifiquen l'estat d'autoacetilació de l'enzim (GSTHAT), sino que p27^{kip1} es acetilada *in vitro* per PCAF de manera dosi depenent. És a dir, p27^{kip1} és un substrat de PCAF *in vitro*.

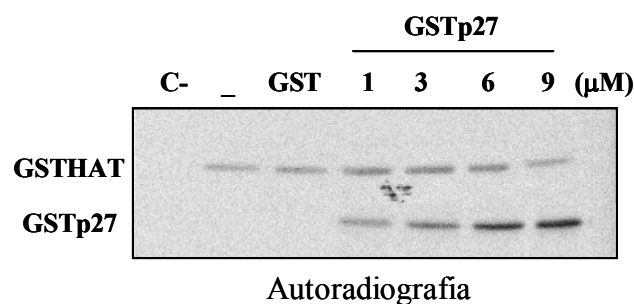


Fig 3.17: Acetilació *in vitro* de p27^{kip1} per PCAF. Per analitzar l'acetilació de p27^{kip1} per PCAF vam incubar la proteïna recombinant GSTHAT amb les diferents concentracions indicades de GST-p27 i en presència d'acetil CoA¹⁴C. Com a controls de l'experiment, es va realitzar un assaig sense l'enzim GSTHAT (C-), una reacció sense cap tipus de substrat (-) i una amb GST com a substrat. L'autoacetilació de GSTHAT i l'acetilació de p27^{kip1} van ser analitzades mitjançant una autoradiografia.

Per tant, p27^{kip1} és un substrat de l'acetilasa PCAF i no un inhibidor. Els assaigs d'activitat HAT *in vitro* (Fig 3.11 i 3.12) en els quals disminueix l'acetilació de les histones, segurament és degut a un fenomen de competència pel substrat.

4. Acetilació de p27^{kip1} per PCAF.

Per tal d'estudiar si p27^{kip1} era acetilada per PCAF *in vivo*, cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb un fragment de PCAF que conté el domini carboxi terminal de l'enzim (GFPCtWT). Es van realitzar assaigs d'immunoprecipitació (IP) a partir dels extractes cel·lulars amb anticossos específics de p27^{kip1} i a continuació, mitjançant tècniques de *Western-blot* es va analitzar l'estat d'acetilació de p27^{kip1} amb anticossos anti-acetil-lisina (AcLys).

Com es demostra a la Figura 3.19, p27^{kip1} s'acetila *in vivo*. L'acetilació *in vivo* de p27^{kip1} augmenta quan hi ha una sobreexpressió de PCAF. En canvi, quan realitzem el mateix experiment però transfectant una forma inactiva de PCAF, el vector d'expressió GFPCtΔHAT (extrem carboxi terminal de PCAF amb el domini catalític HAT

deleccionat), no s'observa cap increment d'acetilació de p27^{kip1}. Aquests resultats ens indiquen que l'acetilació de p27^{kip1} depèn de l'activitat acetilasa de l'enzim PCAF *in vivo*.

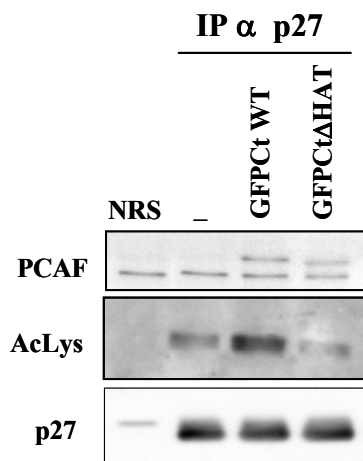


Fig 3.18: Acetilació de p27^{kip1} *in vivo*. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb el vector GFPcTWT o bé, amb la seva forma inactiva GFPcTΔHAT. Després de 8 h de transfecció es va afegir l'inhibidor de proteasoma ALLNL durant 16 h. Els extractes cel·lulars van ser immunoprecipitats (IP) amb anticossos anti-p27^{kip1} o amb sèrum de conill (NRS), com a control d'experiment. Els nivells totals de p27^{kip1} i els nivells de p27^{kip1} acetilada, van ser analitzats per tècniques de *Western-blot* mitjançant l'ús d'anticossos anti-p27^{kip1} o anti-acetil-lisina (AcLys), respectivament.

Per demostrar l'especificitat de l'enzim PCAF sobre el substrat p27^{kip1} *in vivo*, es van realitzar tècniques de RNA d'interferència (siRNA) amb l'objectiu de silenciar l'expressió de PCAF.

Vam transfectar cèl·lules HCT116 amb molècules petites de RNA de doble cadena específiques per a la seqüència del gen PCAF (siPCAF), durant 96 h. Com s'observa a la Figura 3.19a, mitjançant aquesta tècnica aconseguíem una disminució dels nivells de PCAF endògena d'aproximadament el 65%.

A continuació, vam analitzar el nivell d'acetilació de p27^{kip1} en extractes cel·lulars transfectats amb siPCAF mitjançant la immunoprecipitació de p27^{kip1} i posterior *Western-blot* amb anticossos anti-acetil-lisina. A la Figura 3.19b, es pot observar la disminució del

grau d'acetilació de p27^{kip1} a cèl·lules amb baixos nivells de PCAF (siPCAF) en comparació amb les cel·lules control (siGFP).

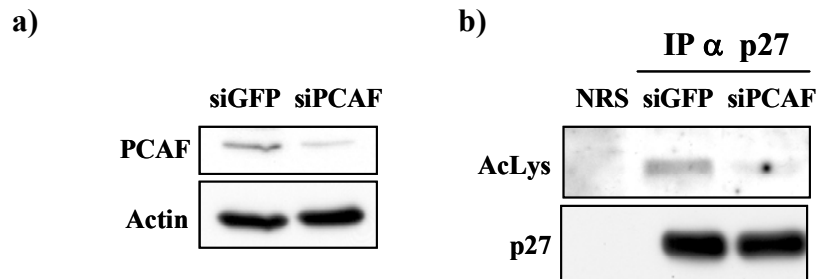


Fig 3.19: Acetilació de p27^{kip1} per PCAF *in vivo*. a) Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb siPCAF i amb siGFP durant 96 h. Els nivells de PCAF es van analitzar amb tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-PCAF. Es van fer *Western-blot*s anti-actina com a control de càrrega. b) Els extractes cel·lulars tractats amb siPCAF i siGFP, van ser immunoprecipitats amb anticossos anti-p27^{kip1} o bé amb sèrum de conill (NRS) com a control negatiu. Els nivells de p27^{kip1} totals i p27^{kip1} acetilada es van analitzar amb anticossos anti-p27^{kip1} o anti-acetil-lisina, respectivament.

Amb l'objectiu d'analitzar l'especificitat entre enzim (PCAF) i substrat (p27^{kip1}), vam estudiar si PCAF era capaç d'acetilar p21^{cip1}, membre de la mateixa família d'inhibidors que p27^{kip1}.

Es van realitzar assaigs d'acetilació *in vitro* utilitzant com a substrat de la reacció la proteïna recombinant GST-p21. Els resultats de la Figura 3.20, ens indiquen que PCAF acetila p27^{kip1} però no p21^{cip1}.

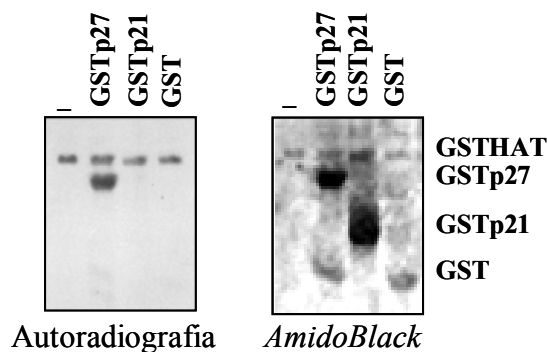


Fig 3.20: PCAF no acetila p21^{kip1} *in vitro*. Assaig d'acetilació *in vitro* incubant GSTHAT, com a enzima, i GST-p27, GST-p21 o GST com a substrats, en presència d'acetil CoA¹⁴C. Com a control de la reacció es va realitzar el mateix assaig en absència de cap substrat (-). Els nivells d'autoacetilació de GSTHAT i dels diferents substrats, van ser visualitzats mitjançant una autoradiografia (esquerra). A continuació, es va realitzar una tinció de la membrana amb *AmidoBlack* com a control de càrrega (dreta).

Per continuar amb l'anàlisi d'especificitat entre enzima i substrat, vam realitzar el mateix assaig d'acetilació *in vitro* però utilitzant com a font enzimàtica l'acetilasa CBP, que pertany a una altra família d'acetilases.

Com s'observa a la Figura 3.21, l'enzim CBP no és capaç d'acetilar p27^{kip1}.

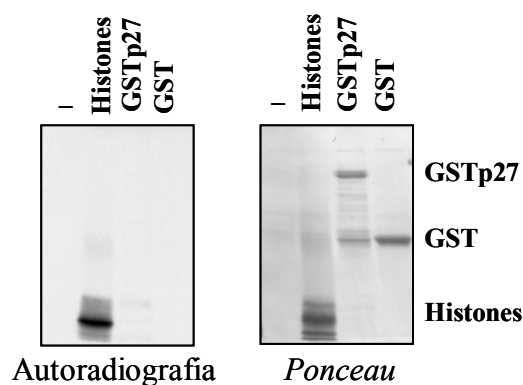


Fig 3.21: p27^{kip1} no es acetilada per CBP *in vitro*. Assaig d'acetilació *in vitro* incubant GSTCBP, com a font enzimàtica, i *pool* d'histones, GST-p27 o GST com a substrats, en presència d'acetil CoA¹⁴C. Com a control de la reacció es va realitzar el mateix assaig sense cap substrat (-). Els nivells d'acetilació dels diferents substrats, van ser visualitzats mitjançant una autoradiografia (esquerra). A continuació, es va realitzar una tinció de la membrana amb *Red Ponceau* com a control de càrrega (dreta).

5. PCAF acetila la lisina K100 de p27^{kip1}.

Un cop demostrada l'acetilació de p27^{kip1} per PCAF, vam voler identificar quins eren els residus acetilats. En primer lloc, es van realitzar assaigs d'acetilació *in vitro* utilitzant com a substrats dos fragments purificats de la proteïna p27^{kip1}, el fragment que pertany al domini amino terminal (1-110 aa) i el fragment que pertany al domini carboxi terminal (110-198 aa).

Els resultats obtinguts a la Figura 3.22, indiquen clarament que el domini que s'acetila és el domini amino terminal de p27^{kip1}.

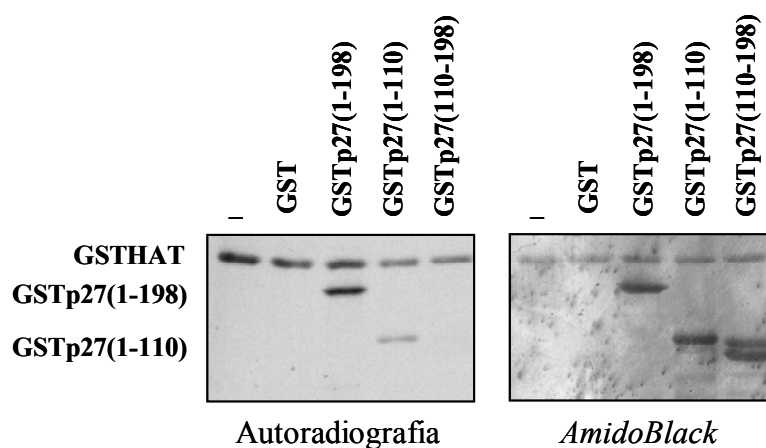


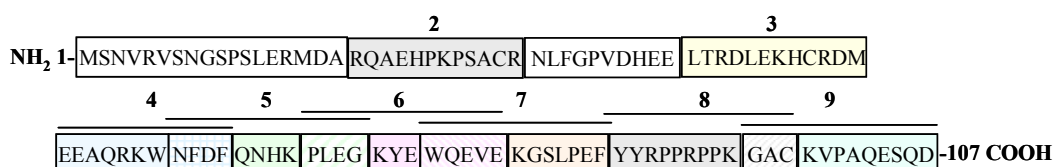
Fig 3.22: PCAF acetila lisines de l'extrem amino terminal de p27^{kip1}. L'enzim GSTHAT va ser incubat en presència d'acetil CoA¹⁴C amb GST, GSTp27 sencera (GSTp27(1-198)), el domini NH₂ de p27^{kip1} (GSTp27(1-110)), el domini COOH de p27^{kip1} (GSTp27(110-198)) o GST. Com a control de la reacció es va realitzar el mateix assaig sense la presència de cap substrat (-). Els nivells d'acetilació dels diferents substrats, van ser visualitzats mitjançant una autoradiografia (esquerra). A continuació, es va realitzar una tinció de la membrana amb *AmidoBlack* com a control de càrrega (dreta).

El domini amino terminal (NH₂) de p27^{kip1} conté 8 lisines susceptibles de ser acetilades per PCAF. Per poder esbrinar de quin/s residu/s es tractava/en, vam realitzar una tècnica anomenada *Spot Mapping*.

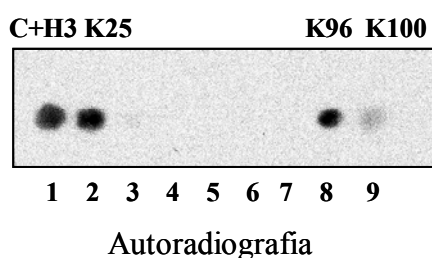
Es van sintetitzar 8 pèptids, on cada un contenia una lisina present al domini amino terminal de p27^{kip1}. Tots ells, van ser hibridats a una membrana de nitrocel·lulosa. Sobre aquesta membrana es va realitzar un assaig d'acetilació *in vitro*, incubant la membrana en presència d'acetilCoA radioactiu i de l'enzim de la reacció GSTHAT.

Com s'observa a la Figura 3.23b, els residus K25, K96 i K100 de p27^{kip1} són clarament acetilats per PCAF.

a)



b)



c)

- 1- H3: KSTGGKAPRKQ
- 2- K25: RQAEHPKPSACR
- 3- K47: LTRDLEKHCRDM
- 4- K59: EEASQRKWNFDQ
- 5- K68: NFDQNHKPLEG
- 6- K73: PLEGKYEWEVE
- 7- K81: WQEVEKGSLEPF
- 8- K96: YRPPRPPKGAC
- 9- K100: GACKVPAQESQD

Fig 3.23: Identificació del/s residu/s de p27^{kip1} acetilat/s *in vitro*. a) Pèptids de l'extrem amino terminal de p27^{kip1} dissenyats per a la tècnica de *Spot Mapping*. b) Assaig d'acetilació *in vitro* incubant GSTHAT, en presència d'acetil CoA¹⁴C, amb una membrana de nitrocel·lulosa. A la membrana hi ha hibridats 8 pèptids que contenen 8 lisines de p27^{kip1} (*spots* 2 al 9) i un pèptid de la histona H3 (*spot* 1), que conté la K14 acetilable per PCAF, com a control positiu de la reacció. Els nivells d'acetilació dels diferents pèptids van ser visualitzats mitjançant una autoradiografia. c) Seqüència dels pèptids hibridats a la membrana de nitrocel·lulosa.

Per confirmar que realment les lisines 25, 96 i 100 eren els residus específics de p27^{kip1} acetilats per PCAF, varem iniciar un anàlisi sintetitzant mutants de la proteïna

p27^{kip1} mitjançant tècniques de biologia molecular. En primer lloc, vam substituir les lisines 25, 96 i 100 per arginines, obtenint el triple mutant GSTp27-K25RK96RK100R (GSTp27-3R), o bé el doble mutant GSTp27-K96RK100R (GSTp27-2R) i mutants senzills GSTp27-K96R i GSTp27-K100R. A continuació, tots aquests substrats purificats en forma de proteïna recombinant, van ser sotmesos a un assaig d'acetilació *in vitro* per tal de comprovar si s'acetilaven, o bé les mutacions puntuals de les lisines ho impediien.

Com demostra la figura 3.24, els mutants GSTp27-3R, GSTp27-2R i GSTp27-K100R no son acetilats per PCAF *in vitro* a diferència de la construcció GSTp27-K96R i GSTp27 (sense cap mutació).

Això ens indica que el residu acetilat per PCAF és la lisina K100 de p27^{kip1}.

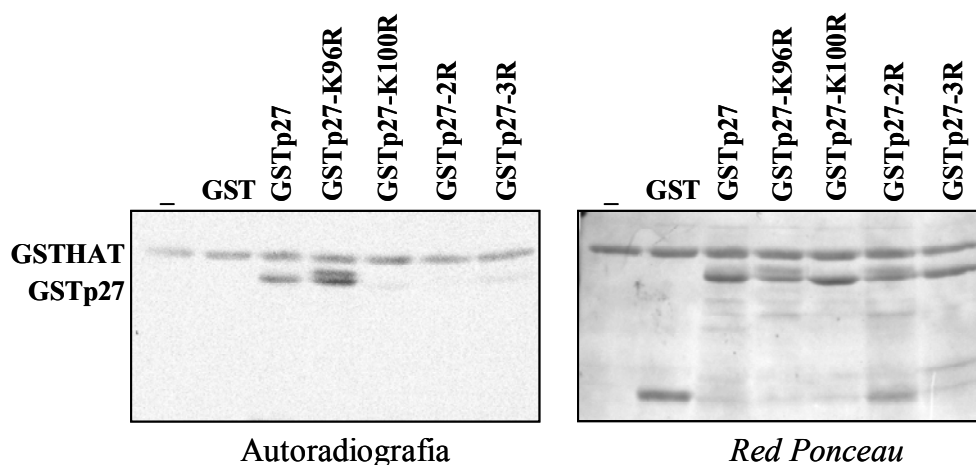


Fig 3.24: PCAF acetila p27^{kip1} a la lisina 100. Assaig d'acetilació *in vitro* incubant GSTHAT, en presència d'acetil CoA¹⁴C, amb les proteïnes GST, GSTp27, GSTp27-K96R, GSTp27-K100R, GSTp27-2R o GSTp27-3R, com a substrats. Com a control s'ha realitzat la mateixa reacció sense cap substrat (-). Els nivells d'acetilació de les diferents proteïnes van ser visualitzats mitjançant una autoradiografia. A continuació, es va realitzar una tinció de la membrana amb *Red Ponceau* com a control de càrrega de l'experiment.

6. L'acetilació de p27^{kip1} promou la seva degradació.

Quan una proteïna s'acetila pot patir conseqüències molt diverses, com un canvi de localització subcel·lular, permetre la unió a una altra proteïna, afavorir la unió al DNA (en el cas dels factors de transcripció), l'estabilització de la pròpia proteïna acetilada, o tot el contrari. En aquest estudi, vam voler esbrinar quin era el sentit funcional de l'acetilació de p27^{kip1} per PCAF.

Vam començar analitzant l'efecte de PCAF sobre l'estabilitat de p27^{kip1}. Al sobreexpressar la proteïna PCAF en cèl·lules HCT116 assincròniques s'observa una disminució dels nivells proteics de p27^{kip1}.

Com es mostra a la Figura 3.25, a cèl·lules transfectades amb el domini carboxi terminal actiu de PCAF (GFPCtWT) els nivells de p27^{kip1} disminueixen. Aquesta disminució de l'estabilitat de p27^{kip1} depèn de l'activitat acetilasa de PCAF, ja que quan les cèl·lules son transfectades amb el mateix domini de PCAF però inactiu (GFPCtΔHAT), els nivells de la proteïna no es veuen alterats.

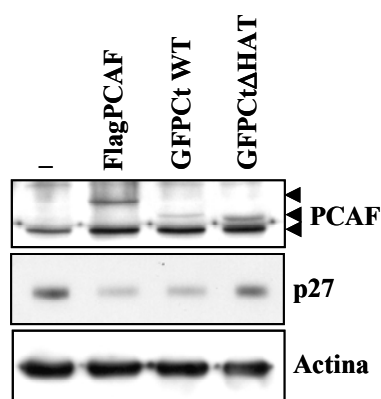


Fig 3.25: La sobreexpressió de PCAF provoca la disminució dels nivells de p27^{kip1}. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb el vector d'expressió de GFP (-), FlagPCAF, GFPCtWT o amb la forma inactiva GFPCtΔHAT. Després de 24 h, es van preparar els extractes cel·lulars i a continuació, van ser analitzats mitjançant tècniques de *Western-blot* utilitzant anticossos anti-p27. Es va realitzar un *Western-blot* amb anticossos anti-actina com a control de càrrega.

A continuació, vam estudiar el mecanisme per el qual els nivells proteics de p27^{kip1} es veien disminuïts per la sobreexpressió de PCAF. Volíem saber, si es tractava d'una regulació a nivell transcripcional o bé, a nivell post-traducciona.

Amb aquest objectiu, es van analitzar els nivells de RNA missatger (RNAm) a cèl·lules que sobreexpressaven PCAF mitjançant tècniques de *real time-PCR*. Els resultats de la Figura 3.26, mostren que els nivells de RNAm de p27^{kip1} no es veuen alterats per la sobreexpressió de PCAF.

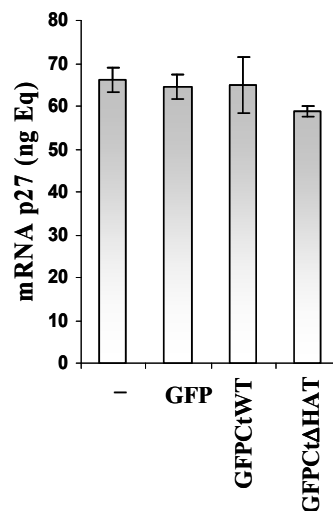


Fig 3.26: La sobreexpressió de PCAF no altera els nivells de RNA missatger de p27^{kip1}. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb el vector d'expressió de GFP (-), GFPCtWT o amb la forma inactiva GFPCΔHAT. Després de 24 h es va aïllar el RNAm de les diferents mostres. Els nivells de RNAm van ser quantificats mitjançant *real time-PCR*. Els resultats estan expressats com el promig de les unitats equivalents de nanogram (ng Eq) +/- la desviació estàndard de tres experiments independents.

Un cop vam descartar la regulació a nivell transcripcional de PCAF sobre p27^{kip1}, ens vam centrar en l'estudi de la regulació post-traducciona dels nivells de la proteïna p27^{kip1}.

Se sap que la vida mitja de la proteïna p27^{kip1} es de 2 a 4 h (Malek et al., 2001). En aquest treball, vam analitzar si la vida mitja de p27^{kip1} a cèl·lules HCT116 es veia afectada per la sobreexpressió de PCAF.

Per això, vam tractar cèl·lules transfectades amb el vector FlagPCAF o bé amb el vector buit, amb cicloheximida per tal d'inhibir la síntesi de proteïna. Aquest tipus d'experiment ens permet fer un estudi de la cinètica de degradació de la proteïna p27^{kip1} en diferents condicions cel·lulars.

Com s'observa a la Figura 3.27, el temps de vida mitja de p27^{kip1} disminueix en cèl·lules transfectades amb PCAF (~ 1 h) en comparació a les no transfectades (~ 3 h). Aquests resultats confirmen que PCAF regula l'estabilitat de la proteïna p27^{kip1}.

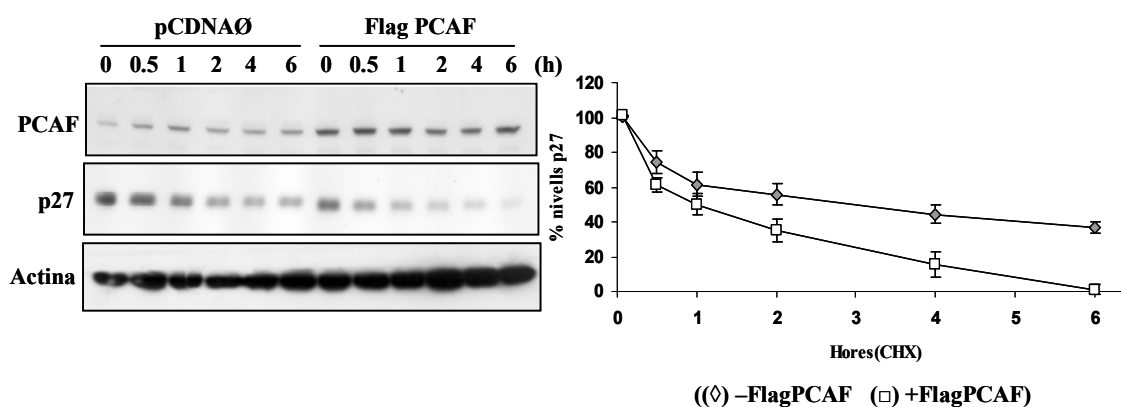


Fig 3.27: La sobreexpressió de PCAF redueix el temps de vida mitja de p27^{kip1}. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb el vector FlagPCAF o amb el vector pCDNA0, com a control. A les 24 h post-transfecció, les cèl·lules van ser tractades amb cicloheximida (10 µg/ml) i recollides a diferents temps. Les mostres van ser analitzades mitjançant tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-p27 i anti-PCAF. Es van realitzar *Western-blot* amb anticossos anti-actina com a control de càrrega. Els nivells de p27^{kip1}, observats en 3 experiments independents, van ser quantificats. Els resultats estan expressats com a percentatge relatiu dels nivells observats a temps 0 h. (□) p27^{kip1} de cèl·lules transfectades amb el vector buit (pCDNA0) i (◇) p27^{kip1} de cèl·lules transfectades amb FlagPCAF.

Per demostrar que la modulació dels nivells de p27^{kip1} era un efecte directe de PCAF sobre p27^{kip1}, vam voler comparar l'estabilitat de p27^{kip1} (p27WT) respecte l'estabilitat d'una p27^{kip1} no acetilable per PCAF (p27-K100R).

Es van transfectar cèl·lules HCT116 amb el vector buit pCDNAØ, pCDNAp27WT o bé amb pCDNAp27-K100R. A les 6 h, aquestes cèl·lules es van dividir en 4 parts per tal d'aconseguir 4 mostres comparables amb el mateix percentatge de transfecció per cada vector d'expressió. A les 20 h post-transfecció, van ser tractades amb cicloheximida i recollides a diferents temps com indica la figura 3.28.

Els resultats mostren que la proteïna exògena p27-K100R, la qual no pot ser acetilada per PCAF, és clarament més estable que la proteïna exògena p27WT acetilable. Així doncs, amb aquest experiment es demostra que l'acetilació de p27^{kip1} al residu K100 per PCAF indueix la seva desestabilització.

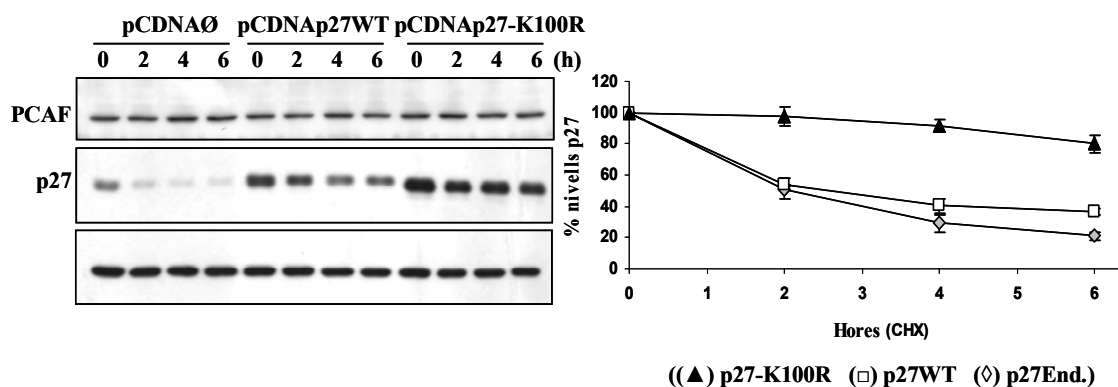


Fig 3.28: p27-K100R presenta un temps de vida mitja més llarg que p27-WT. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els vectors pCDNAp27WT, pCDNAp27-K100R, o amb pCDNAØ com a control. Després de 20 h post-transfecció les mostres van ser tractades amb cicloheximida i recollides a diferents temps. Els nivells de p27^{kip1} i PCAF van ser analitzats per *Western-blot* amb anticossos anti-p27 i anti-PCAF, respectivament. Es va realitzar un *Western-blot* amb anticossos anti-actina com a control de càrrega. Els nivells de p27^{kip1} observats en 3 experiments independents, van ser quantificats. Els resultats estan expressats com a percentatge relatiu dels nivells observats a temps 0 h. (◊) p27^{kip1} endògena, (□) p27WT exògena i (▲) p27-K100R exògena.

7. La degradació de p27^{kip1} acetilada es dona via proteasoma.

Una de les vies que regula els nivells de gran part de proteïnes a la cèl·lula, és la via de degradació de proteïnes a través del proteasoma (Cardozo and Pagano, 2004).

Per comprovar si la disminució dels nivells de p27^{kip1} provocats per l'acetilació de PCAF es donava via proteasoma, vam tractar cèl·lules HCT116 amb l'inhibidor específic de la subunitat 26S del proteasoma, ALLNL.

A la Figura 3.29, veiem com els nivells de p27^{kip1} en cèl·lules transfectades amb el vector FlagPCAF disminueixen. Si aquestes mateixes cèl·lules son tractades amb l'inhibidor ALLNL, l'efecte es reverteix i els nivells de p27^{kip1} augmenten. Aquests resultats ens indiquen que PCAF promou la degradació de p27^{kip1} i que aquesta degradació és dependent de la via del proteasoma.

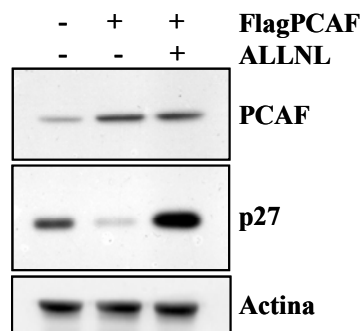


Fig 3.29: La degradació de p27^{kip1} induïda per PCAF es dona via proteasoma. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb el vector FlagPCAF. Després de 8 h, es va afegir l'inhibidor del proteasoma ALLNL (100 µM) durant 16 h. Els extractes obtinguts van ser analitzats amb tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-p27. Es va realitzar un *Western-blot* amb anticossos anti-actina com a control de càrrega.

Per veure si l'acetilació per si sola, com a senyal post-traduccional de p27^{kip1}, és suficient per induir la ubiquïtinització de p27^{kip1}, es van realitzar assaigs de ubiquïtinització *in vitro*. Vam utilitzar extractes de reticulòcits de conill com a font de la maquinària d'ubiquïtinització però no de degradació, en reaccions on teníem les proteïnes recombinants GSTp27WT o GSTp27-K100R, en presència o absència de PCAF.

Com s'observa a la figura 3.30, l'acetilació de p27^{kip1} per PCAF indueix la ubiquïtinització de p27^{kip1} *in vitro*. Aquesta ubiquïtinització de p27^{kip1} depèn del residu K100, ja que el mutant no acetilable per PCAF (GSTp27-K100R) no és capaç de ser ubiquïtinitzat.

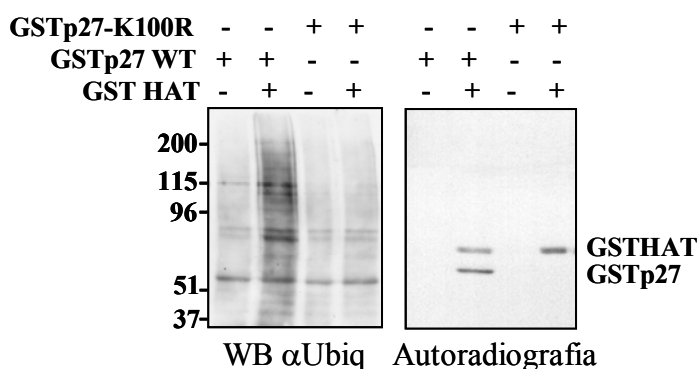


Fig 3.30: L'acetilació de p27^{kip1} indueix la seva ubiquïtinització. Es van realitzar assaigs d'acetilació *in vitro* amb acetil CoA radioactiu, GSTp27WT o GSTp27-K100R com a substrats i en presència o absència de GSTHAT. A continuació, es va realitzar un assaig d'ubiquïtinització *in vitro* mitjançant la incubació d'aquestes mostres amb extractes de reticulòcits. El 50% de la mostra obtinguda va ser analitzada per tècniques de *Western-blot* (WB) amb anticòccos anti-ubiquitina (Esquerra). La resta de la mostra es va utilitzar per visualitzar els nivells d'acetilació de p27^{kip1} mitjançant una autoradiografia (Dreta).

Després de descriure que l'acetilació de p27^{kip1} per PCAF *in vitro* indueix la seva ubiquïtinització, vam voler comprovar si aquest efecte es produïa *in vivo*. Per dur a terme aquest experiment, es van transfectar cèl·lules HCT116 amb el vector FlagPCAF o bé amb el vector pDNAØ, com a control. Després de 6 h, es va afegir al cultiu cel·lular l'inhibidor de proteasoma ALLNL. A les 24 h, es van obtenir els extractes cel·lulars i a continuació es va realitzar un assaig d'immunoprecipitació amb anticossos específics de p27^{kip1}. Per

analitzar l'estat d'ubiquïtinització de la proteïna immunoprecipitada es van fer *Western-blot* amb anticossos anti-Ubiquïtina.

Els resultats de la Figura 3.31, demostren com la presència de PCAF estimula la ubiquïtinització de p27^{kip1}.

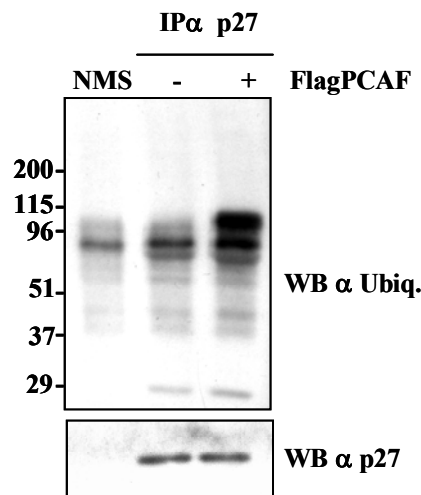


Fig 3.31: PCAF estimula la ubiquïtinització de p27^{kip1} *in vivo*. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els vectors de pCDNAØ (-) o FlagPCAF. Les diferents mostres es van tractar amb l'inhibidor del proteasoma ALLNL i a les 24 h es van preparar els extractes cel·lulars. Es van realitzar assaigs de immunoprecipitació amb anticossos anti-p27 o bé amb sèrum de ratolí (NMS) com a control de l'experiment. Vam analitzar les formes ubiquïtinitzades de p27^{kip1} mitjançant tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-ubiquïtina (Ubiq). Els nivells de p27^{kip1} immunoprecipitada van ser detectats amb anticossos anti-p27.

Vam voler aprofundir en l'estudi de la maquinària de degradació de p27^{kip1} acetilada per PCAF. L'objectiu d'aquest experiment era el d'esbrinar quina ubiquitin-ligasa era capaç de reconèixer p27^{kip1} acetilada al residu K100 per tal de portar-la a degradar via proteasoma.

Està descrit que p27^{kip1} fosforilada a la T187, és reconeguda per l'enzim E3 ubiquitin lligasa Skp2 (Carrano et al., 1999).

Per veure si la degradació de p27^{kip1} induïda per PCAF depenia de la ubiquitin lligasa Skp2, vam realitzar experiments amb RNA d'interferència. Es van transfectar cèl·lules HCT116 amb el vector FlagPCAF i posteriorment es van tractar durant 24 h amb petits RNAs d'interferència (siRNA) específics de Skp2 per tal d'impedir la seva expressió.

Com es demostra a la Figura 3.32, en cultius assincrònics d'HCT116, la sobreexpressió de PCAF estimula la degradació de p27^{kip1} endògena al igual que en cèl·lules on no s'expressa Skp2. Aquests resultats ens indiquen que la degradació de p27^{kip1} provocada per PCAF és independent de la ubiquitin-lligasa Skp2, ja que PCAF no requereix de la seva presència per degradar p27^{kip1}.

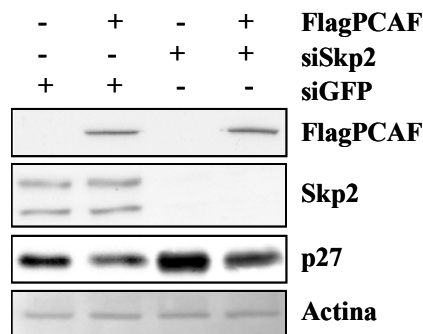


Fig 3.32: La degradació de p27^{kip1} induïda per PCAF és independent de Skp2.

Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els vectors pCDNAØ (-) o FlagPCAF. Es van tractar les mostres amb siSkp2, per inhibir l'expressió proteica de Skp2, i amb siGFP com a control de l'experiment. Per analitzar els nivells de p27^{kip1} es va realitzar un *Western-blot* amb anticossos anti-p27. Mitjançant anticossos anti-Skp2 es va comprovar la inhibició de la seva expressió a cèl·lules tractades amb siSkp2. Es va realitzar un *Western-blot* amb anticossos anti-actina com a control de càrrega.

8. Regulació dels nivells de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular.

La degradació de p27^{kip1} durant la fase G₁ és un esdeveniment essencial per a la progressió del cicle cel·lular (Pagano et al., 1995). És per això que vam voler estudiar si PCAF estava involucrada en la disminució dels nivells de p27^{kip1} observada en aquesta fase del cicle cel·lular.

El primer que vam fer va ser analitzar els nivells de PCAF i p27^{kip1} al llarg del cicle cel·lular. Per això es van sincronitzar cèl·lules HCT116 i es van obtenir mostres a diferents temps de sincronia que corresponien a les diferents fases del cicle cel·lular.

Com s'observa a la figura 3.33, els nivells de PCAF es mantenen constants al llarg de tot el cicle cel·lular. En canvi, els nivells de p27^{kip1} disminueixen al llarg del cicle. S'observa el nivell màxim de p27^{kip1} a les 0 h (cèl·lules quiescents), i disminueix progressivament a les 5 h (fase G₁), 12 h (fase S) i 17 h (fases G₂/M).

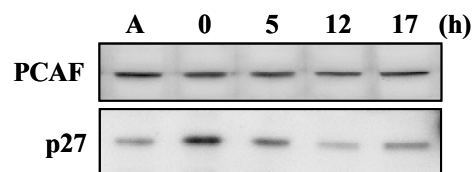


Fig 3.33: Nivells de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular. Cèl·lules HCT116 van ser sincronitzades en absència de factors de creixement i per confluència, durant 48 h. Les mostres van ser preparades després de diferents temps d'activació del cicle cel·lular. Els nivells de PCAF i p27 en cultius assincrònics (A) i sincrònics d'aquestes cèl·lules es van analitzar per *Western-blot* amb anticossos anti-PCAF i anti-p27.

Vam voler estudiar l'associació de p27^{kip1} a PCAF al llarg del cicle cel·lular. Per aquest motiu, extractes sincronitzats de cèl·lules HCT116, representatius de les diferents fases del cicle cel·lular, van ser immunoprecipitats amb anticossos específics de PCAF. Els nivells de p27^{kip1} associada a PCAF van ser mesurats mitjançant tècniques de *Western-blot*.

Els resultats de la Figura 3.34, revelen que p27^{kip1} es troba altament associada a PCAF a cèl·lules quiescents (0 h) i a cèl·lules després de l'estímul proliferatiu (5 h). Aquesta associació disminueix progressivament al llarg de les fases S (12 h) i G₂/M (17 h).

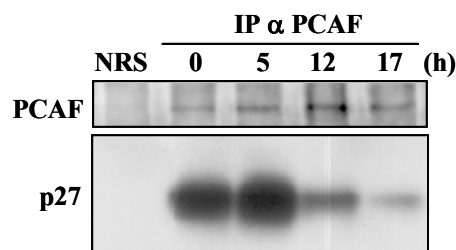


Fig 3.34: Associació de p27^{kip1} a PCAF durant el cicle cel·lular. Cèl·lules HCT116 van ser sincronitzades en absència de factors de creixement i per confluència, durant 48 h. Les mostres van ser preparades després de diferents temps d'activació del cicle cel·lular. A continuació, van ser immunoprecipitades amb anticossos anti-PCAF. Cèl·lules quiescents (0 h) es van immunoprecipitar amb sèrum de conill (NRS) com a control d'immunoprecipitació. Els nivells de p27^{kip1} van ser examinats mitjançant tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-p27.

A continuació vam analitzar l'activitat de PCAF al llarg del cicle cel·lular. Per això, extractes de cèl·lules HCT116 sincronitzades van ser immunoprecipitades amb anticossos específics de PCAF. Seguidament, amb aquests precipitats es va realitzar un assaig d'acetilació *in vitro* en presència d'acetil CoA radioactiu i un *pool* d'histones, com a substrat. La quantitat d'acetil CoA radioactiu incorporat a les histones ens indicava l'activitat de l'enzim PCAF a cada fase del cicle cel·lular.

Com s'aprecia a la gràfica de la Figura 3.35, tot i que existeix una activitat basal histona acetil transferasa al llarg de tot el cicle cel·lular, es dona un pic d'activitat PCAF després de 5 h de l'estímul mitogènic.

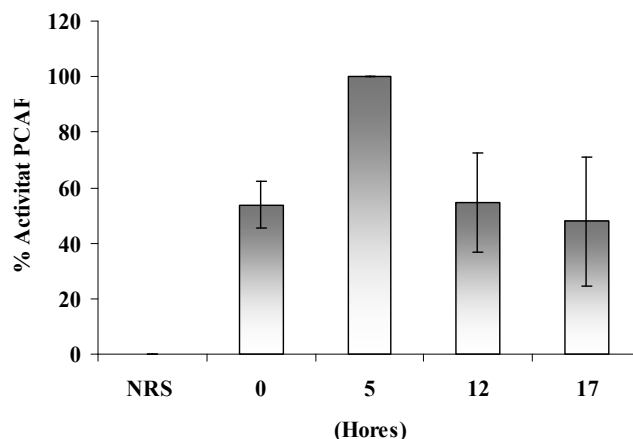


Fig 3.35: Activitat de PCAF durant el cicle cel·lular. Cèl·lules HCT116 van ser sincronitzades en absència de factors de creixement i per confluència, durant 48 h. Els extractes cel·lulars dels diferents temps d'activació del cicle cel·lular van ser immunoprecipitats amb anticossos anti-PCAF. Extractes cel·lulars procedents de cèl·lules quiescents (0 h) van ser immunoprecipitats amb sèrum de conill (NRS) com a control de la reacció. Els resultats estan expressats com a percentatge relatiu de l'activitat màxima observada a les 5 h.

Finalment, amb l'objectiu de mesurar l'acetilació de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular, cèl·lules HCT116 quiescents (0 h) i cèl·lules a diferents fases del cicle cel·lular van ser immunoprecipitades amb anticossos específics de p27^{kip1}. Seguidament, analitzàvem l'acetilació de p27^{kip1} en aquests precipitats mitjançant l'ús d'anticossos anti-acetil-lisina (AcLys).

Com s'observa a la Figura 3.36, tot i que p27^{kip1} ja estigui acetilada a cèl·lules quiescents, els nivells d'acetilació de p27^{kip1} augmenten després de l'estímul proliferatiu.

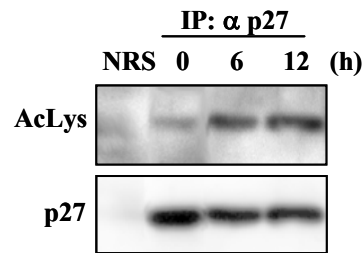


Fig 3.36: Acetilació de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular. Cèl·lules HCT116 van ser sincronitzades en absència de factors de creixement i per confluència, durant 48 h. Els extractes cel·lulars dels diferents temps d'activació del cicle cel·lular van ser immunoprecipitats amb anticossos anti-p27. Extractes cel·lulars procedents de cèl·lules quiescents (0 h) van ser immunoprecipitats amb sèrum de conill (NRS) com a control. Els nivells de p27^{kip1} acetilada i p27^{kip1} totals es van analitzar per *Western-blotting* amb anticossos anti-acetil-lisina (AcLys) i anti-p27, respectivament.

Per confirmar que l'acetilació de p27^{kip1} es donava en altres models cel·lulars, vam realitzar experiments semblants però utilitzant la línia cel·lular no transformada NIH3T3 (fibroblastes de rata). La Figura 3.37b, ens mostra resultats similars als obtinguts amb la línia cel·lular HCT116. La proteïna p27^{kip1} ja es troba acetilada a cèl·lules quiescents NIH3T3 i aquesta acetilació augmenta després dels estímuls mitogènics.

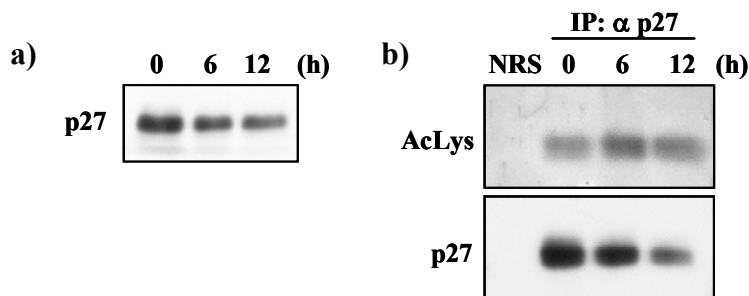


Fig 3.37: Acetilació de p27^{kip1} a cel·lules NIH3T3. Cèl·lules NIH3T3 van ser sincronitzades en absència de factors de creixement, durant 24 h. **a)** Les mostres es van preparar després dels diferents temps d'activació del cicle cel·lular. Els nivells de p27^{kip1} es van analitzar amb anticossos anti-p27. **b)** Els extractes cel·lulars van ser immunoprecipitats amb anticossos anti-p27. Extractes cel·lulars procedents de cèl·lules quiescents (0 h) varen ser immunoprecipitats amb sèrum de conill (NRS) com a control. Els nivells de p27^{kip1} acetilada i p27^{kip1} totals es van analitzar per tècniques de *Western-blot* amb anticossos anti-acetil-lisina (AcLys) i anti-p27, respectivament.

En resum, a cèl·lules quiescents p27^{kip1} es troba altament associada a PCAF i acetilada en baixa proporció. Després de l'estímul proliferatiu, augmenta l'activitat histona acetil transferasa de PCAF, p27^{kip1} es acetilada i com a conseqüència es degrada. Aquesta degradació de p27^{kip1} durant la fase G₁ (5 h) es pot observar a la Figura 3.33.

9. La sobreexpressió de PCAF regula l'activitat Cdk2

Un cop analitzada l'acetilació i degradació de p27^{kip1} durant la fase G₁ del cicle cel·lular, i sabent que durant aquesta fase del cicle la principal funció de p27^{kip1} es la d'inhibir la cinasa Cdk2, vam voler analitzar l'efecte de PCAF sobre l'activitat de Cdk2.

Així doncs, vam transfectar cèl·lules HCT116 amb els vectors d'expressió GFPcWT (domini de PCAF actiu) o bé amb GFPcΔHAT (forma inactiva de PCAF). Com es mostra a la Figura 3.38a, els nivells de p27^{kip1} disminueixen quan es sobreexpressa PCAF activa (GFPcWT) a diferència de les cèl·lules transfectades amb GFPcΔHAT (forma inactiva), que no disminueixen.

A continuació, vam realitzar una immunoprecipitació amb anticossos específics de Cdk2 i posteriorment, vam analitzar els nivells de p27^{kip1} associada a Cdk2 mitjançant *Western-blot* amb anticossos anti-p27.

Com es demostra a la Figura 3.38b, els nivells de p27^{kip1} associada Cdk2 es veuen clarament disminuïts quan se sobreexpressa PCAF activa, a diferència de les cèl·lules transfectades amb GFPcΔHAT, on p27^{kip1} es manté associada.

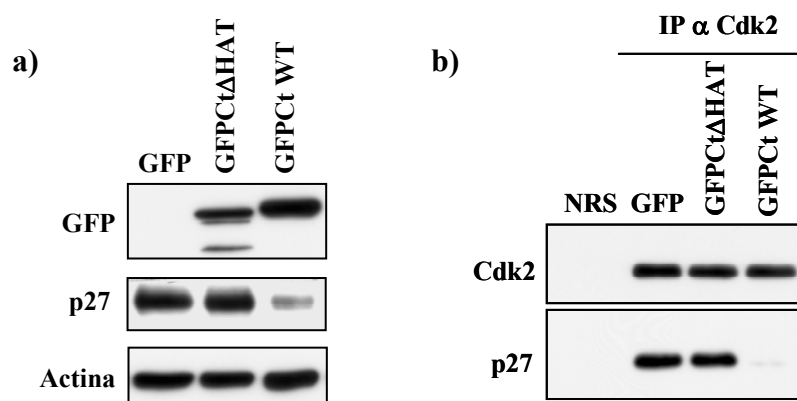


Fig 3.38: La sobreexpressió de PCAF fa disminuir l'associació de p27^{kip1} a Cdk2.

Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els vectors GFP Δ HAT, GFP Δ WT, o el vector buit GFP com a control. **a)** Les mostres es van preparar 24 h post-transfecció i es van analitzar mitjançant tècniques electroforètiques i de *Western-blot* amb anticossos anti-GFP i anti-p27. Es va realitzar un *Western-blot* amb anti-actina com a control de càrrega. **b)** Els extractes cel·lulars van ser immunoprecipitats (IP) amb anticossos anti-Cdk2. Les mostres transfectades amb GFP van ser immunoprecipitades amb sèrum de conill (NRS) com a control. Els nivells de Cdk2 totals i els nivells de p27^{kip1} associada van ser analitzats per *Western-blot* amb anticossos anti-Cdk2 i anti-p27, respectivament.

Després d'observar que la sobreexpressió de PCAF provocava la disminució dels nivells totals de p27^{kip1} així com la disminució de l'associació de p27^{kip1} a la cinasa Cdk2, vam analitzar l'activitat de Cdk2 en aquestes cèl·lules.

Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els vectors d'expressió GFP Δ WT i la seva forma inactiva, GFP Δ HAT. A continuació, es van immunoprecipitar els extractes cel·lulars amb anticossos anti-Cdk2 i es va mesurar l'activitat cinasa dels precipitats en presència d'ATP radioactiu i de la histona H1 com a substrat.

Els resultats de la figura 3.39, demostren que PCAF estimula l'activitat Cdk2, i que aquesta estimulació és dependent de la seva activitat histona acetil transferasa, ja que l'activació de Cdk2 no s'observa quan es transfecta la forma inactiva GFP Δ HAT.

El augment de l'activitat Cdk2 com a conseqüència de la sobreexpressió de PCAF, es correlaciona amb la degradació de p27^{kip1} (Figura 3.38a) i amb la disminució de p27^{kip1} associada a Cdk2 (Figura 3.38b).

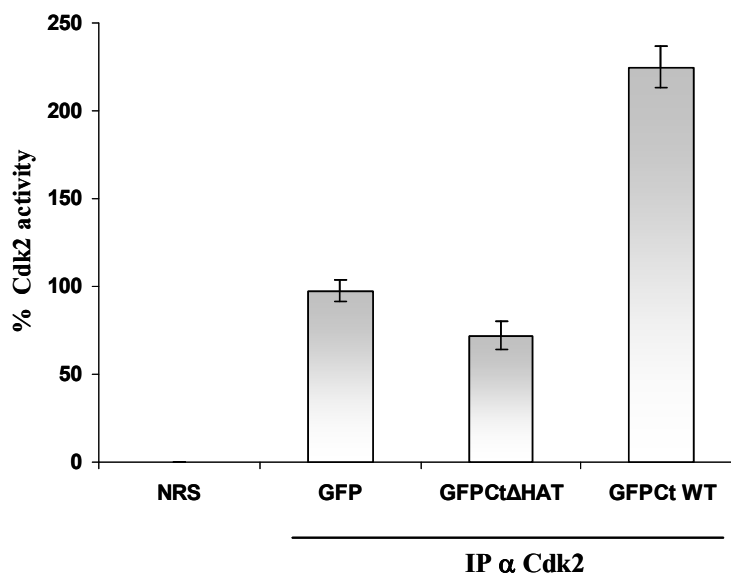


Fig 3.39 . La sobreexpressió de PCAF augmenta l'activitat Cdk2. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els vectors GFPCtΔHAT, GFPCtWT, o el vector buit GFP com a control. A les 24 h post-transfecció, els extractes cel·lulars van ser immunoprecipitats (IP) amb anticossos anti-Cdk2. Les mostres transfectades amb GFP van ser immunoprecipitades amb sèrum de conill (NRS) com a control. Es va mesurar l'activitat Cdk2 dels diferents precipitats. Els resultats estan expressats com a percentatge relatiu de l'activitat observada en les cèl·lules transfectades amb GFP (100%) i representen la mitja de tres experiments independents.

DISCUSSIÓ

L'inhibidor de Cdks, p27^{kip1} és una proteïna clau pel control del cicle cel·lular. La disminució dels nivells de p27^{kip1} després de l'estímul mitogènic permet la progressió del cicle cel·lular. Nivells anormalment baixos de p27^{kip1} han estat descrits en molts tipus de cèl·lules tumorals. El principal avenç del nostre treball ha estat el de definir un nou mecanisme a través del qual les cèl·lules poden regular els nivells d'aquest inhibidor. Els nostres resultats demostren que l'acetilació de p27^{kip1} a través de PCAF condueix a la seva degradació durant les primeres fases del cicle cel·lular.

El principal mecanisme per el qual els nivells de p27^{kip1} disminueixen, és la degradació de la proteïna a través de la via ubiquitin-proteasoma 26S. La degradació de p27^{kip1} dependent d'ubiquitinització es dona en dos passos consecutius, diferents en el temps i l'espai. El primer pas de degradació es produeix durant la transició G₀/G₁ en el citoplasma, a través del reconeixement d'una E3 ubiquitin lligasa anomenada KPC que la porta a degradar via proteasoma (Kamura et al., 2004). El mecanisme causant de que p27^{kip1} es degradi per aquesta via encara és desconegut. En canvi, el segon procés de degradació està molt ben caracteritzat. Després d'una primera tanda de degradació, p27^{kip1} es degrada durant les fases S i G₂/M en el nucli per un mecanisme que, en aquest cas, és dependent de SCF^{Skp2} que reconeix p27^{kip1} fosforilada a la treonina T187 pel complex Cdk2-ciclina E (Carrano et al., 1999). Els resultats obtinguts en aquest treball ens demostren que p27^{kip1} es acetilada a la lisina K100 i que aquesta acetilació és senyal d'ubiquitinització i posterior degradació via proteasoma.

PCAF acetila p27^{kip1} *in vitro* i *in vivo*

El primer objectiu d'aquest treball era el de identificar noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}. Com a resultat d'aquest estudi vam descriure que p27^{kip1} interacciona de forma directa amb el domini catalític de la histona acetil transferasa PCAF (p300/CBP *associated factor*). Com a conseqüència d'aquesta interacció PCAF acetila p27^{kip1} al residu lisina K100 *in vitro*. També l'acetila *in vivo* com hem demostrat en experiments on es sobreexpressa PCAF i augmenten els nivells d'acetilació de p27^{kip1}, o també, mitjançant

experiments de RNA d'interferència en els que quan disminuïm els nivells totals de PCAF endògena de la cèl·lula i observem que el grau d'acetilació de p27^{kip1} disminueix. A més, l'acetilació de p27^{kip1} és específica d'enzim i substrat, com mostrem en assaigs d'acetilació *in vitro* on la histona acetil transferasa CBP no es capaç d'acetilar p27^{kip1} i PCAF no acetila l'altre membre de la família Cip/Kip, p21^{Cip1}.

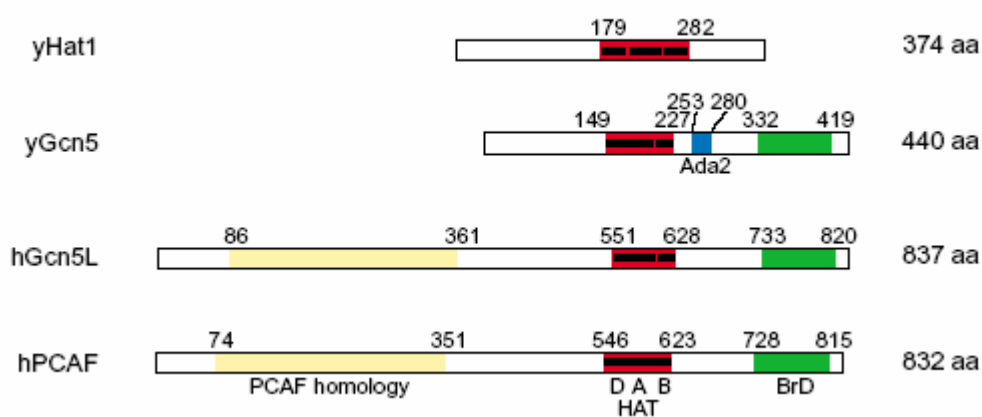
L'acetilació és una modificació post-traduccional que regula la funció de moltes proteïnes

L'acetilació dels grups ε-amino de les lisines és una modificació post-traduccional covalent, fenomen descrit principalment en eucariotes, que és dóna en la majoria de les histones i factors de transcripció, però també en un gran nombre creixent d'altres proteïnes (Carrozza et al., 2003). Des de 1995, han estat descobertes moltes proteïnes amb activitat acetil transferasa, i encara que la majoria d'aquests enzims van ser inicialment identificats com histona acetil transferases (HATs), també s'han identificat acetil transferases exclusives per a substrats no-histona (*Lysine acetil transferase*, LAT). Les acetil transferases poden ser dividides en varies famílies segons el tipus de dominis estructurals altament conservats que continguin. Tres de les famílies més amplies i més ben descrites, són la família GNAT (acetil transferases relacionades amb Gcn5) que inclou PCAF, la família p300/CBP i la família de proteïnes MYST (Yang, 2004).

La superfamília GNAT està formada per HATs que presenten una similitud a nivell de seqüència i d'estructura amb l'acetilasa Gcn5. Els membres d'aquesta família contenen un domini N terminal variable, un domini catalític anomenat HAT molt més conservat, una regió que interacciona amb el cofactor ADA2 i, a l'extrem carboxi, presenten un domini anomenat *Bromodomain*, el qual interacciona amb residus lisina acetilats. Aquests enzims són importants pel creixement cel·lular i el desenvolupament. Els ratolins *Knock-out* per Gcn5 es moren durant el desenvolupament embrionari (Carrozza et al., 2003). Dins d'aquesta família es troba la histona acetil transferasa PCAF (*p300/CBP associated factor*). PCAF va ser descrita per primera vegada a l'any 1996 com a proteïna associada a la histona acetil transferasa CBP, amb activitat HAT intrínseca, i la seva principal funció era

la de ser coactivador transcripcional (Yang et al., 1996). En aquest treball es va veure que PCAF interaccionava de forma competitiva amb l'oncoproteïna adenoviral E1A per la mateixa regió que ho feia CBP.

El paper de PCAF en la transcripció gènica ha estat àmpliament estudiat. La seva activitat HAT i la seva funció com a coactivador transcripcional s'han vist involucrades en processos com la miogènesis, en l'activació de receptors nuclears i en l'activació de la transducció de senyals dependents de factors de creixement, entre altres processos (revisat a Sterner and Berger, 2000). A més, s'ha demostrat que PCAF pot exercir la seva funció de coactivador transcripcional de forma independent a la seva activitat HAT i estimular la transcripció unint-se directament a promotors (Krumm et al., 1998). Tot i que PCAF va ser originalment identificada com a histona acetil transferasa, treballs recents mostren la seva capacitat d'acetilar una gran varietat de substrats no-histona, com per exemple proteïnes associades a cromatina com HMG17 i HMG I(Y), factors de transcripció relacionats amb el cicle cel·lular com p53 (en resposta a dany del DNA) i E2F (regulador de l'expressió de gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular), també acetila al factor de transcripció implicat en la diferenciació muscular MyoD, factors de transcripció més generals com TFIIE i TFIIIF i la proteïna del virus d'immunodeficiència adquirida Tat (Sartorelli et al., 1999; Martinez-Balbas et al., 2000; Kouzarides, 2000; Liu et al., 1999).



GNAT. El quadrat groc representa una regió homòloga a PCAF trobada a la majoria de HATs d'aquesta família. La regió del quadrat vermell representa el domini catalític anomenat HAT. El quadrat verd representa la regió que conté el domini Bromodomain (BrD) (Carrozza et al., 2003).

Fins fa poc la principal i única funció coneguda de les acetilases era la de ser reguladors de la transcripció gènica, però el descobriment de molts dels seus substrats les han relacionat en processos com la replicació del DNA, el control del cicle cel·lular, la reparació del DNA o l'estabilitat genòmica (Herceg and Wang, 2005). L'activitat i funció de les acetil transferases pot ser regulada per diferents mecanismes com: 1) la unió a coenzims, que pot estabilitzar a acetilases, com per exemple PCAF; 2) la formació de complexos, que permeten modular la seva activitat i la seva especificitat per substrat; 3) la unió a factors de transcripció com P/CIP, Twist, zta, proteïnes Hox...etc.; 4) per modificacions post-traduccionals (fosforilacions, acetilacions, ubiqüitinització o sumolització); 5) la degradació a través de caspases, calpaines o via proteasoma i 6) per la seva localització subcel·lular (revisat a Yang, 2004).

family	LAT	organism	substrate	Stoichiometric complex	Established roles/function
Hat1	Hat1	S.cerevisiae to mammals	H4	Hat B	Histone deposition, chromatin assembly and gene silencing
Gcn5/PCAF	Gcn5	S.cerevisiae	H4/H2B	SAGA, ADA, HAT-A2, SLIK/SALSA	Transcriptional co-activator
	PCAF	Mammals	H3/H4, TFs, E1A, TAT	PCAF	Transcriptional co-activator
	GCN5L	Worms to mammals	H3/H4, TFsa	STAGA, TFTC	Transcriptional co-activator
p300/CBP	CBP	C.elegans to mammals	Histones, TFs, E1A		Transcriptional co-activator
	p300	Mammals	Histones, TFs, E1A, TAT		Transcriptional co-activator
MYST	Sas2	S.cerevisiae	H4 K16b	SAS	Gene silencing
		S.cerevisiae	H3	NuA3	Transcriptional co-activator
		S.cerevisiae	H4/H2A	NuA4, piccolo NuA4	Transcriptional co-activator E4 ubiquitin ligase for p53
	Mof	Drosophila	H4 K16	MSL	Gene dosage compensation
	Chameau	Drosophila			PcG-dependent gene silencing
	Enok	Drosophila			Neuroblast proliferation
	TIP60	Mammals	H3/H4, androgen receptor	TIP60	Transcriptional co-regulator, DNA repair and apoptosis
	MOF	Mammals	H4	MAF2	Transcriptional co-activator
	HBO1	Mammals	H3/H4b		DNA replication, transcriptional co-repressor
	MOZ	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
	MORF	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
p160	SRC-1	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
	ACTR	Mammals	H3/H4		Transcriptional co-activator
CIITA	CIITA	Mammals	H4		Transcriptional co-activator
ATF2	ATF2	Mammals	H4/H2B		Transcriptional activator
TAFII250	TAFII230	Drosophila	H3/H4	TFIID	Transcription initiation
	TAFII250	Mammals	H3/H4	TFIID	Transcription initiation, kinase and ubiquitin ligase
TFIIIC	TFIIIC subunits	S.cerevisiae to mammals	H3/H4		Transcription initiation
Nut1	Nut1	S.cerevisiae	H3/H4	Mediator	Transcription initiation
Elp3	Elp3	S.cerevisiae to mammals	Histones	Elongator	Transcription elongation, lysine demethylase?
CDY	CDY	Humans	H4		
	CDYL	Mammals	H4		Histone-to-protamine transition during spermatogenesis
Hpa2	Hpa2	S.cerevisiae	H3/H4		Unknown
	Hpa3	S.cerevisiae			Unknown
TFIIB	TFIIB	S.cerevisiae to mammals	TFIIB		Transcription initiation
MCM3AP	MCM3AP	mammals	MCM3		DNA replication initiation
Eco1	Eco1	mammals	Cohesin subunits		Sister chromatid cohesion
ARD1	ARD1	mammals	HIF1a		pVHL association, ubiquitination and degradation

Taula 4.1: Classificació de les famílies d'acetil transferases descrites i les seves funcions. (Yang, 2004).

Conseqüències funcionals de l'acetilació d'una proteïna

Les conseqüències funcionals de l'acetilació d'una proteïna són molt variades. Quan una lisina d'una proteïna es acetilada es provoquen canvis que poden implicar tant un guany de funció com una pèrdua de funció de la proteïna.

- Regulació de la unió al DNA

Quan un grup ϵ -amino d'una lisina es acetilat la seva càrrega positiva es neutralitzada, així doncs aquesta modificació pot alterar la unió d'aquesta proteïna acetilada amb el DNA que està carregat negativament. Aquest és el cas de molts factors de transcripció. Hi ha casos on l'acetilació estimula la unió del factor de transcripció al DNA, com per exemple p53, E2F1, MyoD, EKLF i GATA1 (Martinez-Balbas et al., 2000; Gu and Roeder, 1997; Sartorelli et al., 1999; Boyes et al., 1998; Zhang and Bieker, 1998). En altres casos, s'ha vist que quan s'acetila una lisina del domini d'unió al DNA de factors de transcripció com per exemple, HMGI(Y), es perd la capacitat d'unió al DNA (Kouzarides, 2000).

- Regulació de la interacció entre proteïnes

En alguns casos, l'acetilació de lisines és capaç d'inhibir la oligomerització de proteïnes, ja que quan un grup ϵ -amino es acetilat no pot formar ponts d'hidrogen. Aquest és el cas de la proteïna Alba (Bell et al., 2002). També hi ha casos on l'acetilació impedeix la interacció entre proteïnes. En el cas del receptor d'androgens (AR), la seva acetilació inhibeix la seva unió a corepressors com NCoR i per una altra banda, l'acetilació del receptor d'estrògens (ER α) provoca la pèrdua de sensibilitat per unir-se als seus lligands (Fu et al., 2004b). En canvi, hi ha altres casos en els que l'acetilació afavoreix la unió entre proteïnes. Les proteïnes amb lisines acetilades seran reconegudes i s'uniran amb proteïnes que continguin dominis *Bromodomain*. Moltes proteïnes presenten un, o més d'un, domini *Bromodomain* on la seva seqüència aminoacídica determina la seva especificitat pel substrat (Dhalluin et al., 1999; Hassan et al., 2002; Zeng and Zhou, 2002). S'ha vist, que l'acetilació del

receptor nuclear AR afavoreix la seva interacció amb els seu coactivador p300 (Fu et al., 2004b) i que l'acetilació del factor de transcripció STAT3 indueix la seva dimerització i per tant, la seva activació (Yuan et al., 2005).

- Pèrdua d'activitat

Hi ha un únic cas, descrit fins ara, on l'acetilació provoca la pèrdua de funció d'una proteïna. L'Acetil-CoA Sintetasa es acetilada a la lisina K609 situada en el seu centre catalític i l'acetilació d'aquest residu implica la pèrdua de la seva funció enzimàtica (Starai et al., 2002).

- Regulació de la localització intracel·lular

Quan el receptor nuclear AR es acetilat en el seu domini NLS, la seva localització subcel·lular es veu afectada en alguns casos, dependent del model cel·lular i de la quantitat de receptor que expressin les línies cel·lulars (Fu et al., 2004b).

- Regulació de l'estabilitat proteica

En cèl·lules eucariotes els grups ϵ -amino de les lisines són susceptibles de ser ubiquïtinitzats, metilats o sumolitzats. Són modificacions post-traduccionals exclusives de residu, per tant existeix una important competència entre elles. S'ha vist, per exemple, que en les proteïnes SREBP, Smad7 i p53 l'acetilació i la ubiquïtinització competeixen pels mateixos residus, quan aquests son acetilats es protegeix la proteïna de la degradació i s'estabilitza (Gronroos et al., 2002; Giandomenico et al., 2003). L'acetilació de E2F1 augmenta la seva vida mitja (Martinez-Balbas et al., 2000) però en canvi, hi ha altres casos com per exemple l'acetilació de la proteïna HIF-1 α per l'acetilasa ARD1 que indueix la seva degradació (Jeong et al., 2002).

Type of protein		Functional consequence of acetylation
Core histone	H2A	Chromatin loosening/gene activation
	H2B	Chromatin loosening/gene activation
	H3	Chromatin loosening/gene activation
	H4	Chromatin loosening/gene activation, histone deposition/nucleosome assembly
Non-histone chromatin protein DNA-binding transcription factor Transcriptional co-regulator	HMG14 and HMG17	Inhibit nucleosome binding
	p53, ELKF, HMG1(Y), TCF, NF-kB, MyoD, GATA1, E2F1, HNF4 and ~30 others	Alter DNA binding, co-regulator interaction, ubiquitination, stability and nuclear localization
	ATCR	Inhibit coactivator association
	CIITA	Nuclear accumulation and ubiquitination
	b-Catenin	c-Myc gene activation
	RB	Inhibit phosphorylation and increase MDM2 association
	RIP140	Block CtBP association
General transcription factor	TFIIE	Not determined
	TFIIF	Not determined
	TFIIB	Stimulate TFIIF association and transcriptional activation
HAT autoacetylation	PCAF	Promote nuclear localization
	p300, CBP, MOZ, MORF, etc.	Not determined
Chromatin remodeler	Brm	Block transcriptional activation and growth inhibition
DNA replication factor	MCM3	Inhibit DNA replication
Chromatid cohesion protein DNA metabolic enzyme	Cohesin subunits	Not determined
	Flap endonuclease-1	Inhibit DNA binding and nuclease activity
	Thymine DNA glycosylase	Block interaction with the repair endonuclease APE
	Werner DNA helicase	Augment translocation into nuclear foci
Signaling regulator	Smad7	Prevent ubiquitination and proteasomal degradation
Cytoskeletal protein	α -Tubulin	Increase cell motility
Nucleocytoplasmic trafficking protein	Importin α	Not determined
Viral protein	HIV Tat	Regulate RNA binding, co-regulator interaction and transcriptional activation
	Adenoviral E1A	Inhibit CtBP association and stimulate nuclear accumulation
	Large T antigen	Stimulate DNA replication
Archaeal chromatin protein	Alba	Inhibit oligomerization and DNA binding
Bacterial protein	Acetyl-CoA synthetase	Inhibit enzymatic activity
	CheY	Regulate the chemotaxis response

Taula 4.2: Proteïnes substrat d'acetil transferases i les conseqüències funcionals de l'acetilació. (Yang, 2004)

L'acetilació de p27^{kip1} regula la seva estabilitat

Els nostres resultats encaixen amb aquesta última funció d'acetilació de proteïnes descrita, ja que la sobreexpressió de PCAF provoca una disminució dels nivells proteics de p27^{kip1}. Hem demostrat, mitjançant tècniques de RT-PCR, que els nivells de mRNA de p27^{kip1} en cèl·lules que sobreexpressen PCAF no varien i en canvi, quan aquestes mateixes cèl·lules les tractem amb l'inhibidor de proteasoma ALLN els nivells de p27^{kip1} augmenten. A més, la sobreexpressió de PCAF provoca una disminució de la vida mitja de p27^{kip1} (d'unes tres vegades aproximadament). Tot el contrari passa quan analitzem la vida mitja del mutant p27K100R no acetilable que es comporta de forma molt més estable que la p27^{kip1} salvatge.

L'acetilació de p27^{kip1} a la lisina K100 també és senyal d'ubiquïtinització com demostrem en experiments *in vitro* on el mutant p27K100R no s'ubiquïtinitza en presència de PCAF i *in vivo*, en els que la sobreexpressió de PCAF indueix l'acumulació de formes poliubiquïtinitzades de p27^{kip1}. Per tal de clarificar la via de degradació de p27^{kip1} dependent d'acetilació, vam sobreexpressar PCAF en cèl·lules Skp2^{-/-} demostrant que la degradació de p27^{kip1} acetilada es dona per una via independent de la E3 ubiquïtin lligasa SCF^{Skp2}.

Aquests resultats ens fan suggerir que la via de degradació de p27^{kip1} dependent d'acetilació a la lisina K100 però independent de Skp2 es dona durant les fases G₀ i G₁ del cicle cel·lular. Dos estudis demostren l'existència de dos vies de degradació de p27^{kip1}, una dependent de la fosforilació a la T187 per Cdk2 i una altre independent d'aquesta modificació. Malek et al., gràcies a la construcció d'un model de ratolins *Knock-in* pel mutant no fosforilable p27T187A, descriuen que la degradació de p27^{kip1} dependent de la fosforilació de la T187 només es dona durant les fases S i G₂ (Malek et al., 2001). Per una altra banda, Hara et al. demostren que la degradació de p27^{kip1} via proteasoma durant la transició G₀/G₁ es dona amb normalitat en cèl·lules Skp2^{-/-}. Els resultats del seu treball indiquen que la degradació de p27^{kip1} durant la fase G₁ és independent de la fosforilació en

el residu T187 i per tant de Skp2, però dependent de l'activitat del proteasoma 26S (Hara et al., 2001).

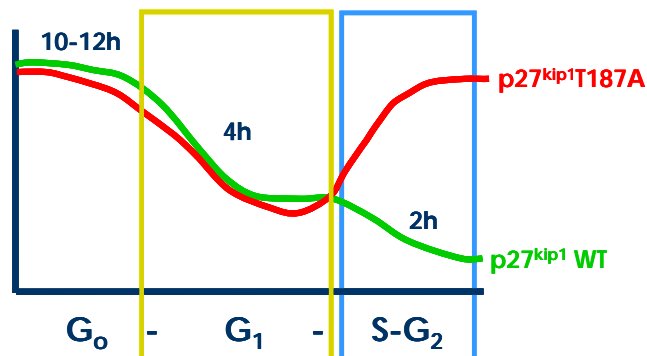


Fig 4.2: Estudi de la vida mitjana de p27^{kip1} en ratolins WT (color verd) i en ratolins p27^{T187A/T187A} (color vermell). La gràfica ens mostra l'existència de dos mecanismes de degradació de p27^{kip1}, un durant la fase G₁ i l'altre durant les fases S i G₂, dependent de la fosforilació a la T187. Les hores indiquen la vida mitjana de p27^{kip1} a les diferents fases del cicle cel·lular (Malek et al., 2001).

Recentment, s'ha descrit una E3 ubiquitin lligasa que degrada p27^{kip1} durant el G₀ i G₁ anomenada KPC (Kamura et al., 2004). A més, s'ha vist que per a la degradació de p27^{kip1} via KPC es requereix la interacció de la subunitat KPC-1 amb la regió de p27^{kip1} que inclou els aminoàcids 42-102 (Kotoshiba et al., 2005). Aquest domini de p27^{kip1} necessari per al reconeixement per KPC inclou el residu K100 (que és el residu acetilat per PCAF), suggerint l'acetilació de la lisina K100 de p27^{kip1} com a possible senyal d'ubiquitinització i degradació via KPC durant la fase G₁.

La localització de KPC i la ubiquitinització i degradació de p27^{kip1} durant el G₀ i G₁, és citoplasmàtica. Se sap que Jab1, conjuntament amb l'exportina CMR1, promouen l'exportació de p27^{kip1} accelerant la seva degradació al citoplasma. A més, el domini d'interacció de p27^{kip1} amb Jab1 (96-151 aa) també coincideix amb la regió de p27^{kip1} que s'acetila (Tomoda et al., 1999; Connor et al., 2003).

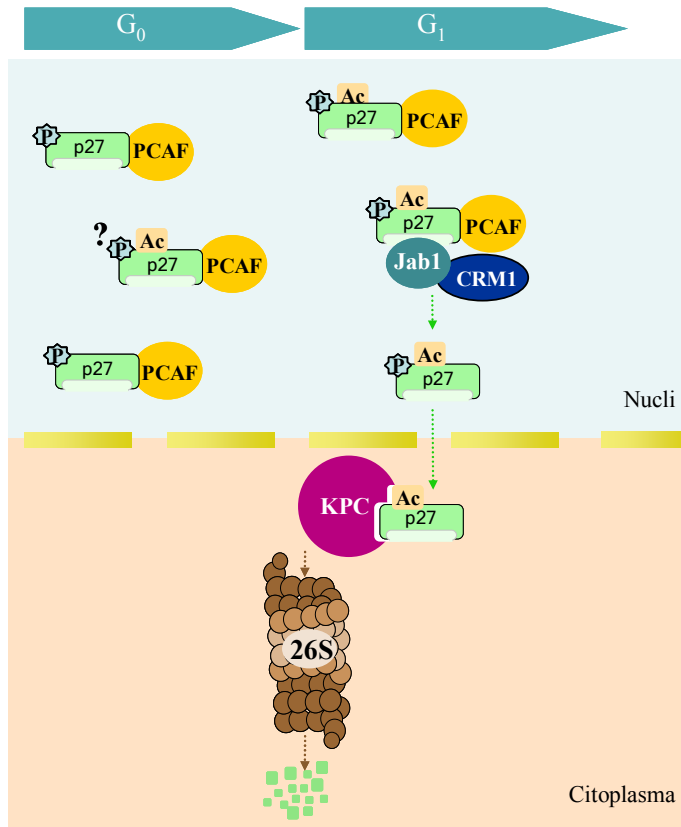


Fig 4.3: Esquema resum de la hipòtesi que plantegem. Jab1 i CRM1 promouen l'exportació de p27^{kip1} acetilada a la lisina K100. En el citoplasma, s'uneix a KPC i es degrada via proteasoma 26S.

L'acetilació i el cycle cel·lular

Tot i que l'acetilació, com a modificació post-traduccional, estigui principalment relacionada amb la regulació de la transcripció gènica, estudis recents impliquen l'acetilació i els enzims que la catalitzen amb importants processos cel·lulars com la replicació i reparació del DNA, l'estabilitat genòmica i la regulació del cycle cel·lular (Carrozza et al., 2003; Yang, 2004; Kouzarides, 2000).

L'acetilació regula la progressió del cicle cel·lular mitjançant la regulació de l'expressió gènica. Per exemple, l'acetil transferasa Gcn5 actua com a supervisor durant la progressió d'un cicle cel·lular normal controlant l'expressió dels gens relacionats amb el cicle cel·lular i l'apoptosi. En un treball recent amb cèl·lules de pollastre DT40 deficientes en Gcn5 es va observar una disminució de la proliferació cel·lular. Es va veure que la delecció del gen de Gcn5 regulava negativament gens involucrats en la progressió de les fases G₁ a S com per exemple, E2F-1, E2F-3, E2F-4, E2F-6, DP-2, ciclina A, ciclina D3, PCNA, cdc25B i p107, per una altra banda, regulava positivament l'expressió dels gens de cMyc, ciclina D2 i ciclina G₁. Tots aquests canvis en l'expressió gènica d'aquestes cèl·lules provocaven com a conseqüència l'aturada del cicle cel·lular en G₁/S (Kikuchi et al., 2005). També s'ha descrit que en llevats la deficiència de Gcn5 provoca l'aturada del cicle cel·lular però en les fases G₂/M (Zhang and Bieker, 1998). A més, fibroblastes de ratolins *Knock-out* per l'acetilasa p300 presenten un creixement cel·lular més lent que en cèl·lules normals i presenten un fenotip de senescència (Yao et al., 1998).

Hi ha molts treballs relacionats amb l'acetilació de factors de transcripció reguladors del cicle cel·lular. En cèl·lules de mamífer, Gcn5 conjuntament amb el cofactor TRRAP activen l'activitat transcripcional de E2F4, el qual regula l'activació temporal de gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular. A més, PCAF, CBP i p300 acetilen E2F1 augmentant la seva capacitat d'unió al DNA, la seva activitat transcripcional i la seva vida mitja (Martinez-Balbas et al., 2000). Les acetilases PCAF i CBP també acetilen p53 afavorint la seva unió al DNA i augmentant la seva vida mitja (Liu et al., 1999). Gcn5 i PCAF actuen com a coactivadors del factor de transcripció NF-Y, el qual regula l'expressió dels gens de ciclina A, cdc25 i cdc2 (Currie, 1998).

Les proteïnes *pocket*, com per exemple pRb, també son regulades per acetilació. S'ha vist que l'acetilació de pRb per p300/CBP impedeix la seva fosforilació pel complex Cdk2-ciclina E i per tant, provoca la inhibició de la transcripció de gens dependents de E2F. L'acetilació de pRb està regulada durant el cicle cel·lular, sent baixa en quiescència i augmentant en G₁, i també durant la diferenciació on els nivells de pRb acetilats augmenten (Chan et al., 2001). En un treball posterior, s'ha descrit que pRb també es

acetilat per PCAF i aquesta acetilació és necessària per que pRb indueixi la sortida del cycle cel·lular i activi la transcripció de gens tardans necessaris per a la diferenciació de cèl·lules musculars (Nguyen et al., 2004).

Diferents treballs demostren que ciclina D1 regula la progressió del cycle cel·lular mitjançant l'associació directa a histona acetiltransferases (HATs) i a histona deacetilases (HDACs), de forma independent a l'activitat cdk. S'ha vist que la ciclina D1 augmenta l'activitat transcripcional del receptor nuclear d'estrògens ER α mitjançant el reclutament de PCAF. Ciclina D1 interacciona de forma directa amb el domini HAT de PCAF i a la vegada amb el receptor ER α , potenciant la seva activitat (McMahon et al., 1999). Per una altra banda, ciclina D1 inhibeix l'activitat dependent de lligand del receptor nuclear d'andrògens AR, competint per la interacció amb els seus coactivadors com per exemple PCAF o afavorint la unió dels seus corepressors amb activitat deacetilasa (Fu et al., 2004a). A més, ciclina D1 inhibeix l'activitat del receptor PPAR γ mitjançant el reclutament de HDAC1, HDAC2 i HDAC3 durant la diferenciació d'adipòcits (Fu et al., 2005).

Aquests estudis demostren que l'acetilació representa un mecanisme d'activació transcripcional de gens necessaris per a la coordinació dels esdeveniments involucrats en la progressió del cycle cel·lular.

En aquest treball demostrem, per primera vegada, que l'acetilació regula de forma directa la maquinària del cycle cel·lular acetilant l'inhibidor p27^{kip1} i induint la seva degradació durant la fase G₁.

L'acetilació de p27^{kip1} regula la progressió del cicle cel·lular

En aquest treball també hem estudiat la implicació de l'acetilació de p27^{kip1} en la progressió del cicle cel·lular. En cèl·lules HCT116 i NIH3T3 sincronitzades, hem demostrat que p27^{kip1} ja està acetilada i associada a PCAF durant la quiescència. Aquests resultats indiquen que l'acetilació, per si sola, no és el senyal de degradació de p27^{kip1} que promou l'entrada en la fase G₁ de cèl·lules quiescents. Hem observat, que després de l'estímul proliferatiu l'acetilació de p27^{kip1} augmenta, indicant que els senyals mitogèniques activen algun factor desconegut necessari per promoure la degradació de p27^{kip1} acetilada. A més, hem comprovat que aquest augment dels nivells d'acetilació de p27^{kip1} durant la fase G₁ coincideix amb el pic màxim d'activitat histona acetil transferasa de PCAF observada en cèl·lules HCT116 sincronitzades.

Durant la fase G₁ del cicle cel·lular p27^{kip1} està associada als complexos Cdk2-ciclina E inhibint la seva activitat cinasa. La degradació de p27^{kip1} acetilada permetrà que una part d'aquests complexos quedin lliures i actius donant pas a l'entrada en la fase S. Com demostrem en els resultats obtinguts en aquest treball, la sobreexpressió de PCAF permet l'activació dels complexos Cdk2, demostrant que PCAF està involucrada en la regulació de l'activitat de Cdk2, al menys, pel fet de ser capaç de degradar p27^{kip1} i disminuir els nivells de p27^{kip1} associada als complexos inactius. Després d'aquesta primera fase de degradació de p27^{kip1}, els complexos Cdk2-ciclina actius seran els responsables de mantenir els nivells de p27^{kip1} baixos durant la progressió de les fases S i G₂/M, fosforilant-la a la T187 i induint la seva degradació via proteasoma en el nucli (Malek et al., 2001; Sheaff et al., 1997).

Hipòtesi de treball: Degradació de p27^{kip1} durant el cicle cel·lular

El model que proposem en aquest treball descriu un mecanisme mitjançant el qual una cèl·lula normal pot degradar la proteïna p27^{kip1} durant la fase G₁ del cicle cel·lular.

Estat G₀

Hem observat que, en cèl·lules quiescents, alts nivells de p27^{kip1} es troben associats a la histona acetil transferasa PCAF. Al G₀, p27^{kip1} ja es troba acetilada a la lisina K100 en baixos nivells i se sap, que p27^{kip1} també està fosforilada a la serina S10 en aquesta fase.

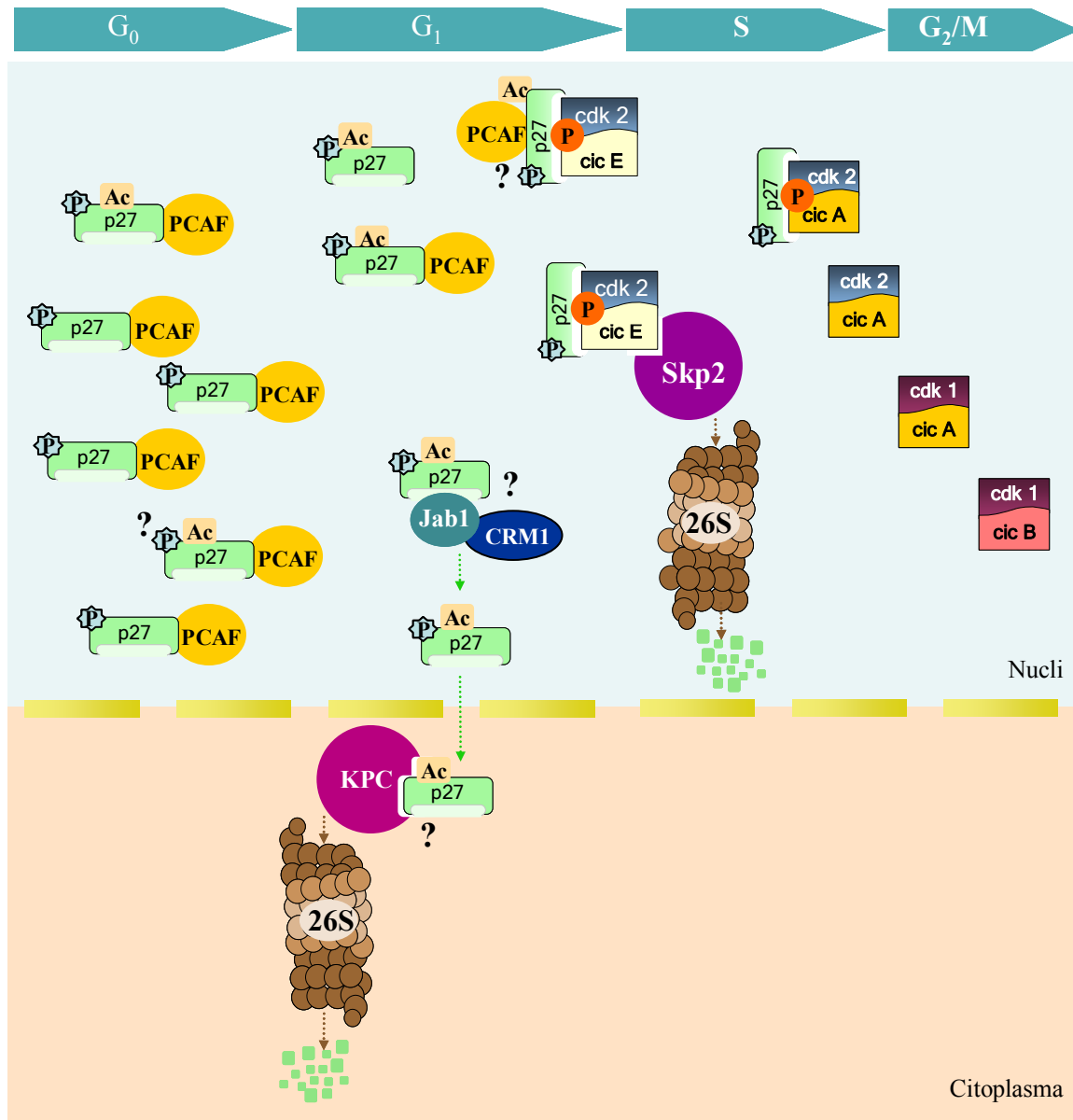
Fase G₁

La fase G₁ comença després de l'estímul proliferatiu, el qual provoca l'entrada de la cèl·lula des de l'estat de quiescència al cicle cel·lular. Hem demostrat que després de l'activació de la proliferació, l'acetilació de p27^{kip1} augmenta. L'augment d'acetilació de p27^{kip1} en aquesta fase coincideix amb una disminució dels seus nivells proteics. Hem vist que la degradació de p27^{kip1} acetilada a la lisina K100 es dona via ubiquitin-proteasoma i de forma independent de l'enzim E3 Ubiquitin Lligasa SCF^{Skp2}. Per una altra banda, s'ha descrit que durant la fase G₁ del cicle cel·lular p27^{kip1} es exportada al citoplasma gràcies a la formació del complex amb Jab1 i CRM1 i que un cop al citoplasma, p27^{kip1} es degradada via proteasoma a través de la unió a la E3 Ubiquitin Lligasa KPC (Connor et al., 2003; Tomoda et al., 1999; Kamura et al., 2004). Per tant, nosaltres postulem que p27^{kip1} acetilada a la lisina K100, i després de l'estímul mitogènic, s'uneix a Jab1 i CRM1 i es exportada al citoplasma on serà degradada pel complex de proteasoma 26S via KPC.

Transició G₁/S

Després d'aquest primer *pool* de p27^{kip1} degradat a través de la via d'acetilació per PCAF, la concentració de p27^{kip1} nuclear disminueix i apareixen complexos Cdk2-ciclina E actius. Cdk2 fosforilarà p27^{kip1} a la treonina T187 que serà senyal de degradació en el nucli a través del proteasoma 26S via SCF^{Skp2} (Carrano et al., 1999). Aquest segon pas de degradació de p27^{kip1} permetrà l'entrada en la fase S i la progressió del cicle cel·lular. Veure figura 4.4.

L'acetilació de p27^{kip1} forma part del primer mecanisme de degradació de p27^{kip1} descrit durant la fase G₁ via KPC, el qual permet l'activació dels primers complexos Cdk2-ciclina E donant lloc al segon mecanisme de degradació de p27^{kip1} via Skp2 i a l'entrada a la fase S i progressió del cicle cel·lular.



Lisina K100 acetilada
 Serina S10 fosforilada
 Treonina T187 fosforilada

Fig 4.4: Hipòtesi sobre la degradació de p27^{kip1} acetilada a la lisina K100 durant la progressió del cicle cel·lular.

La formulació d'aquest model ens fa plantejar altres preguntes que ens ajudin a entendre el mecanisme de la degradació de p27^{kip1} induïda per l'acetilació a la lisina K100.

- Quin sentit funcional te que en cèl·lules quiescents hi hagi tanta p27^{kip1} unida a PCAF?. Una possible explicació seria la de que p27^{kip1} actues com a factor repressor de PCAF durant el G₀, per tal d'inhibir l'activació de la transcripció dels gens regulats per PCAF. Seria una nova funció de p27^{kip1} molt semblant a la que desenvolupa ciclina D1 segregant PCAF i impeding l'activació del receptor d'andrògens AR dependent de lligand (Fu et al., 2004b). A més, encara no es coneix quin és el mecanisme per el qual, nivells elevats de p27^{kip1}, porten les cèl·lules a un estat de quiescència (Rivard et al., 1996). Aquesta hipòtesi definiria p27^{kip1} com a regulador de la transcripció gènica durant el G₀.

- Una altra qüestió que ens plantegem és la relació entre la fosforilació de la serina S10 i l'acetilació de la lisina K100 de p27^{kip1}. Són modificacions post-traduccionals dependents una de l'altre?. La fracció de p27^{kip1} acetilada al G₀ i a la fase G₁ del cicle cel·lular, es troba també fosforilada a la S10?. Per una banda, s'ha vist que en ratolins p27^{S10A/S10A} la fosforilació a la S10 de p27^{kip1} és dispensable per a la seva exportació al citoplasma (Kotake et al., 2005) però, és necessària aquesta fosforilació per a la degradació de p27^{kip1} acetilada per PCAF?

- Quina és la via d'activació de la degradació de p27^{kip1} acetilada durant la fase G₁? S'han descrit diferents vies de transducció de senyal com per exemple la via de Ras (mitjançant la fosforilació de p27^{kip1} a la S10), o la via de PI3K (a través del seu efector Akt/PKB, el qual promou la disminució dels nivells de p27^{kip1} inhibint la seva transcripció i induint la deslocalització citoplasmàtica de p27^{kip1} fosforilant-la a la treonina T157), o també la via de ErbB2/HER2, que provoca la disminució dels nivells de p27^{kip1} nuclears induint la seva exportació al citoplasma (Boehm et al., 2002; Liang et al., 2002; Medema et al., 2000; Le et al., 2005). Seria de gran interès descriure la via que promou la degradació de p27^{kip1} acetilada durant la fase G₁ pel disseny de futures teràpies clíniques.

Actualment, en el laboratori estem realitzant experiments que ens poden ajudar a confirmar la nostre hipòtesi sobre la via de degradació de p27^{kip1} acetilada a la lisina 100. Per una banda, hem dissenyat estudis per tal de clarificar si l'acetilació de p27^{kip1} indueix la seva translocació al citoplasma (com per exemple, mitjançant tractaments amb leptomicina B). Si és així, el nostre objectiu següent serà el d'estudiar si la proteïna Jab1, juntament amb l'exportina CRM1, promouen l'exportació de p27^{kip1} acetilada per PCAF. Per això, ens resultaria de gran ajuda, conèixer exactament quin és el domini de p27^{kip1} que interacciona amb PCAF per definir la possible formació de complexes amb Jab1 i CRM1 i també, per veure si p27^{kip1} acetilada i unida a PCAF està formant complex amb Cdk2-ciclina E. Per una altre banda, ja estem realitzant experiments amb l'objectiu d'esbrinar si KPC és realment la E3 ubiquitin lligasa que reconeix i porta a degradar p27^{kip1} acetilada. Gràcies a l'obtenció de totes aquestes dades podríem definir en quin moment i com afecta exactament l'acetilació de p27^{kip1} en la progressió del cycle cel·lular.

Considerant el paper principal de p27^{kip1} a l'hora de mantenir una cèl·lula en estat de quiescència, esbrinar la regulació i la via de la seva degradació durant la fase G₁ es un tema clau per entendre el control de la progressió del cycle cel·lular.

Està àmpliament acceptada la funció de p27^{kip1} com a gen supressor de tumors, no només per la seva activitat com a inhibidor de Cdks sinó també per la informació obtinguda dels models de ratolins p27^{-/-} i estudis clínics realitzats on es relaciona la disminució dels nivells de p27^{kip1} amb un mal pronòstic dels pacients amb diferents tipus de càncer. La delecció d'altres gens supressors de tumors, com p53 o pRb, és infreqüent en els càncers humans. Els nivells proteics de p27^{kip1} es troben disminuïts en cèl·lules tumorals i no hi ha evidències de mutacions puntuals, deleccions o translocacions del seu gen, suggerint que la desregulació de l'expressió de p27^{kip1} en tumors es deguda a mecanismes transcripcionals o bé post-traduccional. Gràcies als resultats obtinguts en aquest treball, obrim la possibilitat d'obtenir noves dianes terapèutiques amb l'objectiu d'impedir la disminució dels nivells de p27^{kip1} i evitar la transformació cel·lular, com per exemple KPC. La desregulació de les ubiquitin lligases que reconeixen proteïnes reguladores del cycle cel·lular és un procés que participa en l'aparició de tumors. En càncers humans, és freqüent l'amplificació dels gens o la sobreexpressió de les proteïnes E3

ubiquitin lligases. Com per exemple el cas de Skp2, considerat un oncogen, el qual la seva principal funció és la d'induir la degradació de supressors de tumors com per exemple p27^{kip1}, p21^{Cip1}, p57^{kip2}, i p130, per tal de promoure la proliferació cel·lular. La sobreexpressió de Skp2 està implicada en el mal pronòstic de càncer de mama, pròstata, limfomes i gliomes. En alguns casos, la disminució dels nivells d'expressió de p27^{kip1} en els càncers humans es correlacionen amb la sobreexpressió de Skp2, tot i que en molts altres casos aquesta correlació no existeix. Seria de gran interès estudiar els nivells d'expressió i la regulació de l'activitat E3 ubiquitin lligasa de KPC, donada la seva especificitat de substrat per p27^{kip1}, en aquests tumors. És difícil pensar que les ubiquitin lligases puguin ser bones dianes terapèutiques, degut a la quantitat i varietat de substrats que regulen però, per exemple, ja existeixen teràpies basades en petites molècules peptídiques inhibidores de la ubiquitin lligasa Mdm2 (anomenades *Nutlins*), les quals el seu mecanisme d'inhibició està basat en la competència pel lloc d'unió al seu substrat p53 (Yamasaki and Pagano, 2004). Actualment, tractaments clínics basats en la combinació d'inhibidors de proteasoma amb inhibidors de deacetilases, es troben en una fase d'investigació clínica molt avançada. En alguns casos de càncer, s'ha observat la desregulació de l'activitat histona acetil transferasa degut a l'amplificació, translocació o mutacions puntuals dels gens que codifiquen per les acetilases (com per exemple, el cas de mutacions inhibidores o delecions de p300 en càncer colorectal, gàstric o epitelial) (Di Gennaro et al., 2004; Iyer et al., 2004). Tot i així, resultaria difícil dissenyar una teràpia basada en inhibidors de PCAF amb l'objectiu de regular exclusivament els nivells de p27^{kip1} en els càncers humans, degut a la seva implicació en múltiples processos cel·lulars gràcies a la seva funció de regular la transcripció gènica.

L'apunt final

Els resultats presentats en aquest treball suggereixen que el motiu per el qual existeix una disminució dels nivells proteics de p27^{kip1} en cèl·lules tumorals, podria ser degut a la desregulació del seu estat d'acetilació i per tant, com a conseqüència, a un augment de la seva degradació via proteasoma.

CONCLUSIONS

- 1) Hem identificat un conjunt de noves proteïnes d'unió a p27^{kip1}. Els resultats suggereixen que p27^{kip1} pot estar implicada en processos cel·lulars com la transducció de senyals, el metabolisme, la transcripció gènica, l'*splicing* diferencial i la remodelació de cromatina.
- 2) p27^{kip1} interacciona de forma directa amb el domini catalític de l'acetilasa PCAF *in vitro* i formen part del mateix complex *in vivo*.
- 3) PCAF acetila p27^{kip1} *in vitro* i *in vivo* de forma específica. Experiments *in vitro* demostren que PCAF acetila el residu lisina K100 de p27^{kip1}.
- 4) L'acetilació de p27^{kip1} per PCAF afecta a la seva estabilitat proteica i indueix la seva degradació.
- 5) La degradació de p27^{kip1} acetilada es produeix via proteasoma. PCAF indueix la ubiquitinització *in vitro* i *in vivo* de p27^{kip1} de forma independent de l'enzim E3 ubiquitin lligasa Skp2.
- 6) p27^{kip1} ja es troba acetilada i associada a PCAF durant l'estat de quiescència. Després de l'estímul proliferatiu el grau d'acetilació de p27^{kip1} augmenta coincidint amb l'increment de la seva degradació durant el cicle cel·lular en cèl·lules HCT116 i NIH3T3.
- 7) La sobreexpressió de PCAF provoca un augment de l'activitat cinasa de Cdk2 degut a la disminució dels nivells proteics de p27^{kip1} a la cèl·lula i a la conseqüent disminució de l'associació del inhibidor p27^{kip1} als complexos Cdk-ciclina.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrawal, D., P.Hauser, F.McPherson, F.Dong, A.Garcia, and W.J.Pledger. 1996. Repression of p27kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 16:4327-4336.
2. An, B., R.H.Goldfarb, R.Siman, and Q.P.Dou. 1998. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death. Differ.* 5:1062-1075.
3. Bagui, T.K., S.Mohapatra, E.Haura, and W.J.Pledger. 2003. p27Kip1 and p21Cip1 Are Not Required for the Formation of Active D Cyclin-cdk4 Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 23:7285-7290.
4. Baldassarre, G., M.V.Barone, B.Belletti, C.Sandomenico, P.Bruni, S.Spiezia, A.Boccia, M.T.Vento, A.Romano, S.Pepe, A.Fusco, and G.Viglietto. 1999. Key role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for embryonal carcinoma cell survival and differentiation. *Oncogene* 18:6241-6251.
5. Bartek, J. and J.Lukas. 2001. p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat Cell Biol* 3:E95-E97.
6. Bell, S.D., C.H.Botting, B.N.Wardleworth, S.P.Jackson, and M.F.White. 2002. The Interaction of Alba, a Conserved Archaeal Chromatin Protein, with Sir2 and Its Regulation by Acetylation. *Science* 296:148-151.
7. Besson, A., R.K.Assoian, and J.M.Roberts. 2004a. REGULATION OF THE CYTOSKELETON: AN ONCOGENIC FUNCTION FOR CDK INHIBITORS? *Nat Rev Cancer* 4:948-955.
8. Besson, A., M.Gurian-West, A.Schmidt, A.Hall, and J.M.Roberts. 2004b. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* 18:862-876.
9. Blain, S.W. and J.Massague. 2002. Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nat Med* 8:1076-1078.
10. Bloom, J. and M.Pagano. 2003. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars in Cancer Biology* 13:41-47.
11. Blume-Jensen, P. and T.Hunter. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.
12. Boehm, M., T.Yoshimoto, M.F.Crook, S.Nallamshetty, A.True, G.J.Nabel, and E.G.Nabel. 2002. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27Kip1 and regulates cell cycle progression. *EMBO J.* 21:3390-3401.
13. Boyes, J., P.Byfield, Y.Nakatani, and V.Ogryzko. 1998. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396:594-598.
14. Brugarolas, J., C.Chandrasekaran, J.I.Gordon, D.Beach, T.Jacks, and G.J.Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377:552-557.
15. Cardozo, T. and M.Pagano. 2004. THE SCF UBIQUITIN LIGASE: INSIGHTS INTO A MOLECULAR MACHINE. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:739-751.
16. Carnero, A. and G.J.Hannon. 1998. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:43-55.:43-55.

17. Carrano, A.C., E.Eytan, A.Hershko, and M.Pagano. 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.* 1:193-199.
18. Carrozza, M.J., R.T.Utley, J.L.Workman, and J.Cote. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends in Genetics* 19:321-329.
19. Casanovas, O., M.Jaumot, A.B.Paules, N.Agell, and O.Bachs. 2004. P38SAPK2 phosphorylates cyclin D3 at Thr-283 and targets it for proteasomal degradation. *Oncogene* 23:7537-7544.
20. Casanovas, O., F.Miro, J.M.Estanyol, E.Itarte, N.Agell, and O.Bachs. 2000. Osmotic Stress Regulates the Stability of Cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 275:35091-35097.
21. Chamovitz, D.A. and D.Segal. 2001. JAB1/CNS5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep.* 2:96-101.
22. Chan, H.M., M.Krstic-Demonacos, L.Smith, C.Demonacos, and N.B.L.Thangue. 2001. Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* 3:667-674.
23. Cheng, M., P.Olivier, J.A.Diehl, M.Fero, M.F.Roussel, J.M.Roberts, and C.J.Sherr. 1999. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18:1571-1583.
24. Cho, S., J.H.Kim, S.H.Back, and S.K.Jang. 2005. Polypyrimidine Tract-Binding Protein Enhances the Internal Ribosomal Entry Site-Dependent Translation of p27Kip1 mRNA and Modulates Transition from G1 to S Phase. *Mol. Cell. Biol.* 25:1283-1297.
25. Connor, M.K., R.Kotchetkov, S.Cariou, A.Resch, R.Lupetti, R.G.Beniston, F.Melchior, L.Hengst, and J.M.Slingerland. 2003. CRM1/Ran-Mediated Nuclear Export of p27Kip1 Involves a Nuclear Export Signal and Links p27 Export and Proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 14:201-213.
26. Coqueret, O. 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology* 13:65-70.
27. Craig, C., R.Wersto, M.Kim, E.Ohri, Z.Li, D.Katayose, S.J.Lee, J.Trepel, K.Cowan, and P.Seth. 1997. A recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 14:2283-2289.
28. Currie, R.A. 1998. NF-Y Is Associated with the Histone Acetyltransferases GCN5 and P/CAF. *J. Biol. Chem.* 273:1430-1434.
29. de Koning, J.P., A.A.Soede-Bobok, A.C.Ward, A.M.Schelen, C.Antonissen, D.van Leeuwen, B.Lowenberg, and I.P.Touw. 2000. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene* 19:3290-3298.
30. Delmas, C., N.Aragou, S.Poussard, P.Cottin, J.M.Darbon, and S.Manenti. 2003. MAP Kinase-dependent Degradation of p27Kip1 by Calpains in Choroidal Melanoma Cells. REQUIREMENT OF p27Kip1 NUCLEAR EXPORT. *J. Biol. Chem.* 278:12443-12451.
31. Deng, X., S.E.Mercer, S.Shah, D.Z.Ewton, and E.Friedman. 2004. The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27Kip1 Is Stabilized in G0 by Mirk/dyrk1B Kinase. *J. Biol. Chem.* 279:22498-22504.
32. Dhalluin, C., J.E.Carlson, L.Zeng, C.He, A.K.Aggarwal, M.M.Zhou, and M.M.Zhou. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399:491-496.

33. Di Gennaro, E., F.Bruzzese, M.Caraglia, A.Abruzzese, and A.Budillon. 2004. Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: Review article. *Amino Acids* 26:435-441.
34. Diehl, J.A., F.Zindy, and C.J.Sherr. 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11:957-972.
35. el Deiry, W.S., T.Tokino, V.E.Velculescu, D.B.Levy, R.Parsons, J.M.Trent, D.Lin, W.E.Mercer, K.W.Kinzler, and B.Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
36. Estanyol, J.M., M.Jaumot, O.Casanovas, A.Rodriguez-Vilarrupla, N.Agell, and O.Bachs. 1999. The Protein SET Regulates the Inhibitory Effect of p21Cip1 on Cyclin E-Cyclin-dependent Kinase 2 Activity. *J. Biol. Chem.* 274:33161-33165.
37. Eymin, B., M.Haugg, N.Droin, O.Sordet, M.T.Dimanche-Boitrel, and E.Solary. 1999. p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogene* 18:1411-1418.
38. Fang, G., H.Yu, and M.W.Kirschner. 1998. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* 12:1871-1883.
39. Fero, M.L., M.Rivkin, M.Tasch, P.Porter, C.E.Carow, E.Firpo, K.Polyak, L.H.Tsai, V.Broudy, R.M.Perlmutter, K.Kaushansky, and J.M.Roberts. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85:733-744.
40. Fero, M.L., E.Randel, K.E.Gurley, J.M.Roberts, and C.J.Kemp. 1998. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396:177-180.
41. Fu, M., M.Rao, T.Bouras, C.Wang, K.Wu, X.Zhang, Z.Li, T.P.Yao, and R.G.Pestell. 2005. Cyclin D1 Inhibits Peroxisome Proliferator-activated Receptor {gamma}-mediated Adipogenesis through Histone Deacetylase Recruitment. *J. Biol. Chem.* 280:16934-16941.
42. Fu, M., C.Wang, Z.Li, T.Sakamaki, and R.G.Pestell. 2004a. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* 145:5439-5447.
43. Fu, M., C.Wang, X.Zhang, and R.G.Pestell. 2004b. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 68:1199-1208.
44. Fujita, N., S.Sato, K.Katayama, and T.Tsuruo. 2002. Akt-dependent Phosphorylation of p27Kip1 Promotes Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization. *J. Biol. Chem.* 277:28706-28713.
45. Fujita, N., S.Sato, and T.Tsuruo. 2003. Phosphorylation of p27Kip1 at Threonine 198 by p90 Ribosomal Protein S6 Kinases Promotes Its Binding to 14-3-3 and Cytoplasmic Localization. *J. Biol. Chem.* 278:49254-49260.
46. Ganoth, D., G.Bornstein, T.K.Ko, B.Larsen, M.Tyers, M.Pagano, and A.Hershko. 2001. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCFSkp2-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3:321-324.
47. Giandomenico, V., M.Simonsson, E.Gronroos, and J.Ericsson. 2003. Coactivator-Dependent Acetylation Stabilizes Members of the SREBP Family of Transcription Factors. *Mol. Cell. Biol.* 23:2587-2599.

48. Gonzalez, T., M.Seoane, P.Caamano, J.Vinuela, F.Dominguez, and J.Zalvide. 2003. Inhibition of Cdk4 Activity Enhances Translation of p27kip1 in Quiescent Rb-negative Cells. *J. Biol. Chem.* 278:12688-12695.
49. Gronroos, E., U.Hellman, C.H.Heldin, and J.Ericsson. 2002. Control of Smad7 Stability by Competition between Acetylation and Ubiquitination. *Molecular Cell* 10:483-493.
50. Gu, W. and R.G.Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90:595-606.
51. Hara, T., T.Kamura, K.Nakayama, K.Oshikawa, S.Hatakeyama, and K.I.Nakayama. 2001. Degradation of p27Kip1 at the G0-G1 Transition Mediated by a Skp2-independent Ubiquitination Pathway. *J. Biol. Chem.* 276:48937-48943.
52. Harbour, J.W. and D.C.Dean. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14:2393-2409.
53. Harper, J.W., G.R.Adami, N.Wei, K.Keyomarsi, and S.J.Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
54. Harper, J.W., S.J.Elledge, K.Keyomarsi, B.Dynlacht, L.H.Tsai, P.Zhang, S.Dobrowolski, C.Bai, L.Connell-Crowley, E.Swindell, and . 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6:387-400.
55. Harvat, B.L., A.Wang, P.Seth, and A.M.Jetten. 1998. Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J Cell Sci* 111:1185-1196.
56. Hassan, A.H., P.Prochasson, K.E.Neely, S.C.Galasinski, M.Chandy, M.J.Carrozza, and J.L.Workman. 2002. Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to Promoter Nucleosomes. *Cell* 111:369-379.
57. Hauser, P.J., D.Agrawal, M.Flanagan, and W.J.Pledger. 1997. The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 8:203-211.
58. Hengst, L. 2004. A second RING to destroy p27(Kip1). *Nat. Cell Biol.* 6:1153-1155.
59. Hengst, L. and S.I.Reed. 1996. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271:1861-1864.
60. Hengst, L. and S.I.Reed. 1998. Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:25-41.:25-41.
61. Herceg, Z. and Z.Q.Wang. 2005. Rendez-vous at mitosis: TRRAPed in the chromatin. *Cell Cycle* 4:383-387.
62. Hu, W., C.J.Bellone, and J.J.Baldassare. 1999. RhoA Stimulates p27Kip Degradation through Its Regulation of Cyclin E/CDK2 Activity. *J. Biol. Chem.* 274:3396-3401.
63. Hwang, C.Y., Y.S.Ryu, M.S.Chung, K.D.Kim, S.S.Park, S.K.Chae, H.Z.Chae, and K.S.Kwon. 2004. Thioredoxin modulates activator protein 1 (AP-1) activity and p27Kip1 degradation through direct interaction with Jab1. *Oncogene* 23:8868-8875.
64. Inoue, T., J.Kamiyama, and T.Sakai. 1999. Sp1 and NF-Y Synergistically Mediate the Effect of Vitamin D3 in the p27Kip1 Gene Promoter That Lacks Vitamin D Response Elements. *J. Biol. Chem.* 274:32309-32317.

65. Ishida, N., T.Hara, T.Kamura, M.Yoshida, K.Nakayama, and K.I.Nakayama. 2002. Phosphorylation of p27Kip1 on Serine 10 Is Required for Its Binding to CRM1 and Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* 277:14355-14358.
66. Iyer, N.G., H.Ozdog, and C.Caldas. 2004. p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23:4225-4231.
67. Jaruga-Killeen, E. and W.Rayford. 2004. TNF receptor 1 is involved in the induction of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in the prostate cancer cell line PC-3. *FASEB J.* 04-2305fje.
68. Jeong, J.W., M.K.Bae, M.Y.Ahn, S.H.Kim, T.K.Sohn, M.H.Bae, M.A.Yoo, E.J.Song, K.J.Lee, and K.W.Kim. 2002. Regulation and Destabilization of HIF-1[alpha] by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell* 111:709-720.
69. Jones, P.A. and P.W.Laird. 1999. Cancer-epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167.
70. Kamiyama, J., T.Inoue, N.Ohtani-Fujita, S.Minami, H.Yamagishi, and T.Sakai. 1999. The ubiquitous transcription factor NF-Y positively regulates the transcription of human p27Kip1 through a CCAAT box located in the 5'′-upstream region of the p27Kip1 gene. *FEBS Letters* 455:281-285.
71. Kamura, T., T.Hara, M.Matsumoto, N.Ishida, F.Okumura, S.Hatakeyama, M.Yoshida, K.Nakayama, and K.I.Nakayama. 2004. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat. Cell Biol.* 6:1229-1235.
72. Kanzawa, T., T.Komata, S.Kyo, I.M.Germano, Y.Kondo, and S.Kondo. 2003. Down-regulation of telomerase activity in malignant glioma cells by p27KIP1. *Int. J Oncol.* 23:1703-1708.
73. Katayose, Y., M.Kim, A.N.Rakkar, Z.Li, K.H.Cowan, and P.Seth. 1997. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res.* 57:5441-5445.
74. Kikuchi, H., Y.Takami, and T.Nakayama. 2005. GCN5: a supervisor in all-inclusive control of vertebrate cell cycle progression through transcription regulation of various cell cycle-related genes. *Gene* 347:83-97.
75. King, R.W., R.J.Deshaies, J.M.Peters, and M.W.Kirschner. 1996. How Proteolysis Drives the Cell Cycle. *Science* 274:1652-1659.
76. Koff, A., M.Ohtsuki, K.Polyak, J.M.Roberts, and J.Massague. 1993. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 260:536-539.
77. Kotake, Y., K.Nakayama, N.Ishida, and K.I.Nakayama. 2005. Role of Serine 10 Phosphorylation in p27 Stabilization Revealed by Analysis of p27 Knock-in Mice Harboring a Serine 10 Mutation. *J. Biol. Chem.* 280:1095-1102.
78. Kotoshiba, S., T.Kamura, T.Hara, N.Ishida, and K.I.Nakayama. 2005. Molecular Dissection of the Interaction between p27 and Kip1 Ubiquitylation-promoting Complex, the Ubiquitin Ligase That Regulates Proteolysis of p27 in G1 Phase. *J. Biol. Chem.* 280:17694-17700.
79. Kouzarides, T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19:1176-1179.
80. Krumm, A., L.Madisen, X.J.Yang, R.Goodman, Y.Nakatani, and M.Groudine. 1998. Long-distance transcriptional enhancement by the histone acetyltransferase PCAF. *PNAS* 95:13501-13506.
81. Kudo, Y., S.Kitajima, I.Ogawa, M.Miyauchi, and T.Takata. 2005. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 41:105-116.

82. Latres, E., M.Malumbres, R.Sotillo, J.Martin, S.Ortega, J.Martin-Caballero, J.M.Flores, C.Cordon-Cardo, and M.Barbacid. 2000. Limited overlapping roles of P15INK4b and P18INK4c cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* 19:3496-3506.
83. Le, X.F., F.Pruefer, and R.C.Bast, Jr. 2005. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. *Cell Cycle* 4:87-95.
84. Lee, M.H., I.Reynisdottir, and J.Massague. 1995. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9:639-649.
85. Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
86. Li, P., D.Nijhawan, I.Budihardjo, S.M.Srinivasula, M.Ahmad, E.S.Alnemri, and X.Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
87. Liang, J. and J.M.Slingerland. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2:339-345.
88. Liang, J., J.Zubovitz, T.Petrocelli, R.Kotchetkov, M.K.Connor, K.Han, J.H.Lee, S.Ciarallo, C.Catzavelos, R.Beniston, E.Franssen, and J.M.Slingerland. 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8:1153-1160.
89. Liu, L., D.M.Scolnick, R.C.Trievl, H.B.Zhang, R.Marmorstein, T.D.Halazonetis, and S.L.Berger. 1999. p53 Sites Acetylated In Vitro by PCAF and p300 Are Acetylated In Vivo in Response to DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* 19:1202-1209.
90. Lloyd, R.V., L.A.Erickson, L.Jin, E.Kulig, X.Qian, J.C.Cheville, and B.W.Scheithauer. 1999. p27kip1: A Multifunctional Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with Prognostic Significance in Human Cancers. *Am J Pathol* 154:313-323.
91. Malek, N.P., H.Sundberg, S.McGrew, K.Nakayama, T.R.Kyriakidis, and J.M.Roberts. 2001. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature* 413:323-327.
92. Malumbres, M. 2005. Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 4:206-210.
93. Malumbres, M. and M.Barbacid. 2001. TO CYCLE OR NOT TO CYCLE: A CRITICAL DECISION IN CANCER. *Nat Rev Cancer* 1:222-231.
94. Martin, A., J.Odajima, S.L.Hunt, P.Dubus, S.Ortega, M.Malumbres, and M.Barbacid. 2005. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27Kip1 and p21Cip1. *Cancer Cell* 7:591-598.
95. Martinez-Balbas, M.A., U.M.Bauer, S.J.Nielsen, A.Brehm, and T.Kouzarides. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.* 19:662-671.
96. Matsuo, T. and C.J.Thiele. 1998. p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 16:3337-3343.
97. McAllister, S.S., M.Becker-Hapak, G.Pintucci, M.Pagano, and S.F.Dowdy. 2003. Novel p27kip1 C-Terminal Scatter Domain Mediates Rac-Dependent Cell Migration Independent of Cell Cycle Arrest Functions. *Mol. Cell. Biol.* 23:216-228.
98. McMahon, C., T.Suthiphongchai, J.DiRenzo, and M.E.Ewen. 1999. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *PNAS* 96:5382-5387.

99. Medema, R.H., G.J.P.L.Kops, J.L.Bos, and B.M.T.Burgering. 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404:782-787.
100. Messina, G., C.Blasi, S.A.La Rocca, M.Pompili, A.Calconi, and M.Grossi. 2005. p27Kip1 Acts Downstream of N-Cadherin-mediated Cell Adhesion to Promote Myogenesis beyond Cell Cycle Regulation. *Mol. Biol. Cell* 16:1469-1480.
101. Millard, S.S., A.Vidal, M.Markus, and A.Koff. 2000. A U-Rich Element in the 5' Untranslated Region Is Necessary for the Translation of p27 mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 20:5947-5959.
102. Millard, S.S., J.S.Yan, H.Nguyen, M.Pagano, H.Kiyokawa, and A.Koff. 1997. Enhanced Ribosomal Association of p27Kip1 mRNA Is a Mechanism Contributing to Accumulation during Growth Arrest. *J. Biol. Chem.* 272:7093-7098.
103. Miura, M., S.Hatakeyama, K.Hattori, and K.I.Nakayama. 1999. Structure and Expression of the Gene Encoding Mouse F-Box Protein, Fwd2. *Genomics* 62:50-58.
104. Moeller, S.J., E.D.Head, and R.J.Sheaff. 2003. p27Kip1 Inhibition of GRB2-SOS Formation Can Regulate Ras Activation. *Mol. Cell. Biol.* 23:3735-3752.
105. Montagnoli, A., F.Fiore, E.Eytan, A.C.Carrano, G.F.Draetta, A.Hershko, and M.Pagano. 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev.* 13:1181-1189.
106. Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev Cell Dev. Biol* 13:261-91.:261-291.
107. Motti, M.L., C.De Marco, D.Califano, A.Fusco, and G.Viglietto. 2004. Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* 3:1074-1080.
108. Muller, D., K.Thieke, A.Burgin, A.Dickmanns, and M.Eilers. 2000. Cyclin E-mediated elimination of p27 requires its interaction with the nuclear pore-associated protein mNPAP60. *EMBO J.* 19:2168-2180.
109. Munoz-Alonso, M.J., J.C.Acosta, C.Richard, M.D.Delgado, J.Sedivy, and J.Leon. 2005. p21Cip1 and p27Kip1 Induce Distinct Cell Cycle Effects and Differentiation Programs in Myeloid Leukemia Cells. *J. Biol. Chem.* 280:18120-18129.
110. Murata, K., M.Hattori, N.Hirai, Y.Shinozuka, H.Hirata, R.Kageyama, T.Sakai, and N.Minato. 2005. Hes1 Directly Controls Cell Proliferation through the Transcriptional Repression of p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 25:4262-4271.
111. Nakayama, K., H.Nagahama, Y.A.Minamishima, M.Matsumoto, I.Nakamichi, K.Kitagawa, M.Shirane, R.Tsunematsu, T.Tsukiyama, N.Ishida, M.Kitagawa, K.I.Nakayama, and S.Hatakeyama. 2000. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27Kip1, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* 19:2069-2081.
112. Naruse, I., H.Hoshino, K.Dobashi, K.Minato, R.Saito, and M.Mori. 2000. Over-expression of p27kip1 induces growth arrest and apoptosis mediated by changes of pRb expression in lung cancer cell lines. *Int. J Cancer* 88:377-383.
113. Nguyen, D.X., L.A.Baglia, S.M.Huang, C.M.Baker, and D.J.McCance. 2004. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 23:1609-1618.

114. Pagano, M., S.W.Tam, A.M.Theodoras, P.Beer-Romero, G.Del Sal, V.Chau, P.R.Yew, G.F.Draetta, and M.Rolfe. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-685.
115. Pagano, M. 2004. Control of DNA Synthesis and Mitosis by the Skp2-p27-Cdk1/2 Axis. *Molecular Cell* 14:414-416.
116. Pan, Z.Q., J.T.Reardon, L.Li, H.Flores-Rozas, R.Legerski, A.Sancar, and J.Hurwitz. 1995. Inhibition of Nucleotide Excision Repair by the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21. *J. Biol. Chem.* 270:22008-22016.
117. Pardee, A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 71:1286-1290.
118. Pei, X.H. and Y.Xiong. 2005. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 24:2787-2795.
119. Philipp-Staheli, J., S.R.Payne, and C.J.Kemp. 2001. p27Kip1: Regulation and Function of a Haploinsufficient Tumor Suppressor and Its Misregulation in Cancer. *Experimental Cell Research* 264:148-168.
120. Pickart, C.M. and M.J.Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1695:55-72.
121. Polyak, K., M.H.Lee, H.Erdjument-Bromage, A.Koff, J.M.Roberts, P.Tempst, and J.Massague. 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78:59-66.
122. Qian, X., L.Jin, E.Kulig, and R.V.Lloyd. 1998. DNA Methylation Regulates p27Kip1 Expression in Rodent Pituitary Cell Lines. *Am J Pathol* 153:1475-1482.
123. Quaroni, A., J.Q.Tian, P.Seth, and C.Ap Rhys. 2000. p27Kip1 is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1045-C1057.
124. Reed, S.I. 2002. Keeping p27(Kip1) in the cytoplasm: a second front in cancer's war on p27. *Cell Cycle* 1:389-390.
125. Rivard, N., G.L'Allemain, J.Bartek, and J.Pouyssegur. 1996. Abrogation of p27Kip1 by cDNA Antisense Suppresses Quiescence (G0 State) in Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271:18337-18341.
126. Sa, G., Y.Guo, and D.W.Stacey. 2005. The regulation of S phase initiation by p27Kip1 in NIH3T3 cells. *Cell Cycle* 4:618-627.
127. Santos-Rosa, H., E.Valls, T.Kouzarides, and M.Martinez-Balbas. 2003. Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucl. Acids Res.* 31:4285-4292.
128. Sartorelli, V., P.L.Puri, Y.Hamamori, V.Ogryzko, G.Chung, Y.Nakatani, J.Y.Wang, and L.Kedes. 1999. Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell* 4:725-734.
129. Seeger, M., R.Kraft, K.Ferrell, D.Bech-Otschir, R.Dumdey, R.Schade, C.Gordon, M.Naumann, and W.Dubiel. 1998. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* 12:469-478.
130. Sekimoto, T., M.Fukumoto, and Y.Yoneda. 2004. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J.* 23:1934-1942.

131. Seo, S.b., P.McNamara, S.Heo, A.Turner, W.S.Lane, and D.Chakravarti. 2001. Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT, a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein. *Cell* 104:119-130.
132. Serrano, M. 1997. The Tumor Suppressor Protein p16INK4a. *Experimental Cell Research* 237:7-13.
133. Servant, M.J., P.Coulombe, B.Turgeon, and S.Meloche. 2000. Differential Regulation of p27Kip1 Expression by Mitogenic and Hypertrophic Factors: Involvement of Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *J. Cell Biol.* 148:543-556.
134. Sharpless, N.E., N.Bardeesy, K.H.Lee, D.Carrasco, D.H.Castrillon, A.J.Aguirre, E.A.Wu, J.W.Horner, and R.A.DePinho. 2001. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413:86-91.
135. Sheaff, R.J., M.Groudine, M.Gordon, J.M.Roberts, and B.E.Clurman. 1997. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11:1464-1478.
136. Sherr, C.J. and J.M.Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9:1149-1163.
137. Sherr, C.J. and J.M.Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
138. Shin, I., F.M.Yakes, F.Rojo, N.Y.Shin, A.V.Bakin, J.Baselga, and C.L.Arteaga. 2002. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8:1145-1152.
139. Shirane, M., Y.Harumiya, N.Ishida, A.Hirai, C.Miyamoto, S.Hatakeyama, K.I.Nakayama, and M.Kitagawa. 1999. Down-regulation of p27Kip1 by Two Mechanisms, Ubiquitin-mediated Degradation and Proteolytic Processing. *J. Biol. Chem.* 274:13886-13893.
140. Slingerland, J.M., L.Hengst, C.H.Pan, D.Alexander, M.R.Stampfer, and S.I.Reed. 1994. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol. Cell Biol* 14:3683-3694.
141. St Croix, B., V.A.Florenes, J.W.Rak, M.Flanagan, N.Bhattacharya, J.M.Slingerland, and R.S.Kerbel. 1996. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat. Med.* 2:1204-1210.
142. Starai, V.J., I.Celic, R.N.Cole, J.D.Boeke, and J.C.Escalante-Semerena. 2002. Sir2-Dependent Activation of Acetyl-CoA Synthetase by Deacetylation of Active Lysine. *Science* 298:2390-2392.
143. Steiner, P., A.Philipp, J.Lukas, D.Godden-Kent, M.Pagano, S.Mittnacht, J.Bartek, and M.Eilers. 1995. Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 14:4814-4826.
144. Sterner, D.E. and S.L.Berger. 2000. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:435-459.
145. Tian, S.S., P.Lamb, H.M.Seidel, R.B.Stein, and J.Rosen. 1994. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 84:1760-1764.
146. Tomoda, K., Y.Kubota, Y.Arata, S.Mori, M.Maeda, T.Tanaka, M.Yoshida, N.Yoneda-Kato, and J.y.Kato. 2002. The Cytoplasmic Shuttling and Subsequent Degradation of p27Kip1 Mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 Signalosome Complex. *J. Biol. Chem.* 277:2302-2310.

147. Tomoda, K., Y.Kubota, and J.y.Kato. 1999. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398:160-165.
148. Toyoshima, H. and T.Hunter. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78:67-74.
149. Vermeulen, K., D.R.Van Bockstaele, and Z.N.Berneman. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36:131-149.
150. Vidal, A., S.S.Millard, J.P.Miller, and A.Koff. 2002. Rho Activity Can Alter the Translation of p27 mRNA and Is Important for RasV12-induced Transformation in a Manner Dependent on p27 Status. *J. Biol. Chem.* 277:16433-16440.
151. Viglietto, G., M.L.Motti, P.Bruni, R.M.Melillo, A.D'Alessio, D.Califano, F.Vinci, G.Chiappetta, P.Tsichlis, A.Bellacosa, A.Fusco, and M.Santoro. 2002. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8:1136-1144.
152. Vlach, J., S.Hennecke, K.Alevizopoulos, D.Conti, and B.Amati. 1996. Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J.* 15:6595-6604.
153. von Lindern, M., D.Breems, S.van Baal, H.Adriaansen, and G.Grosveld. 1992. Characterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia. *Genes Chromosomes. Cancer* 5:227-234.
154. Wang, C., X.Hou, S.Mohapatra, Y.Ma, W.D.Cress, W.J.Pledger, and J.Chen. 2005. Activation of p27Kip1 Expression by E2F1: A NEGATIVE FEEDBACK MECHANISM. *J. Biol. Chem.* 280:12339-12343.
155. Watanabe, H., Z.Q.Pan, N.Schreiber-Agus, R.A.DePinho, J.Hurwitz, and Y.Xiong. 1998. Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *PNAS* 95:1392-1397.
156. Weber, J.D., W.Hu, J.Jefcoat, D.M.Raben, and J.J.Baldassare. 1997. Ras-stimulated Extracellular Signal-related Kinase 1 and RhoA Activities Coordinate Platelet-derived Growth Factor-induced G1 Progression through the Independent Regulation of Cyclin D1 and p27KIP1. *J. Biol. Chem.* 272:32966-32971.
157. Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
158. Yamamoto, H., J.W.Soh, H.Shirin, W.Q.Xing, J.T.Lim, Y.Yao, E.Slosberg, N.Tomita, I.Schieren, and I.B.Weinstein. 1999. Comparative effects of overexpression of p27Kip1 and p21Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18:103-115.
159. Yamasaki, L. and M.Pagano. 2004. Cell cycle, proteolysis and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 16:623-628.
160. Yang, X.J., V.V.Ogryzko, J.Nishikawa, B.H.Howard, and Y.Nakatani. 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382:319-324.
161. Yang, X.J. 2004. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucl. Acids Res.* 32:959-976.
162. Yao, T.P., S.P.Oh, M.Fuchs, N.D.Zhou, L.E.Ch'ng, D.Newsome, R.T.Bronson, E.Li, D.M.Livingston, and R.Eckner. 1998. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93:361-372.

163. Yuan, Z.I., Y.j.Guan, D.Chatterjee, and Y.E.Chin. 2005. Stat3 Dimerization Regulated by Reversible Acetylation of a Single Lysine Residue. *Science* 307:269-273.
164. Zeng, L. and M.M.Zhou. 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters* 513:124-128.
165. Zeng, Y., K.C.Forbes, Z.Wu, S.Moreno, H.Piwnica-Worms, and T.Enoch. 1998. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395:507-510.
166. Zhang, H., R.Kobayashi, K.Galaktionov, and D.Beach. 1995. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 82:915-925.
167. Zhang, W. and J.J.Bieker. 1998. Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *PNAS* 95:9855-9860.
168. Zindy, F., J.van Deursen, G.Grosveld, C.J.Sherr, and M.F.Roussel. 2000. INK4d-Deficient Mice Are Fertile Despite Testicular Atrophy. *Mol. Cell. Biol.* 20:372-378.

