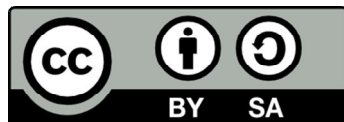




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Rol d'ERK5 en la preservació de l'estabilitat genòmica i en el desenvolupament hematopoètic

Maria Angulo Ibáñez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Universitat de Barcelona Facultat de Biologia

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Memòria presentada per **Maria Angulo Ibáñez**, llicenciada en Biologia, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona, per el programa de Doctorat en Biomedicina del departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia (2011-2016).

La present tesi doctoral: “Rol d’ERK5 en la preservació de l’estabilitat genòmica i el desenvolupament hematopoètic” ha estat realitzada en el grup CELLTEC-UB del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia sota la direcció del Dr. Manuel Reina del Pozo i del Dr. Enric Espel Masferrer.

Vist-i-plau dels directors,

La interessada,

Dr. Manuel Reina

Dr. Enric Espel

Maria Angulo Ibáñez

Barcelona
Juny, 2016

**Rol d'ERK5 en la preservació de
l'estabilitat genòmica i en el
desenvolupament hematopoètic**

Maria Angulo Ibáñez

Barcelona, Juny 2016

Als meus pares, Fernando i Margarita.

AGRAÏMENTS

Em sento afortunada de trobar-me escrivint aquestes línies, i és que he tingut la sort que són moltes les persones que m'han acompanyat fins a aquí.

Primer de tot vull donar les gràcies als meus directors de Tesi. Manuel i Enric, moltes gràcies per donar-me aquesta oportunitat. Enric, gràcies per ensenyar-me tantes coses i per aconsellar-me, ha sigut un plaer poder treballar amb tu tots aquests anys.

Gràcies als “sèniors” del lab: Ofelia, Francesc, Ricardo i Conxita. Cadascú de vosaltres ha contribuït de manera directa o indirecta a la meva formació i us estic agraïda. M'ha encantat poder aprendre de vosaltres i passar tants bons moments plegats. També vull fer extensiu el meu agraïment a l'Oriol, l'Eva i la Trini per ser allà quan tot just començava a fer els meus “pinitos” al laboratori.

Gràcies a la Sònia, a la Chari i al Jaume per tantes hores a citometria. Gràcies pels vostres consells i la passió que poseu en el que feu.

Als meus Labrats: Gràcies. Tantes hores compartides han fet que ens haguem convertit en família. Sens dubte, el doctorat sense vosaltres no hagués estat el mateix. Citant a la Núria us diré que “Sois muy grandes”.

També vull agrair als altres laboratoris que han participat en la meva formació. Especialment a ti Carmen, gracias por acogerme aquel verano de 2008 y enseñarme tantísimas cosas en tan poco tiempo. Gracias también a ti Maria José, por dejarme ser tu sombra durante dos meses. Als membres del DD lab de Montreal, els hi vull donar les gràcies per totes les discussions i consells, i perquè no només vaig tenir la sort de conèixer grans científics sinó grans persones. Merci.

Gràcies als Immunòlegs i als Biòlegs, per la complicitat que ens uneix i tots els bons moments aprenent junts. Ens anirem retrobant i sempre serà com si el temps no hagués passat.

Calellencs, Liceuans i Xaxericho's: infinites gràcies per haver-me escoltat i animat al llarg d'aquests anys. Em sento afortunada de tenir amics com vosaltres.

També vull donar les gràcies a la meva família. En especial vull donar les gràcies a la meva mare, Margarita i al Josep Maria, així com als meus germans i a la meva família vilanovina: Mercè, Josep Maria, Anna i Gerard, pel seu suport i consells al llarg d'aquests anys i per tots els bons moments que hem viscut i que viurem.

I per acabar et vull donar les gràcies a tu, Xavi. Gràcies per ser el millor company que es pot tenir, dins i fora del laboratori. Gràcies per la teva visió de la ciència i de la vida. Em fas créixer com a científica i com a persona i, el més important, em fas feliç. T'estimo.

Gràcies.

Maria

ÍNDIX

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURES | 11 |
| 1 . INTRODUCCIÓ | 16 |
| 1. DESENVOLUPAMENT HEMATOPOÈTIC | 19 |
| 1. 1. ERITRÒCITS | 20 |
| 1. 2. LIMFÒCITS | 22 |
| 1. 2. 1. Limfòcits B | 22 |
| 1. 2. 2. Limfòcits T..... | 24 |
| 2. CICLE CEL·LULAR | 26 |
| 2. 1. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR | 28 |
| 2. 1. 1. Oncogens i supressors de tumors | 29 |
| 2. 1. 2. Punts de control o <i>Checkpoints</i> | 31 |
| 3. REPLICACIÓ DEL DNA | 34 |
| 3. 1. ESTRÈS DE REPLICACIÓ | 36 |
| 3. 1. 1. Estrès de replicació i càncer | 37 |
| 3. 1. 2. Estrès de replicació i desenvolupament hematopoètic | 39 |
| 4. METABOLISME DE DNTP | 40 |
| 4. 1. SÍNTESI DE DNTP | 40 |
| 4. 1. 1. Via de novo..... | 40 |
| 4. 1. 2. Via de salvament | 41 |
| 4. 1. 3. Ribonucleòtid Reductasa | 42 |
| 4. 2. CATABOLISME DE DNTP | 44 |
| 4. 3. DNTP I CÀNCER | 44 |
| 4. 3. 1. dnTP i Mutagènesi..... | 44 |
| 4. 3. 2. dnTP i quimioteràpia..... | 45 |
| 4. 4. DNTP I DESENVOLUPAMENT HEMATOPOÈTIC..... | 46 |
| 5. ERK5 | 47 |
| 5. 1. MAPK | 47 |
| 5. 2. ERK5 | 48 |
| 5. 2. 1. Estructura i activació d'ERK5 | 48 |
| 5. 2. 2. ERK5 i desenvolupament | 49 |
| 5. 2. 3. ERK5, cicle cel·lular i càncer | 50 |
| 2 . HIPÒTESI I OBJECTIUS | 53 |
| 3 . MATERIAL I MÈTODES | 57 |
| 1. TAMPONS I ALTRES REACTIUS | 59 |
| 2. CULTIUS CEL·LULARS | 60 |
| 2. 1. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES | 60 |
| 2. 2. MANTENIMENT..... | 60 |
| 2. 3. COMPTATGE | 60 |
| 2. 4. CONGELACIÓ | 60 |
| 2. 5. ASSAIG DE SINCRONITZACIÓ EN EL CICLE CEL·LULAR | 61 |
| 2. 6. LÍNIES CEL·LULARS | 62 |
| 3. TRANSFECCIONS ESTABLES I TRANSITÒRIES | 63 |
| 3. 1. PLASMIDIS | 63 |
| 3. 2. ELECTROPORACIÓ | 63 |
| 4. MODEL ANIMAL | 64 |
| 4. 1. RATOLINS | 64 |
| 4. 2. GENOTIPAT | 65 |

| | |
|---|------------|
| 4. 3. AÏLLAMENT DE PRECURSORS D'ERITRÒCITS | 65 |
| 5. CITOMETRIA DE FLUX | 66 |
| 5. 1. MARCATGE D'ANTÍGENS DE SUPERFÍCIE | 66 |
| 5. 2. ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR..... | 66 |
| 5. 3. ANÀLISI D' APOPTOSI..... | 66 |
| 5. 4. SEPARACIÓ CEL·LULAR O SORTING | 66 |
| 6. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA | 67 |
| 6. 1. ANÀLISI DE MITOSIS ABERRANTS..... | 67 |
| 7. TÈCNiques MOLECULARS | 67 |
| 7. 1. ELECTROFORESI DE PROTEÏNES I DETECCIÓ PER <i>WESTERN BLOT</i> | 67 |
| 7. 2. ANÀLISI DENSITOMÈTRIC | 69 |
| 7. 3. EXTRACCIÓ DE RNA, RETROTRANSCRIPCIÓ I PCR A TEMPS REAL..... | 69 |
| 7. 4. DETECCIÓ DELS NIVELLS DE DNTP | 70 |
| 7. 5. ASSAIG DE BRADFORD..... | 71 |
| 7. 6. ASSAIG D' ACTIVITAT QUINASA DE L'ENZIM TIMIDINA QUINASA | 72 |
| 7. 7. ASSAIG D' ABSORCIÓ DE TIMIDINA | 72 |
| | |
| 4 . RESULTATS | 75 |
| 1. L'ABSÈNCIA D'ERK5 INDUEIX INESTABILITAT GENÒMICA EN LA LÍNIA CEL·LULAR JURKAT I LA SENSIBILITZA ENFRONT AL TRACTAMENT AMB TIMIDINA..... | 77 |
| 2. LA DISMINUCIÓ DELS NIVELLS D'ERK5 ACTUA SINÈRGICAMENT AMB LA TIMIDINA PER DISMINUIR ELS NIVELLS CEL·LULARS DE DCTP | 86 |
| 3. LA MANCA D'ERK5 NO TE CAP EFECTE SOBRE ELS NIVELLS D'EXPRESSIÓ DE L'ENZIM RNR2 NI SOBRE ELS NIVELLS D'EXPRESSIÓ DE MRNA D'ENZIMS RESPONSABLES DEL METABOLISME DE NUCLEÒTIDS | 92 |
| 4. LA MANCA D'ERK5 <i>IN VIVO</i> ALTERA L'EFICIÈNCIA DEL DESENVOLUPAMENT ERITROPOÈTIC AL MOLL DE L'OS | 94 |
| 5. LA MANCA D'ERK5 <i>IN VIVO</i> INDUEIX UNA EXPANSIÓ DEL POOL DE DTTP I UN AUGMENT EN LA TAXA DE MUTACIÓ EN LA POBLACIÓ TER119+ DEL MOLL DE L'OS | 100 |
| | |
| 5 . DISCUSSIÓ | 105 |
| | |
| 6 . CONCLUSIONS..... | 115 |
| | |
| 7 . BIBLIOGRAFIA | 119 |
| | |
| 8 . ANNEX..... | 131 |

ABREVIATURES

ABREVIATURES

| | |
|-------|---|
| APC | Complex promotor de l'anafase |
| ATM | Atàxia telangectàsia mutada |
| ATR | Atàxia telangectàsia relacionada amb Rad3 |
| BAFF | Factor activador de cèl·lules B |
| BCR | Receptor de cèl·lules B |
| CD | <i>Cluster</i> de diferenciació |
| CDK | Quinasa depenent de ciclina |
| CFU | Unitat formadora de colònia |
| CHK1 | <i>Checkpoint</i> quinasa 1 |
| CHK2 | <i>Checkpoint</i> quinasa 2 |
| CKI | Inhibidors de CDK |
| CLP | Progenitor limfoide comú |
| CMP | Progenitor mieloide comú |
| DAPI | 4'-6-diamino-2-fenilindol |
| DMSO | Dimetil sulfòxid |
| dCK | Deoxicitidina quinasa |
| DDK | Quinasa depenent de DBF4 |
| dGK | Deoxiguanosina quinasa |
| DN | Doble negatiu |
| DNA | Àcid deoxiribonucleic |
| dNDP | Deoxinucleòsid difosfat |
| NDPK | Nucleòsid difosfat quinasa |
| dNMP | Deoxinucleòsid monofosfat |
| dNTP | Deoxinucleòsid trifosfat |
| DP | Doble positiu |
| ECL | <i>Enhanced Chemoluminescence</i> |
| EGF | Factor de creixement epidèrmic |
| EGFR | Receptor del factor de creixement epidèrmic |
| ERK | Quinasa regulada per senyalització extracel·lular |
| FACS | Separació cel·lular activada per fluorescència |
| FANCC | Anèmia de Fanconi, complementació de grup C |
| FBS | Sèrum fetal boví |
| FL | Flanquejat per Lox |
| HSC | Cèl·lula mare hematopoètica |
| IC | Complex d'iniciació |
| IgM | Immunoglobulina M |

| | |
|--------|---|
| IP | Iodur de propidi |
| JNK | Quinasa C-jun N-terminal |
| KLF2 | Factor <i>Kruppel-like 2</i> |
| KO | <i>Knockout</i> |
| LMPP | Cèl·lula progenitora limfoide multipotent |
| M | Mitosi |
| MAPK | Proteïna quinasa activada per mitogen |
| MCM | Complex de manteniment de minicromosoma |
| MEK | Map/ERK quinasa |
| mRNA | RNA missatger |
| N | Nucleòsid |
| NF-κB | Factor nuclear κB |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| NLS | Senyal de localització nuclear |
| NS | No significatiu |
| P/S | Penicil·lina/Estreptomicina |
| PBS | Tampó fosfat salí |
| PCR | Reacció en cadena de la polimerasa |
| pRB | Proteïna del retinoblastoma |
| Pre-IC | Complex de pre-iniciació |
| PTEN | Homòleg de la fosfatasa i tensina |
| RC | Complex de replicació |
| RNA | Àcid ribonucleic |
| RNR | Ribonucleòtid reductasa |
| ROS | Espècies reactives d'oxigen |
| RPA | Proteïna de replicació A |
| Rpm | Revolucions per minut |
| S | Síntesi |
| SAMHD1 | Proteïna 1 contenint els dominis SAM i HD |
| shRNA | Petit ARN llaç |
| TBS | Tampó Tris salí |
| TCR | Receptor de cèl·lules T |
| TK | Timidina quinasa |
| TS | Timidilat sintasa |
| UV | Ultra violat |
| VDJ | <i>Variable, Diversity, Joining</i> |

1 . INTRODUCCIÓ

1. Desenvolupament hematopoètic

L'hematopoesi és la formació de les cèl·lules de la sang i té lloc en etapes successives des del desenvolupament embrionari fins a l'edat adulta. En mamífers adults, l'hematopoesi té com a principal origen el moll de l'os, on la cèl·lula mare hematopoètica (HSC) donarà lloc a diferents tipus cel·lulars. Entre aquests tipus cel·lulars podem destacar dos grups principals: els glòbuls vermells (o eritròcits) i els glòbuls blancs (o leucòcits). Els leucòcits es poden subdividir en dos llinatges, el mioide (monòcits, neutròfils, eosinòfils, basòfils i mastòcits) i el limfoide (limfòcits B, T i els limfòcits innats que inclou les NKs). En el model tradicional de desenvolupament hematopoètic una cèl·lula mare hematopoètica del moll de l'os donarà lloc a una cèl·lula progenitora comú mioide (CMP) o bé una cèl·lula progenitora comú limfoide (CLP). Les CMP es diferencien a cèl·lules progenitores granulòcit monòcit (GMP) o bé a cèl·lules progenitores megacariòcit eritroide (MEP)¹ (Figura 1. 1.). Recentment s'ha descrit un model alternatiu de diferenciació hematopoètica on les HSC es diferencien directament a CMP, MEP i megacariòcits o bé a cèl·lula progenitora limfoide multipotent (LMPP)² (Figura 1. 1.).

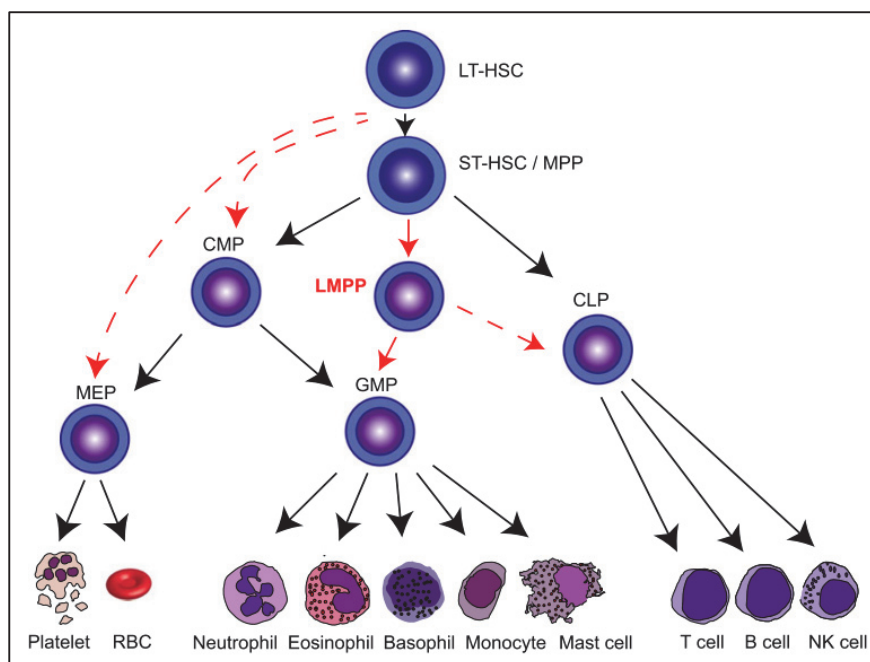


Figura 1. 1. Desenvolupament hematopoètic al moll de l'os adult. La jerarquia marcada per les fletxes negres representa el model tradicional, mentre que en vermell es mostra el model alternatiu descrit recentment per Notta, Zandy i col·laboradors. (Figura obtinguda de Nandakumar, SK i col·laboradors, 2016.)

Al llarg del desenvolupament l'hematopoesi té lloc a diferents teixits. A l'inici del desenvolupament embrionari té lloc al sac vitel·lí, durant l'estadi fetal és el fetge qui pren el relleu i després del naixement i fins l'edat adulta, l'hematopoesi tindrà lloc al moll de l'os (Figura 1. 2.)³.

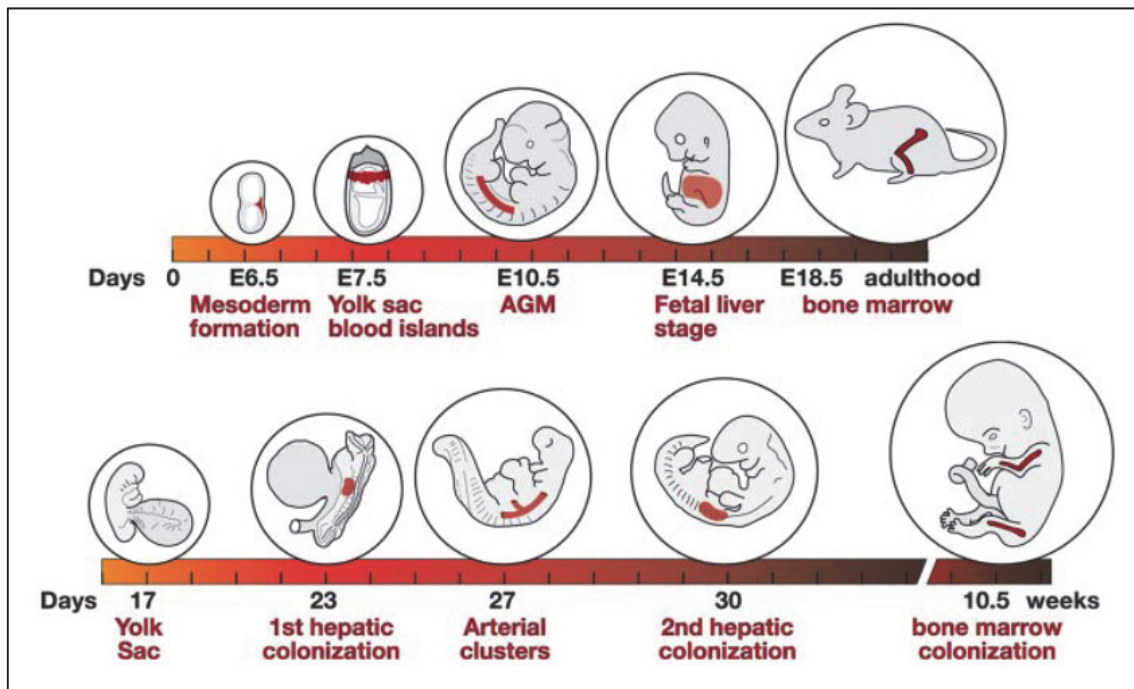


Figura 1. 2. Localització de l'hematopoesi al llarg del desenvolupament en ratolí (part superior) i en humà (part inferior). (Figura obtinguda de Baron, MH i col·laboradors, 2012)

1. 1. Eritròcits

Els eritròcits són les cèl·lules més abundants de l'organisme i les encarregades de fer arribar l'oxigen des dels pulmons fins a la resta d'òrgans del nostre cos. Per tal de mantenir el nombre d'eritròcits en sang, el moll de l'os d'un humà adult haurà de produir de l'ordre de $2 \cdot 10^{11}$ eritròcits cada dia. L'eritropoesi es pot dividir en dues fases principals: la primera és la que anomenem la fase primitiva i té lloc durant l'estadi embrionari, la segona fase és la definitiva i es dona durant l'estadi fetal i després del naixement durant tota la vida de l'individu (Figura 1. 3.). La fase primitiva s'inicia al sac vitel·lí i es caracteritza pel fet que la diferenciació des dels precursors fins a eritròcits madurs té lloc en sang, mentre que a la fase definitiva aquest procés es desenvolupa al fetge fetal i al moll de l'os post-natal (Figura 1. 3.)^{1,4}. Després del naixement, els progenitors i els precursors es trobaran en espais extravasculars en el moll de l'os mentre que els eritròcits madurs es trobaran circulant per sang. Abans de sortir a la sang en forma de reticulòcit, els precursors eritroides es

diferenciaran en zones que anomenem illes eritroblàstiques. L'illa eritroblàstica és el nínxol on tenen lloc els darrers estadis de diferenciació dels eritròcits en mamífers. Aquesta estructura histològica consisteix en un macròfag, rodejat de fins a 30 precursors eritroides, des de CFU-E fins a reticulòcits (Figura 1. 3).⁴ La maduració d'aquests precursors tindrà lloc a través d'una progressiva expansió mitjançant divisions simètriques (ProEritroblast), acumulació d'hemoglobina (BasoEritroblast), disminució en el tamany cel·lular (PoliEritroblast), picnosi nuclear i disminució del contingut de RNA. D'altra banda l'anàlisi de l'expressió de certs marcadors de membrana, també ens permetrà classificar les cèl·lules en els diferents estadis de diferenciació⁴. Cap al final de l'estadi de proeritroblast, es començarà a expressar el marcador Ter119, a la membrana fins al final de la diferenciació. D'altra banda, el receptor de transferrina (CD71), s'expressa en grans quantitats en la membrana dels proeritroblasts i aquests nivells aniran disminuint fins a desaparèixer en els darrers estadis de diferenciació¹. Tenint en compte les possibles combinacions dels nivells de Ter119 i CD71 a la membrana, així com la mida cel·lular, es pot establir una classificació alternativa dels precursors eritroides. En aquesta classificació trobem, de menys a més diferenciació, les poblacions EryA, EryB i EryC⁵. Un eritròcit circularà pel torrent sanguini durant una mitjana de 115 dies. Arribat aquest punt, els eritròcits comencen a presentar signes d'envelliment, com ara irregularitat en la seva forma o l'expressió de certs marcadors de senescència. En el moment en que els glòbuls vermells senescents travessen la melsa aquests senyals seran detectats pels macròfags residents en aquest òrgan i es durà a terme la seva fagocitosi i degradació .

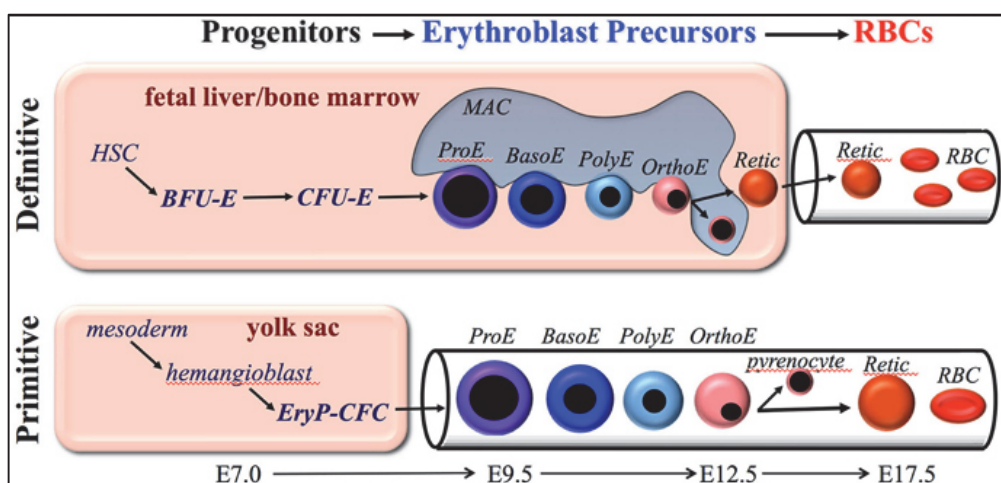


Figura 1. 3. Representació dels estadis de diferenciació d'eritròcits en ratolí. L'eritropoesi definitiva té lloc al fetge fetal o bé al moll de l'os adult i els reticulòcits entren al torrent sanguini (Part superior). L'eritropoesi primitiva té lloc al sac vitel·lí i els

darrers estadis a partir de ProE tenen lloc al torrent sanguini (Part inferior). (Figura obtinguda de Palis, J, 2014)

En individus adults sans, aquest procés només té lloc en el moll de l'os. Les patologies afectant els eritròcits poden afectar-ne el desenvolupament, la funció de les cèl·lules madures o bé pot ser una combinació de totes dues coses ¹. En el cas de les condicions patològiques en què la correcta producció de glòbuls vermells es veu compromesa, hi haurà altres òrgans que prendran el rol d'òrgans eritropoètics: és el que anomenem eritropoesi extra-medul·lar ^{6,7}. Un dels principals òrgans en suplir el dèficit productor del moll de l'os és la melsa. Aquestes malalties poden tenir diverses causes, des de mutacions en els factors de diferenciació eritroide (*GATA1*, *KLF1*, *KIF23...*)^{8,9} en el cas de les anèmies eritropoètiques congènites fins a l'anèmia de Fanconi, on la mutació en la via de reparació del DNA de l'anèmia de Fanconi abocarà a un fallida del moll de l'os que no podrà sintetitzar les cèl·lules del llinatge hematopoètic ¹⁰.

1. 2. Limfòcits

Els limfòcits són les cèl·lules que componen la immunitat adaptativa del nostre organisme i es caracteritzen per l'expressió de receptors específics d'antigen a la seva superfície. En el cas dels limfòcits B, el BCR i en el cas dels limfòcits T, el TCR. El BCR es compon de dues cadenes pesades i dues lleugeres i cada cadena presenta una regió constant a la vegada que una regió variable que serà l'encarregada de reconèixer l'antigen específic¹¹. El TCR es compon d'una cadena alfa i una cadena beta (o bé gamma i delta) que presenten cadascuna una regió constant i una regió variable. Cada limfòcit presenta un receptor amb una especificitat diferent que es genera durant el desenvolupament mitjançant la reorganitzacions dels segments gènics *V*, *D* i *J* (per a les cadenes pesades i beta) i *V* i *J* (per a les cadenes lleugeres i alfa). Aquesta reorganització genòmica generarà un fragment definitiu que codificarà per la regió variable del BCR o el TCR de cada clon ¹².

1. 2. 1. Limfòcits B

En mamífers, la generació de limfòcits B té lloc al moll de l'os i, durant el desenvolupament fetal, al fetge. En el moll de l'os el desenvolupament depèn de les cèl·lules de l'estroma que hi resideixen. Mitjançant l'adhesió i la secreció dels factors de creixement adequats,

l'estroma estimularà la diferenciació dels limfòcits B i la seva proliferació. A mida que els limfòcits B maduren, migren a través del moll de l'os fins a abandonar-lo pel torrent sanguini i colonitzar teixits limfoides secundaris com la melsa (Figura 1. 4). Els últims estadis de diferenciació són independents de les cèl·lules de l'estroma i tindran lloc en aquests teixits perifèrics.

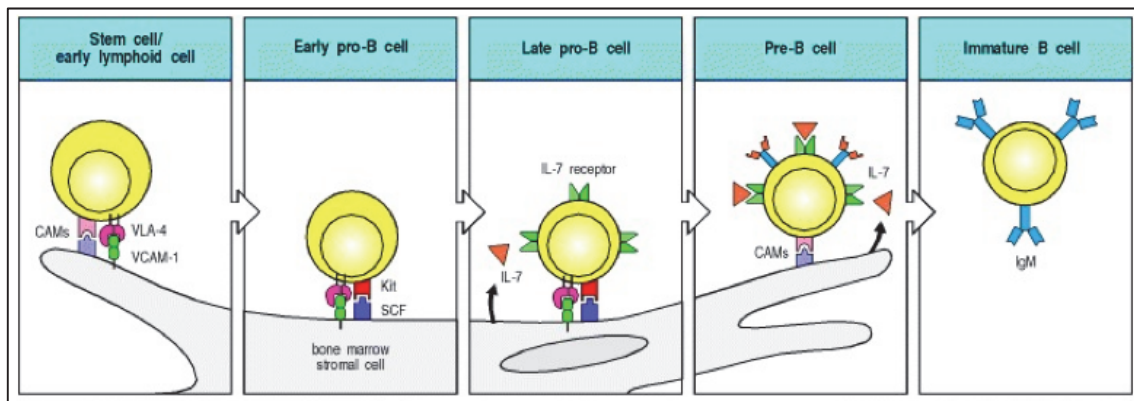


Figura 1. 4. Estadis de diferenciació dels limfòcits B. Des de l'estadi de cèl·lula mare fins a l'estadi de pre-limfòcit B la diferenciació és depenent de les cèl·lules de l'estroma del moll de l'os. Aquesta diferenciació depèn de factors d'adhesió (VLA-4/VCAM-1) així com de factors de creixement (IL-7R/IL-7). (Figura adaptada de *Janeway's Immunology*)

A nivell fenotípic podem classificar els diversos estadis de diferenciació dels limfòcits B mitjançant els tipus de marcadors que expressen les cèl·lules a la seva superfície. A més a més, durant el desenvolupament tindrà lloc la reorganització dels gens del BCR i l'expressió del receptor BCR o immunoglobulina a la membrana cel·lular. Aquest fenomen permet classificar les cèl·lules segons si expressen o no les cadenes d'immunoglobulina, i en el cas d'expressar-les, si s'expressa la cadena pesada sola, o la cadena pesada juntament amb la cadena lleugera. L'expressió d'altres marcadors, com B220, juntament amb els estadis de reorganització del BCR permet classificar els diferents estadis de diferenciació dels limfòcits B. En els estadis finals de diferenciació al moll de l'os, els limfòcits B expressaran IgM a la seva superfície.

L'estadi més primerenc del desenvolupament de les cèl·lules B és el que anomenem Pro-limfòcits B. Aquest estadi progenitor deriva directament de l'estadi de cèl·lula mare hematopoètica pluripotent, es caracteritza per una baixa capacitat d'auto-renovació i és el moment en el que té lloc la reorganització de la cadena pesada del BCR. Aquesta reorganització condueix a l'expressió en membrana de la cadena pesada de la

immunoglobulina que marcarà el pas de Pro-limfòcit B a Pre-limfòcit B. Els Pre-limfòcits B es poden subdividir en Pre-limfòcits B grans i Pre-limfòcits B petits. En els Pre-limfòcits B grans, la cadena pesada s'expressa abundantment a nivell intracel·lular i en menor mesura a la superfície cel·lular. Aquesta cadena pesada definitiva s'expressa a la superfície conjuntament amb la cadena lleugera suplent, aquest complex és el Pre-BCR. Els Pre-limfòcits B grans tenen una elevada capacitat de proliferació i donaran lloc al Pre-limfòcits B petits. En aquestes cèl·lules petites tindrà lloc la reorganització de les cadenes lleugeres definitives del BCR. Quan la cèl·lula expressa uns nivells elevats de BCR complet a la seva superfície deixem de parlar de Pre-limfòcit B i l'anomenarem limfòcit B immadur. En aquest moment és quan els limfòcits B abandonen el moll de l'os per a prosseguir la seva maduració als teixits limfoides perifèrics^{13,14}.

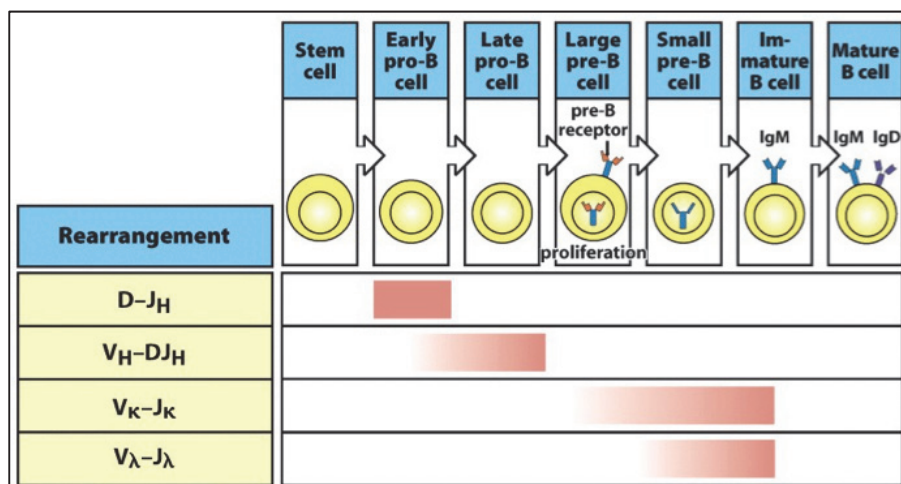


Figura 1. 5. Estadis de reorganització de les cadenes pesades i lleugeres de la IgM durant la diferenciació de limfòcits B. (Figura adaptada de Janeway's *Immunology*.)

1. 2. 2. Limfòcits T

Els precursors de limfòcit T migren del moll de l'os al tim, on es diferenciaran seguint un procés similar al dels limfòcits B amb una reorganització dels gens que codifiquen per al TCR. Els marcadors que caracteritzen els diferents estadis de diferenciació T al tim són essencialment, el TCR, CD44, CD25, CD4 i CD8. Dins dels limfòcits T madurs trobem dos grups principals, els limfòcits T que expressen CD8 a la superfície cel·lular i que esdevindran T citotòxics quan siguin estimulats per antigen, o bé els limfòcits T que expressen el marcador CD4 que esdevindran T col·laboradors. Quan les cèl·lules

progenitores arriben al tim des del moll de l'os, no expressen cap d'aquestes dues molècules, i és el que anomenem la població de timòcits doble negatiu (DN). Aquesta població pot subdividir-se en DN1, DN2, DN3 i DN4 en funció dels nivells en membrana dels marcadors CD44 i CD25 (Figura 1. 6). Passada aquesta etapa de diferenciació, els timòcits expressaran els marcadors CD4 i CD8 simultàniament en un estadi que es coneix com a doble positiu (DP). Finalment, s'acabarà expressant un dels dos i on el limfòcit sortirà a la circulació sanguínia ¹⁵.

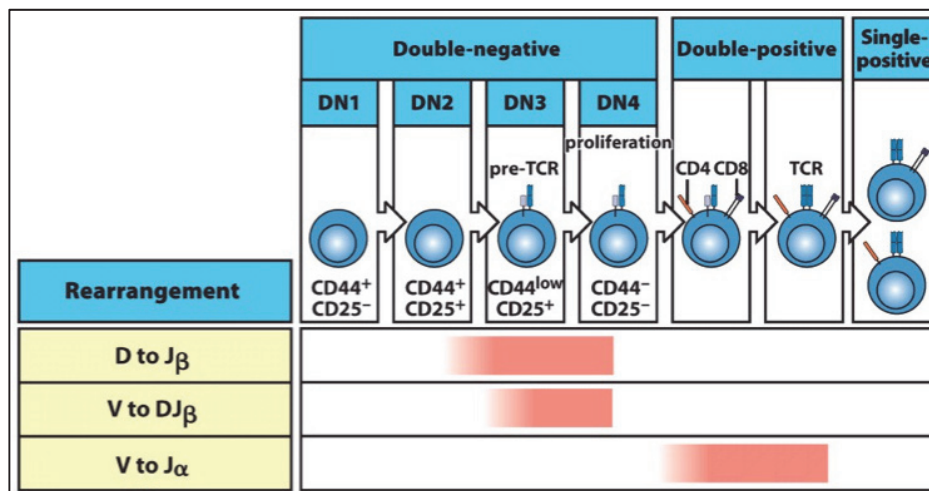


Figura 1. 6. Estadis de reorganització de les cadenes alfa i beta del TCR durant la diferenciació de timòcit a limfòcit T madur que té lloc al tim. (Figura adaptada de *Janeway's Immunology*.)

L'elevada taxa de divisió, així com la necessitat de reorganització del genoma durant la diferenciació dels limfòcits els fa extremadament vulnerables a alteracions en la maquinària de detecció i reparació del dany al DNA ¹⁶. La majoria de patologies associades a mutacions o alteracions en l'activitat d'aquestes proteïnes venen acompanyades d'algun tipus d'immunodeficiència ¹⁷. Així doncs, aquest llinatge serveix com a eina d'estudi del metabolisme dels àcids nucleics i les vies de senyalització associades.

2. Cicle cel·lular

La divisió cel·lular o cicle cel·lular és el procés mitjançant el qual una cèl·lula duplicarà el seu contingut genòmic i es dividirà, generant així dues cèl·lules filles. El cicle cel·lular es compon de quatre estadis principals, dos estadis de transició: G1 (*Gap 1*) i G2 (*Gap 2*) i dos estadis d'acció: S (*Synthesis*) i M (*Mitosis*). Quan la cèl·lula no es troba en el cicle cel·lular, es troba en l'estadi G0 (*Gap 0*) que correspon als estadis de quiescència o de senescència. Les fases G1, S i G2 corresponen al que anomenem interfase mentre que la fase M correspon a la divisió cel·lular pròpiament dita (Figura 1. 7.).

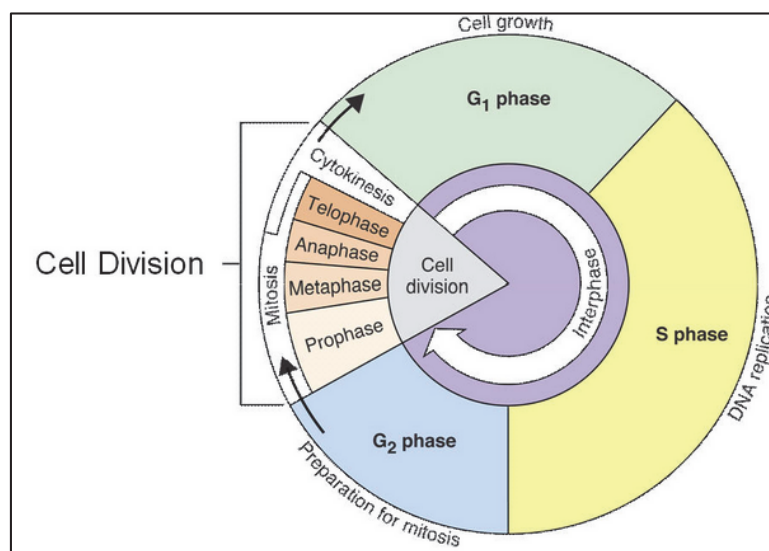


Figura 1. 7. Esquema representant les diferents fases del cicle cel·lular. (Figura obtinguda de www.tes.com)

Durant la fase G1, la cèl·lula es prepara per dur a terme la duplicació del seu contingut genòmic o replicació del DNA. En aquest punt, la cèl·lula incrementa la seva mida i els orgànuls intracel·lulars, i una sèrie de mecanismes de control vetllen per a que tot estigui a punt per iniciar la següent fase del cicle. En G1 es duplica tot excepte el DNA. En cas que es detecti alguna anomalia que pugui comprometre el correcte desenvolupament de la fase S, la cèl·lula no procedirà a replicar el DNA fins que el problema estigui resolt. La durada de la fase G1 varia entre els diferents tipus cel·lulars així com de les condicions del medi extracel·lular.

La fase S és, juntament amb la fase M, la fase més crítica del cicle cel·lular. En aquesta etapa, la cèl·lula ha de duplicar el seu DNA de manera fidel i assegurar-se que no queda cap regió sense replicar així com que tot el DNA no es duplica més que una sola vegada.

A l'estadi G2, la cèl·lula continua amb el seu creixement i el punt de control de la fase G2 vetlla per a que la fase M es pugui dur a terme. Aquesta etapa és la menys crítica de totes i en certes condicions de desenvolupament aquesta fase es inexistent.

Durant la fase M té lloc la segregació dels cromosomes. La fase M es pot subdividir en cinc estadis en funció de la condensació i distribució dels cromosomes: La profase, quan la cromatina es condensa, els cromosomes es tornen visibles i el fus mitòtic es comença a formar; la prometafase, quan la membrana nuclear es trenca i els cromosomes comencen a contactar amb el fus mitòtic; la metafase, quan els cromosomes s'alineen a l'equador de la cèl·lula en el fus mitòtic; l'anafase, en que les cromàtides es separen i la telofase, en que la cèl·lula es divideix físicament separant la cèl·lula mare en dues filles contenint el mateix material genòmic (Figura 1. 8).

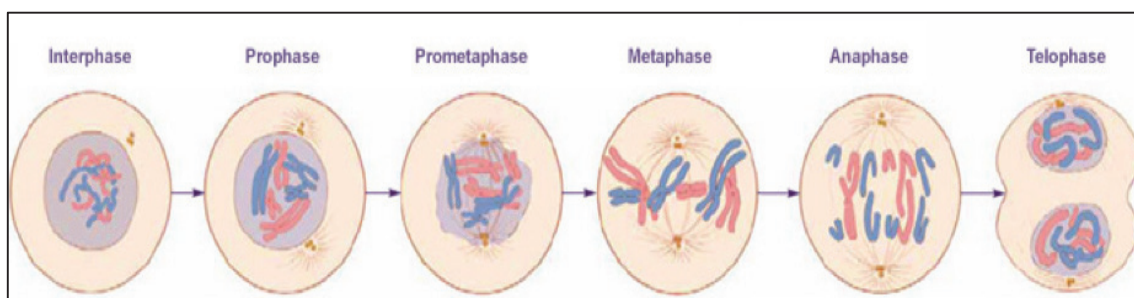


Figura 1. 8. Esquema representant les diferents fases de la mitosi. Els cromosomes estan representats en dos colors fent referència a l'origen matern i patern de cada un dels cromosomes. (Figura obtinguda de <https://publications.nigms.nih.gov/insidethecell>)

Qualsevol error no reparat durant les fases S i M pot comportar mutacions o alteracions cromosòmiques que seran transmises a les cèl·lules filles i això pot tenir conseqüències deletèries a nivell d'organisme com poden ser l'aparició de tumors si les mutacions es donen a nivell somàtic, o bé malalties congènites si les mutacions tenen lloc a les línies germinals. Així doncs, les diferents fases de la divisió cel·lular estan finament regulades per a que tinguin lloc de manera ordenada i unidireccional en el temps, vetllant així per a una correcta duplicació i distribució del DNA a les cèl·lules filles.

2. 1. Regulació del cicle cel·lular

En eucariotes, el cicle cel·lular està controlat per l'oscil·lació de l'activitat dels duets Ciclina/quínasa dependent de Ciclina (CDK), on la CDK és la subunitat catalítica amb una expressió constant i la Ciclina és la subunitat reguladora que s'expressa de manera variable al llarg del cicle cel·lular. Diferents duets Ciclina/CDK governen els diferents estadis del cicle cel·lular. La Ciclina D s'acumula durant la fase G1 en resposta a estímuls mitogènics i, juntament amb CDK4 o CDK6, promou la fosforilació i conseqüent inactivació de la proteïna del Retinoblastoma (pRb)¹⁸. La inhibició de la pRb induirà l'activitat del factor E2F, que activarà la transcripció de les ciclins de la fase G1/S i S, així com de les proteïnes necessàries per a la replicació del DNA durant la fase S. Una elevada activitat dels complexos Ciclina E/CDK2 i Ciclina A/CDK2 promou l'entrada a la fase S i la progressió de la replicació mentre que inhibeix l'activitat del complex promotor de l'anafase (APC/C). Aquesta activitat es manté fins a l'arribada de la fase G2/M on s'indueix l'expressió de la ciclina B i l'activació del complex Ciclina B/CDK1. En aquest estadi s'assoleix l'activitat CDK total màxima, i l'arribada a aquest llindar determina l'entrada en mitosi de la cèl·lula. L'activitat de CDK1 està regulada mitjançant l'equilibri de l'activitat de la quínasa WEE1 i la fosfatasa CDC25. Mentre dura la fase S, els nivells de WEE1 es mantenen elevats, inhibint així l'activitat de CDK1. El complex Ciclina B/CDK1 actuarà promovent la mitosi i activant el complex APC/C que en última instància, induirà la sortida de la mitosi i la disminució de l'activitat CDK, tornant així a la fase G1 (Figura 1. 9.)^{19,20}.

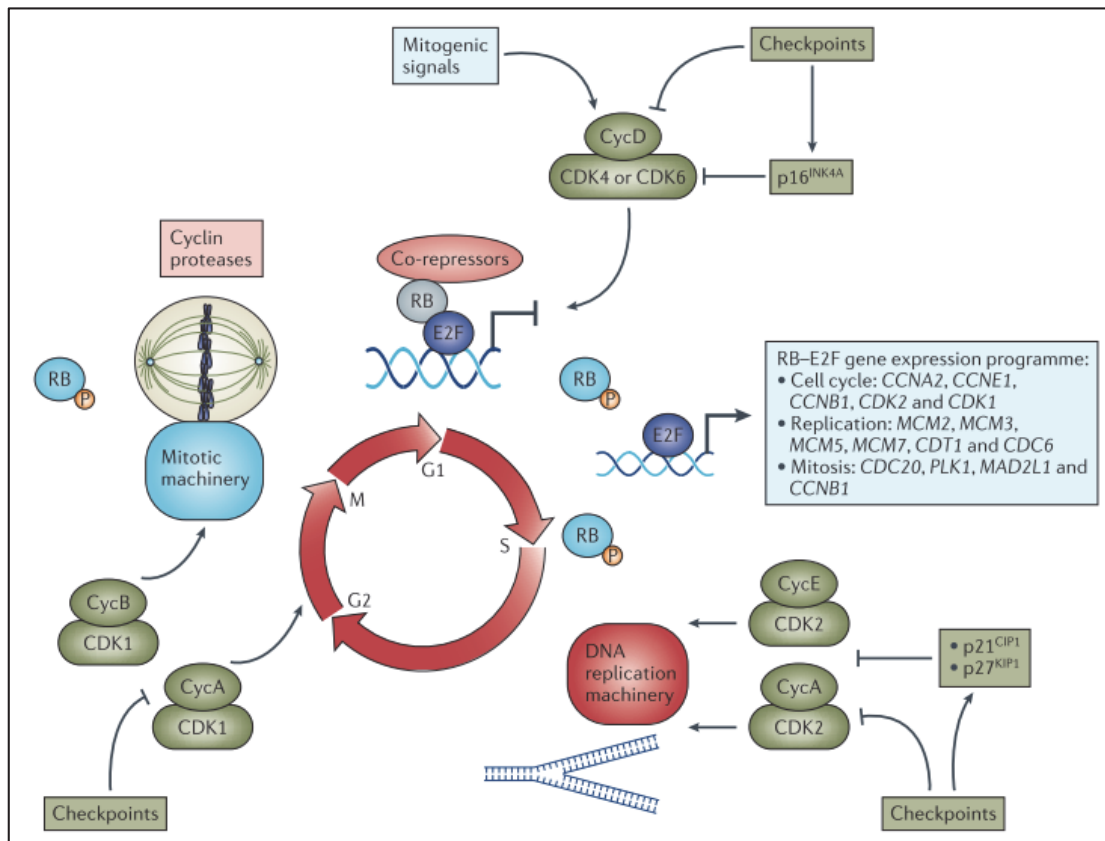


Figura 1. 9. Esquema representant la regulació del cicle cel·lular per els diferents duets Ciclina/CDK i la proteïna del retinoblastoma. (Figura obtinguda de Dobblestein, M i Sorensen CS, 2015.)

2. 1. 1. Oncogens i supressors de tumors

Oncogens

Un oncogen és un gen que té per producte una proteïna (oncoproteïna) caracteritzada per tenir tres propietats principals: promoure el creixement cel·lular i la divisió, inhibir l'apoptosi i contribuir a la formació i progressió de tumors. Generalment els oncogens actuen sobre les transicions G1/S i G2/M, promovent la replicació i la mitosi, respectivament. Els oncogens són formes mutades de proto-oncogens. Durant condicions normals, els proto-oncogens s'encarreguen de controlar la progressió normal del cicle cel·lular. Podem trobar diferents tipus de proto-oncogens, des de receptors de membrana com l'EGFR fins a GTPases com KRAS o bé ciclins com la ciclina D1 i la ciclina E1. El pas de proto-oncogen a oncogen pot venir determinat per mutacions, translocacions o

amplificacions cromosòmiques que comportaran un augment en els nivells o l'activitat de la proteïna per la qual codifica l'oncogen²¹.

L'estrès oncogènic és un dels principals promotors de la senescència^{21,22}. La sobre-expressió o sobre-activació de certs oncogens activa les vies de senyalització de resposta al dany al DNA i punts de control, provocant així l'aturada de les cèl·lules en el cicle cel·lular. La ciclina E actua sobre dos punts crítics del cicle cel·lular, per una banda promou el pas de G1 a S, i d'altra banda promou l'engegada de les forquilles de replicació. La sobre-expressió de c-Myc també actua sobre la progressió de la fase S, i correlaciona amb un augment de la resposta de dany al DNA i un augment de la inestabilitat genòmica²³.

Supressors de tumors

A diferència dels oncogens, els supressors de tumors s'encarreguen de frenar la progressió cel·lular o induir l'apoptosi en cas de condicions adverses, protegint així la cèl·lula d'una possible transformació maligna. D'entre els diversos supressors de tumors trobem pRB, p53 i PTEN.

pRB és el primer dels supressors de tumors descrits i la seva activitat es necessària per frenar l'inici de la replicació del DNA. Així doncs una disfunció en la seva activitat induirà la replicació del DNA sense tenir en compte que les condicions siguin favorables i no comportin cap possible dany al material genòmic de la cèl·lula^{18,24}.

p53 representa el supressor de tumors més mutat en càncer, certes mutacions generaran una disfunció de la proteïna mentre que d'altres n'induiran una activitat oncogènica. En situacions normals p53 està unida a MDM2, que promou la seva degradació per via del proteasoma. Quan s'activa la resposta al dany al DNA, p53 és fosforilada per ATM, Chk1/Chk2 entre d'altres. Aquesta fosforilació permet que p53 es dissociï de MDM2 i els nivells proteics s'estabilitzin²⁵⁻²⁷. Un cop p53 és activa, promourà la transcripció de diversos gens que codifiquen per a proteïnes inhibidores de CDK (CKI), com p21 que induirà l'aturada del cicle cel·lular en G1²⁸ o gens que codifiquen per a proteïnes de la maquinària de resposta al dany al DNA com FANCC^{29,30}.

PTEN contribueix a l'estabilització dels nivells de p53 i, a més a més, s'ha demostrat que la manca d'aquesta proteïna induïx l'acumulació de inestabilitat genòmica així com errors en la segregació cromosòmica. Específicament, les cèl·lules mancades de l'activitat de PTEN presenten tolerància a l'estrès de replicació, la incapacitat d'activar correctament el punt de control de la fase S, i la consegüent acumulació de mutacions³¹⁻³³.

Segons les circumstàncies, una proteïna pot presentar dualitat oncogènica/supressora de tumors. PTEN n'és un clar exemple, ja que en una cèl·lula sana exerceix el rol de supressor de tumor, però la seva activitat en una cèl·lula amb l'activitat de p53 compromesa és oposada, ja que promourà l'estabilització d'una proteïna amb activitat oncogènica³⁴.

2. 1. 2. Punts de control o *Checkpoints*

Els punts de control monitoritzen la progressió del cicle cel·lular i són els encarregats d'aturar la cèl·lula en el pas a la següent etapa del cicle en el cas de que el pas previ no s'hagi dut a terme correctament. Trobem quatre punts principals de control al llarg del cicle cel·lular: a les fases G1, S i G2 trobem els punts de control de dany al DNA, i a la fase M trobem el punt de control de segregació cromosòmica²⁵ (Figura 1. 10.).

Punt de control de la transició G1/S

Al final de la fase G1 trobem un punt de no retorn en el que la cèl·lula està compromesa a entrar al cicle cel·lular i no pot retornar a la fase G0, és el que es coneix com a punt de restricció (R)³⁵. En aquest punt la cèl·lula integrarà la informació corresponent a les condicions favorables per a la divisió cel·lular, com la presència de nutrients o enzims i metabòlits necessaris per a la replicació. A més a més, quan la cèl·lula pateix algun tipus de dany al DNA, aquesta activa la via del *checkpoint*, ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53-p21 que induirà l'aturada de la cèl·lula en G1 per permetre la reparació del dany causat.

Punt de control de la fase S

Aquest punt de control s'activa degut a alteracions en el desenvolupament de la replicació del DNA. Un bloqueig de les forquilles de replicació activarà ATR, que fosforilarà Chk1 i

1 | INTRODUCCIÓ

al seu torn actuarà sobre les proteïnes que regulen la replicació, inhibint la progressió de les forquilles de replicació en funcionament, fins que el dany no s'hagi reparat ^{19,36}.

Punt de control de la transició G2/M

Aquest punt de control avalua si la cèl·lula està en condicions per a entrar en mitosi. De manera anàloga al punt de control de la fase G1, es permet que el dany al DNA es pugui reparar abans de procedir a la fase M. Per a l'entrada a mitosi s'ha d'activar el complex Ciclina B/CDK1 mitjançant la desfosforilació a la tirosina 15 de CDK1. La fosfatasa encarregada de dur aquesta tasca és CDC25c. En cas de dany al DNA, ATR activarà Chk1, que fosforilarà CDC25c inhibint-la, i mantenint així l'estat inactiu del duet Ciclina B/CDK1 i impedit l'entrada en mitosi ^{37,38}.

Punt de control de l'assemblatge del fus mitòtic (SAC)

El punt de control mitòtic o SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) monitoritza la orientació dels cromosomes al fus mitòtic i frena la progressió de metafase a anafase fins que tots els cromosomes es troben ben ancorats i orientats a l'equador del fus mitòtic. El SAC és actiu durant la prometafase, la securina inhibeix la separasa encarregada de separar les dues cromàtides germanes mitjançant la degradació del complex cohesina. Quan s'arriba a la metafase, amb tots els cromosomes correctament alineats, el SAC s'inactiva i s'indueix així la degradació de la securina, amb la conseqüent activació de la separasa i el pas de metafase a anafase, marcat per la segregació cromosòmica. D'aquesta manera el SAC prevé pèrdues de cromàtides per la segregació prematura de cromosomes mal ancorats al fus, i les conseqüents alteracions en la ploïdia de la cèl·lula ³⁹.

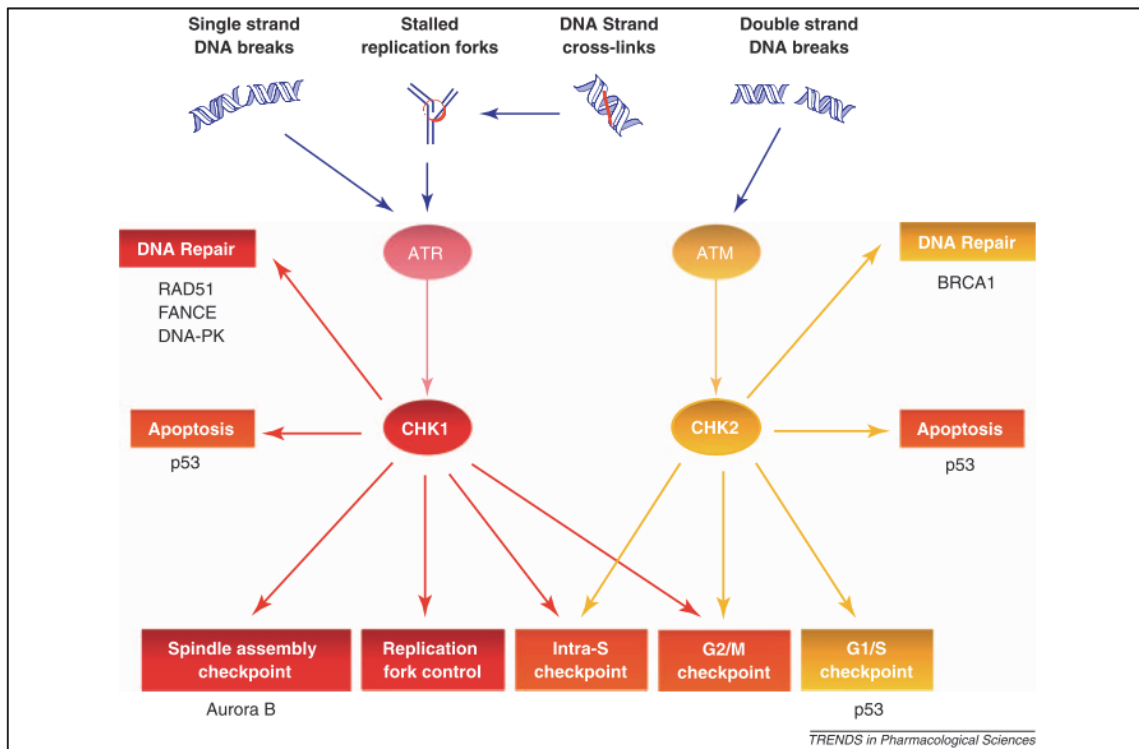


Figura 1. 10. Punts de control del cicle cel·lular. Cascades de senyalització ATR/Chk1 – ATM/Chk2 i control de la progressió del cicle cel·lular. (Figura obtinguda de Garret, MD i Collins, I, 2011).

3. Replicació del DNA

La replicació del DNA ha d'estar regulada d'una manera molt fina per tal d'assegurar una fidel duplicació del genoma a cada divisió cel·lular. En humans, la replicació del DNA dura entre 6 i 10 hores. Els orígens de replicació corresponen a les zones del genoma on s'inicia la replicació, i s'activen en dues etapes consecutives i coordinades: en primer lloc es dona el reconeixement de la seqüència per part del complex pre-replicatiu (Pre-RC, Figura 11), fenomen que es coneix com "licenciament" dels orígens de replicació; posteriorment té lloc l'inici de la replicació del DNA, és el que anomenem "engegada" dels orígens de replicació. Aquestes dues etapes consecutives són essencials per a protegir el genoma de la reduplicació durant un mateix cicle cel·lular. El licenciament dels orígens de replicació té lloc des del final de la fase M fins al final de la fase G1, on el complex helicasa MCM s'uneix al voltant del DNA de doble brai conjuntament amb altres cofactors. El complex MCM s'uneix al DNA en excés i no tots els orígens llicenciats seran engegats durant la fase S, són el que anomenem orígens de llicència latent (*license dormant origins*)⁴⁰. Certs estudis proposen que aquest excés d'orígens latents es poden activar en resposta a estrès de replicació que comporti l'aturada o l'esfondrament de forquilles de replicació^{41,42}. A banda de poder exercir un mecanisme de rescat, s'ha especulat que aquesta potencial versatilitat d'orígens de replicació pugui jugar un paper durant el desenvolupament per a donar flexibilitat de replicació en diferents programes de diferenciació. L'engegada dels orígens de replicació té lloc mitjançant la formació del complex pre-iniciació (pre-IC) i l'activació del complex helicasa MCM per part de les CDK de la transició G1/S juntament amb la quinasa dependent de DBF4 (DDK, sombrejat lila a la Figura 11). A més a més, aquestes quinases promouran l'addició de la resta de factors necessaris per a la replicació com la topoisomerasa o la polimerasa; i l'activació del complex helicasa MCM reclutarà altres proteïnes al pre-IC, generant així dues forquilles de replicació actives a banda i banda de l'origen de replicació, aquesta unitat funcional rep el nom de replisoma⁴³. A les forquilles de replicació, la doble hèlix del DNA s'obre i es desenrotlla exposant així els nucleòtids desaparellats per a poder permetre el reconeixement i l'aparellament de bases per a la incorporació dels nucleòtids lliures per part de l'enzim polimerasa. Quan trobem un replisoma actiu, certes proteïnes implicades en els punts de control participaran en la inhibició dels orígens de replicació adjacents protegint així la cèl·lula de la inestabilitat genòmica (Figura 1. 11.)²².

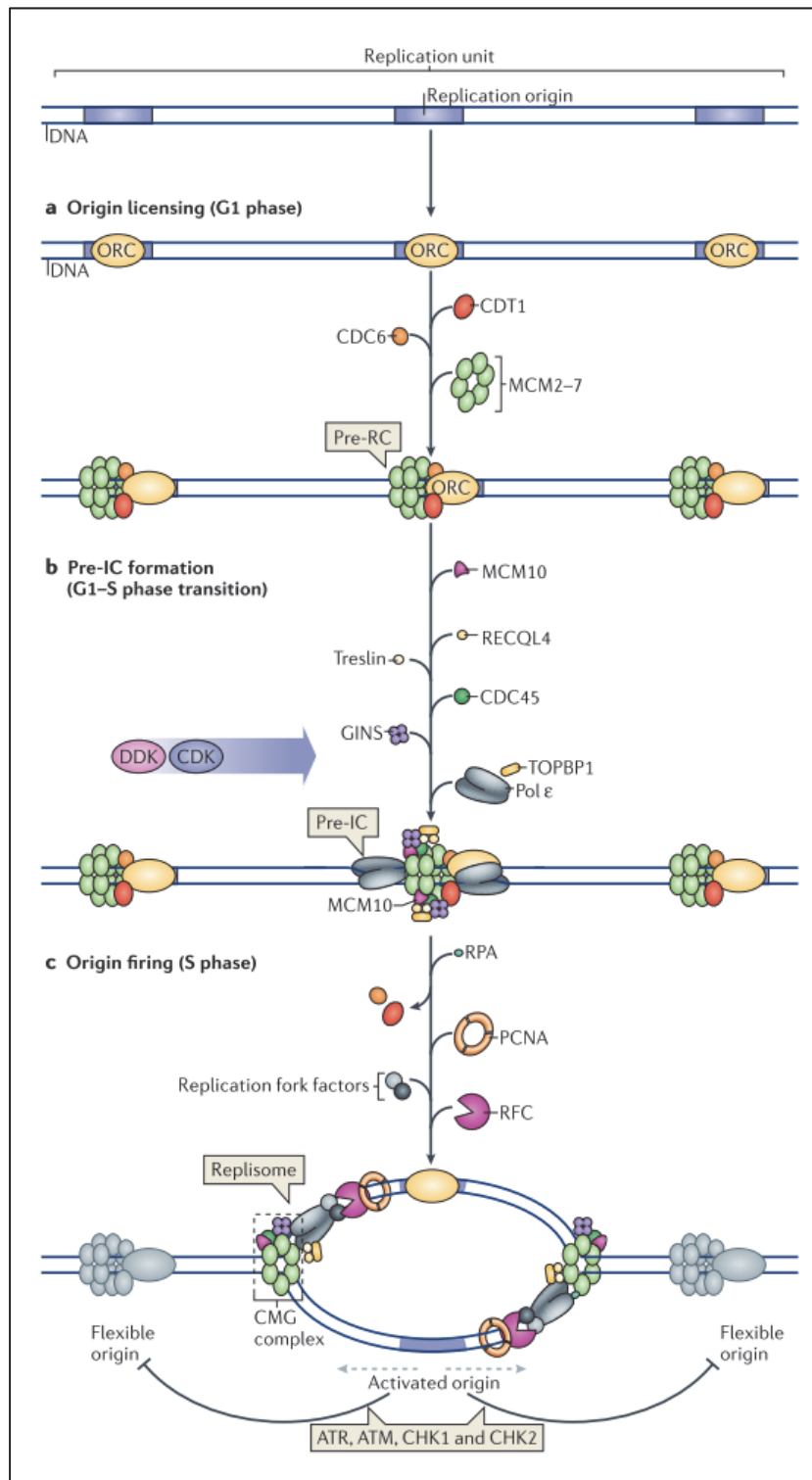


Figura 1. 11. Esquema representatiu de l'activació dels orígens de replicació. A. Llicenciament de l'origen de replicació. B. Formació del complex pre-IC. C. Engegada de l'origen de replicació. (Figura obtinguda de Fragkos, M, Ganier, O, Coulombe, P, et al., 2015)

3. 1. Estrès de replicació

Durant la fase S del cicle cel·lular, las bases del DNA queden exposades i per tant són molt més sensibles a qualsevol dany. Així doncs, el desenvolupament de la replicació està subjecte a errors i interrupcions que la cèl·lula ha de controlar i reparar. En el cas en que els mecanismes de control i reparació no siguin òptims, el dany causat al DNA s'anirà acumulant i es produirà una aturada del cicle cel·lular i, en cas que el dany no sigui reparat, la mort de la cèl·lula. L'estrès que pot rebre una cèl·lula mentre duplica el DNA pot tenir diversos orígens que es poden classificar en endògens i exògens. Com a estrès endogen al qual la cèl·lula ha de fer front trobem les espècies reactives d'oxigen (ROS) que provenen de l'estrès oxidatiu, l'activació d'oncogens, els errors d'incorporació de nucleòtids per part de la polimerasa així com petits talls o *nicks* al DNA resultants dels processos fisiològics de la replicació, o bé alteracions en el metabolisme de dNTP (Figura 1. 12.) . De fet, molts dels estressos endògens venen donats per el mateix DNA, com per exemple, durant la replicació de telòmers i seqüències repetitives o bé en el cas de que les zones de replicació col·lideixin amb zones del DNA que s'estan transcrivint ²³ (Figura 1. 12.). Els tipus d'estrès exògens poden venir donats per la presència de substàncies genotòxiques (agents intercalants o alquilants del DNA) o bé radiació de tipus UV o gamma⁴⁴.

Quan la cèl·lula pateix dany al DNA durant la fase S, la DNA polimerasa atura la seva activitat a la forquilla de replicació. Si el dany no és de molta envergadura, es repararà i la polimerasa reprendrà la seva activitat. En cas de que l'abast del dany superi les capacitats de reparació de la cèl·lula, la forquilla de replicació s'esfondrarà, és a dir es produirà un desacoblament de la maquinària de replicació del DNA ^{20,23}. Quan la DNA polimerasa i la helicasa es desacoblen del DNA, queden exposats trams de DNA de simple bri (ssDNA) que seran reconeguts per la maquinària de resposta al dany al DNA de la cèl·lula. La proteïna de replicació A (RPA) cobrirà els trams de ssDNA i això conduirà a l'activació de la proteïna quinasa ATR, la proteïna central de la resposta al estrès de replicació. ATR fosforilarà la histona H2AX a la serina 139 i CHK1 a la serina 345, entre d'altres factors ⁴⁴. Mentre que p-H2AX és un marcador general de dany al DNA, la fosforilació de CHK1 és un marcador específic d'estrès de replicació. L'acció d'ATR també tindrà un efecte sobre proteïnes implicades en la regulació de la progressió del cicle cel·lular o l'apoptosi, com WEE1, CDC25 o p53 ³⁶ (Figura 1. 12.).

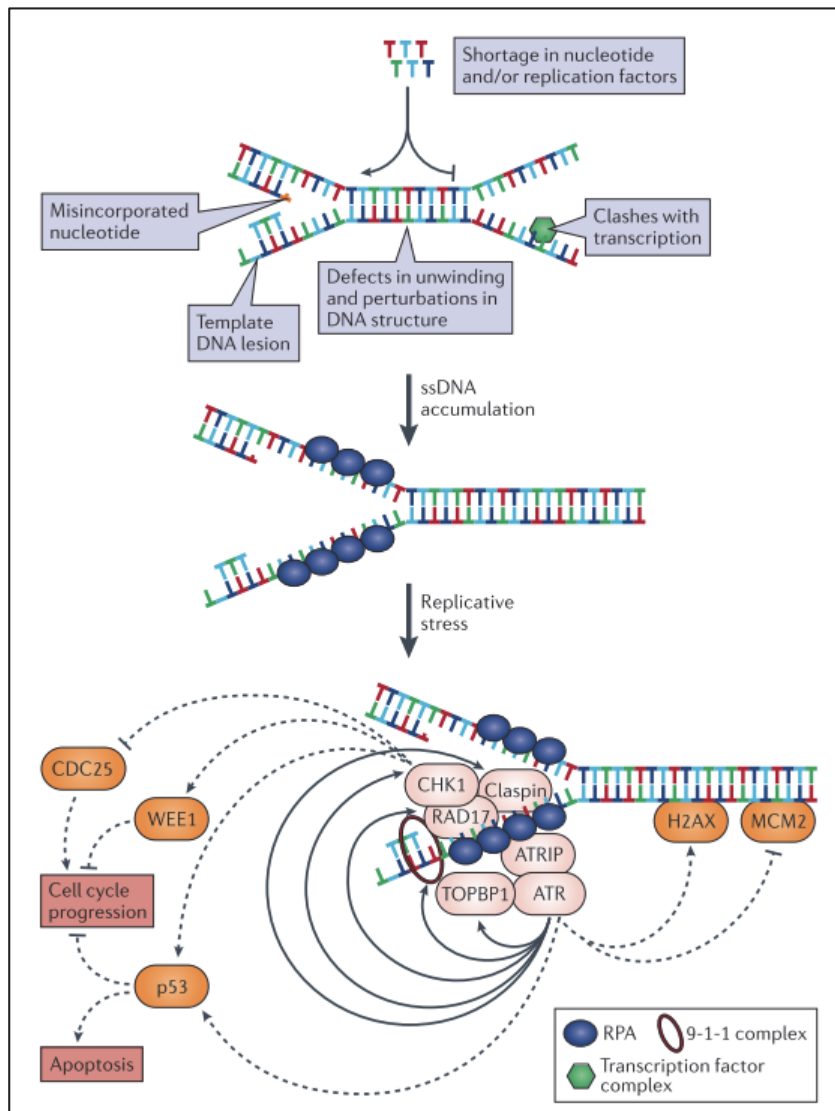


Figura 1. 12. Respostes en front a estrès de replicació. Una sèrie d'agressions al DNA induirà una acumulació de ssDNA i la conseqüent activació de la maquinària de resposta al dany del DNA. (Figura obtinguda de *Dobblestein, M i Sorensen CS, 2015.*)

3. 1. 1. Estrès de replicació i càncer

Les cèl·lules tumorals es divideixen a una velocitat molt superior a les cèl·lules sanes i això té com a conseqüència una disminució en l'eficiència del control del cicle cel·lular i un augment en l'estrès de replicació. L'estrès de replicació forma part de les característiques de una cèl·lula tumoral i és conseqüència directa de les mutacions en gens supressors de tumors o l'activitat de certs oncogens^{45,46}. Al seu torn l'estrès de replicació potenciarà

l'acumulació de mutacions secundàries²⁰ (Figura 1. 13.). De manera inversa, una disminució en l'activitat de gens supressors de tumors també pot desembocar en un increment en l'estrès de replicació. Això succeeix mitjançant la promoció del pas de la fase G1 a la fase S¹⁸. Degut a aquest estrès crònic, les cèl·lules tumorals presenten de manera natural la presència de proteïnes de resposta al dany al DNA⁴⁵ (Figura 1. 13.). El fet de que les cèl·lules canceroses presentin aquest dany basal les torna molt més vulnerables a l'estrès de replicació exogen. És en aquest principi en què es basa el tractament quimioterapèutic.

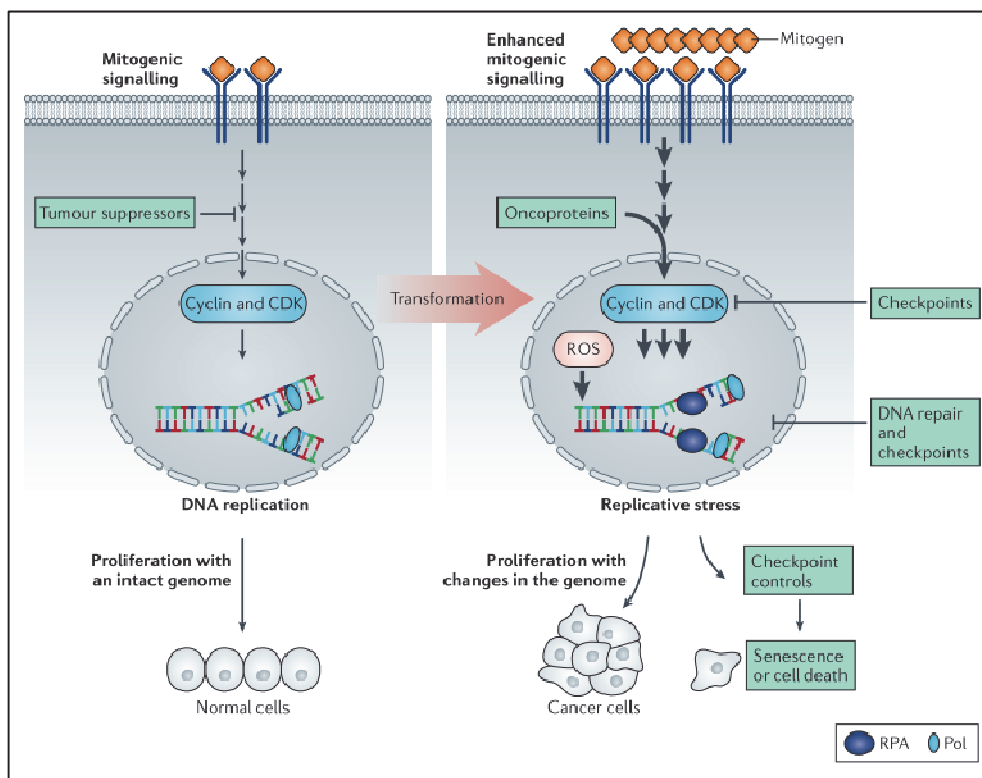


Figura 1. 13. Transformació oncogènica. Proliferació cel·lular controlada per la senyalització mitogènica i l'acció de supressors de tumors, el genoma queda intacte després de cada divisió (Esquerra). Sobre-activació mitogènica, l'activació d'oncoproteïnes i inhibició de supressors de tumors indueixen un increment en l'estrès de replicació que activa la resposta al dany al DNA. Les cèl·lules moren o bé acumulen canvis en el seu genoma a cada divisió (Dreta). (Figura obtinguda de *Dobblestein, M i Sorensen CS, 2015.*)

3. 1. 2. Estrès de replicació i desenvolupament hematopoètic

Les cèl·lules precursors del llinatge hematopoètic presenten una taxa de divisió molt més elevada que certs tipus de cèl·lules tumorals, fet que comporta un increment en els nivells d'estrès de replicació endogen el qual han de neutralitzar per tal de prevenir possibles lesions al DNA. En concordança amb això, diversos models de ratolí deficient per a proteïnes implicades en la resposta del dany al DNA presenten alteracions en el desenvolupament del llinatge hematopoètic. Els ratolins sense ATM són propensos a desenvolupar limfomes tímics i moren al cap d'uns pocs mesos de vida⁴⁷, a més a més, una acumulació de dany al DNA per estrès oxidatiu redueix la capacitat d'auto-renovació de les cèl·lules mare hematopoètiques⁴⁸. Recentment s'ha demostrat que una de les causes de l'envelliment natural de les cèl·lules mare hematopoètiques és l'acumulació d'estrès de replicació, i disfuncions en proteïnes implicades en la replicació del DNA, com Geminina i MCM, promou un defecte de la producció d'eritròcits en ratolí^{49,50}.

4. Metabolisme de dNTP

4. 1. Síntesi de dNTP

És de vital importància que les cèl·lules controlin els nivells de síntesi i degradació de dCTP, dTTP, dGTP i dATP necessaris per a la síntesi del DNA així com per a la seva reparació. En cas de que aquesta regulació es vegi compromesa, es produirà un desequilibri, una depleció o una acumulació d'un o varis dNTPs i, consegüentment, es produirà un augment en la taxa de mutació. Una replicació o reparació errònia del DNA i les mutacions que en deriven són un dels principals motors de la gènesi tumoral ^{36,51}. La cèl·lula pot obtenir dNTP per dues vies, per la síntesi *de novo* o bé per la via de salvament.

4. 1. 1. Via *de novo*

A la via *de novo*, els dNTP són produïts a partir de l'àcid inosínic (IMP) i de la uridina monofosfat (UMP). Les purines es derivaran de l'IMP, mentre que les pirimidines ho faran a partir de l'UMP. Els ribonucleòsid difosfats ADP, GDP, CDP i UDP són reduïts a desoxi-ribonucleòsid difosfats (dNDP), dADP, dGDP, dCDP i dUDP respectivament per l'enzim Ribonucleòtid Reductasa (RNR). A continuació, els dNDP són fosforilats a dNTP per l'enzim Nucleòsid Difosfat Quinasa (NDPK). La dTTP es produeix a partir de dUMP, que resulta de la hidròlisi de dUTP o de la desaminació de dCMP. A continuació la dUMP és metilada, produïnt-se així dTMP que serà fosforilada fins a aconseguir dTTP ⁵²(Figura 1. 14).

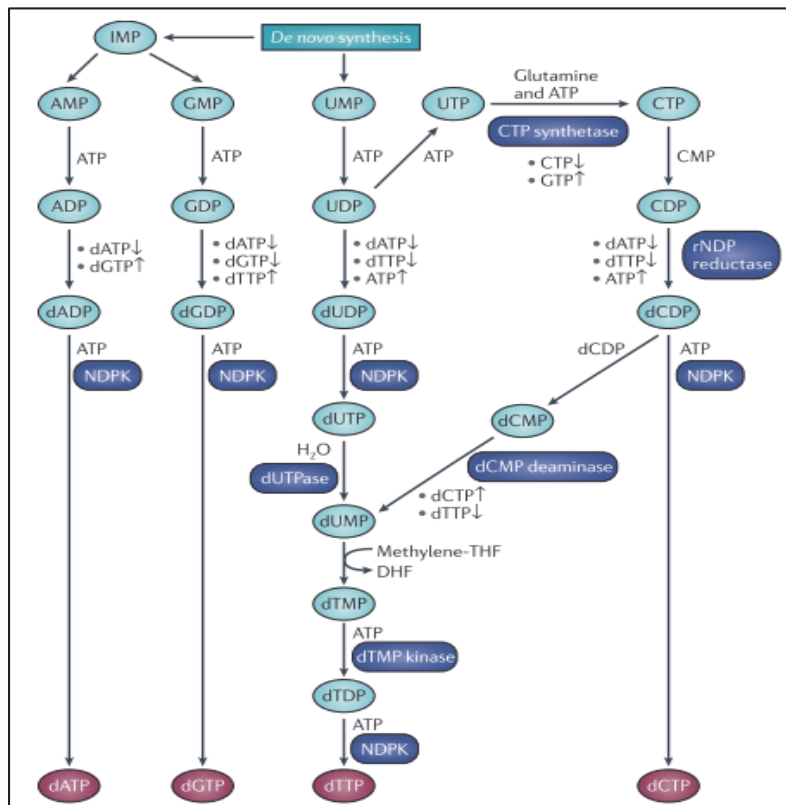


Figura 1. 14. Rutes metabòliques de la via de síntesi de novo de dNTP. En blau clar, els metabòlits intermediaris; en vermell, el producte final (dNTP) i en blau marí, els enzims. (Figura adaptada de Mathews CK, 2015.)

4. 1. 2. Via de salvament

A la ruta de salvament, els dNTP es generen a partir de desoxiribonucleòsids que són introduïts a la cèl·lula i fosforilats per l'acció dels diferents enzims desoxiribonucleòsid quinasa (dNK), reutilitzant així els nucleòsids i bases nucleades procedents de la degradació d'àcid nucleic d'aliments o altri. L'enzim Timidina quinasa (TK) té dues isoformes en mamífers: TK1 i TK2, que es troben al citoplasma i al mitocondri, respectivament⁵³. Aquest enzim té una funció principal en el salvament de la dTTP. L'enzim desoxicitidina quinasa (dCK) participa en el salvament de dCTP, així com de dATP i dGTP. L'enzim desoxiguanosin quinasa (dGK) té com a substrats la desoxiguanosina i desoxiadenosina, però és molt menys eficient. L'enzim TK és regulada durant el cicle cel·lular, mentre que l'enzim dCK presenta una expressió constitutiva (Figura 1. 15.)^{52,54}.

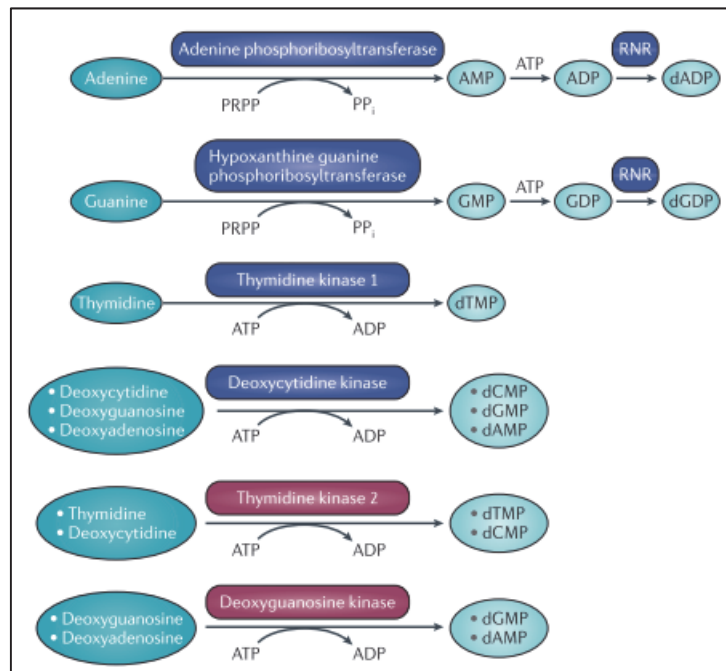


Figura 1. 15. Rutes metabòliques de la via de síntesi de salvament de dNTP. En blau clar, els metabòlits; en blau marí, els enzims citosòlics i en vermell, els enzims mitocondrials. (Figura adaptada de Mathews CK, 2015.)

4. 1. 3. Ribonucleòtid Reductasa

En humans, l'enzim RNR és un enzim de classe I i es compon per dues subunitats homodimèriques, R1 o subunitat gran (170 kD) i R2 o subunitat petita (88 kD). Dues subunitats alfa formen la proteïna R1 i dues subunitats beta, de menor tamany, formen la proteïna R2^{55,56}. Una proteïna R2 alternativa pot substituir la forma R2 canònica. Aquesta R2 alternativa s'anomena p53R2 i la seva expressió s'indueix com a resposta al dany al DNA⁵⁷⁻⁶⁰. També s'ha descrit que el complex R1p53R2 té una funció en la replicació del DNA mitocondrial⁶¹. Tot i rebre el nom de p53, la relació entre aquest supressor de tumors i la forma alternativa de R2 no ha estat completament elucidada⁶².

La RNR és l'enzim limitant per a la síntesi *de novo* de dNTP i és l'únic enzim responsable de la reducció dels NDPs al seu dNDP corresponent, que posteriorment seran fosforilats a dNTP⁶³. Això fa d'aquest enzim un punt clau i indispensable per a la replicació i reparació del DNA. Per això, la cèl·lula ha de vetllar per la seva correcta regulació i activitat.

Existeixen diversos mecanismes de regulació d'aquest enzim: regulació al·lostèrica, regulació post-traduccionals i, en llevats, localització sub-cel·lular.

La regulació al·lostèrica de la RNR té lloc a la subunitat R1. La subunitat alfa conté dos llocs de regulació al·lostèrica. El primer lloc (A- activitat) unirà ATP o dATP, activant o inhibint, respectivament, l'activitat del complex. Un segon lloc (S- especificitat) unirà dATP, dGTP i dTTP per tal d'ajustar l'especificitat dels diferents substrats de l'enzim, regulant així la proporció de cada dNTP produït. Quan dATP s'uneix al lloc S, l'enzim RNR generarà dCDP i dUDP. Quan és dTTP el que s'hi uneix, l'enzim generarà dGDP i inhibirà la síntesi de pirimidines. La unió de dGTP induïx la producció de dADP i inhibeix la producció de GDP i pirimidines (Figura 1. 16.)^{55,62,64}.

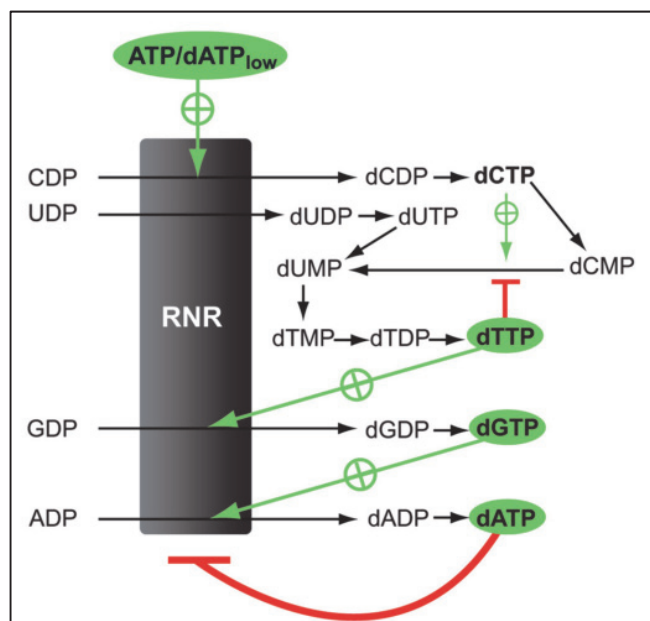


Figura 1. 16. Regulació al·lostèrica de la síntesi de novo de dNTP. En verd estan presentats els reguladors de l'enzim. Les fletxes verdes indiquen activació mentre que les línies vermelles indiquen inhibició. (Figura obtinguda de Hofers, A *et al.* 2012)

Durant el cicle cel·lular, mentre que la subunitat R1 és estable al llarg del cicle cel·lular amb una expressió constitutiva, la subunitat R2 es regula mitjançant transcripció així com regulació de l'estabilitat del mRNA i de la proteïna^{65,66}. Aquesta segona subunitat és la subunitat limitant del complex i presenta uns nivells màxims durant la fase S del cicle cel·lular⁶³.

4. 2. Catabolisme de dNTP

La degradació dels dNTP juga un paper tan important en la seva regulació com la seva biosíntesi ⁶⁷. L'enzim principal encarregat del catabolisme dels dNTP és SAMHD1. SAMHD1 es troba sota forma de monòmer o dímer i presenta dos llocs de regulació al·lostèrica ⁶⁸. En un dels llocs, la unió de GTP o dGTP promourà la tetramerització del complex i la unió de qualsevol dNTP al segon lloc de regulació que determinarà l'especificitat de l'enzim. La disminució dels nivells de SAMHD1 condueix a una acumulació dels nivells intracel·lulars de dNTP i provoca un atur a la fase G1 del cicle cel·lular ^{52,69}.

4. 3. dNTP i càncer

4. 3. 1. dNTP i Mutagènesi

Se sap que el càncer apareix a partir d'acumulació de mutacions. Aquestes mutacions poden succeir de manera espontània o bé de manera induïda. El metabolisme dels dNTP està regulat amb una elevada precisió al llarg del cicle cel·lular. Durant la fase S, els nivells de dNTP són màxims, arribant a vint vegades més nivells que a la fase G1 i coincidint amb la replicació del DNA mentre que durant les fases G1/G0 i G2/M, els nivells es redueixen ⁵². Una regulació anòmala de les reserves cel·lulars de dNTP pot conduir a aberracions durant la replicació, un augment de la taxa de mutagènesi, a un augment en la sensibilitat a agents genotòxics, i, conseqüentment, aquests defectes conduiran a la transformació oncogènica o bé a la mort cel·lular ^{59,70,71}.

Una deficiència global d'un o varis dNTP produirà una aturada en la replicació i defectes en la reparació del DNA mentre que una expansió de les reserves intracel·lulars de dNTP o un desequilibri en les proporcions dels dNTP té efectes mutagènics ^{59,72}. A més a més, aquest excés de dNTP també pot causar que les bases s'aparellin correctament però fora de la pauta correcta, conduint a mutacions de pauta de lectura degenerada. La regulació de dNTP pot venir donada per la desregulació d'oncogens que regulin l'expressió de proteïnes implicades en el metabolisme de dNTP.

4. 3. 2. dNTP i quimioteràpia

Molts fàrmacs anti-tumorals són anàlegs de nucleòsids o bases nucleiques i per activar-se necessiten ser convertits a anàlegs de nucleòtids mitjançant la ruta de salvament. No s'administren anàlegs de nucleòtids directament ja que aquests no podrien travessar la membrana cel·lular. Als anys 50, els doctors Berner i Cohen van descriure per primer cop el fenomen de la mort per manca de timidina. En el seu treball van descriure com bacteris deficients per a l'enzim timidilat sintasa (TS) eren sensibles a la manca de timidina en el medi de cultiu. Mentre que la soca salvatge aturava el seu creixement, els bacteris sense TS perdien la seva viabilitat⁷³. Aquest fenomen ha estat observat també en cèl·lules de mamífer que han estat tractades amb metotrexat, un compost que inhibeix l'enzim dihidrofolat reductasa i indueix així una deficiència en timidina⁷⁴. Aquesta deficiència en timidina provoca una caiguda en els nivells intracel·lulars de dTTP i un augment de més de mil vegades dels nivells de dUTP. Durant la replicació en presència de metotrexat, el dUTP s'incorporarà a les noves cadenes de DNA i conseqüentment s'induiran talls al DNA i un augment en la mort cel·lular⁷⁵. Aquests estudis van conduir al desenvolupament de tractaments amb anàlegs de purina i pirimidina, com per exemple el 5-Fluorouracil (Taula 1. 1.). Tot i la seva eficàcia, la inestabilitat genòmica inherent a les cèl·lules tumorals pot facilitar la seva adaptació a aquest tractaments i generar resistències, motiu pel qual actualment s'estan invertint esforços per a trobar dianes terapèutiques per a un co-tractament amb inhibidors específics i agents quimio-terapèutics tradicionals.

| Anàlegs de Pirimidines | Diana terapèutica | Ús clínic |
|--------------------------------------|----------------------------|---|
| 5- Fluorouracil | Timidilat sintasa | Càncer de colon, pàncreas, mama, estómac, cap i coll, pell. |
| Arabinosilcitosina (AraC/Citarabina) | DNA polimerasa | Leucèmia limfocítica aguda, Limfoma no-Hodgkin. |
| Gemcitabina | RNR | Càncer d'ovari, pulmó i pàncreas. |
| Anàlegs de Purines | | |
| 6-Mercaptopurina | Síntesi de novo de purines | Leucèmia limfocítica aguda, Limfoma no-Hodgkin. |
| Fludarabina | DNA polimerasa i RNR | Leucèmia limfocítica crònica, limfomes de baix grau. |
| Clofarabina | RNR | Leucèmies pediàtriques agudes. |

Taula 1. 1. Exemples d'anàlegs de pirimidines i purines, la diana terapèutica sobre la qual actuen i l'ús clínic. (Informació extreta de *Dobblestein, M i Sorensen CS, 2015.*)

4. 4. dNTP i desenvolupament hematopoètic

El sistema hematopoètic està subjecte a un dels nivells d'estrès més elevats a l'organisme, havent de suplir una elevada demanda cel·lular que només es pot assolir amb taxes de proliferació elevades. Recentment s'han publicat estudis que demostren una sensibilitat del llinatge hematopoètic en front a alteracions en el metabolisme de dNTP. De fet els teixits on té lloc el desenvolupament hematopoètic és on els nivells de dNTP són més elevats ⁷⁶, remarcant un paper d'aquests metabòlits en la diferenciació cel·lular que té lloc en aquests òrgans. El ratolí deficient per a l'enzim dCK presenta una disminució dels nivells d'eritròcits a causa d'un increment en l'estrès de replicació⁷⁶. La manca d'aquest enzim també altera el desenvolupament de limfòcits T i B ⁷⁷.

5. ERK5

5. 1. MAPK

Les proteïnes quinases activades per mitògen (MAPK), són una família de proteïnes conservades al llarg de l'evolució que estan implicades en diverses vies de senyalització promotores de proliferació, diferenciació i apoptosi ⁷⁸. En mamífers, en trobem diverses subfamílies com ara p38, JNK, ERK 1/2, ERK 3/4, ERK5, ERK7 i ERK8. Aquestes proteïnes es caracteritzen per la seva capacitat de fosforilació de residus serina i treonina i la seva activitat pot ser regulada mitjançant un ampli ventall de mecanismes, com poden ser canvis de conformació, localització sub-cel·lular, fosforilació o degradació ^{79,80}. En les vies de senyalització de les Map Quinases, l'activació d'una Quinasa quinasa quinasa activada per mitògen (MAPKKK) fosforilarà una Quinasa quinasa activada per mitògen (MAPKK) que al seu torn fosforilarà una Quinasa activada per mitògen (MAPK) (Figura 1. 17.).

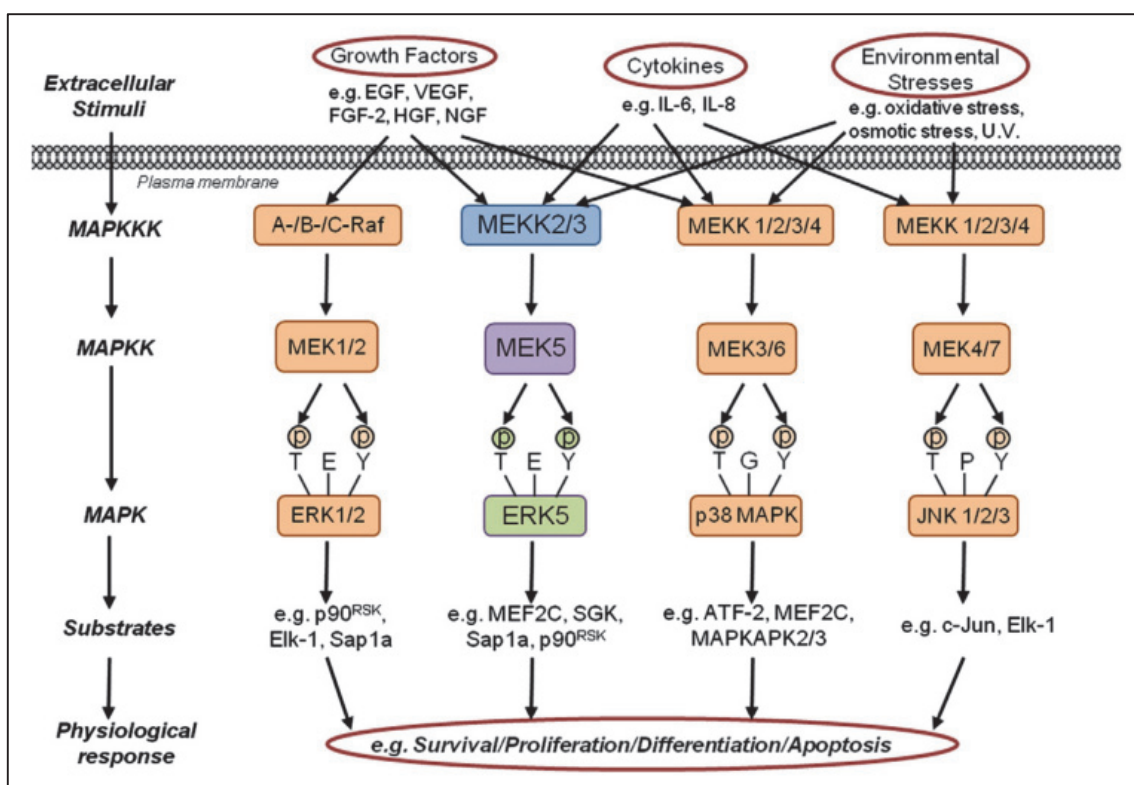


Figura 1. 17. Vies de senyalització de MAP quinases clàssiques. El senyal es transmet a través d'una via formada per tres nòduls centrals: MAPKKK, MAPKK, MAPK. (Figura adaptada de Nithianandarajah-jones, GN, 2012.)

5. 2. ERK5

ERK5, juntament amb ERK1/2, p38 i JNK pertany a les MAPK anomenades típiques, i va ser la darrera d'aquest grup en ser caracteritzada als anys 1990. ERK5 o MAPK7, es diferencia de la resta de MAP Quinases per la presència de un domini C-terminal que li confereix activitat transcripcional⁸¹. Aquesta proteïna s'expressa de manera ubíqua, i és activada per la via de MEK5 responnent a estímuls de creixement o d'estrès⁸². La seva activitat és necessària per a un correcte desenvolupament cardíac i de vasos sanguinis⁸³, i a més a més s'ha demostrat la seva implicació en processos tumorals, en la divisió cel·lular i la metastasi⁸⁴.

5. 2. 1. Estructura i activació d'ERK5

En humans, el gen *ERK5* o *MAPK7* es situa al cromosoma 17p11.2 i consta d'un total de 5,8 quilo-bases, amb una pauta de lectura oberta de 2,4 quilo-bases. La isoforma principal codificada per aquest gen es compon de 816 aminoàcids, una mida molt superior a la resta de MAPK que li ve donada per un domini C-terminal que no trobem als altres membres de la família. La part N-terminal va de l'aminoàcid 1 fins al 406 i es divideix en dues regions: la regió requerida per a la localització citoplasmàtica (aminoàcid 1-77) seguida per el domini quinasa (aminoàcid 78-406). Aquest segon domini comparteix un 52% d'homologia amb el domini quinasa d'ERK2 i pot subdividir-se en dues sub-regions: el domini d'unió a MEK5 (aminoàcid 78-139) i el domini d'oligomerització (aminoàcid 140-406). A diferència de la resta de MAPK, ERK5 té una part C-terminal de 410 aminoàcids que li confereix activitat transcripcional⁸⁵. Aquesta cua C-terminal presenta quatre regions importants: una seqüència de localització nuclear (NLS) (aminoàcid 505-539), dos dominis rics en prolina, PR1 (aminoàcid 434-465) i PR2 (aminoàcid 578-701) i un domini d'unió a MEF2 (440-501). Per tal d'activar ERK5, MEK5 fosforila la treonina 218 i la tirosina 220 d'aquesta proteïna. Un cop activada, ERK5 pot fosforilar altres dianes com poden ser c-Myc i MEF2 o bé es pot auto-fosforilar en la seva regió C-terminal que conté un domini NLS permetent així la seva translocació al nucli⁸⁶ (Figura 1. 18.). Així doncs, ERK5 pot actuar com a proteïna quinasa o bé com a factor de transcripció⁸³.

presenten cap anomalia durant el desenvolupament i són viables i fèrtils ^{89,90}. Quan es depleciona ERK5 d'un ratolí adult mitjançant un sistema induïble, els ratolins moren al cap de pocs dies degut a defectes en els vasos sanguinis que provoquen la seva fenestració i, conseqüentment, hemorràgies internes que condueixen a la mort.

Desenvolupament del sistema nerviós

Diversos estudis han demostrat que ERK5 juga un paper clau en la supervivència neuronal durant el desenvolupament del sistema nerviós. Els ratolins deficients per a ERK5, presenten anomalies en el desenvolupament del cervell, degut a una inhibició de la neurogènesi ⁹¹.

Desenvolupament del sistema hematopoètic

Tot i que ERK5 no és necessària per al manteniment de les poblacions de limfòcits T a la perifèria ⁹², en el nostre laboratori s'ha demostrat que la manca d'ERK5 en ratolí juga un paper en la regulació del principal receptor d'aquestes cèl·lules, el TCR i promou una alteració en els nivells de limfòcits T reguladors⁹³. Recentment també s'ha publicat un estudi que demostra que la manca d'ERK5 compromet un correcte desenvolupament dels limfòcits B mitjançant l'activitat del factor BAFF ⁹⁴.

5. 2. 3. ERK5, cicle cel·lular i càncer

Durant les darreres dècades, es coneix i s'ha estudiat en profunditat el rol de les MAPK, com ERK1/2, en la generació i progressió de tumors. ERK5 no ha estat una excepció i també ha despertat un gran interès en el camp de l'oncologia. A finals dels anys 90 es va descriure que la proliferació induïda per EGF en cèl·lules HeLa depenia d'ERK5 ⁸², mitjançant la fosforilació de la quinasa SGK que permetia l'entrada de les cèl·lules a la fase S ⁹⁵. Posteriorment es va demostrar que ERK5 participa en la transició G1/S mitjançant la regulació de la ciclina D1 ⁹⁶. En estudis més recents, s'ha demostrat que la manca d'ERK5 condueix a l'estabilització de p21 i p53, inhibint així el complex CDK2/ciclina E i aturant parcialment les cèl·lules en la fase G1 del cicle cel·lular^{97,98}. En concert amb aquests resultats, la sobre-expressió d'ERK5 en un model de càncer de pròstata, correlaciona amb un augment dels nivells de Geminin, una proteïna promotora de la replicació del DNA ⁹⁹.

Tot i que en alguns models la manca d'ERK5 induïx una aturada en la fase G1 del cicle cel·lular, altres estudis mostren que les cèl·lules sense ERK5 poden proliferar sense problemes¹⁰⁰.

La deficiència de *Slit2* o *Mpk1*, l'homòleg d'ERK5 en *S. Cerevisiae*, provoca un augment de la sensibilitat en front a agents genotòxics com la hidroxürea, un inhibidor específic de la RNR o bé la cafeïna, un inhibidor d'ATM^{101,102}. A més a més, Mpk1 contacta directament amb els factors Swi4 i Paf1 per activar la iniciació de la transcripció i l'elongació del transcrit, respectivament¹⁰³. Els efectes causats per la deficiència de Mpk1 en llevat poden ser revertits mitjançant l'expressió de la proteïna ERK5 humana, suggerint una conservació d'aquestes funcions d'ERK5 al llarg de l'evolució i un rol d'aquesta proteïna en la preservació de l'estabilitat genòmica en mamífers.

D'altra banda també s'han publicat estudis que mostren una implicació de l'activitat quinasa d'ERK5 en el progrés de la fase G2/M. La fosforilació d'ERK5 es veu incrementada en mitosi i s'uneix a BIM promovent la seva inactivació i, conseqüentment, la supervivència de les cèl·lules en mitosi. La fosforilació d'ERK5 en mitosi és independent de MEK5 i està regulada per CDK1^{104,105}. A més a més l'activitat d'ERK5 es requereix per a la regulació de l'expressió de NF-κB durant la transició G2/M del cicle cel·lular¹⁰⁶.

A nivell clínic, ERK5 representa un biomarcador de mal pronòstic en diferents tipus de càncer⁸⁴. En càncer de mama, una elevada expressió d'aquesta proteïna correlaciona amb una menor supervivència dels pacients i una resistència al tractament amb agents quimioterapèutics. Estudis *in vitro* on es va fer un co-tractament amb diferents inhibidors d'ERK5 i agents quimioterapèutics, mostren un augment en el dany al DNA i apoptosi a les línies cel·lulars tractades¹⁰⁷. Recentment també s'ha reportat que la inhibició d'ERK5 sensibilitza les cèl·lules de leucèmia mieloide aguda en front al tractament amb Citarabina (o Ara-C), una droga d'ús comú per a aquesta patologia^{108,109}. A nivell de càncer de pròstata, ERK5 també correlaciona amb una pitjor prognosi així com amb un increment en la metastasi als ossos⁹⁹. Això presenta ERK5 com una diana per a sensibilitzar certs tumors al tractament amb quimioteràpia tradicional.

En conjunt, tots aquests estudis apunten cap a la idea que ERK5 juga un paper important en la proliferació cel·lular, a diferents estadis del cicle cel·lular i sota diferents contextos.

2 . HIPÒTESI I OBJECTIUS

Evidències clíniques suggereixen que la desregulació de la via de senyalització MEK5/ERK5 és un promotor de la gènesi de tumors en varis tipus de càncer ^{84,99,107,110}. ERK5 està sobre expressada en molts tipus de tumors i existeix una relació directa entre l'augment dels nivells d'aquesta quinasa i la resistència a agents quimio-terapèutics ^{107,110}. Aquests fets condueixen a fer-se la següent pregunta: Té ERK5 un rol directe en la preservació de l'estabilitat genòmica?

HIPÒTESI

ERK5 participa en el manteniment de l'estabilitat genòmica.

OBJECTIUS

- 1 – Determinar el rol d'ERK5 en la preservació de la integritat genòmica en línies tumorals
- 2 – Determinar el rol d'ERK5 en el desenvolupament de poblacions altament proliferatives de progenitors hematopoètics.

3 . MATERIAL I MÈTODES

1. Tampons i altres reactius

- PBS 10X: 1M NaCl, 26M KCl, 14M KH₂PO₄, 80mM Na₂HPO₄
- TBS 10X: Per a un volum final de 500 mL, 50mL Tris-HCl 1M pH7.4, 150 mL NaCl 5M i 300 mL de H₂O mQ.
- Tampó Laemmli 1x: 1% SDS, 25mM Tris-HCl (pH6.8), 10% glicerol, 0,001% Blau de Bromofenol. En el cas de voler tractar les mostres amb medi reductor, al tampó Laemmli se li va afegir just abans del seu ús una concentració final de beta-mercaptoetanol a l'1%.
- Tampó SDS-PAGE 10x: 30 gr. Tris base, 144 gr. Glicina i 10 gr. SDS
- Tampó de transferència 1X 2 litres: 6 gr. Trizima, 28,84 gr. Glicina, 1 gr. SDS, 400 mL metanol.
- Tampó de bloqueig (western blot): PBS, 0,1% tween20, 5% llet desnatada en pols (Nestlé).
- Tampó de bloqueig (immunofluorescència/citometria de flux): PBS 2% FBS.
- Tampó de permeabilització: PBS, 2% FBS, 0,1% Tritó X100.
- Tampó de tinció amb iodur de propidi: PBS, 0,2% Tritó X100, 200 µg/mL RNAsa, 30 µg/mL Iodur de propidi.
- Tampó d'annexina: 10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂.
- Tampó Isoosmolar (Eppendorff)
- Tampó Hypoosmolar (Eppendorff)
- Medi de cultiu DMEM (Lonza, #BE12-707F)
- FBS (Lab Clinic #A15-101)
- Penicil·lina/Estreptomicina (Lonza #DE17602F)
- L-Glutamina (Lonza #17905C)

2. Cultius cel·lulars

Totes les tècniques descrites en el següent apartat varen ser dutes a terme en campanes de flux laminar vertical, els medis de cultiu van ser pre-escalfats en un bany de 37°C i les cèl·lules van ser cultivades en un incubador a 37°C, 5% CO₂.

2. 1. Descongelació de cèl·lules

Les línies cel·lulars es conserven en crio-vials en tancs de nitrogen líquid. Per tal de descongelar-les, el vial va ser passat del tanc de nitrogen al bany de 37°C, en el que va ser incubat durant 5 minuts. Passat aquest temps es va passar a afegir medi de cultiu molt lentament per no diluir el medi de congelació de manera molt sobtada. Es va anar passant mica en mica, amb una pipeta Pasteur de plàstic estèril, el contingut del crio-vial en un tub falcon de 50 mL contenint 25 mL de medi de cultiu a 37°C. Aquest tub es va centrifugar durant 5 minuts a 1000 rpm i es van re-suspendre les cèl·lules en 10 mL de medi de cultiu en un flascó T75 i es van posar a l'incubador.

2. 2. Manteniment

Les línies cel·lulars es van mantenir en flascons T75 en un incubador a 37°C, 5% CO₂. Es van mantenir a una concentració d'entre 0,2·10⁶ i 1·10⁶ Cèl·lules/mL i es va procedir a canviar el medi cada 2-3 dies segons els tipus cel·lulars.

2. 3. Comptatge

Prèviament a cada assaig es va determinar la densitat cel·lular de cada cultiu. Per això, primer es va homogeneïtzar el cultiu amb una pipeta serològica i tot seguit es van pipetejar 10 uL del cultiu i es van dipositar a una cambra de Newbauer amb la qual es va determinar el nombre de cèl·lules per mL.

2. 4. Congelació

Per tal de congelar una línia cel·lular, es van usar cultius que estiguessin en creixement exponencial. Les cèl·lules es van recollir, centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm, i es van

re-suspendre en una solució FBS 5-10% DMSO (el percentatge de DMSO varia en funció del tipus cel·lular).

2. 5. Assaig de sincronització en el cicle cel·lular

Per tal d'analitzar el paper d'ERK5 en la progressió del cicle cel·lular, vàrem dur a terme diferents assajos de sincronització.

Per a l'estudi de la fase M i l'anàlisi de la segregació cromosòmica, vàrem sincronitzar les cèl·lules amb 50 ng/mL de Nocodazol. El Nocodazol inhibeix la polimerització dels microtúbuls, impedit així la progressió de les cèl·lules a la mitosi. Les cèl·lules tractades amb Nocodazol queden aturades a la prometafase, on els cromosomes s'han condensat però encara no s'han organitzat al fus mitòtic. Per a poder estudiar la progressió mitòtica, les cèl·lules varen ser rentades tres vegades amb PBS per assegurar l'eliminació total de Nocodazol del medi. Després van ser re-suspeses en medi pre-escalfat a 37°C, incubades a 37°C, 5% CO₂, i a diferents temps es van recollir i fixar les cèl·lules per a ser marcades i analitzades per microscopi de fluorescència Olympus BX61.

Per a dur a terme l'anàlisi de la progressió durant la fase S del cicle cel·lular, es van utilitzar diferents compostos que interfereixen amb la progressió de la replicació mitjançant diferents mecanismes. Es van usar la timidina i la hidroxiiurea, que interfereixen amb el metabolisme de dNTP, provocant així una aturada de les forquilles de replicació just a l'inici de la fase S del cicle. Mentre que la timidina indueix un desequilibri de dNTP amb un augment massiu de dTTP i una depleció dels nivells de dCTP, la hidroxiiurea, inhibidor específic del complex enzimàtic RNR, provoca una depleció dels dNTP a la cèl·lula impedit així la seva incorporació durant la replicació. Com la timidina, la hidroxiiurea bloqueja les cèl·lules en l'inici de la fase S. A banda de la inhibició de la fase S alterant els dNTP, es pot inhibir l'enzim polimerasa alpha, que és l'encarregat d'iniciar la replicació del DNA a les forquilles de replicació. Quan tractem amb aquest compost, les cèl·lules no poden iniciar la fase S, així doncs, es bloquegen en la fase G1/S (Taula 3. 1.).

| | Afidicolina | Timidina | Hidroxyurea | Nocodazol |
|--------------------|---|---|---------------------------------------|---|
| Fase d'aturada | G1 | G1/S | G1/S | G2/M |
| Concentració final | 5 ug/mL | 2,5 mM/ 100 uM | 2mM | 50 ng/mL |
| Temps d'incubació | 16h | 18, 24, 28h | 18h | 16h |
| Mecanisme d'acció | Inhibició de la DNA polimerasa α | Desequilibri en el pool de nucleòtids | Depleció del pool de nucleòtids | Inhibició de la polimerització de microtúbuls |

Taula 3. 1. Mecanisme d'acció, concentració i temps d'incubació de les diferents reactius usades per analitzar la progressió en el cicle cel·lular de les línies shCTRL i shERK5.

2. 6. Línies cel·lulars

Jurkat

La línia cel·lular Jurkat va ser establerta a partir de la sang perifèrica d'un adolescent de 14 anys. El tipus cel·lular és una leucèmia aguda de limfòcit T. Aquesta línia cel·lular creix en suspensió. Les condicions de cultiu en les que es va fer créixer aquesta línia es en RPMI 1640, 10% FBS, L-glutamina, penicil·lina/estreptomicina.

HL-60

La línia HL-60 va ser establerta a partir de la sang perifèrica d'una dona de 36 anys, malalta de leucèmia pro-mielocítica. Per a cultivar aquesta línia cel·lular es va usar medi RPMI suplementat amb 20% FBS, L-glutamina, penicil·lina/estreptomicina i no es va permetre en cap cas que la densitat arribés a $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL ja que les cèl·lules HL-60 es diferencien a macròfags en arribar a una elevada densitat de cultiu. Per a la seva crio-preservació es va usar una concentració de DMSO de 5% enlloc de 10% ja que el DMSO també pot induir la diferenciació d'aquesta línia tumoral.

U937

La línia tumoral U-937 va ser establerta a partir d'una efusió pleural d'un home de 37 anys que patia d'un limfoma histiocític. Aquesta línia és monocítica i es cultiva en suspensió en medi RPMI 1640 10% FBS, L-glutamina, penicil·lina/estreptomicina.

Hut-78

La línia Hut-78 prové d'un home de 53 anys patint d'un síndrome de Sézary, és del tipus cel·lular limfòcit T cutani .

3. Transfeccions estables i transitòries

3. 1. Plasmidis

En aquest estudi es van usar clons de la llibreria MISSION shRNA de SIGMA-ALDRICH. El vector usat en aquest sistema és el vector pLKO.1-puro.

shCTRL: MISSION[®] pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA

shERK5DNA_2:

CCGGCCCTAATGCTTTCGATGTGGTCTCGAGACCACATCGAAAGCATTAGGGTTTTT

3. 2. Electroporació

Es van re-suspendre $2 \cdot 10^6$ cèl·lules en 5 mL de medi RPMI, tot seguit es van centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm es va aspirar el sobrenedant o es van re-suspendre les cèl·lules en 800 uL de tampó hypoOsmolar. Es van incubar les cèl·lules durant 15 minuts a temperatura ambient i es va afegir el plasmidi d'interès linearitzat a una concentració final de 4 ug/mL. Es va passar la barreja a una cubeta d'electroporació de 0.4 cm d'amplada amb una pipeta Pasteur de plàstic estèril i es va procedir a electroporar les cèl·lules amb el Eppendorf Multiporator.

Programa Multiporator:

| |
|-------------------------------|
| Mode: eukaryotes "(.)" |
| Voltage (V): 630 |
| Time constant (t): 40 μ s |
| Pulse number (n): 1 |

Tot seguit, es va extreure la cubeta de l'aparell i es va deixar durant 5 minuts a temperatura ambient per a que les cèl·lules es recuperessin de l'impuls elèctric. Passats els-5 minuts, es van transferir les cèl·lules a un tub Eppendorf amb una pipeta Pasteur de plàstic i es van centrifugar durant 2 minuts a 2000 rpm per a eliminar la solució hipoosmolar. Finalment, es van re-suspendre en 5 mL de medi RPMI 10% FBS prèviament escalfat i es van incubar a 37°C, 5% CO₂ durant un parell d'hores. Tot seguit es va afegir l'antibiòtic al medi de cultiu i es van repartir les cèl·lules en fraccions de 1 mL en plaques de 24 pous. Al cap de un parell de setmanes es poden començar a veure els primers clons resistents a l'antibiòtic, que seran amplificats, validats mitjançant qPCR i WB per a detectar els nivells de la proteïna d'interès i els que siguin validats seran congelats tal i com es descriu en l'apartat de congelació.

4. Model animal

4. 1. Ratolins

Els ratolins usats en aquest estudi són de la soca C57Bl/6. Ratolins transgènics *Erk5^{fl/fl}* van ser creuats amb ratolins *VavCre*, que expressen la recombinasa Cre sota l'activitat del promotor del gen *Vav*, que només és expressat en el llinatge hematopoètic. Es van usar ratolins de 4 i 8 setmanes. Tots els ratolins usats en aquest estudi han sigut tractats sota les condicions i procediments que dicta el Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya.

4. 2. Genotipat

Es va usar una biòpsia de les orelles dels ratolins per tal de genotipar cada individu en funció de l'expressió de les seqüències LoxP i de la recombinasa Cre. El teixit va ser incubat durant 5 minuts a 100°C en una solució NaOH 50mM, passats aquests 5 minuts, es va procedir a homogeneïtzar la mostra mitjançant pipeteig i es va deixar incubant durant 5 minuts més a 100°C. Tot seguit es va afegir 60 uL de 1 M Tris-HCl pH 6.8 i es va tornar a incubar a 100°C durant 5 minuts més. Finalment, es va centrifugar la mostra durant 15 minuts a 13000 rpm per eliminar les restes de teixit. El DNA queda a la fase líquida del sobrenedant i pot ser usat directament per a la reacció de PCR de genotipat.

| Genotipat | Seqüència 5'-3' |
|---------------------------|-----------------------|
| Erk5 fl/fl <i>forward</i> | tccatgctgtagtccttgg |
| Erk5 fl/fl <i>reverse</i> | agcggctgtgaagagtgaat |
| VavCre <i>forward</i> | cgagtgatgagggtcgcaag |
| VavCre <i>reverse</i> | atcttcagggttctgcgggaa |

Taula 3. 2. Encebadors usats pel genotipat dels ratolins.

4. 3. Aïllament de precursors d'eritròcits

Per tal d'aïllar els precursors d'eritròcits vàrem extreure les cèl·lules del moll de l'os i de la melsa i vàrem procedir al comptatge de cèl·lules per tal de determinar la cel·lularitat de l'òrgan i tot seguit es va procedir a descartar els eritròcits madurs mitjançant un gradient de iodixanol: es va dipositar la suspensió cel·lular sobre un coixí de iodixanol al 16% evitant la barreja de les dues fases, i es va centrifugar durant 20 minuts a 900 xg. Passat aquest temps es van recolectar les cèl·lules a la interfase, es van fer dos rentats amb PBS i es van tornar a comptar per poder procedir amb els protocols d'interès.

5. Citometria de Flux

5. 1. Marcatge d'antígens de superfície

Es van marcar $0,5 \cdot 10^6$ cèl·lules en 100 μL de la dilució de l'anticòs corresponent en PBS 2% FBS (Taula 3. 3), durant 30 minuts a 4 °C. Després de dos rentats amb PBS 2% FBS les cèl·lules es van ressuspèndre en 0,5 mL de PBS. Just abans de passar les mostres pel citòmetre es va afegir 20 ng de DAPI a cada mostra per poder descartar les cèl·lules mortes de l'anàlisi. Les mostres es van analitzar amb un citòmetre Gallios (Beckman Coulter).

5. 2. Anàlisi del cicle cel·lular

Per dur a terme aquest anàlisi, es va agafar $1 \cdot 10^6$ de cèl·lules per punt. Es van ressuspèndre les cèl·lules en 100 μL de PBS, es van afegir 900 μL d'etanol 70% i es va agitar per inversió. Un cop arribat aquest punt les cèl·lules fixades poden ser guardades a -20°C fins el moment en el que vulguem fer l'anàlisi.

Per a l'anàlisi del cicle, es van tenyir les cèl·lules durant 30 minuts a temperatura ambient en 500 μL de tampó de iodur de propidi. Tot seguit, les mostres van ser analitzades per citometria de flux.

5. 3. Anàlisi d'apoptosi

Per dur a terme aquest anàlisi, es van analitzar $0,2 \cdot 10^6$ per punt. Es van ressuspèndre les cèl·lules en 100 μL de tampó d'annexina, passats 15 minuts es van afegir 400 μL de tampó d'annexina i 1 μL de iodur de propidi per punt. Tot seguit es van analitzar les mostres mitjançant citometria de flux, usant un citòmetre FC500 (Beckman Coulter).

5. 4. Separació cel·lular o *Sorting*

Les cèl·lules van ser marcades durant 30 minuts a 4°C a una densitat de $10 \cdot 10^6$ per mL. Passats els 30 minuts, es van centrifugar durant 5 minuts a 1200 rpm, es van ressuspèndre en 5 mL de PBS 2%FBS, es van tornar a centrifugar i finalment es van ressuspèndre en

FBS a una concentració de entre 10 i $15 \cdot 10^6$ per mL. Les cèl·lules van ser purificades usant un separador FACSAria (Becton Dickinson).

6. Microscòpia de fluorescència

6. 1. Anàlisi de mitosis aberrants

Per dur a terme l'anàlisi de les mitosis es van incubar les cèl·lules amb 50 ng/ml Nocodazol durant 16 hores a 37°C , 5% CO_2 , a una densitat de $0,5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. Passades aquestes 16 hores, es van rentar les cèl·lules tres vegades per tal d'eliminar qualsevol resta de nocodazol, es van ressuspèndre en medi de cultiu i es van incubar a 37°C durant 30 minuts. Passats els 30 minuts, les cèl·lules van ser fixades amb 70% etanol, tenyides amb DAPI i analitzades mitjançant l'ús d'un microscopi de fluorescència Olympus BX61.

7. Tècniques moleculars

7. 1. Electroforesi de proteïnes i detecció per *Western Blot*

Les mostres van ser processades en tampó Laemmli 1x i van ser escalfades durant 15 minuts a 95°C . Tot seguit, van ser carregades en gels d'acrilamida (8 - 12% , depenent del pes de la proteïna que volíem estudiar) (Taula 3. 2) i es van fer córrer els gels a 120V durant $1\text{h}30$ minuts. Després de l'electroforesi, el contingut dels gels va ser transferit a membranes de nitrocel·lulosa a 120V durant 50 minuts. Un cop les nostres mostres van estar transferides a la membrana, es va procedir a bloquejar la membrana durant 1h a temperatura ambient en tampó de bloqueig (western blot), un cop bloquejades les membranes es van incubar tota la nit a 4°C i en agitació amb l'anticòs corresponent diluït en tampó de bloqueig. Passada la incubació amb l'anticòs primari, es va rentar la membrana quatre vegades durant 5 minuts i en agitació amb PBS $0,05\%$ Tween 20. Tot seguit, es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent durant 1h a temperatura ambient i en agitació. Passada l'hora, es van fer quatre rentats en PBS $0,05\%$ Tween 20 i tres rentats en PBS, de 5 minuts cadascun i en agitació. La detecció del senyal es va efectuar mitjançant quimioluminescència en un aparell LAS-3000 (Fujifilm).

3 | INTRODUCCIÓ

En el cas de proteïnes fosforilades, es va usar TBS enloc de PBS i per a determinats anticossos es va usar BSA per a bloquejar enloc de llet, seguint les instruccions de la casa comercial.

| | Acrilamida 37% | Tris-HCl 1.5M pH8.8 | Tris-HCl 0.5M pH6.8 | H ₂ O mQ | SDS 10% | APS 20% | TEMED |
|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------|------------|----------|
| Gel Separador | | | | | | | |
| 8% Acrilamida | | 1,75 mL | - | 3,2 mL | 140 uL | 35 uL | 10 uL |
| 10% Acrilamida | 1,9 mL | --- | - | | --- | --- | --- |
| 12% Acrilamida | | --- | - | | --- | --- | --- |
| Gel Concentrador | | | | | | | |
| 4% Acrilamida | 320 uL | - | 730 uL | 1,86 mL | 60 uL | 15 uL | 5 uL |

Taula 3. 3. Recepta dels gels d'acrilamida

| Anticòs primari | Casa comercial (#ref.) | Dilució |
|---------------------|--------------------------|---------|
| Ter119-FITC | Biolegend (#116205) | 1:600 |
| CD71-PE | BD (#553267) | 1:1000 |
| B220-FITC | Immunotools (#22159453) | 1:25 |
| IgM-PerCP | Life Technologies | 1:1000 |
| Phospho-H2AX | Biolegend (#613401) | 1:1500 |
| H3 | Cell Signaling (#601901) | 1:1500 |
| Beta-Actina | Sigma (#A1978) | 1:10000 |
| Anticòs secundari | Casa comercial (#ref.) | Dilució |
| Anti-mouse IgG-HRP | Sigma | 1:3000 |
| Anti-rabbit IgG-HRP | Dako | 1:3000 |
| Anti-goat IgG-HRP | Dako | 1:3000 |

Taula 3. 4. Anticossos usats, referència i dilució.

7. 2. Anàlisi densitomètric

Les imatges van ser capturades amb un aparell LAS-3000 i van ser analitzades amb el programa FIJI-ImageJ.

7. 3. Extracció de RNA, retrotranscripció i PCR a temps real

Per a cada condició experimental, es van lissar $1 \cdot 10^6$ cèl·lules en *RNA lysis buffer* i es va procedir a l'aïllament de RNA amb el *PureLink® RNA Mini Kit* (Life technologies, #12183018A) seguint les instruccions de la casa comercial. L'RNA es va conservar a -80°C fins al seu ús per a la síntesi de cDNA. Per dur a terme la reacció de retro-transcripció, vàrem usar el kit *Super Script® III First-Strand Synthesis SuperMix* (ThermoFisher Scientific; #11752) amb les condicions següents:

Reacció – Volum final = 10 μL :

- 5 μL de 2x Reaction Mix
- 4 μL de RNA
- 1 μL d'enzim

Programa del termociclador:

| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | Temps (min) |
|------------------------------------|-------------|
| 25 | 5 |
| 50 | 30 |
| 85 | 5 |
| 4 | ∞ |

Amb el cDNA obtingut, es van dur a terme les reaccions de PCR a temps real usant les següents condicions:

Reacció – Volum final = 20 μL :

- 10 μL 2xGoTaq qPCR Master Mix
- 0,2 μL *Forward primer* 10 μM
- 0,2 μL *Reverse primer* 10 μM
- 7,6 μL H_2O mQ
- 2 μL cDNA

Programa termociclador:

| Temperatura (°C) | Temps |
|------------------|-----------|
| 95 | 1 minuts |
| 95 | 10 segons |
| 60 | 10 segons |
| 72 | 20 segons |
| 4 | ∞ |

X40 cicles

| Metabolisme dNTPs | Seqüència 5'-3' |
|-------------------|----------------------|
| Samhd1 forward | aggggtggggtatctagcag |
| Samhd1 reverse | tgttcatgctccatttcac |
| dCK forward | aagaggttctgcccttctcc |
| dCK reverse | gaaccacttcccaatcctca |
| SAC | Seqüència 5'-3' |
| Cenp-E forward | gggagaaaagagcaggcatt |
| Cenp-E reverse | tcactgcctgcaagatcaac |
| Mad2 forward | cttctcattcggcatcaaca |
| Mad2 reverse | tccaggacctcaccactttc |
| Bub1 forward | atgaccctctggtgaa |
| Bub1 reverse | ggcaatgtacagaggggatg |
| Bubr1 forward | ccaagggattggtgttcac |
| Bubr1 reverse | caacagagttgccgagaca |
| Mps1 forward | ccgaggatttaagtggcaga |
| Mps1 reverse | caaccagtctctgggtgt |
| Checkpoint | Seqüència 5'-3' |
| p21 forward | cagcagaggaagaccatgtg |
| p21 reverse | ggcgttggagtggtagaaa |
| Chk1 forward | caggggtgggttatctgcat |
| Chk1 reverse | ttcaacaacgctcacgatt |

Taula 3. 5. Taula d'encebadors usats per la PCR quantitativa.

7. 4. Detecció dels nivells de dNTP

Preparació de la mostra

Les cèl·lules van ser fixades amb una solució fixadora de metanol al 60% freda, varen ser homogeneïtzades amb un vòrtex i tot seguit es van guardar a -20°C durant una nit. L'endemà les mostres es van bullir durant 3 minuts i posteriorment es van centrifugar durant 15 minuts a 17000 xg a 4°C. Els sobre-nedants van ser evaporats durant tota una nit en un concentrador SpeedVac. Els *pellets* van ser dissolts en 100 uL d'H₂O mQ, la mostra es va homogeneïtzar amb un vòrtex i es va centrifugar durant 15 minuts a 17000 xg a 4°C per a descartar els debrís insolubles.

Reacció de PCR

Per quantificar els nivells de dNTP es va dur a terme el mètode descrit per Wilson i col·laboradors ¹¹¹. Es du a terme una reacció amb una seqüència motllo específica per a cada dNTP, una sonda que hibrida al motllo i que presenta un marcador FAM a l'extrem 5' i un *Quencher* a l'extrem 3', un encebador específic per a amplificar el motllo, 3 dels 4 dNTP en excés excepte el que volguem mesurar i un enzim Taq polimerasa amb activitat exonucleasa. El dNTP que volguem mesurar serà el factor limitant, i a mida que es vagi amplificant la seqüència motllo, s'anirà alliberant el FAM de la sonda produint fluorescència. Quan s'esgoti el dNTP que estem mesurant l'increment de fluorescència s'aturarà.

Reacció – Volum final = 30 uL:

- 3 uL PCR buffer 10x
- 1 uL encebador
- 1 uL sonda
- 1 uL motllo
- 1 uL cadascun dels dNTP excepte el dNTP problema
- 2 uL mostra
- 19 µL H₂O
- 1 uL Taq polimerasa

Programa termociclador:

| Temperatura (°C) | Temps |
|------------------|-----------|
| 95 | 1 minut |
| 56 | 10 segons |
| 60 | 20 minuts |

amb lectura cada 60 sec

7. 5. Assaig de Bradford

Per dur a terme aquest assaig es van diluir les mostres en PBS 1x, en un volum final de 200 uL. D'altre banda es va fer un banc de dilucions d'OVA (100, 300, 900, 2700, 8100 ug/mL) a partir d'una solució estoc de 50 g/L. Les mostres i les dilucions de la recta patró varen ser repartides en duplicats en una placa de 96 pous.

7. 6. Assaig d'activitat quinasa de l'enzim Timidina quinasa

Es van lissar $10 \cdot 10^6$ cèl·lules de cada tipus cel·lular (shCTRL i shERK5) en buffer de lisi amb un xeringa de 20G. Tot seguit es van centrifugar els lisats durant 10 minuts a 15000 xg per descartar els restes cel·lulars, es va quantificar el sobrenedant mitjançant l'assaig de Bradford i es va congelar a -80°C fins al seu ús.

Reacció – Volum final = 100 uL:

- 5mM MgCl_2
- 10 mM ATP
- 2,5 μCi ^3H -TdR
- 5 μL extracte cel·lular
- 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

Es va incubar a 30°C durant 15 minuts i la reacció es va aturar incubant les mostres durant 3 minuts a 95°C i la totalitat de la mostra va ser aplicada sobre membrana DEAE de 2 cm^2 . Els quadrats de DEAE contenint la mostra varen ser rentats quatre vegades durant 15 minuts en una solució de 0,001 M format d'amoni. Tot seguit es va fer un rentat final amb metanol i les mostres es van deixar assecar i es va mesurar la radioactivitat amb líquid de centelleig PBT.

7. 7. Assaig d'absorció de timidina

Per quantificar l'absorció de timidina, es van incubar 10^5 cèl·lules amb 1.05 uCi de H^3 -dT i 0.33 uM de cada nucleòsid en un volum final de 100 uL de medi de cultiu en plaques de 96 pous, durant una hora a 37°C , 5% CO_2 . Tot seguit, les cèl·lules es van rentar 3 vegades amb PBS 1x fred. Els *pellets* es van assecar durant 10 minuts a 50°C i tot seguit es va afegir 200 uL de líquid de centelleig. La radioactivitat va ser mesurada utilitzant un comptador de centelleig Trilux MicroBeta (Perkin Elmer).

4 . RESULTATS

1. L'absència d'ERK5 induïx inestabilitat genòmica en la línia cel·lular Jurkat i la sensibilitza enfront al tractament amb timidina

Vàrem voler explorar si ERK5 participa en la preservació de l'estabilitat genòmica. Per això, es va triar l'aproximació de disminuir el contingut de d'ERK5 en línies tumorals deficientes per a p53 i/o PTEN. PTEN i p53 són dos supressors de tumors que es troben mutats o absents en un gran nombre de tumors, i són coneguts per el seu rol en la homeòstasi genòmica^{31,32,112,113}. Vàrem triar quatre línies tumorals d'origen hematopoètic que presentaven una funció de p53 deficient. D'aquestes quatre línies p53 deficientes, dues també són deficientes per a la proteïna PTEN (Taula 4. 1.). Per a dur a terme l'estudi, inicialment vàrem transfectar cèl·lules Jurkat, una línia tumoral p53- i PTEN-deficient amb un plàsmid codificant un shRNA dirigit contra ERK5 (shERK5) i línies control transfectades amb un shRNA *random* (shCTRL). Es van testar diversos shRNA contra ERK5 i es va seleccionar el que va generar més baixada dels nivells d'ERK5, aquest shRNA actua contra la seqüència conservada a l'exó 2 del gen de la MAP quinasa (Figura 4. 1.A.). Es va observar que les línies que expressaven shERK5 (seleccionades amb puromicina) presentaven un creixement inicial més lent en comparació amb les cèl·lules transfectades amb shCTRL. Consistent amb aquesta observació, hi ha estudis que han descrit que la manca d'ERK5 induïx una aturada parcial en el cicle cel·lular mitjançant l'augment de l'expressió de p21 en un model de fibroblast o bé induïx apoptosi en alguns tipus tumorals^{78,97,99}.

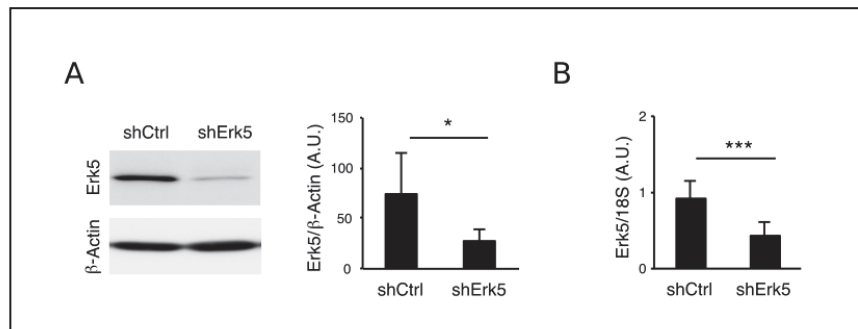


Figura 4. 1. A. Western blot representatiu que mostra la disminució dels nivells d'ERK5 a nivell proteic en les línies Jurkat transfectades amb shERK5DNA2 en comparació amb les shCTRL. Es va usar actina com a control de càrrega. Quantificació per luminescència dels nivells d'ERK5. Les línies shERK5 presenten una disminució significativa dels nivells d'ERK5 respecte a les línies shCTRL (n=10). B. Disminució significativa dels nivells d'expressió del mRNA d'ERK5 a les línies shERK5 respecte a les línies shCTRL. (n=10).

Les cèl·lules Jurkat, en ser una línia p53- i PTEN-deficient, presenten certa permissivitat per a l'acumulació d'anomalies en el contingut genòmic^{32,112}. De fet, estudis anteriors han descrit que un cultiu prolongat d'aquestes cèl·lules facilita l'acumulació de una subpoblació tetraploide¹¹⁴. El que es va observar va ser que, en un total de 20 línies que vam generar en dues transfeccions independents, una majoria significativa de línies shERK5 presentaven una subpoblació tetraploide mentre que les línies shCTRL mantenien una càrrega genòmica diploide (Figura 4. 2.), resultat que ens suggereix que ERK5 pot tenir una implicació en la preservació de l'estabilitat genòmica, ja que la baixada dels nivells d'ERK5 accelera un procés ja descrit d'instabilitat genòmica¹.

¹ Cal constatar que aquesta subpoblació tetraploide no és una aturada de les cèl·lules en G2/M tal i com es mostra a la Figura 4. 2., on podem observar una població amb un contingut genòmic 8N, que representaria la fracció proliferant en G2/M de la subpoblació tetraploide.

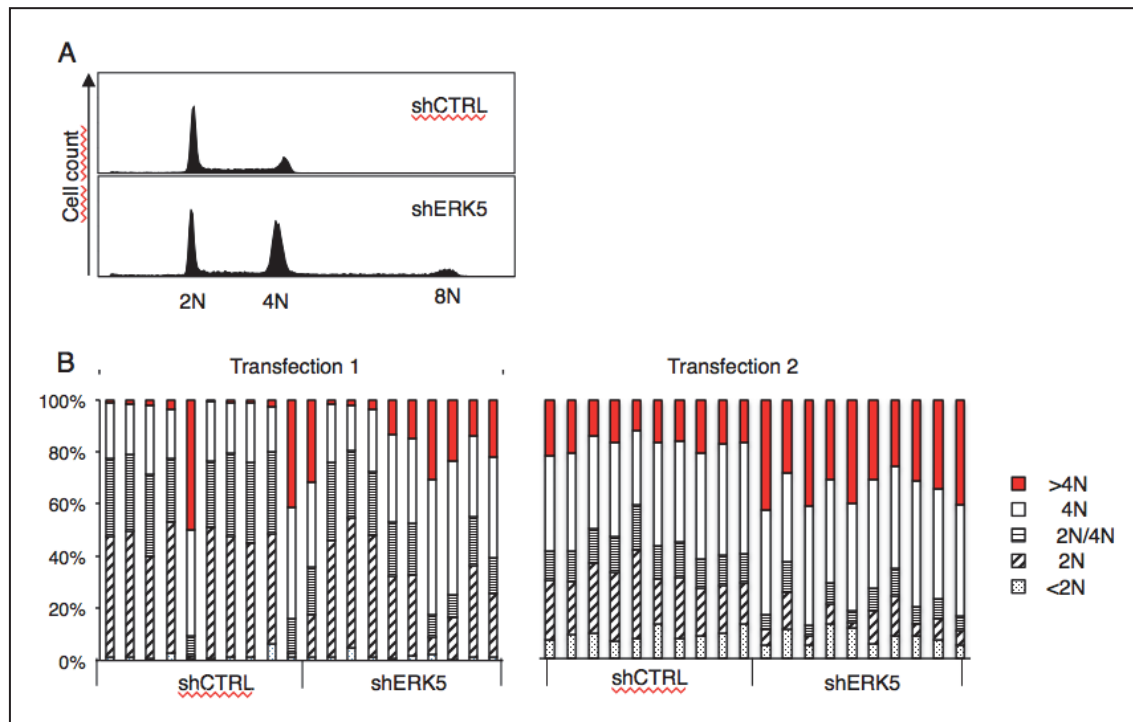


Figura 4. 2. A. Perfil de cicle cel·lular representatiu shCTRL (a dalt) i shERK5DNA2 (a baix). B. Representació del contingut genòmic de cada línia individual de les dues transfeccions independents amb shERK5DNA2 o bé amb shCTRL, en vermell està representat el percentatge de cèl·lules que presenten un contingut genòmic superior a 4N (n=10).

Per descartar que es tractés d'un fenomen particular de les línies Jurkat, vàrem transfectar altres línies amb l'activitat de p53 i/o PTEN compromesa (HL60, U937, Hut-78) amb shERK5. Tot i que no vam veure canvis substancials en HL-60 i Hut-78, la majoria de línies U-937 shERK5 van presentar aneuploidia (Figura 4. 3.). A banda de ser deficientes per a la funció de p53, tan les Jurkat com les U937 són deficientes per a la proteïna PTEN (Taula 4. 1.). Aquests resultats suggereixen que en cèl·lules p53- i PTEN-deficients que són permissives per a la inestabilitat genòmica, l'absència d'ERK5 incrementa aquesta inestabilitat.

| | Jurkat | U937 | HL-60 | Hut-78 |
|----------------|--------|------|-------|--------|
| Activitat p53 | - | - | - | - |
| Activitat PTEN | - | - | + | + |

Taula 4. 1. Activitat de p53 i PTEN en les línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi.

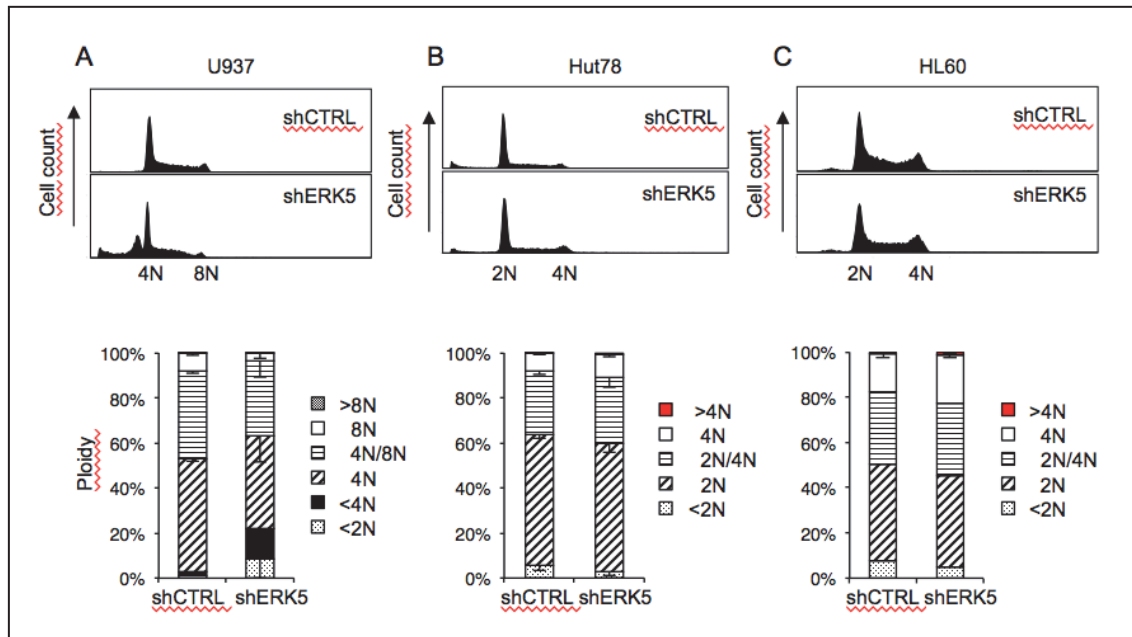


Figura 4. 3. Gràfic representant el contingut de DNA (a dalt) i el percentatge de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular (a baix) en A. Línies U937 shCTRL i shERK5DNA2 (n=10). B. Línies Hut 78 shCTRL i shERK5DNA2 (n=10) i C. Línies HL60 shCTRL i shERK5DNA2 (n=10).

En vista d'aquests resultats, vam especular que ERK5 podia estar jugant un rol durant algun dels punts del cicle cel·lular, i que la seva absència induïa una disfunció en la segregació cromosòmica. Treballs recents han descrit el paper d'ERK5 durant la mitosi. Més concretament, s'ha descrit que la disminució dels nivells d'aquesta MAP quinasa induïx una aturada parcial del cicle cel·lular a la mitosi^{97,105,106}.

Aquestes dades juntament amb els resultats mostrats a les figures anteriors ens suggereixen que ERK5 participa en la protecció en front a la inestabilitat genòmica i que podia estar participant en la segregació cromosòmica. Per testar aquesta hipòtesi vàrem sincronitzar les línies Jurkat shCTRL i shERK5 amb nocodazol per poder analitzar si hi havia algun tipus d'anomalia durant la metafase. Nocodazol inhibeix la polimerització de microtúbuls i per tant bloqueja la formació del fus mitòtic. Vàrem observar un tendència de les cèl·lules shERK5 a allargar la metafase, però el fet de que continguin el doble de material genètic podria explicar aquest retard. També vàrem analitzar els nivells de mRNA dels components del *Spindle Assembly Complex* (SAC), el complex encarregat de vetllar per una alineació i segregació correcta dels cromosomes durant la mitosi, assegurant així que les dues cèl·lules filles reben exactament la mateixa quantitat de contingut genòmic. Quan hi ha variacions en la quantitat o l'activitat de les proteïnes del SAC es pot generar aneuploidia o bloquejar la mitosi³⁹. No es van detectar diferències significatives en els nivells de mRNA dels

diferents components del SAC (Figura 4. 4.), tot i això no es pot descartar que hi hagi una alteració de nivells o activitat de la proteïna.

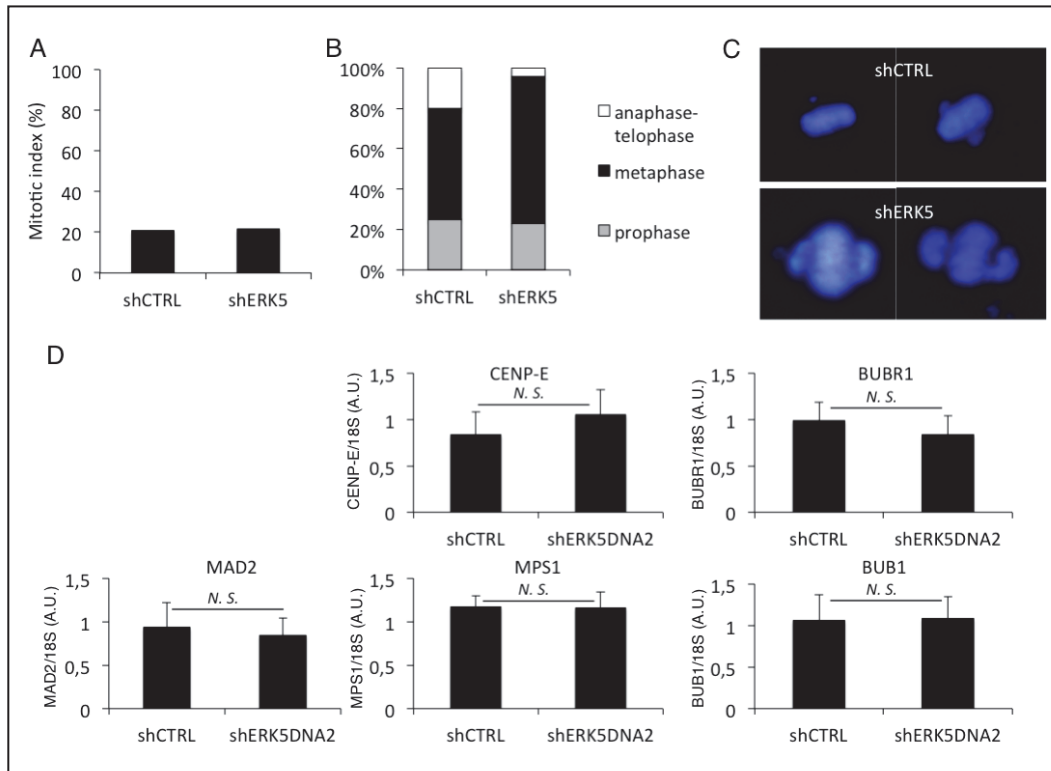


Figura 4. 4. A. Representació gràfica de l'índex mitòtic després d'incubar les cèl·lules 16h amb 50 µg/mL Nocodazol (n=1) B. Gràfic representant la distribució en les diferents fases de la mitosi en cèl·lules tractades 16 hores amb 50 µg/mL Nocodazol, rentades i cultivades 30 minuts en medi sense Nocodazole (n=1). C. Imatge representativa de les línies shCTRL (línia 10) i shERK5 (línia 14) en metafase (n=1) D. Gràfic representant els nivells de mRNA dels diferents components del SAC en les línies generades amb la primera transfecció de shERK5DNA2 (n=10). La quantificació del mRNA es va fer per transcripció reversa i PCR quantitativa. N.S. (no significatiu).

Una entrada prematura en mitosi quan la replicació del DNA no ha acabat completament pot generar aneuploidia. Per a fer un seguiment de la replicació en presència o absència d'ERK5, vàrem tractar les cèl·lules amb agents inhibidors de la replicació per tal de sincronitzar les cèl·lules en la fase S.

Vàrem sincronitzar les cèl·lules en G1/S mitjançant un bloqueig amb timidina, que consisteix en un tractament de 18 hores amb 2,5 mM timidina. Passat aquest temps d'incubació es van tenyir les cèl·lules amb Iodur de Propidi (IP) i es va avaluar la distribució de les cèl·lules en el cicle cel·lular mitjançant citometria de flux.

A part de la presència de tetraploïdia en línies shERK5 com s'ha mostrat abans (Figura 3.2), el tractament amb timidina durant 18 hls hi induïa un augment en la mort cel·lular, com evidència l'augment de la fracció subG1 (o <2N) dels perfils de cicle cel·lular (Figura 4. 5. A). Aquest resultat de mort cel·lular es va confirmar mitjançant un assaig complementari d'apoptosi, tenyint les cèl·lules amb annexina V i IP o bé DAPI (Figura 4. 5. B).

Aquest resultat ens va conduir a aprofundir en l'estudi de la funció d'ERK5 en la resposta al tractament amb timidina. Per tal de descartar que es tractés d'una inespecificitat del shRNA contra *Erk5*, vàrem reconstituir els nivells d'ERK5 de manera estable mitjançant la transfecció de les línies shERK5 amb un plasmidi expressant ERK5 (línies shERK5+ERK5) i vàrem repetir l'experiment de tractament amb timidina, seguit de l'assaig d'apoptosi. Comparant les línies shCTRL, shERK5 i shERK5+ERK5, es va observar que quan es va recuperar l'expressió d'ERK5 es va recuperar significativament la viabilitat cel·lular després del tractament amb timidina (Figura 4. 5. B, C).

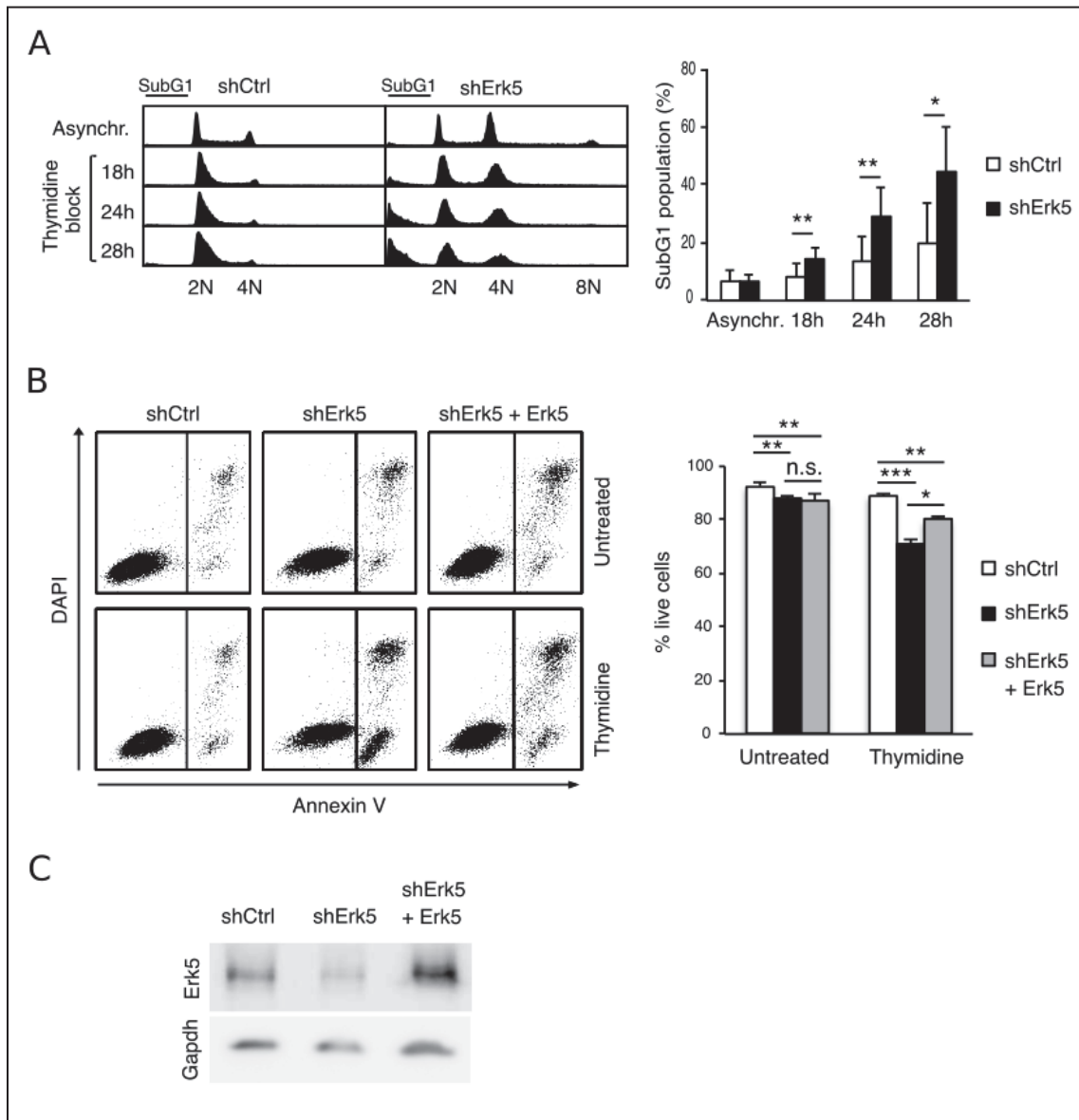


Figura 4. 5. La manca d'ERK5 sensibilitza les cèl·lules al tractament amb timidina. A. Perfils de cicle cel·lular representatius de cèl·lules Jurkat shCTRL o bé shERK5 en condicions de cultiu asincrònic o bé tractades amb timidina a diferents temps (18, 24 i 28 hores) (esquerra). Quantificació de la fracció subG1 després de 0, 18, 24 i 28 hores de bloqueig amb timidina, n=6 (dreta). B. Anàlisi per FACS mitjançant tinció amb Annexina V/DAPI de cèl·lules shCtrl, shERK5 o bé shERK5+ERK5 tractades o no durant 18 hores amb timidina (esquerra). Quantificació de la viabilitat de les cèl·lules shCtrl, shERK5 o bé shERK5+ERK5 tractades o no durant 18 hores amb timidina (dreta), n=3. C. Western blot representatiu mostrant els nivells d'Erk5 en les línies shCtrl, shERK5 o bé shERK5+ERK5. Es va usar GAPDH com a control de càrrega.

Per tal de determinar si la hipersensibilitat a la timidina en les cèl·lules shERK5 era deguda al bloqueig de les forquilles de replicació, vàrem incubar les cèl·lules amb dos compostos inhibidors transcripcionals addicionals (Figura 4. 6. A.) . L'afidicolina, que inhibeix la DNA polimerasa alfa no va induir un augment en l'apoptosi en cap de les dues línies. La hidroxiurea té un mode d'acció més semblant a la timidina, al inhibir específicament la

RNR no es generen suficients dNTP per a la replicació de DNA^{60,115}. La hidroxiurea, va produir un elevat grau d'apoptosi tant en les línies shCTRL com shERK5, tot i que l'apoptosi en les cèl·lules shERK5 continuava sent lleugerament major que en les control (Figura 4. 6. A.).

Aquests resultats suggereixen que la disminució dels nivells d'ERK5 sensibilitza la línia cel·lular Jurkat específicament contra la timidina degut a una baixada del contingut de dNTP i no degut a la inhibició de la replicació del DNA.

L'apoptosi detectada en les línies shERK5 correlaciona amb la presència del marcador de dany al DNA, la fosforilació de la histona H2AX en la serina 139 (p-H2AX) (Figura 4. 6. B). Vàrem voler saber si aquest dany al DNA i apoptosi podien ser revertits en les línies shERK5 quan la timidina era eliminada del medi de cultiu. Es va rentar la timidina i es va analitzar a diferents temps el cicle cel·lular així com els nivells de p-H2AX. Després del tractament amb timidina i posterior eliminació, les cèl·lules shCTRL varen disminuir els nivells de p-H2AX i varen prosseguir amb la replicació del DNA sense un augment en la mort cel·lular. En canvi, les línies shERK5 no varen poder reduir els nivells de p-H2AX ni la mort cel·lular, indicant una incapacitat per a reparar el dany al DNA i el conseqüent increment en l'apoptosi (Figura 4. 6. B,C.).

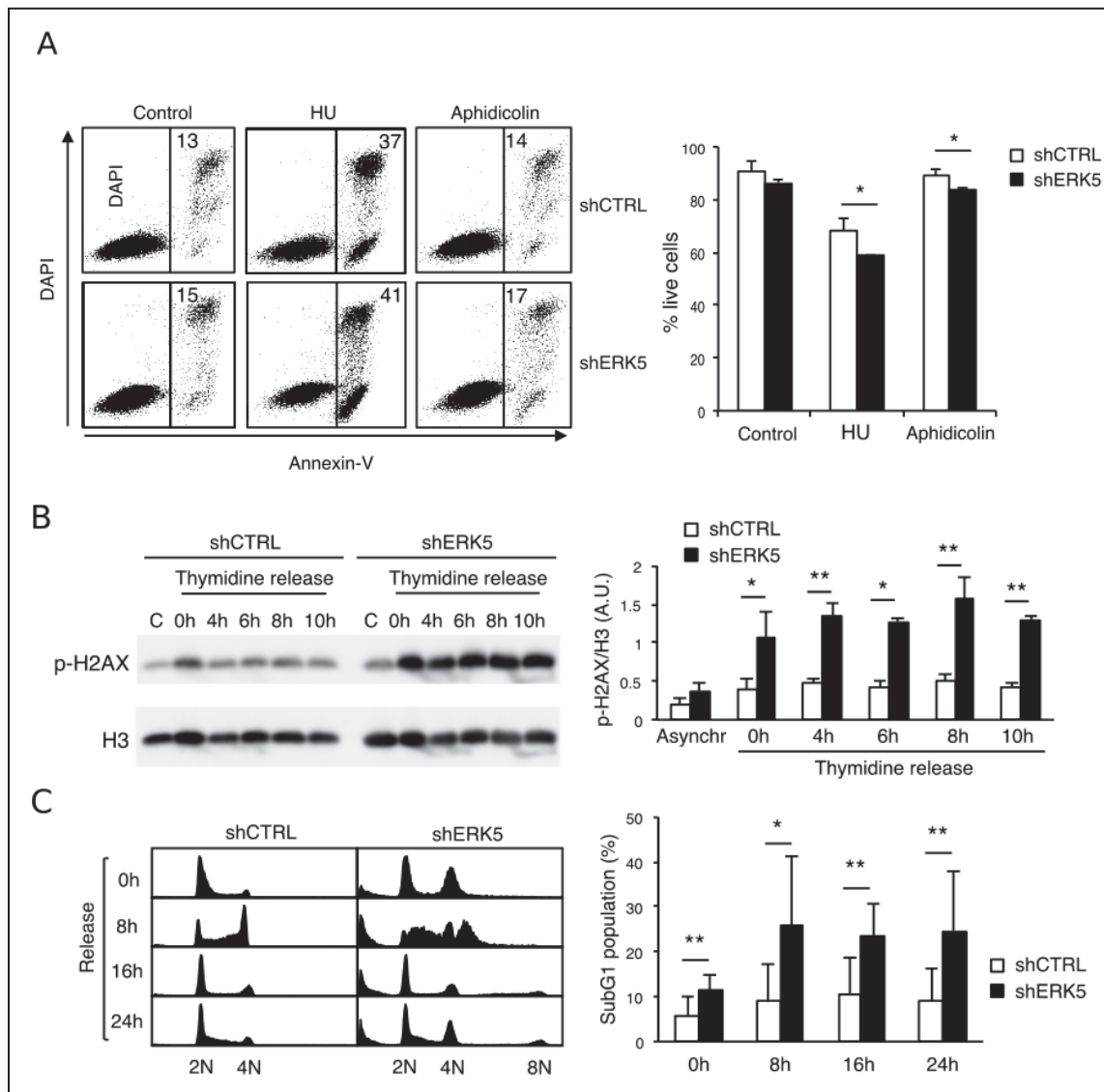


Figura 3. 6. El tractament amb timidina indueix dany al DNA en les línies Jurkat shERK5. A. Viabilitat de les cèl·lules després de 18 h de tractament amb 5 µg/mL d'afidicolina o bé 2 mM hidroxidreua. Anàlisi per FACS mitjançant tinció amb AnnexinaV/DAPI. Els nombres a l'interior de la gràfica indiquen el percentatge de cèl·lules positives per Annexina V en aquest experiment representatiu (esquerra). Quantificació de l'apoptosi, n=3 (dreta). B. Western blot representatiu mostrant els nivells de histona H2AX fosforilada, i els nivells d'histona H3 com a control de càrrega en línies Jurkat shCtrl o bé shErk5 als temps indicats després de l'alliberament del tractament amb timidina (esquerra). Quantificació per luminiscència de la ratio fosfo-H2AX:H3, n=3 (dreta). C. Perfils de cycle cel·lular representatius després de 0, 8, 16 i 24 hores de l'alliberament del bloqueig amb timidina (esquerra). Quantificació de la fracció subG1 després de 18 hores de bloqueig amb timidina, n=6 (dreta). Per dur a terme els experiments representats en aquesta figura es van utilitzar pools de dues línies shCtrl i dues línies shErk5.

Aquest fet ens va conduir a tractar les cèl·lules amb una concentració baixa de timidina per tal d'avaluar millor la resposta de les línies shCTRL i shERK5. A 100 µM timidina, es va reduir la proliferació en ambdues línies, però a diferència de les shCTRL, les shERK5 van

presentar un augment en els nivells de p-H2AX (Figura 4. 7.), indicant una reducció en el llindar de toxicitat en front a timidina en absència d'ERK5.

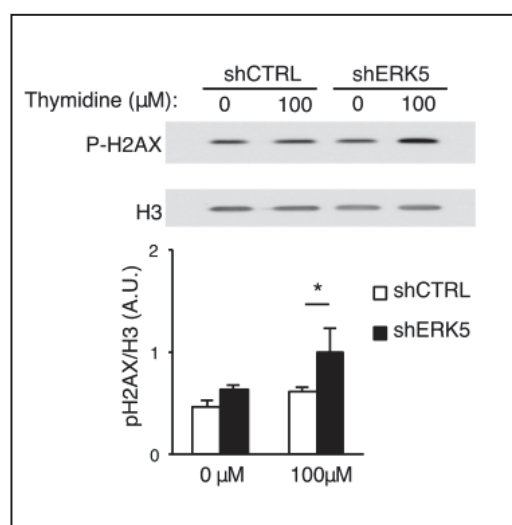


Figura 4. 7. (part superior) Western blot representatiu mostrant els nivells de fosforilació de la histona H2AX en línies shCTRL, shERK5 i shERK5+ERK5 després de 24 hores de tractament amb 100 μM timidina. (Part inferior) Quantificació dels nivells de fosforilació de la histona H2AX (n=3).

2. La disminució dels nivells d'ERK5 actua sinèrgicament amb la timidina per disminuir els nivells cel·lulars de dCTP

Degut a que les línies amb els nivells ERK5 disminuïts eren altament susceptibles a la timidina i no a l'afidicolina, vàrem especular un possible rol d'ERK5 en el metabolisme dels dNTP, i vam decidir analitzar els nivells de dNTP intracel·lulars després de diversos tractaments. L'exposició de les cèl·lules a la timidina induïx un augment intracel·lular de dTTP que inhibeix al·lostèricament la producció de deoxicitidina difosfat (dCDP) per l'enzim RNR⁶². Donat que dCDP és el precursor directe de dCTP, la resultant baixada dels nivells de dCTP enlentirà les forquilles de replicació i s'activaran els punts de control de la fase S¹⁹.

Els nivells de dNTP en les línies shERK5 i shCTRL en cultiu asincrònic van presentar valors similars en dCTP, dGTP i dTTP mentre que les línies shERK5 van presentar valors significativament elevats de dATP (Figura 4. 8. A.). Després del tractament amb timidina, els nivells de dTTP es van veure incrementats en ambdós tipus cel·lulars, però les

línies shERK5 varen presentar una baixada molt més severa en els nivells de dCTP que les línies control, set vegades menys que en el cultiu asincrònic en front a tres vegades menys, respectivament (Figura 4. 8. B).

El rati dTTP/dCTP en les línies shERK5 tractades amb timidina incrementa més de deu vegades per sobre del rati dTTP/dCTP a les línies control (Figura 4. 8. C.). El tractaments amb afidicolina i hidroxiiurea no van tenir cap efecte en aquest rati.

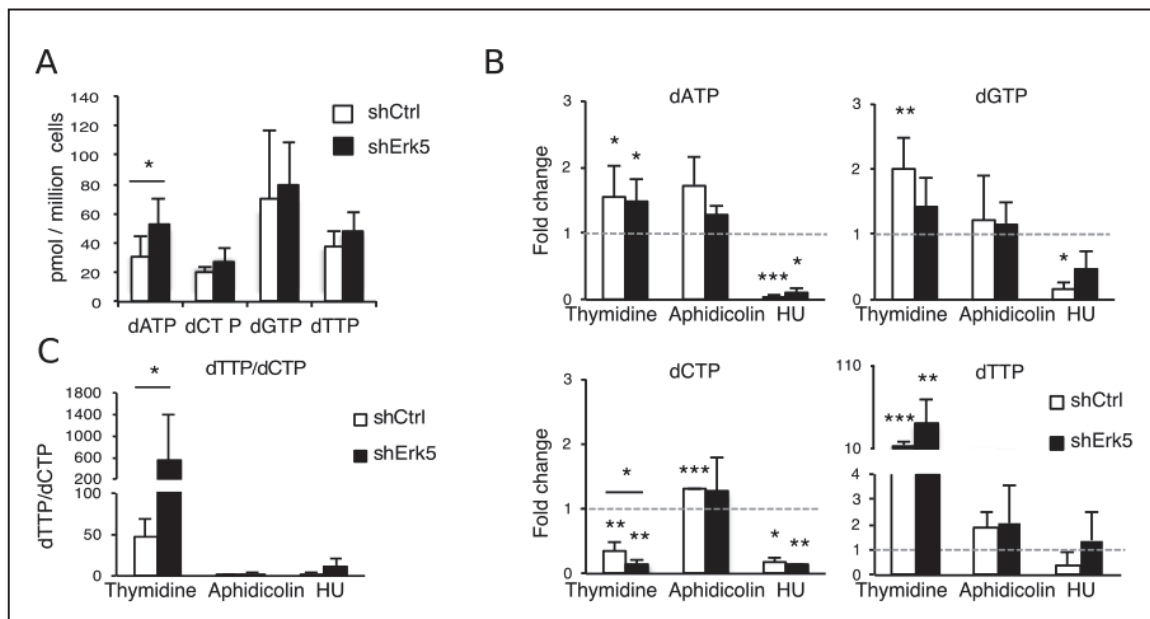


Figura 4. 8. A. Nivells de dNTP en condicions de cultiu asincrònic de cèl·lules shCTRL i shERK5, (n=3). B. Nivells de dNTP en cèl·lules shCTRL i shERK5 després de 18 hores de tractament amb timidina, afidicolina o hidroxiiurea. Tots els valors estan normalitzats a la condició control de cultiu asincrònic al qual se li ha donat el valor arbitrari de 1 (línia gris discontinua), (n=5). C. Rati dTTP:dCTP en les línies shCTRL i shERK5 després de 18 hores de tractament amb timidina, afidicolina o hidroxiiurea.

Aquest fenomen també es va reproduir a concentracions baixes de timidina on només es va observar una disminució dels nivells de dCTP en les línies shERK5 i no a les shCTRL (Figura 4. 9.).

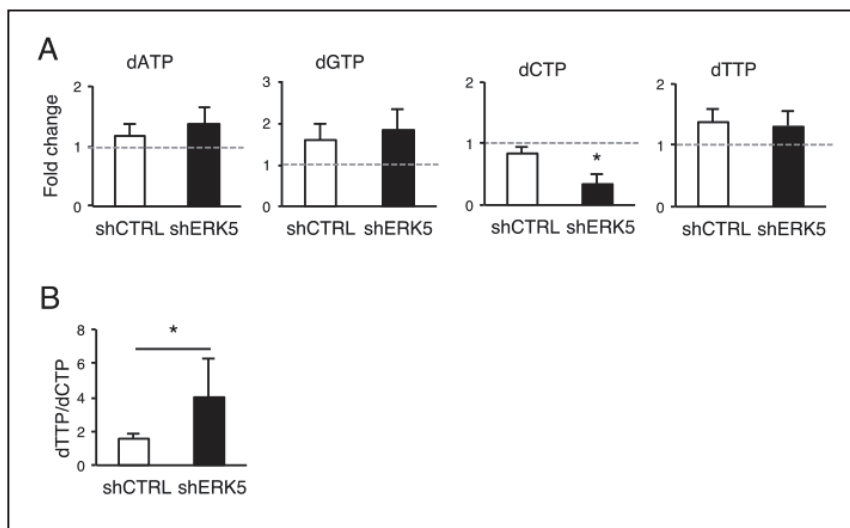


Figura 4.9. Baixes concentracions de timidina indueixen una reducció de dCTP en les cèl·lules shERK5. A. Nivells de dNTP en cèl·lules shCTRL i shERK5 després de 24 hores de tractament amb 100 μ M de timidina. Tots els valors han estat normalitzats a la condició control de cultiu asincrònic al qual se li ha donat el valor arbitrari de 1 (línia gris discontinua), (n=4). B. Rati dTTP:dCTP en les cèl·lules shCTRL i shERK5 després de 24 hores amb timidina, (n=4).

En vista d'aquests resultats, vàrem plantejar-nos la hipòtesi de que la suplementació del tractament amb timidina amb deoxynucleosids (Ns) podria rescatar els efectes de la timidina en les línies shERK5 mitjançant la ruta de salvament del metabolisme de dNTP.

La disminució en la proliferació quan les diferents línies cel·lulars van ser tractades amb 100 μ M timidina va ser completament revertida en les línies shCTRL i shERK5+ERK5 quan es van afegir Ns al medi, però només es va observar una tendència a la recuperació en el cas de les cèl·lules shERK5 (Figura 4. 10.). Aquests resultats suggereixen que l'absència d'ERK5 dificulta el processament dels Ns exògens.

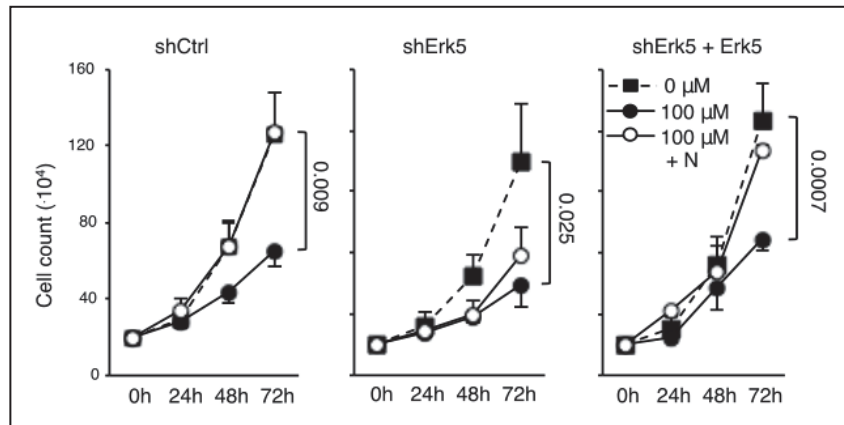


Figura 4. 10. Proliferació de línies shCTRL, shERK5 i shERK5+ERK5 en medi contenint 100 μM timidina ± 1 μM deoxinucleosids (N), (n=3).

Donat que p21^{Waf1/Cip1} i CHK1 prevenen l'apoptosi durant l'estrès de replicació induït per la timidina¹¹⁶, vàrem analitzar si la susceptibilitat de les línies shERK5 a la timidina venia donada per una disfunció en aquestes dues proteïnes. La regulació de p21 es principalment transcripcional¹¹⁷, per això vàrem mesurar els nivells de mRNA tant de p21 i de CHK1. No es van detectar diferències en l'expressió de cap del dos gens (Figura 4. 11.)

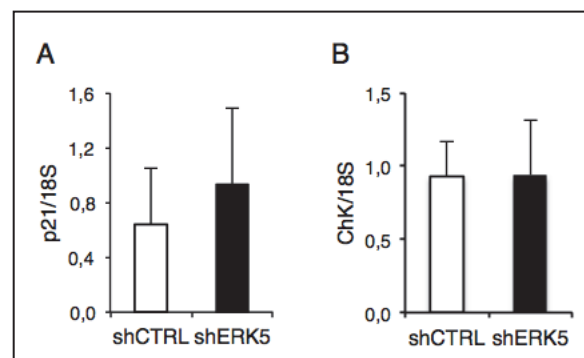


Figura 4. 11. Nivells mRNA analitzats per transcripció reversa i PCR a temps real. A. Nivells basals de mRNA de p21 normalitzats respecte als valors de RNA de 18S. B. Nivells de mRNA de Chk1 normalitzats respecte als valors de RNA de 18S. shCTRL (n=9); shERK5 (n=10).

El dany al DNA produït per la inhibició de les forquilles de replicació desencadena la fosforilació en la serina 317 i conseqüent activació de la quinasa CHK1 per part de la quinasa ATR⁴². Tot i que ambdós tipus cel·lulars van mostrar un augment en la fosforilació de CHK1 després del tractament amb timidina, aquest increment va ser major en les línies shERK5 (Figura 4. 12.). Aquests resultats mostren l'estrès genòmic produït per

l'aturada de les forquilles de replicació amb la timidina i ens indiquen que l'increment de la mort en les cèl·lules shERK5 no es deu a una deficiència en p21 o bé en l'activitat de CHK1 (Figures 4. 11. i 4. 12.).

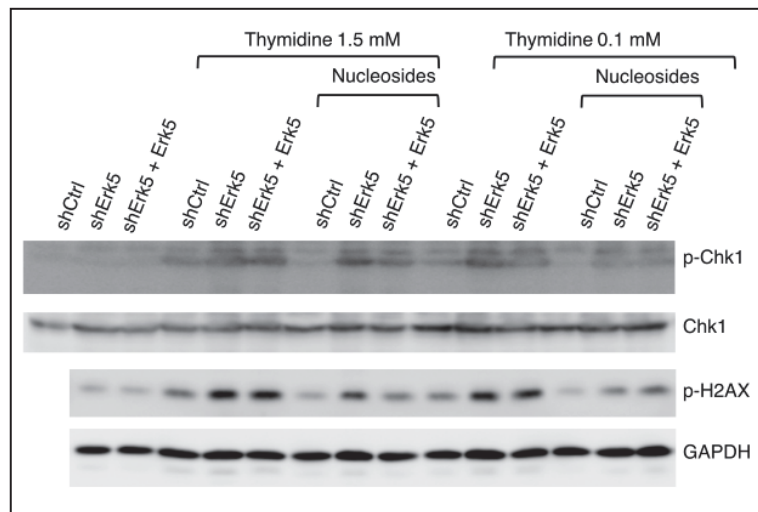


Figura 4. 12. Nivells de p-H2AX i p-CHK1 en cèl·lules shCTRL, shERK5 i shERK5+ERK5 després de 18 hores d'incubació amb 1.5 mM timidina i Ns, segons indicat. CHK1 i GAPDH van ser usats com a control de càrrega. *Western blot* representatiu de 3 experiments.

Durant la replicació del DNA, la presència de un desequilibri de dNTPs condueix a un augment en la taxa d'errors i mutacions puntuals, dany al DNA i inestabilitat cromosòmica^{70,72,118}. La manca d'ERK5 induïx un augment de dany al DNA en cèl·lules tractades amb timidina. Tot i que en el cas d'elevades concentracions de timidina els Ns exògens no van poder rescatar el fenotip shERK5 (Figura 4. 14.), l'addició de Ns exògens en els tractaments amb baixa concentració de timidina 100 μ M va restaurar parcialment els nivells de dCTP així com els nivells de p-H2AX (Figures 4. 12. i 4. 14.).

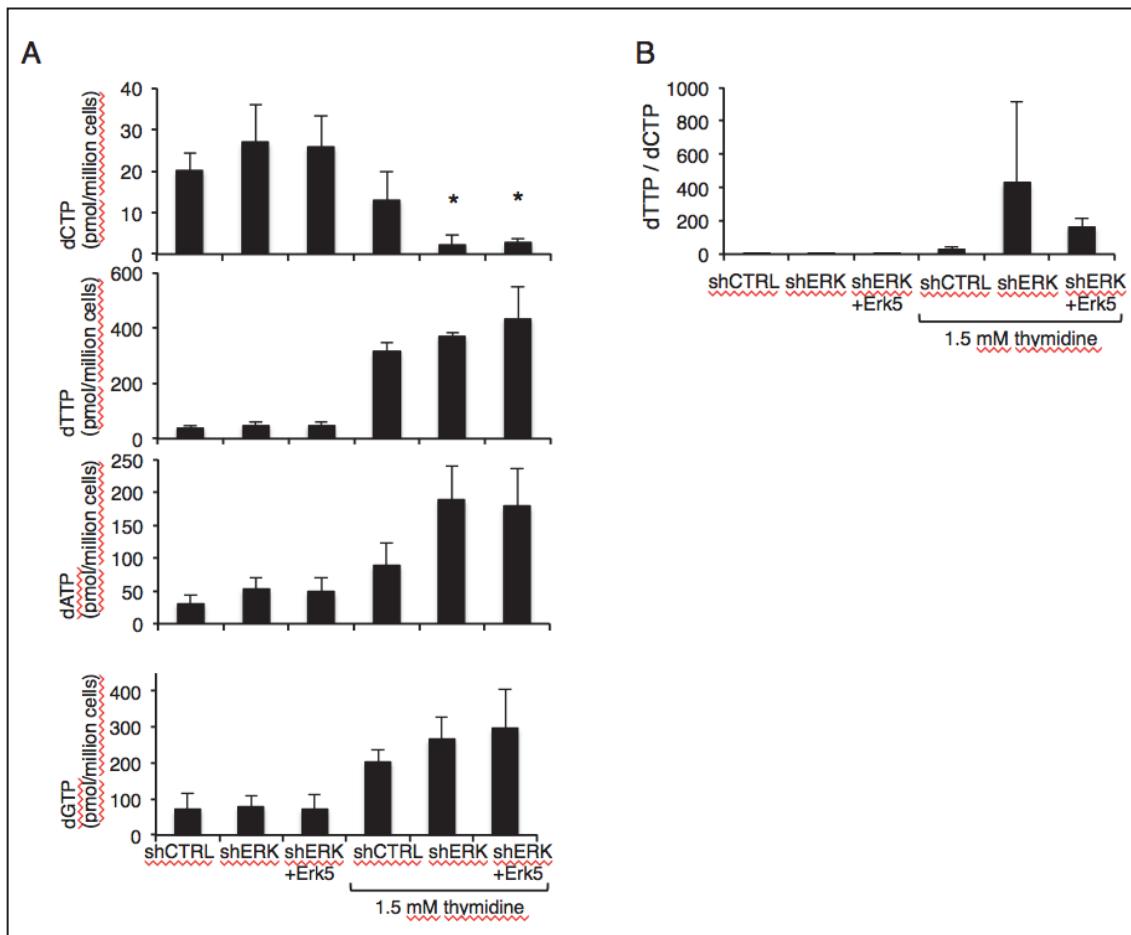


Figura 4. 13. Nivells de dNTP en cèl·lules shCTRL, shERK5 o bé shERK5+ERK5 en cultiu asincrònic o bé després de ser tractades amb timidina durant 18 hores, (n=3). B. Rati dTTP:dCTP dels valors mostrats en (A).

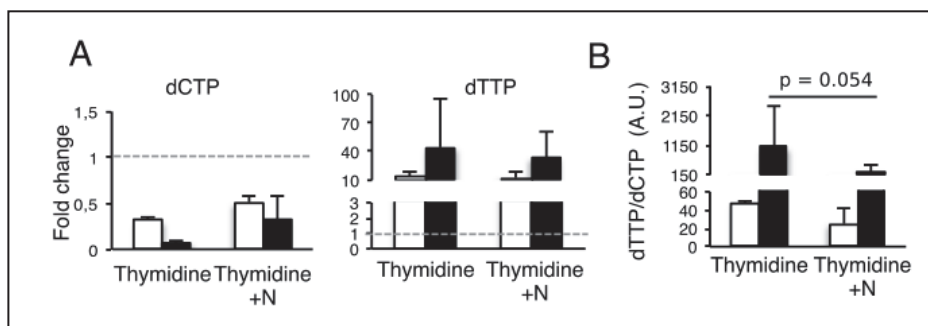


Figura 4. 14. A. Nivells de dCTP i dTTP en cèl·lules shCTRL i shERK5 després de 24 hores de tractament amb 100 μM de timidina o bé 100 μM de timidina 1 μM Ns. Tots els valors han estat normalitzats a la condició control de cultiu asincrònic al qual se li ha donat el valor arbitrari de 1 (línia gris discontinua), (n=2). B. Rati dTTP:dCTP després de 24 hores de tractament amb 100 μM de timidina o bé 100 μM de timidina 1 μM Ns, (n=2).

Així doncs, la disminució dels nivells d'ERK5 en la línia cel·lular Jurkat potencia la inhibició de la producció de dCTP i genera així una depleció quasi total dels nivells de dCTP intracel·lulars, dany al DNA i apoptosi. A més a més, un menor efecte de la hidroxidreòlisi en la depleció de la dGTP (Figura 4. 8.) a les cèl·lules shERK5 recolza la hipòtesi d'una disfunció en el metabolisme de dNTP en absència d'ERK5. Alteracions en els nivells de dNTP poden conduir a un augment en la taxa de mutació degut a un increment en la inserció errònia de dNTP²

3. La manca d'ERK5 no té cap efecte sobre els nivells d'expressió de l'enzim RNR2 ni sobre els nivells d'expressió de mRNA d'enzims responsables del metabolisme de nucleòtids

Les dades presentades suggereixen un paper d'ERK5 en el metabolisme de dNTP. Vàrem analitzar els nivells del principal enzim encarregat de la síntesi *de novo* de dNTP, la RNR, i no vam detectar diferències significatives entre les cèl·lules shCTRL i shERK5 (Figura 4. 15. A.). Això ens va conduir a explorar si ERK5 podria estar regulant la via de salvament de dNTP. El flux metabòlic a través de la via de salvament és regulat per la timidina quinasa 1 (TK1), que fosforila la timidina i per la deoxicitidina quinasa (dCK) que fosforila la deoxicitosina, deoxiadenosina i la deoxiguanosina. Per avaluar aquesta hipòtesi, vàrem incubar les línies shCTRL i shERK5 amb ³H-timidina i en vàrem analitzar l'absorció i l'activitat de la TK1 en extractes cel·lulars (Figura 4. 15. B, C.). Tot i que si es va observar una major absorció de timidina en les línies shERK5 en comparació a les control, això no era degut a un augment de l'activitat de TK1. Vàrem analitzar l'expressió gènica de *dCK* i *SAMHD1* (responsable de la desfosforilació i catabolisme de dNTP) i no es van observar diferències entre els dos tipus cel·lulars (Figura 4. 15. D, E.).

² Per tal d'estudiar un possible efecte de la mutagènesi en les línies deficientes per ERK5, ens vàrem plantejar de dur a terme l'assaig de mutació del gen HPRT. Per poder dur a terme aquest assaig, és necessari que només hi hagi una còpia del gen (situat al cromosoma X), degut a que les nostres línies d'estudi deficientes per a ERK5 presentaven una còpia extra del gen a causa de la tetraploidia, no es va poder dur a terme aquest estudi, motiu pel qual vàrem decidir dur a terme un assaig de seqüenciació de l'exoma en un model murí en busca de mutacions puntuals, com es descriu en l'apartat final de resultats.

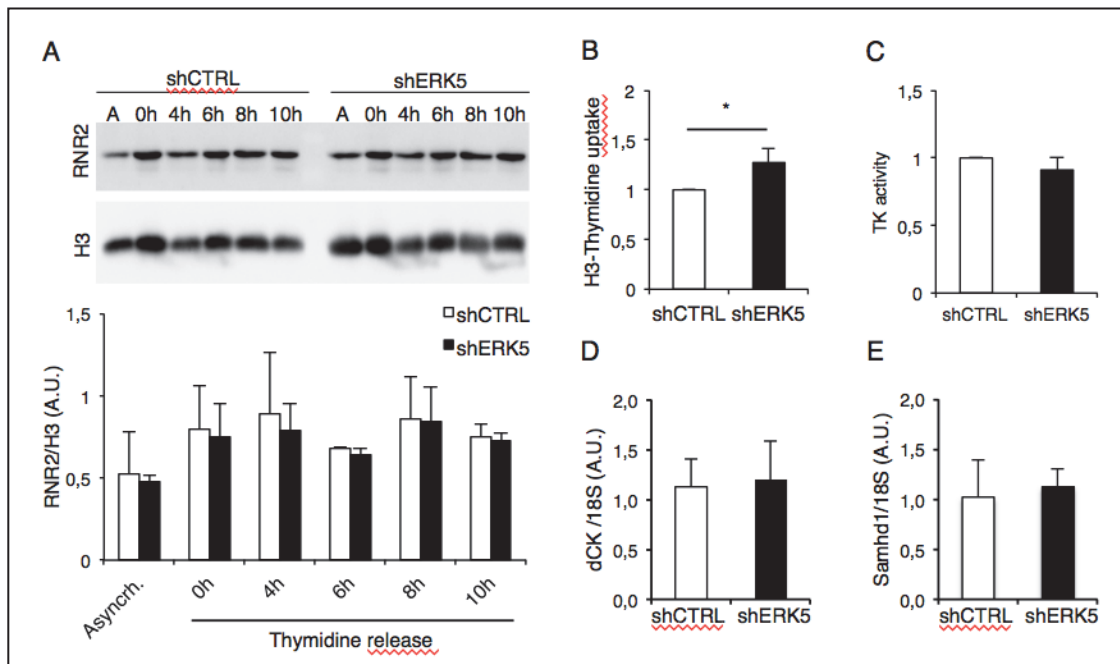


Figura 4. 15. A. (Part superior) Western blot representatiu dels nivells de RNR2 en cèl·lules shCTRL i shERK5 en creixement asincrònic (punt A), després de 18 hores de tractament amb timidina (punt 0h) i a diferents temps després de l'alliberament del tractament amb timidina (punts 4h, 6h, 8h, 10h). (Part inferior) Anàlisi luminomètric dels nivells de RNR2 en les línies shCTRL i shERK5 als temps indicats després de l'alliberament de 18 hores de tractament amb 2.5 mM timidina, n=3. B. Absorció de ³H-timidina per les cèl·lules shCTRL i shERK5, (n=3). C. Activitat de TK1 en les línies shCTRL i shERK5 D. Quantificació del mRNA de dCK en cultius asincrònics de shCTRL i shERK5 (shCTRL, n=10; shERK5, n=10). E. Quantificació del mRNA de SAMHD1 en cultius asincrònics de shCTRL i shERK5 (shCTRL, n=10; shERK5, n=10). En D i E, l'expressió de dCK i SAMHD1 ha sigut normalitzada amb l'expressió del RNA de 18S.

La mort generada pel tractament amb timidina probablement es deu a la falta de nucleòtids durant la replicació del DNA i el conseqüent col·lapse de les forquilles de replicació ¹⁹. D'acord amb aquesta hipòtesi, la inhibició de CDK2 que porta a la disminució de l'activitat de replicació del DNA, hauria de disminuir també el dany produït. Vam testar aquesta hipòtesi utilitzant l' inhibidor de CDKs roscovitina. Vàrem conduir un assaig on vàrem afegir roscovitina, al tractament de 28h amb 2,5 mM timidina. En afegir aquest inhibidor, es va reduir parcialment la mort en les línies shERK5 (Figura 4. 16.) sense anar acompanyat, en aquest cas, d'una recuperació dels nivells de dNTP.

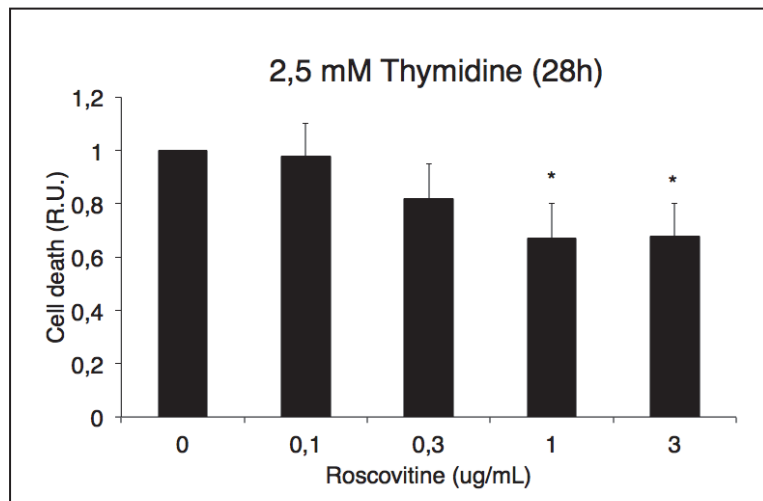


Figura 4. 16. Mort cel·lular en línies shERK5 tractades durant 28 hores amb 2,5 mM timidina i roscovitina a les concentracions indicades, (n=3).

Tots aquests resultats indiquen que l'augment en el rati d'TTP/dCTP en les línies shERK5 és independent de l'enzim TK1, condueix a estrès de replicació, dany en el DNA i apoptosi.

4. La manca d'Erk5 *in vivo* altera l'eficiència del desenvolupament eritropoètic al moll de l'os

Els experiments amb les línies cel·lulars mostren que la disminució dels nivells d'ERK5 actuen sinèrgicament amb la timidina en la disminució dels nivells intracel·lulars de dCTP i conseqüentment es genera una situació d'estrès de replicació. De manera natural els teixits hematopoètics presenten una elevada concentració de timidina, i degut a l'elevada taxa de proliferació de les cèl·lules progenitores en aquests teixits, els mecanismes de protecció i reparació del dany al DNA han d'estar altament regulats^{76,77}. Així doncs, vàrem establir la hipòtesi que ERK5 podria estar implicat en el manteniment de l'estabilitat genòmica en els teixits hematopoètics. Per testar la nostra hipòtesi, vàrem creuar ratolins amb el gen d'*Erk5* flanquejat per regions LoxP amb ratolins expressant la recombinasa *Cre* sota l'acció del promotor del gen *Vav*, que només s'expressa en el llinatge hematopoètic des d'un estadi molt primerenc en el desenvolupament¹¹⁹. El sistema *Vav-Cre* proporciona una excisió eficient durant els estadis inicials del desenvolupament hematopoètic.

L'excisió d'*Erk5* en el llinatge hematopoètic va produir un augment en la mida de la melsa i en la cel·lularitat d'aquest òrgan en ratolins de 1-2 mesos d'edat, mentre que la cel·lularitat del moll de l'os no es va veure afectada (Figura 4. 17.).

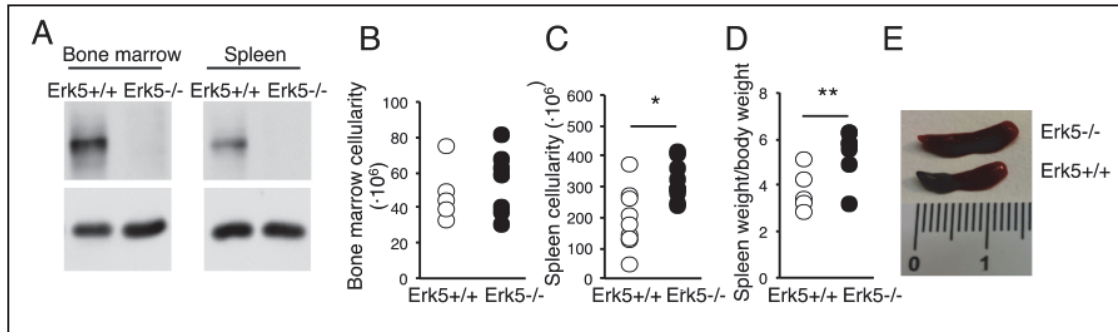


Figura 4. 17. A. Western blot representatiu mostrant la presència o absència d'Erk5 en el moll de l'os (esquerra) o melsa (dreta) de ratolins *Erk5^{fl/fl}* o *Erk5^{fl/fl}VavCre⁺*. B. Cel·lularitat al moll de l'os de ratolins *Erk5^{fl/fl}* i *Erk5^{fl/fl}VavCre⁺* (n >= 6). C. Cel·lularitat a la melsa de ratolins *Erk5^{fl/fl}* i *Erk5^{fl/fl}VavCre⁺* (n >= 9). D. Pes de la melsa normalitzat amb el pes del cos (n >= 7). E. Melses representatives de ratolins *Erk5^{fl/fl}* i *Erk5^{fl/fl}VavCre⁺*.

Vàrem analitzar els precursors eritroides al moll de l'os i a la melsa. Entre aquests precursors trobem els eritroblasts nucleats altament proliferatius EryA (*ter119⁺*, *CD71⁺*, *FSC alt*) i les poblacions que se'n deriven, Ery B (*ter119⁺*, *CD71⁺*, *FSC baix*) i Ery C. Vàrem observar que els precursors del llinatge eritroide *ter119⁺* es trobaven sobre-representats a la melsa dels ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre*, indicant així un augment en la eritropoesi extra-medul·lar. Quan vàrem analitzar el moll de l'os, vàrem observar que la població *ter119⁺* era inferior en els ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* que en els ratolins control (Figura 4. 18.). Aquests resultats indiquen que la manca d'ERK5 altera negativament el desenvolupament dels eritròcits al moll de l'os, promovent la migració dels precursors a la melsa que desenvoluparà la funció de teixit eritropoètic per a compensar la pèrdua d'activitat en el moll de l'os (Figura 4. 18.).

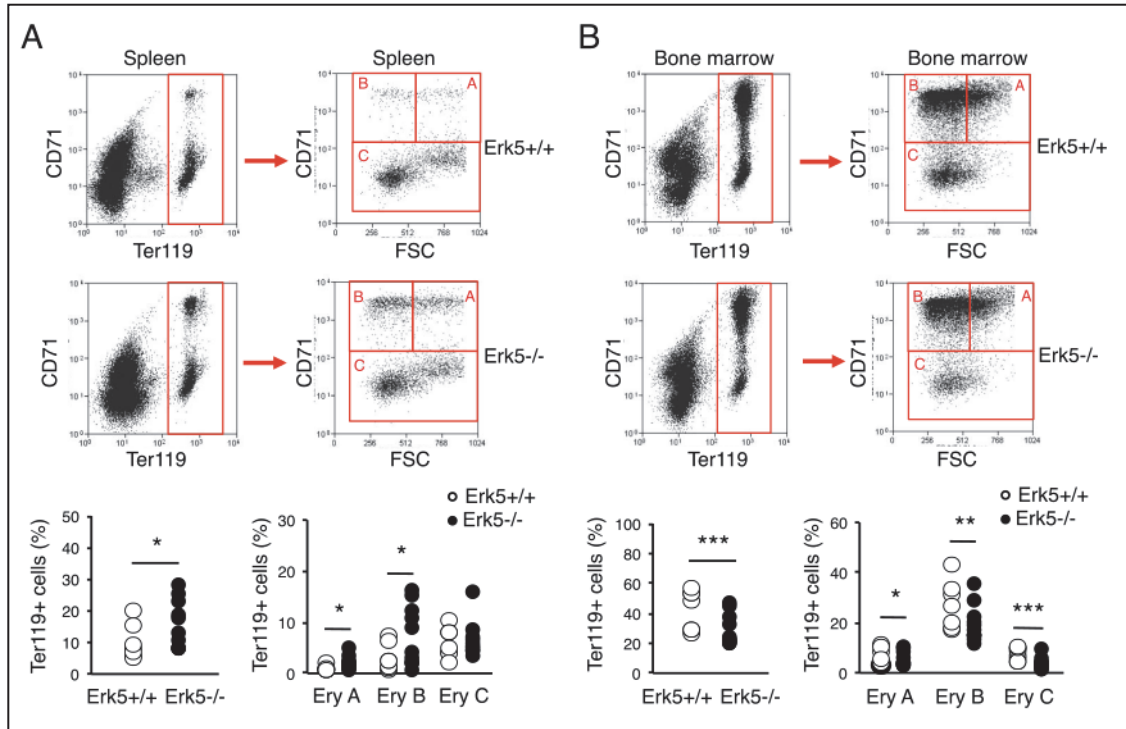


Figura 4. 18. A. Població eritroide de la melsa. *Dot plots* representant la distribució dels precursors eritroides (EryA, B, C) en base a la distribució del FS (*Forward scatter*) i els nivells de CD71 (part superior dreta) en la població Ter119+ (part superior esquerra). Percentatge de població Ter119+ en la melsa de ratolins *Erk5^{fl/fl}* i *Erk5^{fl/fl}VavCre⁺* (part inferior esquerra), i percentatge de les subpoblacions Ter119+, EryA, B, C (part inferior dreta), (n>=8). B. Població eritroide del moll de l'os. *Dot plots* representant la distribució dels precursors eritroides (EryA, B, C) en base a la distribució del FS i els nivells de CD71 (part superior dreta) en la població Ter119+ (part superior esquerra). Percentatge de població Ter119+ en el moll de l'os de ratolins *Erk5^{fl/fl}* i *Erk5^{fl/fl}VavCre⁺* (part inferior esquerra), i percentatge de les subpoblacions Ter119+, EryA, B, C (part inferior dreta), (n>=8).

A banda del llinatge eritroide, la distribució al moll de l'os de les cèl·lules B madures (B220^{high}/IgM⁺) es veu alterada en els ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre*. En aquests ratolins trobem un percentatge menor de cèl·lules B madures al moll de l'os (Figura 4. 19. A, B). Malgrat aquestes diferències, la melsa dels ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i dels ratolins control presentaren el mateix percentatge de limfòcits B madurs (Figura 4. 19. C). L'anàlisi de precursors de limfòcits T al tim no va mostrar diferències entre els ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i els ratolins control.

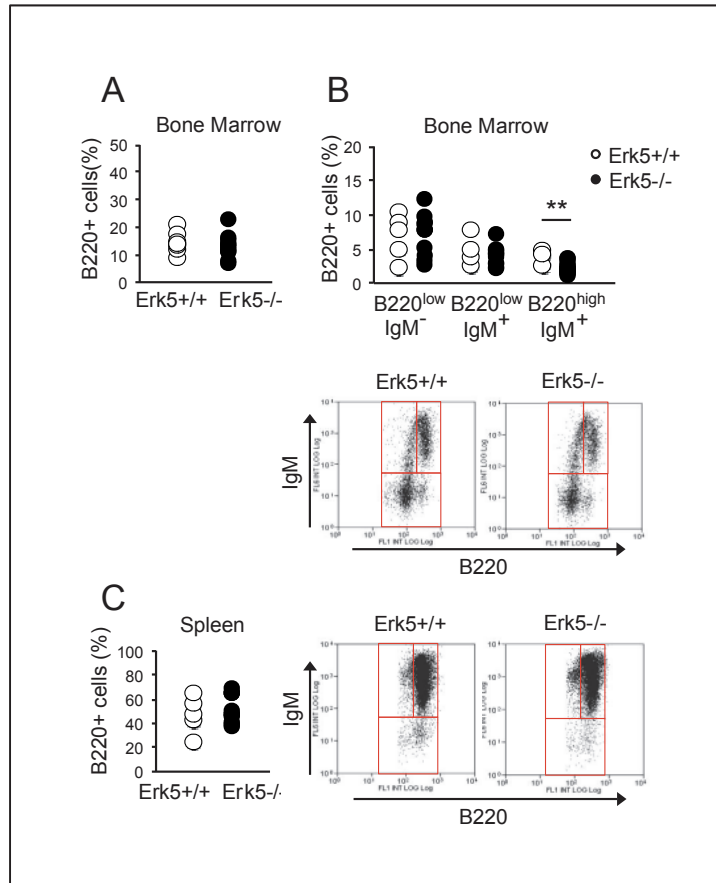


Figura 4. 19. Distribució del progenitors de limfòcits B en el moll de l'os i la melsa de ratolins *Erk5^{-/-}VavCre* i ratolins control *Erk5^{fl/fl}*. A. Població de cèl·lules positives per a B220 al moll de l'os de ratolins *Erk5^{-/-}VavCre* (n=10) i ratolins control *Erk5^{fl/fl}* (n=7). B. (superior) Percentatge de cèl·lules precursors de limfòcits B al moll de l'os de ratolins *Erk5^{-/-}VavCre* (n=10) i ratolins control *Erk5^{fl/fl}* (n=7). (Inferior) Dot plots representant la distribució d'aquestes cèl·lules en funció dels nivells de B220 i IgM C. Població de cèl·lules positives per a B220 a la melsa de ratolins *Erk5^{-/-}VavCre* (n=10) i ratolins control *Erk5^{fl/fl}* (n=7).

A continuació, després d'observar aquestes alteracions en el desenvolupament dels eritròcits i de limfòcits B, vàrem voler investigar quin era el mecanisme responsable per a aquestes anomalies i vam centrar el nostre estudi en el desenvolupament dels eritròcits. Vàrem especular que aquest dèficit en l'eritropoesi al moll de l'os podia venir donat per una aturada en la progressió del cicle cel·lular dels precursors immadurs, per un augment en l'apoptosi, o bé per una combinació d'ambdós fenòmens. Es va analitzar el cicle cel·lular en la població cel·lular total tan de la melsa com del moll de l'os, així com el cicle cel·lular de les cèl·lules Ter119+ d'ambdós teixits (Figura 4. 20.). A nivell de població total, no es van observar diferències en el moll de l'os però si es va detectar un augment de la

proliferació en la melsa dels ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* (Figura 4. 20. A, C.). En analitzar la població Ter119+, vam constatar que al moll de l'os la manca d'ERK5 induïa una aturada parcial del cicle cel·lular d'aquestes cèl·lules, representat per un augment en la fracció cel·lular en G1 i una disminució de les cèl·lules en fase S, en comparació amb la població Ter119+ del moll de l'os dels ratolins control (Figura 4. 20. B.). A la melsa, en canvi, s'observava un increment de la població total d'esplenòcits en fase S tal i com es mostra mitjançant la tinció amb IP. L'augment d'activitat de replicació del DNA es va confirmar per l'assaig d'incorporació de BrdU (Figura 4. 20. C, E.). Curiosament, la replicació del DNA no es veia augmentada en la població eritroide més immadura de la melsa Ter119+ (Figura 4. 20. D). Probablement l'augment d'eritropoesi a la melsa es dona per un augment del nombre de cèl·lules immadures Ter119+ més que no pas per un augment en la velocitat de replicació d'aquesta població.

Aquests resultats ens suggereixen que les poblacions precursors d'eritròcits no presenten una alteració intrínseca del cicle cel·lular sinó que la impossibilitat de desenvolupar-se correctament en el moll de l'os condueix a l'aparició d'eritropoesi extramedul·lar a la melsa, amb una migració a la melsa i conseqüent expansió de cèl·lules altament proliferatives en aquest teixit.

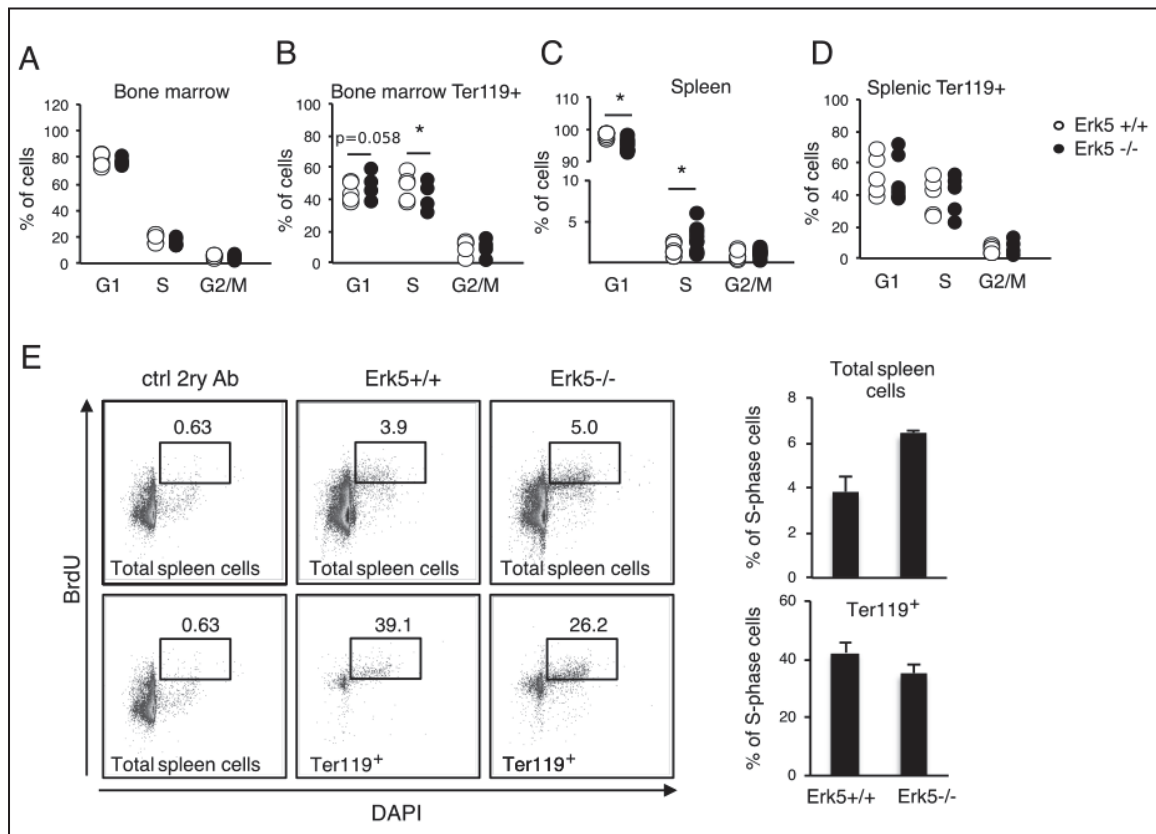


Figura 4. 20. A-D. Percentatge de cèl·lules del moll de l'os (A), Ter119+ del moll de l'os (B), de la melsa (C), Ter119+ de la melsa (D) a cada fase del cicle cel·lular en ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i *Erk5^{fl/fl}* (n≥8). E. (Part esquerra) Percentatge de cèl·lules en la fase G2/M del cicle cel·lular. Població total (panel superior), població Ter119+ (panel inferior). Valors representatius d'un experiment. (Part dreta) Representació de la mitjana de 3 experiments.

Després de l'anàlisi del cicle cel·lular, vam avaluar la viabilitat de les poblacions Ter119+ del moll de l'os en ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i ratolins control mitjançant la tinció amb annexina V i IP i posterior anàlisi per citometria de flux (Figura 4. 20) i vam observar un lleuger increment en l'apoptosi d'aquests precursors en l'absència d'ERK5. En conjunt, aquestes dades indiquen que la disminució de la població Ter119+ en els ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* ve donada per una aturada parcial en la proliferació i per un augment en l'apoptosi (Figura 4. 20. i 4. 21.).

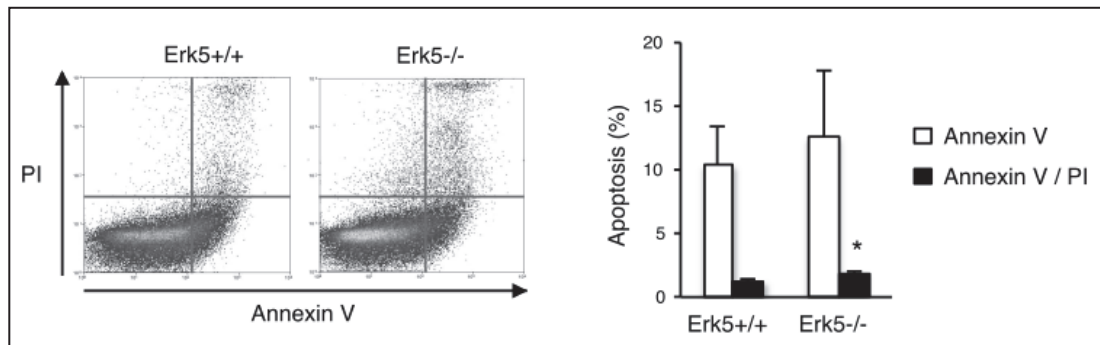


Figura 4. 21. Anàlisi d'apoptosi per tinció d'Annexina V i IP en ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i ratolins *Erk5^{fl/fl}*. (Esquerra) Experiment representatiu. (Dreta) Quantificació de l'apoptosi, (n=2).

5. La manca d'ERK5 *in vivo* indueix una expansió del pool de dTTP i un augment en la taxa de mutació en la població Ter119+ del moll de l'os

Els resultats obtinguts amb les línies cel·lulars ens mostren que la depleció d'ERK5 sensibilitza les cèl·lules en front a la timidina i, seguint aquest raonament, vam qüestionar-nos si les alteracions en el desenvolupament eritroide al moll de l'os podia ser degut a que les cèl·lules Ter119+ deficientes per a ERK5 presentessin algun tipus d'alteració en el metabolisme de dNTP pel fet de trobar-se en un entorn ric en timidina. Per tal de testar aquesta idea, vam procedir a mesurar la quantitat de dNTP en les cèl·lules Ter119+ en ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i ratolins control. Es va detectar un augment significatiu de dTTP intracel·lular així com una tendència cap a l'increment de dCTP i dGTP (Figura 4. 22.). En analitzar els nivells de dNTP en el teixit total (moll de l'os, melsa i tim), no es van observar diferències (dades no mostrades), suggerint que l'increment de dTTP en els precursors eritroides deficientes per ERK5 és específic per a la població Ter119+.

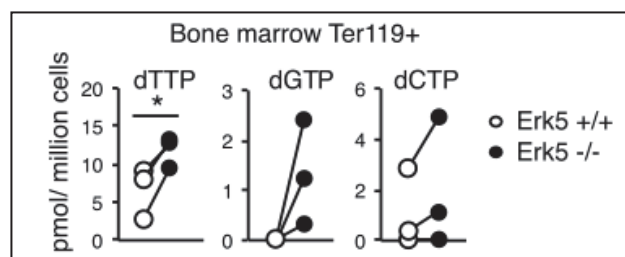


Figura 4. 22. Nivells intracel·lulars de dTTP, dGTP i dCTP en cèl·lules Ter119+ del moll de l'os de ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* i ratolins *Erk5^{fl/fl}*, (n=3). La població Ter119+ es va purificar a partir de moll de l'os per cell sorter. Els nivells de dATP no es van poder detectar en aquestes mostres per falta de sensibilitat suficient.

Canvis en la concentració cel·lular de dNTP genera estrès proliferatiu i incrementa la taxa de mutagènesi a causa d'una disminució en la fidelitat durant la síntesi del DNA. Un dels mecanismes que expliquen l'augment de la mutagènesis induïda per una alteració en la concentració cel·lular de dNTP és la incorporació del dNTP erroni per part de la DNA polimerasa. Per tal de testar si un augment en la concentració de timidina en els teixits hematopoètics i el conseqüent augment de dTTP en la població Ter119 podia induir un augment en la taxa de mutagènesi en ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre*, vàrem separar cèl·lules TER119+ del moll de l'os de ratolins *Erk5^{-/-} Erk5^{fl/fl}VavCre* i *Erk5^{fl/+}VavCre* i vàrem seqüenciar-ne l'exoma a la cerca de mutacions puntuals. Els resultats mostren que la taxa de mutacions *non-synonymous* en el ratolí *knock-out* és 11 vegades superior que en el ratolí control (Figura 4. 23.) (Taula 4. 2.).

| Table 1. Summary of the number and type of mutations identified in <i>Erk5^{-/-}VavCre</i> compared to a heterozygote control <i>Erk5^{+/-}VavCre</i> mouse. | | | | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|-----|-------|
| A. Total mutations identified | | | | | | |
| Type of mutation | | <i>Erk5^{-/-}</i> | <i>Erk5^{+/-}</i> | Increased in <i>Erk5^{-/-}</i> | | |
| Non-synonymous | | 1149 | 103 | 11 | | |
| Exon | | 1135 | 102 | 11 | | |
| Stop codon | | 9 | 1 | 9 | | |
| Splicing | | 5 | 0 | 5 | | |
| Synonymous | | 2398 | 144 | 17 | | |
| Total | | 3547 | 247 | 14 | | |
| B. Classification of mutated bases | | | | | | |
| Reference base | Mouse | Mutated base | | | | Total |
| | | A | C | G | T | |
| A | <i>Erk5^{-/-}</i> | — | 97 | 659 | 96 | 852 |
| | <i>Erk5^{+/-}</i> | — | 7 | 46 | 3 | 56 |
| C | <i>Erk5^{-/-}</i> | 107 | — | 116 | 649 | 872 |
| | <i>Erk5^{+/-}</i> | 11 | — | 13 | 39 | 63 |
| G | <i>Erk5^{-/-}</i> | 772 | 106 | — | 137 | 1015 |
| | <i>Erk5^{+/-}</i> | 49 | 9 | — | 3 | 61 |
| T | <i>Erk5^{-/-}</i> | 85 | 626 | 97 | — | 808 |
| | <i>Erk5^{+/-}</i> | 13 | 46 | 8 | — | 67 |

Taula 4. 2. Resum del nombre i tipus de mutacions identificades en el ratolí *Erk5^{fl/fl}VavCre* en comparació amb el ratolí *Erk5^{fl/+}VavCre*.

En dur a terme la classificació de les bases mutades, vam observar que hi havia un elevat desequilibri en les mutacions entre A, G, C, T. Les transicions C a T/T a C i A a G/G a A tenien una major taxa que els altres tipus de substitució de base (Figura 4. 23. B.). Aquests resultats ens indiquen que l'augment en els nivells de dTTP poden haver causat aquest increment en la taxa de mutació.

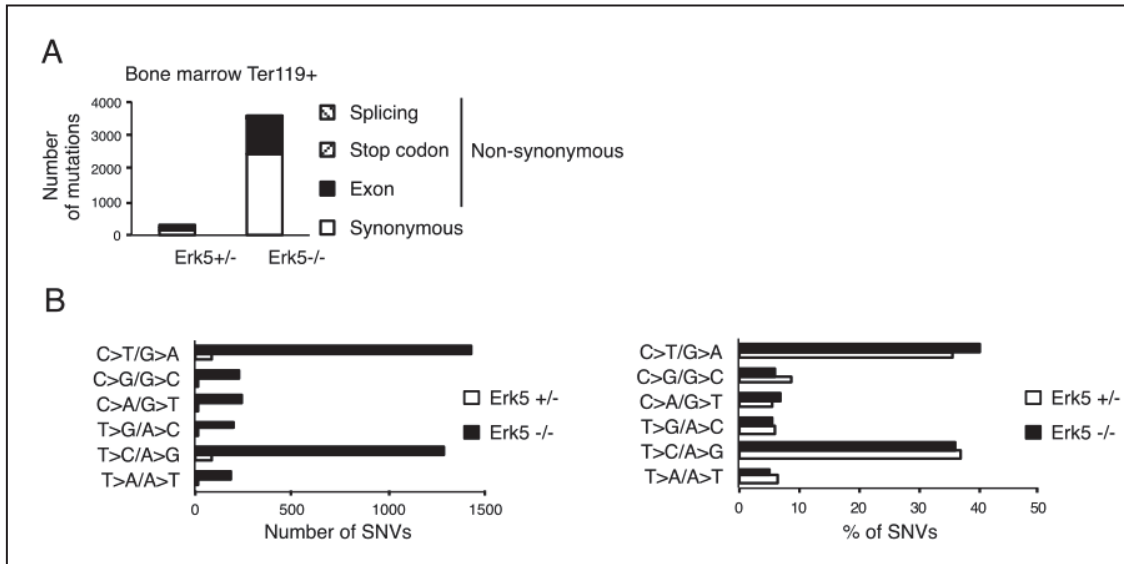


Figura 4. 23. Seqüenciació de l'exoma de cèl·lules Ter119+ del moll de l'os d'un ratolí control *Erk5^{fl/+}VavCre* i un ratolí *Erk5^{fl/fl}VavCre*. A. Nombre i tipus de mutacions. B. Nombre (esquerra) i percentatge (dreta) de *Single Nucleotide Variation* (SNV). (n=1)

5 . DISCUSSIÓ

ERK5 s'ha associat amb la progressió del cicle cel·lular sent indispensable per a la proliferació d'alguns tipus cel·lulars i dispensable per a uns altres ^{97,100,120}. Mentre que la proliferació en cèl·lules Jurkat no es veu alterada per la disminució dels nivells d'ERK5, aquesta deficiència les torna sensibles a l'activació de FAS, un inductor de l'apoptosi ¹²⁰. D'altra banda, la deleció induïda d'ERK5 en MEFs promou l'aturada parcial de la progressió en el cicle cel·lular d'aquestes cèl·lules mitjançant la regulació dels nivells de p21 i de l'activitat de la proteïna del retinoblastoma i de CDK2 ⁹⁷. A més a més, se sap que ERK5 es troba desregulada en varis tipus de tumor i també s'ha descrit que la seva sobreexpressió en càncer correlaciona amb la resistència a agents quimio-terapèutics ^{107,110}. Són nombrosos els estudis que mostren com la inhibició d'aquesta quinasa pot tenir conseqüències positives en el tractament contra el càncer ^{99,107,110,121}. Tot i que majoritàriament s'ha relacionat l'activitat d'ERK5 amb la supervivència de les cèl·lules en front a condicions adverses, els resultats d'aquesta tesi demostren la implicació de ERK5 en el manteniment de l'estabilitat genòmica i el desenvolupament hematopoètic. La manca d'ERK5 no altera la proliferació en condicions normals de cèl·lules tumorals com les Jurkat tal i com s'ha descrit prèviament, però les torna sensibles al desequilibri intracel·lular de dNTP generat pel tractament amb timidina. Aquesta sensibilització deguda a la deficiència d'ERK5 es tradueix en una augment del dany al DNA i l'apoptosi tal i com es presenta a l'apartat de resultats. A més a més, la majoria de línies transfectades amb el shERK5 presenten una major incidència en l'aparició d'aneuploidia en comparació amb les línies shCTRL. A banda de transfectar cèl·lules Jurkat, vàrem generar transfeccions estables de shERK5 i shCTRL en les línies tumorals HL-60, Hut-78 i U-937. Totes quatre línies usades en aquest estudi presenten una funció de p53 compromesa, ja sigui per mutació o inactivació, i a més a més tan les Jurkat com les U-937 presenten una disfunció en l'activitat de PTEN. Se sap que les línies Jurkat presenten permissivitat per a l'acumulació d'alteracions en la seva ploïdia, i la manca d'ERK5 induïx un increment en aquesta susceptibilitat. De la mateixa manera, les cèl·lules U-937 presenten alteracions en el contingut genòmic quan disminuïm els nivells d'ERK5, però d'altra banda no vàrem observar diferències en aquest aspecte quan vam analitzar les línies HL-60 i Hut-78.

ERK5 regula els nivells de p53 a través de l'estabilitat de la unió de p53 amb MDM2 en cèl·lules MEF ⁹⁸. La manca d'ERK5 condueix a l'estabilització dels nivells de p53, que al seu torn tindrà un efecte directe en la proliferació de la cèl·lula. Així doncs, la manca

d'ERK5 condueix a l'aturada del cicle cel·lular en cèl·lules amb p53 funcional, com han descrit diferents grups. En aquest estudi, analitzem l'impacte de la manca d'ERK5 en línies que no presenten punts de control funcionals com p53 i PTEN i aprofundim en els efectes de la manca d'ERK5 en la línia leucèmica Jurkat. La disfunció de punts de control associats amb la preservació de l'estabilitat genòmica combinat amb la disminució dels nivells d'ERK5 ve acompanyat d'un increment en la inestabilitat genòmica.

El dany al DNA és detectat per proteïnes que anomenem sensors, que transduiran el senyal a una xarxa de senyalització altament complexa que anomenem resposta del dany al DNA. Durant aquest dany, la proteïna supressora de tumors p53 juga un paper fonamental en el destí de la cèl·lula malmesa, i activarà un programa transcripcional o un altre en funció de si s'indueix l'aturada al cicle cel·lular o bé l'apoptosi. Com en tots els processos de la biologia, en el cas de la resposta al dany al DNA la cèl·lula integrarà els diferents senyals i el balanç entre ells tindrà un o altre efecte. Així doncs en contraposició al senyal de p53 d'aturada o mort trobem la via de NFkB, que promourà la supervivència cel·lular en condicions d'estrès. NFkB és el principal factor antiapoptòtic en la resposta al dany al DNA, i el seu rol és permetre la coordinació entre la reparació del dany al DNA juntament amb l'activació dels punts de control i la supervivència de la cèl·lula ¹²². Aquesta resposta és dependent d'ATM, mentre que les funcions de NF-kB relacionades amb la resposta immunitària són independents d'aquesta proteïna. Diferents treballs descriuen l'activació directa de NF-kB per part d'ERK5, i el seu paper en la progressió en el cicle cel·lular i la consegüent promoció de la proliferació tumoral en càncer de colon ^{106,120,121,123}.

Curiosament, la disminució dels nivells d'ERK5 a la línia cel·lular Jurkat va comportar un augment en els nivells basals de dATP i una disminució del llindar de sensibilitat en front al tractament amb timidina, incrementant el rati dTTP/dCTP amb un consegüent augment al dany al DNA i a l'apoptosi. Tot i que no es van detectar diferències en els nivells proteics de RNR2, la subunitat limitant, podria ser que la regulació al·lostèrica de l'activitat del complex estigués alterada en les línies shERK5. La subunitat RNR1 presenta un lloc de regulació al·lostèrica on s'hi uneix dATP o bé ATP per tal d'inhibir o activar el complex, respectivament ^{55,124}. Un increment basal en els nivells de dATP podria mantenir el complex RNR parcialment inhibat compromentent la seva capacitat de tamponar l'augment de dTTP en el tractament amb timidina. Per tal d'aclarir aquest aspecte, seria interessant analitzar el rati dATP/ATP, així com l'activitat del complex RNR.

A banda de la RNR, vàrem mesurar l'expressió de l'enzim dCK així com l'activitat de l'enzim TK i l'absorció de timidina. Tot i que no vam observar diferències en l'expressió de dCK, cal dir que l'expressió d'aquesta proteïna es manté estable al llarg del cicle cel·lular i podria ser que la manca d'ERK5 tingués un impacte en la regulació de la seva activitat. A més a més, la inhibició de l'activitat quinasa d'ERK5 sensibilitza les cèl·lules de leucèmia mieloide al tractament amb Ara-C ¹⁰⁸. L'enzim limitant per al metabolisme de l'Ara-C és la dCK, i la disminució en l'activitat d'aquest enzim correlaciona amb la resistència de cèl·lules d'AML al tractament amb aquest fàrmac. De manera proporcionalment inversa, una sobre activació de dCK conduirà a una IC50 inferior d'Ara-C. Fa més d'una dècada, quan encara no s'havia caracteritzat quina modificació post-traduccional patia dCK, Smal i col·laboradors van constatar que dos inhibidors de la via de les MAPK/ERK, PD-98059 i U-0126, indueixen l'activitat de l'enzim dCK ¹²⁵. Aquests inhibidors tenen com a diana, entre d'altres, ERK5 i per tant és temptador preguntar-se si ERK5 pot estar regulant indirectament l'activitat de dCK. D'altra banda la genisteïna, que disminueix els nivells i l'activitat d'ERK5, també potencia els efectes d'Ara-C. Ara-C és un anàleg de pirimidina que per tal d'activar-se correctament i patir l'efecte desitjat a la cèl·lula ha de ser metabolitzat per, entre d'altres enzims, dCK. Així doncs, es podria especular que una inhibició d'ERK5 i un conseqüent augment de l'activitat dCK explicarien un increment en els efectes de l'Ara-C. De fet, els nivells d'activitat de dCK correlacionen directament amb la sensibilitat a Ara-C. L'activitat de dCK pot ser regulada mitjançant la fosforilació a la serina 74. Aquesta fosforilació indueix l'activitat de dCK implicant que aquest enzim necessita l'activitat d'una quinasa per assolir la conformació de màxima activitat. De moment és el sol residu de fosforilació que s'ha descrit, fet que ens condueix a pensar que la possible regulació de l'activitat de dCK per ERK5 seria indirecta.

Per altre banda, en els resultats aquí presentats mostrem com la manca d'ERK5 *in vivo* impedeix el correcte desenvolupament hematopoètic. Se sap que la manca de dCK té un impacte negatiu en l'hematopoesi degut a un estrès replicador ⁷⁶, podria ser que un augment en la seva activitat també tingués conseqüències negatives pel mateix motiu, ja que tant una disminució com una expansió en els nivells de dNTP tenen efectes deleteris a la cèl·lula. Recentment s'ha publicat un estudi on demostren que la inhibició d'ERK5 sensibilitza la línia cel·lular de càncer de colon HCT116 al tractament amb 5-FU, mitjançant un mecanisme p53 dependent ¹²¹. Aquest estudi ens fa pensar que a banda de tenir una

implicació en el control del metabolisme de dNTP, ERK5 juga un paper de supervivència en situacions d'estrès de replicació dins de la via clàssica de p53.

Cal destacar que l'homòleg funcional d'ERK5 en llevats, Slt2 o Mpk1, és necessari per a la correcta regulació de les subunitats del complex RNR en resposta al dany al DNA, és necessari per a la resistència a la deficiència de dNTP induïda pel tractament amb HU i es transloca al nucli quan les cèl·lules són tractades amb metil metasulfonat, un agent alquilant del DNA¹²⁶. Aquestes dades indiquen una relació entre la funció de Slt2 en llevat i ERK5 en mamífer. Malgrat aquestes evidències, nosaltres no hem observat cap alteració en l'expressió de RNR en absència d'ERK5, però no es pot descartar una regulació en la seva activitat. El complex de la RNR és clau per al metabolisme de dNTP i està conservat al llarg de l'evolució, però tot i així els seus mecanismes de regulació varien entre espècies. Això ens indica que podria ser que la relació entre aquestes dues proteïnes estigui conservada però que ERK5 reguli RNR en mamífers mitjançant altres vies diferents de la regulació de la transcripció o l'estabilitat proteica.

En llevats, Slt2 forma part de la via de senyalització que controla la integritat de la paret cel·lular, on és directament activada per PKC¹²⁷. Recentment s'ha descrit que PKC activa els punts de control cel·lulars en front al dany al DNA, i en absència de PKC les cèl·lules no poden activar Rad53¹²⁸, però l'absència de Slt2 no compromet l'activació de rad53 indicant que Slt2 és dispensable per a l'activació dels punts de control del dany al DNA tot i que la seva absència sensibilitzi a les cèl·lules a dit dany. En conjunt, tots aquests resultats suggereixen un paper d'ERK5 en condicions d'estrès genotòxic, que estaria conservat al llarg de l'evolució.

La preservació de l'equilibri de dNTP a les cèl·lules és necessari per a impedir l'estrès de replicació i la inestabilitat genòmica. Els *pools* de dNTP es generen mitjançant dues vies, la via *de novo* i la via de salvament. La via de salvament durant el desenvolupament dels limfòcits B i T, així com durant el desenvolupament eritropoiètic és essencial per a mantenir l'equilibri de la concentració intracel·lular de dNTP i evitar una situació d'estrès replicador a les poblacions progenitores altament proliferatives. Els resultats presentats en aquest estudi mostren que en absència d'ERK5, les cèl·lules progenitores del llinatge eritroide presenten un increment en els nivells intracel·lulars de dTTP, que s'associen a un augment en la taxa de mutació i un defecte en la eritropoesi òrgan-dependent al moll de l'os amb eritropoesi extra-medul·lar a la melsa.

Observem un paral·lelisme entre els resultats *in vitro* amb les Jurkat shErk5 tractades amb timidina, que augmenten la rati d'TTP/dCTP en relació a les Jurkat control, i els valors de d'TTP *in vivo* en progenitors eritroides. A més a més, la manca d'ERK5 a les línies Jurkat incrementa la incidència de tetraploidia, una altra forma d'instabilitat genòmica. Les línies cel·lulars en que es va disminuir els nivells d'ERK5 són línies p53 i/o PTEN negatives i, per tant, són permissives per a l'acumulació d'aberracions genòmiques com la poliploidia. El dany al DNA pot conduir a l'aparició d'instabilitat cromosòmica i se sap que l'absència de PTEN induïx instabilitat genòmica mitjançant alteracions en la fase S i en la fase M ³¹⁻³³. Així doncs l'alteració en l'equilibri de les reserves de dNTP a les línies shERK5 podria ser la responsable de l'aparició de instabilitat cromosòmica a les línies cel·lulars.

Cal remarcar que de mitjana, el moll de l'os conté el doble de timidina que la melsa ⁷⁶. I en absència de ERK5, l'augment de timidina en el microentorn del moll de l'os porta a un augment dels valors intracel·lulars de d'TTP en els progenitors eritroides, el que podria generar estrès de replicació i aquestes poblacions es podrien veure forçades a migrar cap a òrgans més permissius com la melsa. A banda dels precursors d'eritròcits, el desenvolupament dels limfòcits B també està alterat al moll de l'os dels ratolins deficientes per ERK5. Vàrem observar que la població més madura de limfòcits B al moll de l'os estava sots-representada en els ratolins ERK5 KO. Al mateix temps que es publicava el nostre estudi es va publicar un article en el que es veia el mateix fenomen en el desenvolupament B, recolzant així els resultats aquí presentats ¹²⁹.

Jacque i col·laboradors demostren que ERK5 és necessari per a la inducció de l'expressió de Mcl-1, un factor anti-apoptòtic de la família BCL2. Altres estudis relacionen Mcl-1 amb la resposta al dany al DNA, específicament Mcl-1 és necessària per a la activació inicial de Chk-1 ¹³⁰, suggerint així que tot i que la manca d'ERK5 no impedeix l'activació de Chk-1 en les línies cel·lulars Jurkat, podria ser que aquesta es tingui lloc de manera retardada, tornant el dany al DNA causat per el tractament amb timidina irreversible. Mcl-1 també promou la resistència de cèl·lules de càncer de mama en front a quimioteràpia, per la via d'activació del EGFR ¹³¹.

A continuació de l'estudi presentat en aquesta tesi, en el nostre laboratori es van dur a terme un anàlisi de ratolins deficientes per a ERK5 en el llinatge hematopoètic i deficientes per a ATM. Els ratolins ATM KO desenvolupen limfomes tímics de manera espontània i

moren als pocs mesos de vida. No s'ha descrit que els ratolins deficientes per a ERK5 en el llinatge hematopoètic presentin cap tipus de generació espontània de tumors. Curiosament, la combinació d'ambdues deficiències té un efecte protector, retardant l'aparició de limfomes tímics i la conseqüent mort dels animals. Aquests resultats recents concorden amb els resultats presentats on les cèl·lules tumorals presenten una susceptibilitat en front de l'estrès replicador en absència d'ERK5. Cal recordar que el tim, moll de l'os i ganglis són els òrgans que presenten els nivells de timidina més elevats de l'organisme en ratolí, i que a més a més la població de timòcits doble negatius presenta una elevada taxa de divisió. Tot i que no es van detectar diferències en la concentració de dTTP en el teixit total de tim de ratolins control i ratolins deficientes per ERK5, diferències en les poblacions proliferatives de timòcits doble negatius podrien estar emmascarades per la població majoritària de vora el 90% del total del tim dels timòcits doble positius, que no presenten activitat proliferativa. Seria interessant poder analitzar la concentració intracel·lular de dTTP a les poblacions doble negatives.

Com s'ha discutit anteriorment, ERK5 ha sigut presentat en diversos estudis com a una potencial diana terapèutica en co-tractament amb teràpia amb anàlegs de bases nucleiques. Si afegim els resultats d'aquesta tesi en aquest marc argumental, seria interessant plantejar la hipòtesi de que les cèl·lules dels limfomes que es desenvolupen al ratolí doble KO estiguin patint un fenomen similar al de les cèl·lules Jurkat shERK5 tractades amb timidina, fet que concordaria amb el retard en l'aparició dels limfomes en els doble KO comparat amb els ATM KO. Seria molt interessant fer un anàlisi de l'estat d'altres proteïnes implicades en la resposta al dany al DNA, sobretot de p53, ja que els seus nivells són una diana directa d'ERK5, i un augment en l'estabilitat de p53 també podria explicar l'aparició tardana de tumors. A més a més, els ratolins ATM KO presenten un increment en la sensibilitat front a la radiació amb rajos gamma i això es deu a una incapacitat de fosforilar la histona H2AX de manera eficient. Els nous resultats del laboratori mostren com l'absència d'ERK5 recupera la senyalització a l'efecte de la radiació en timòcits sense ATM mitjançant la fosforilació d'H2AX l'aturada parcial del cicle cel·lular i l'apoptosi. L'any 2014 Bunimovich i col·laboradors van publicar un article on demostraven el rol d'ATM en la fosforilació de dCK i el paper d'aquesta última en la resposta a la irradiació. En el moment de la irradiació, l'activitat de dCK augmenta i promou la reparació del dany causat al DNA¹³². A més a més, dos anys abans Yang i col·laboradors van descriure un paper de dCK en front a irradiació que tenia lloc de manera independent a la ruta metabòlica de dNTP. Van

demostrar que dCK interacciona amb CDK1 i promou la seva inhibició, impedit així el pas G2/M¹³³. Aquesta dada és particularment interessant, donat que ERK5 juga un paper important en la transició G2/M d'alguns tipus cel·lulars, sent directament activada per CDK1¹⁰⁵. En els timòcits irradiats de ratolins ATM, el punt de control G2/M s'abroga, mentre que quan es combina l'absència d'ATM amb l'absència d'ERK5 es re-estableix parcialment aquest punt de control, desvelant la importància d'ERK5 en la resposta al dany al DNA per irradiació.

Cal afegir que Queralt i col·laboradors van descriure una interacció genètica entre Slt2 i Rad9, una proteïna essencial en la resposta al dany al DNA per radiació ionitzant¹²⁷. A més a més, ATM està implicada en el desenvolupament hematopoètic, fet que ens suggereix que un anàlisi d'aquesta població en el ratolí doble KO per a ERK5 i ATM possiblement desvelaria diferències en relació al ratolí que només és KO per ATM. Recentment també s'ha descrit un paper d'ATM en la regulació del metabolisme de dNTP^{134,135}.

La inestabilitat genòmica forma part de les característiques tumorals principals i els camins que hi condueixen han estat extensament i profundament estudiats. De la mateixa manera que la transformació maligna pot venir donada per un increment en la inestabilitat genòmica, també pot ser el taló d'Aquil·les de les cèl·lules tumorals, ja que aquestes desenvolupen una sèrie d'estratègies per tal de conviure-hi que si són alterades provocaran la mort cel·lular. Així doncs, se sumen esforços per tal de poder desenvolupar fàrmacs que actuïn contra els mecanismes que protegeixen les cèl·lules tumorals de la mort. Els resultats presentats aquí situen ERK5 com una proteïna implicada en el control del contingut intracel·lular de dNTP i conjuntament amb altres evidències en la bibliografia recolzen la idea de tenir en compte ERK5 com a potencial diana terapèutica.

6 . CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

I – ERK5 protegeix la línia tumoral Jurkat en front a la inestabilitat genòmica i als desequilibris de dNTP

- 1 – La disminució dels nivells d'ERK5 promou inestabilitat genòmica en les línies cel·lulars Jurkat i U-937.
- 2 – La disminució dels nivells d'ERK5 en cèl·lules Jurkat les sensibilitza al tractament amb timidina mitjançant la disminució dels nivells intracel·lulars de dCTP.

II – ERK5 participa en el desenvolupament hematopoètic mitjançant la regulació dels nivells intracel·lulars de dNTP

- 1 – L'absència d'ERK5 en ratolí compromet el desenvolupament dels precursors de limfòcit B al moll de l'os.
- 2 – Els ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* presenten defectes en el desenvolupament eritroide al moll de l'os.
- 3 – Els ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* presenten esplenomegàlia lleugera causada per un increment en l'eritropoesi extramedul·lar a la melsa.
- 4 – Els precursors eritroides dels ratolins *Erk5^{fl/fl}VavCre* presenten un increment en el nombre de mutacions no-sinònimes de 11 vegades en comparació als ratolins control.

7 . BIBLIOGRAFIA

1. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C. & Sankaran, V. G. Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *Br. J. Haematol.* n/a–n/a (2016).
2. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, 1–16 (2015).
3. Baron, M. H., Isern, J. & Fraser, S. T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* **119**, 4828–4837 (2012).
4. Palis, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* **5 JAN**, 1–9 (2014).
5. Koulonis, M. *et al.* Identification and Analysis of Mouse Erythroid Progenitors using the CD71/TER119 Flow-cytometric Assay. *J. Vis. Exp.* **i**, 6–11 (2011).
6. Rivella, S. NIH Public Access. **16**, 187–194 (2013).
7. Kim, C. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* **1**, 13–19 (2010).
8. Marinkovic, D. *et al.* Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. **117**, 2133–2144 (2007).
9. Gordon, A. R. *et al.* Splenomegaly and modified erythropoiesis in KLF13^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* **283**, 11897–11904 (2008).
10. Carreau, M. *et al.* Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage.[see comment]. *Blood* **91**, 2737–2744 (1998).
11. Ebert, A., Hill, L. & Busslinger, M. *Spatial Regulation of V – (D) J Recombination at Antigen Receptor Loci. Long Range Regul. V(D)J Recomb.* **128**, 1–30 (Elsevier Inc., 2015).
12. Robey, E. & Schlissel, M. Lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 155–157 (2003).
13. Hardy, R. R. & Hayakawa, K. B c d p. 595–621 (2001).
14. Hardy, R. R., Kincade, P. W. & Dorshkind, K. The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage. *Immunity* **26**, 703–714 (2007).
15. Anderson, G. & Jenkinson, E. Lymphostromal interactions in thymus development and function. *Nature. Rev. Immunol.* **1**, 31–40 (2001).
16. Galgano, A., Barinov, A., Vasseur, F., de Villartay, J.-P. & Rocha, B. CD8 Memory Cells Develop Unique DNA Repair Mechanisms Favoring Productive Division. *PLoS One* **10**, e0140849 (2015).
17. Nguyen, T. V., Riou, L., Aoufouchi, S. & Rosselli, F. Fanca deficiency reduces A/T transitions in somatic hypermutation and alters class switch recombination junctions in mouse B cells. *J. Exp. Med.* **211**, (2014).
18. Tort, F. *et al.* Retinoblastoma pathway defects show differential ability to activate the constitutive DNA damage response in human tumorigenesis. *Cancer Res.* **66**, 10258–10263 (2006).

19. Beck, H. *et al.* Cyclin-Dependent Kinase Suppression by WEE1 Kinase Protects the Genome through Control of Replication Initiation and Nucleotide Consumption. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4226–4236 (2012).
20. Dobbelstein, M. & Sørensen, C. S. Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 405–423 (2015).
21. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
22. Hills, S. A. & Diffley, J. F. X. DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Curr. Biol.* **24**, R435–R444 (2014).
23. Mazouzi, A., Velimezi, G. & Loizou, J. I. DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Exp. Cell Res.* **329**, 85–93 (2014).
24. Kranz, D. & Dobbelstein, M. Nongenotoxic p53 activation protects cells against S-phase-specific chemotherapy. *Cancer Res.* **66**, 10274–10280 (2006).
25. Garrett, M. D. & Collins, I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: What, where and when? *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 308–316 (2011).
26. Benada, J. & Macurek, L. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules* **5**, 1912–1937 (2015).
27. Poehlmann, A. & Roessner, A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol. Res. Pract.* **206**, 591–601 (2010).
28. Hsu, Y., Li, L. & Fuchs, E. HHS Public Access. **20**, 847–856 (2015).
29. Freie, B. *et al.* Fanconi anemia type C and p53 cooperate in apoptosis and tumorigenesis. *Blood* **102**, 4146–4152 (2003).
30. Liebetrau, W., Budde, a, Savoia, a, Grummt, F. & Hoehn, H. p53 activates Fanconi anemia group C gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 277–283 (1997).
31. He, J., Kang, X., Yin, Y., Chao, K. S. C. & Shen, W. H. PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery. *Nat. Commun.* **6**, 7620 (2015).
32. Shen, W. H. *et al.* Essential Role for Nuclear PTEN in Maintaining Chromosomal Integrity. 157–170 (2007).
33. Puc, J. *et al.* Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. **7**, 193–204 (2005).
34. Haupt, S., Raghu, D. & Haupt, Y. Mutant p53 Drives Cancer by Subverting Multiple Tumor Suppression Pathways. *Front. Oncol.* **6**, 1–7 (2016).
35. Johnson, D. G. & Walker, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 295–312 (1999).
36. Sørensen, C. S. & Syljuåsen, R. G. Safeguarding genome integrity: The checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **40**, 477–486 (2012).
37. Tyagi, a K., Strongly, S. & Human, S. To Arrest or Not To G 2 -M Cell-Cycle Arrest. **8**, 3311–3314 (2002).

38. Chen, T., Stephens, P. a., Middleton, F. K. & Curtin, N. J. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov. Today* **17**, 194–202 (2012).
39. Zhou, J., Yao, J. & Joshi, H. C. Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Sci.* **115**, 3547–3555 (2002).
40. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P. & Méchalí, M. DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 360–74 (2015).
41. Wu, L. H., Liu, Y. & Kong, D. C. Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Sci. China Life Sci.* **57**, 482–487 (2014).
42. Jossen, R. & Bermejo, R. The DNA damage checkpoint response to replication stress: A game of forks. *Front. Genet.* **4**, 1–14 (2013).
43. Yeeles, J. T. P., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A. & Diffley, J. F. X. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* **519**, 431–435 (2015).
44. Zeman, M. K. & Cimprich, K. a. Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* **16**, 2–9 (2014).
45. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, H. T. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 907–913 (2005).
46. Macheret, M. & Halazonetis, T. D. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. (2015).
47. Xu, Y., Ashley, T. & Brainerd, E. E. Targeted disruption of A T M leads to growth retardation , chromosomal fragmentation during meiosis , immun e defects , and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 2411–2422 (1996).
48. Yahata, T. *et al.* Plenary paper Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. **118**, 2941–2951 (2015).
49. Shinnick, K. M., Eklund, E. a. & McGarry, T. J. Geminin deletion from hematopoietic cells causes anemia and thrombocytosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 4303–4315 (2010).
50. Alvarez, S. *et al.* Replication stress caused by low MCM expression limits fetal erythropoiesis and hematopoietic stem cell functionality. *Nat. Commun.* **6**, 8548 (2015).
51. Barlow, J. H. & Nussenzweig, A. Replication initiation and genome instability: A crossroads for DNA and RNA synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4545–4559 (2014).
52. Mathews, C. K. Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 528–539 (2015).
53. McCourt, J. a. & Duggleby, R. G. How an enzyme answers multiple-choice questions. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 222–225 (2005).
54. Arn??r, E. S. J. & Eriksson, S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* **67**, 155–186 (1995).
55. Lundin, D., Berggren, G., Logan, D. & Sjöberg, B.-M. The Origin and Evolution of Ribonucleotide Reduction. *Life* **5**, 604–636 (2015).
56. Xu, H. *et al.* Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I provide insights into dNTP regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4022–4027 (2006).

57. Chabes, A. *et al.* Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**, 391–401 (2003).
58. Morafraille, E. C., Diffley, J. F. X., Tercero, J. A. & Segurado, M. Checkpoint-dependent RNR induction promotes fork restart after replicative stress. *Sci. Rep.* **5**, 7886 (2015).
59. Davidson, M. B. *et al.* Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J.* **31**, 895–907 (2012).
60. Lin, Z. P., Belcourt, M. F., Cory, J. G. & Sartorelli, A. C. Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted short interference RNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **279**, 27030–27038 (2004).
61. Bourdon, A. *et al.* Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **39**, 776–780 (2007).
62. Reichard, P. Ribonucleotide reductases: substrate specificity by allostery. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 19–23 (2010).
63. Nordlund, P. & Reichard, P. Ribonucleotide Reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 681–706 (2006).
64. Kashlan, O. B. & Cooperman, B. S. Comprehensive model for allosteric regulation of mammalian ribonucleotide reductase: Refinements and consequences. *Biochemistry* **42**, 1696–1706 (2003).
65. D'Angiolella, V. *et al.* Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell* **149**, 1023–1034 (2012).
66. Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skogs, S. & Thelander, L. Cell Cycle-dependent Expression of Mammalian Ribonucleotide. *J. Biol. Chem.* **260**, 9114–9116 (1985).
67. Stillman, B. Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) synthesis and destruction regulate the replication of both cell and virus genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14120–1 (2013).
68. Franzolin, E. *et al.* The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 14272–14277 (2013).
69. Kohnken, R., Kodigepalli, K. M. & Wu, L. Regulation of deoxynucleotide metabolism in cancer: novel mechanisms and therapeutic implications. *Mol. Cancer* **14**, 176 (2015).
70. Niida, H., Shimada, M., Murakami, H. & Nakanishi, M. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci.* **101**, 2505–2509 (2010).
71. Mathews, C. K. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J.* **20**, 1300–1314 (2006).
72. Martomo, S. a. & Mathews, C. K. Effects of biological DNA precursor pool asymmetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **499**, 197–211 (2002).
73. Pardee, A. B. Nucleic Acid Precursors and Protein Synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **40**, 263–270 (1954).

74. Howell, S. B., Mansfield, S. J. & Taetle, R. Thymidine and Hypoxanthine Requirements of Normal and Malignant Human Cells for Protection against Methotrexate Cytotoxicity Thymidine and Hypoxanthine Requirements of Normal and Malignant Human Cells for Protection against Methotrexate Cytotoxicity1. 945–950 (1981).
75. Gatzeva-topalova, P. Z., Warner, L. R., Pardi, A. & Carlos, M. NIH Public Access. **18**, 1492–1501 (2011).
76. Austin, W. R. *et al.* Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J. Exp. Med.* **209**, 2215–28 (2012).
77. Toy, G. *et al.* Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5551–5556 (2010).
78. Drew, B. a., Burow, M. E. & Beckman, B. S. MEK5/ERK5 pathway: The first fifteen years. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1825**, 37–48 (2012).
79. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143–180 (1999).
80. Zhang, Y. & Dong, C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2771–2789 (2007).
81. Buschbeck, M. & Ullrich, A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J. Biol. Chem.* **280**, 2659–2667 (2005).
82. Kato, Y., Tapping, R., Huang, S. & Watson, M. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**, 713–716 (1998).
83. Wang, X. & Tournier, C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell. Signal.* **18**, 753–760 (2006).
84. Lochhead, P. A., Gilley, R. & Cook, S. J. ERK5 and its role in tumour development. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 251–256 (2012).
85. Lee, J. D., Ulevitch, R. J. & Han, J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 715–24 (1995).
86. English, J. M., Pearson, G., Baer, R. & Cobb, M. H. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 3854–3860 (1998).
87. Yan, C., Luo, H., Lee, J. D., Abe, J. I. & Berk, B. C. Molecular Cloning of Mouse ERK5/BMK1 Splice Variants and Characterization of ERK5 Functional Domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 10870–10878 (2001).
88. McCaw, B. J. *et al.* Identification and characterization of mErk5-T, a novel Erk5/Bmk1 splice variant. *Gene* **345**, 183–190 (2005).
89. Yan, L. *et al.* Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev. Biol.* **3**, 11 (2003).
90. Regan, C. P. *et al.* Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9248–53 (2002).

91. Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J. & Cross, M. J. ERK5: Structure, regulation and function. *Cell. Signal.* **24**, 2187–2196 (2012).
92. Ananieva, O. *et al.* ERK5 regulation in naïve T-cell activation and survival. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2534–2547 (2008).
93. Rovira-Clavé, X., Angulo-Ibáñez, M., Tournier, C., Reina, M. & Espel, E. Dual role of ERK5 in the regulation of T cell receptor expression at the T cell surface. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 1–10 (2015).
94. Jacque, E., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L. J. & Ley, S. C. BAFF activation of the ERK5 MAP kinase pathway regulates B cell survival. *J. Exp. Med.* (2015). doi:10.1084/jem.20142127
95. Hayashi, M. *et al.* BMK1 Mediates Growth Factor-induced Cell Proliferation through Direct Cellular Activation of Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 8631–8634 (2001).
96. Mulloy, R., Salinas, S., Philips, A. & Hipskind, R. a. Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. *Oncogene* **22**, 5387–5398 (2003).
97. Perez-Madrugal, D., Finegan, K. G., Paramo, B. & Tournier, C. The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs). *Cell. Signal.* **24**, 2360–2368 (2012).
98. Yang, Q. *et al.* BMK1 is involved in the regulation of p53 through disrupting the PML–MDM2 interaction. *Oncogene* **32**, 3156–3164 (2012).
99. Dudderidge, T. J. *et al.* Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer. *Br. J. Cancer* **96**, 1384–1393 (2007).
100. Giurisato, E. & Tournier, C. Can tumour cells proliferate without ERK5? **4101**, (2016).
101. Soriano-Carot, M., Bano, M. C. & Igual, J. C. The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div.* **7**, 1 (2012).
102. Truman, A. W., Kim, K.-Y. & Levin, D. E. Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 6449–6461 (2009).
103. Kim, K.-Y. & Levin, D. E. Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* **144**, 745–56 (2011).
104. Iñesta-Vaquera, F. a. *et al.* Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell. Signal.* **22**, 1829–1837 (2010).
105. Díaz-Rodríguez, E. & Pandiella, A. Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J. Cell Sci.* **123**, 3146–3156 (2010).
106. Cude, K. *et al.* Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NF- κ B signaling pathway. *J. Cell Biol.* **177**, 253–264 (2007).
107. Ortiz-ruiz, M. J., Álvarez-fernández, S., Parrott, T. & Zaknoen, S. Therapeutic potential of ERK5 targeting in triple negative breast cancer. **5**, (2014).
108. Xu, Y., Cao, C., Gong, X. & Rong, L. Inhibition of ERK5 enhances cytarabine-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 6446–6455 (2015).

109. Aleem, E. & Arceci, R. J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front. cell Dev. Biol.* **3**, 16 (2015).
110. Miranda, M., Rozali, E., Khanna, K. K. & Al-ejeh, F. MEK5-ERK5 pathway associates with poor survival of breast cancer patients after systemic treatments. **2**, 99–101 (2015).
111. Wilson, P. M. *et al.* A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1–15 (2011).
112. Senovilla, L. *et al.* P53 Represses the Polyploidization of Primary Mammary Epithelial Cells By Activating Apoptosis. *Cell Cycle* **8**, 1380–1385 (2009).
113. Cao, L. *et al.* A Selective Requirement for 53BP1 in the Biological Response to Genomic Instability Induced by Brca1 Deficiency. *Mol. Cell* **35**, 534–541 (2009).
114. Shan, X. *et al.* Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6945–57 (2000).
115. Alvino, G. M. *et al.* Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6396–406 (2007).
116. Meuth, R. R. and M. Chk1 and p21 Cooperate to Prevent Apoptosis during DNA Replication Fork Stress. *Mol. Biol. Cell* **17**, 402–412 (2006).
117. Gartel, a L. & Tyner, a L. Transcriptional regulation of the p21 ((WAF1/CIP1)) gene. *Exp. Cell Res.* **246**, 280–9 (1999).
118. Buckland, R. J. *et al.* Increased and Imbalanced dNTP Pools Symmetrically Promote Both Leading and Lagging Strand Replication Infidelity. *PLoS Genet.* **10**, e1004846 (2014).
119. Stadtfeld, M. & Graf, T. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development* **132**, 203–213 (2005).
120. Garaude, J. *et al.* ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo. *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)* **177**, 7607–7617 (2006).
121. Pereira, D. M. *et al.* MEK5 / ERK5 signaling inhibition increases colon cancer cell sensitivity to 5- fluorouracil through a p53-dependent mechanism. *Oncotarget* (2016).
122. Kraft, D. *et al.* NF-κB-dependent DNA damage-signaling differentially regulates DNA double-strand break repair mechanisms in immature and mature human hematopoietic cells. *Leukemia* 1–12 (2015).
123. Li, Z. *et al.* Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicol. In Vitro* **22**, 1749–53 (2008).
124. Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T. & Sjöberg, B.-M. DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 50–63 (2012).
125. Smal, C. *et al.* Pharmacological inhibition of the MAPK/ERK pathway increases sensitivity to 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA) in the B-cell leukemia cell line EHEB. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 351–358 (2007).
126. Bandyopadhyay, S. *et al.* Rewiring of Genetic Networks in Response to DNA Damage. **330**, 1385–1389 (2010).

127. Queralt, E. & Igual, J. C. Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **171**, 1485–98 (2005).
128. Soriano-Carot, M., Quilis, I., Bano, M. C. & Igual, J. C. Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7084–7095 (2014).
129. Jacque, E., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L. J. & Ley, S. C. BAFF activation of the ERK5 MAP kinase pathway regulates B cell survival. *J. Exp. Med.* **212**, 883–92 (2015).
130. Skvara, H. *et al.* Mcl-1 blocks radiation-induced apoptosis and inhibits clonogenic cell death. *Anticancer Res.* **25**, 2697–2704 (2005).
131. Liu, H. *et al.* Regulation of Mcl-1 by constitutive activation of NF- κ B contributes to cell viability in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer* **14**, 98 (2014).
132. Bunimovich, Y. L. *et al.* Deoxycytidine Kinase Augments ATM-Mediated DNA Repair and Contributes to Radiation Resistance. *PLoS One* **9**, e104125 (2014).
133. Yang, C. *et al.* Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9621–9632 (2012).
134. Aird, K. M. *et al.* ATM Couples Replication Stress and Metabolic Reprogramming during Cellular Senescence. *Cell Rep.* **11**, 893–901 (2015).
135. Chang, L. *et al.* ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18519–18524 (2008).

8 . ANNEX

I – Aquest treball ha originat la següent publicació (text complet adjuntat a continuació):

- **Angulo-Ibáñez M**, Rovira-Clavé X, Granados-Jaén A, Downs B, Kim YC, Wang SM, Reina M, Espel E. Erk5 contributes to maintaining the balance of cellular nucleotide levels and erythropoiesis. **Cell Cycle**. 2015 Dec;14(24):3864-76.

II - Paral·lelament als resultats d'aquesta tesi s'han publicat els següents treballs:

- Rovira-Clavé X, **Angulo-Ibáñez M**, Tournier C, Reina M, Espel E. Dual role of ERK5 in the regulation of T cell receptor expression at the T cell surface. **Journal of Leukocyte Biology**. 2016 Jan;99(1):143-52.
- Rovira-Clavé X, **Angulo-Ibáñez M**, Reina M, Espel E. The PDZ-binding domain of syndecan-2 inhibits LFA-1 high-affinity conformation. **Cellular Signaling**. 2014 Jul;26(7):1489-99.
- Rovira-Clavé X*, **Angulo-Ibáñez M***, Noguer O, Espel E, Reina M. Syndecan-2 can promote clearance of T-cell receptor/CD3 from the cell surface. **Immunology** 2012 Nov;137(3): 214-25.

**Co-autoria.*

Erk5 contributes to maintaining the balance of cellular nucleotide levels and erythropoiesis

Maria Angulo-Ibáñez¹, Xavier Rovira-Clavé¹, Alba Granados-Jaén¹, Bradley Downs², Yeong C Kim², San Ming Wang², Manuel Reina^{1,*}, and Enric Espel^{1,3}

¹Department of Cell Biology; Celltec-UB; Facultat de Biologia; Universitat de Barcelona; Barcelona, Spain; ²University of Nebraska Medical Center; Nebraska Medical Center; Omaha, NE USA; ³Department of Physiology and Immunology; Facultat de Biologia; Universitat de Barcelona; Barcelona; Spain

Keywords: dNTP metabolism, erythropoiesis, erythroid development, replication stress, thymidine

Abbreviations: BrdU, bromo-2-deoxyuridine; DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; dATP, deoxyadenosine triphosphate; dCTP, deoxycytidine triphosphate; dGTP, deoxyguanosine triphosphate; dTTP, thymidine triphosphate; HU, hydroxyurea; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; RNR, ribonucleotide reductase; shRNA, small hairpin RNA; TK1, thymidine kinase; UTP, uridine triphosphate

An adequate supply of nucleotides is essential for accurate DNA replication, and inappropriate deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) concentrations can lead to replication stress, a common source of DNA damage, genomic instability and tumorigenesis. Here, we provide evidence that Erk5 is necessary for correct nucleotide supply during erythroid development. Mice with Erk5 knockout in the haematopoietic lineage showed impaired erythroid development in bone marrow, accompanied by altered dNTP levels and increased DNA mutagenesis in erythroid progenitors as detected by exome sequencing. Moreover, Erk5-depleted leukemic Jurkat cells presented a marked sensitivity to thymidine-induced S phase stalling, as evidenced by increased H2AX phosphorylation and apoptosis. The increase in thymidine sensitivity correlated with a higher dTTP/dCTP ratio. These results indicate that Erk5 is necessary to maintain the balance of nucleotide levels, thus preventing dNTP misincorporation and DNA damage in proliferative erythroid progenitors and leukemic Jurkat T cells.

Introduction

Erk5 is a member of the mammalian mitogen-activated protein kinase family with a kinase domain that shares 52% of identity with the kinase domain of ERK1/2, but possessing a unique C-terminal domain with transcriptional activity.¹ Deletion of Erk5 in mice leads to defective vascular and cardiac development and embryonic lethality.^{2,3,4} Erk5 controls the expression of genes that regulate angiogenesis and cardiovascular development.⁵

Erk5 is required for proliferation of epithelial cells in response to epidermal growth factor,⁶ but cells like T lymphocytes have the capacity to proliferate independently of Erk5.⁷ During mitosis, Erk5 is phosphorylated in a cdk-dependent manner and translocates to the nuclei.^{8,9} Mek5/Erk5 pathway activity correlates with metastatic potential of prostate¹⁰ and renal tumor cells.¹¹ Erk5 is necessary for proliferation of breast carcinoma cells,^{12,13} where it contributes to G1/S transition by inhibiting the p21 and p27 cdk inhibitors.¹⁴ The tumorigenicity of Erk5 has been related to its capacity to interact with promyelocytic leukemia protein and inhibit its tumor suppressor activity.¹⁵ By

blocking the interaction of promyelocytic leukemia protein and MDM2 Erk5 allows the inhibition of tumor suppressor p53 by MDM2.¹⁶

In the cell, nucleotide metabolism is controlled by 2 pathways: the *de novo* and salvage pathways. Fuelled by extracellular deoxynucleosides imported into the cell,¹⁷ the salvage pathway is necessary for proper haematopoietic development.^{18,19} Haematopoietic tissues contain high thymidine levels, which increases the cellular dTTP levels produced by the salvage pathway.¹⁹ A high dTTP concentration prevents UTP incorporation into DNA and replication stress in erythroid and lymphoid lineages.^{18,19} Alterations in the activity of enzymes metabolising nucleotides can lead to mutagenesis and tumorigenesis *in vitro* and *in vivo*²⁰⁻²² and produce developmental defects in lymphoid and erythroid lineages,^{18,23} underscoring the importance of nucleotide metabolism for proper haematopoietic development.

In this study, we uncovered important alterations in the nucleotide metabolism of Erk5-deficient cells, which were associated to impaired erythropoiesis in mice and to hypersensitivity of leukemic Jurkat cells to exogenous thymidine as evidenced by DNA damage and apoptosis.

*Correspondence to: Manuel Reina; Enric Espel; Email: mreina@ub.edu, Email: eespel@ub.edu

Submitted: 03/26/2015; Revised: 10/08/2015; Accepted: 11/12/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1120914>

Results

Thymidine generates lethal DNA damage in Erk5-depleted Jurkat cells

To investigate Erk5 function, we silenced its expression in Jurkat T cells with a shRNA targeting a conserved sequence in *Erk5* exon 2 (Jurkat-shErk5 cells), and prepared control shCtrl cell lines with a shRNA containing a scrambled sequence (Fig. 1A, B). As Erk5 activity has been associated with cell cycle progression,^{14,24} we synchronised the cells in G1/S phase by incubating them with thymidine and then stained them with propidium iodide (PI) for cytofluorometric evaluation of the cell cycle. The PI profiles showed that a fraction of shErk5 cells were polyploid (Fig. 1C, cells with 8N DNA and the increase of 4N cell population; see below for further details). Surprisingly, exposure to thymidine was associated with increased cell death in Erk5-depleted cells, as evidenced by the increased fraction of cells with less than 2N DNA content (Fig. 1C, subG1 population) and annexin V binding (apoptotic and dead cells) (Fig. 1D).

Because this finding was unexpected, we further explored the role of *Erk5* knockdown in increasing susceptibility to thymidine. To prove that this was not an off-target effect of the shRNA used, Erk5 levels were reconstituted in shErk5 cells (Fig. 1E), and the sensitivity to thymidine was partially reverted (Fig. 1D). To ascertain whether hypersensitivity to thymidine was due to replication stalling we incubated the cells with 2 additional transcriptional inhibitors. Aphidicolin did preferentially target shErk5 cells for apoptosis, but the effect was subtle (Fig. 2A). In contrast to thymidine, treatment with

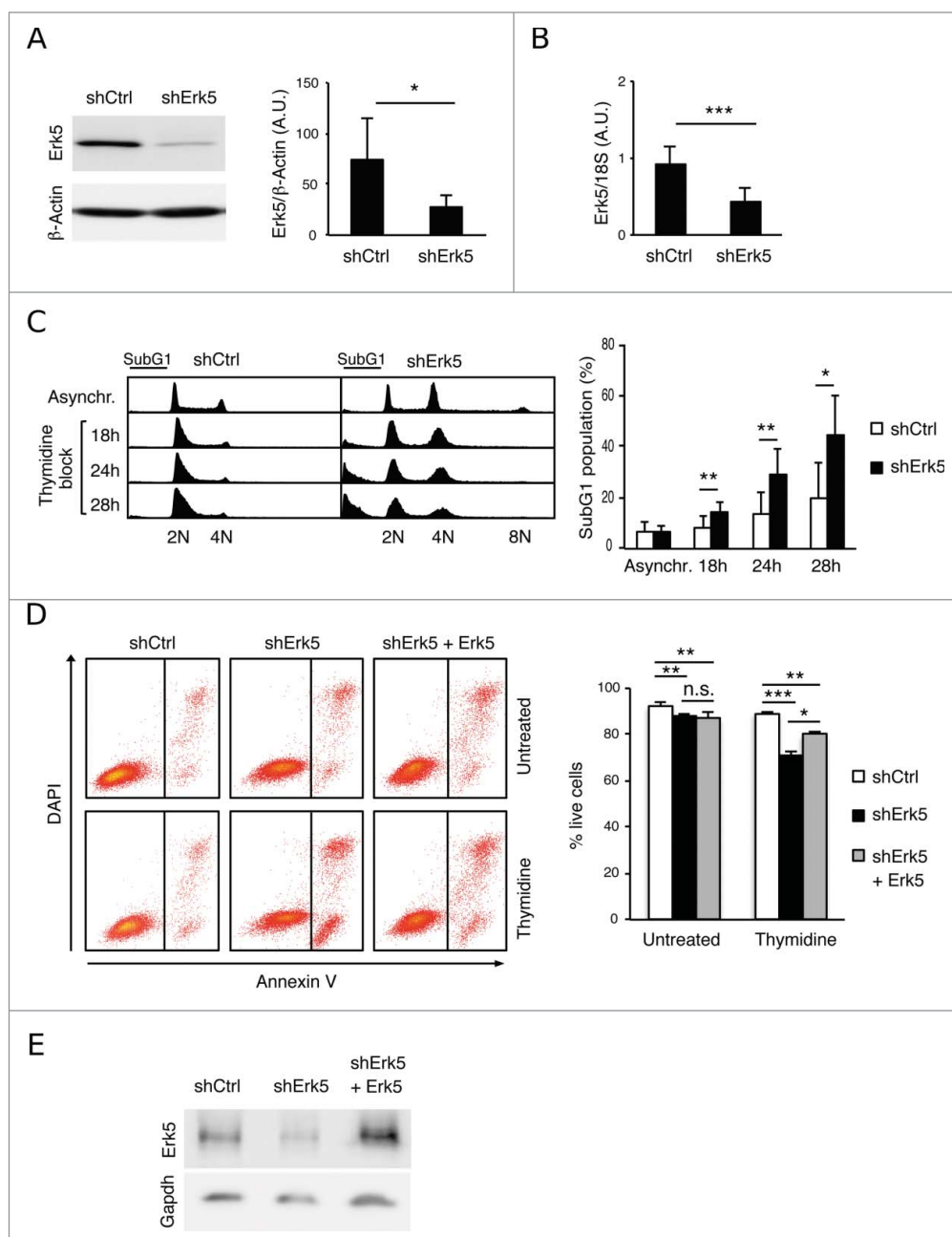


Figure 1. Erk5 depletion sensitizes Jurkat cells to thymidine. (A) Western blot of Erk5 in representative shCtrl and shErk5 cell lines. The blot was reprobbed with anti-actin as loading control and the intensity of the protein bands was quantified using quantitative luminescence. (Right) The analysis was repeated with 10 different shErk5 cell lines and 9 different shCtrl cell lines, and the ratio Erk5:actin \pm s.d. is shown, $*p < 0.05$. (B) Erk5 mRNA expression as analyzed by reverse transcription and real-time PCR. Erk5:18S values were calculated and normalized to shCtrl, which was given an arbitrary value of 1.0. The analysis was repeated with 10 shErk5 and 9 shCtrl cell lines, and the mean \pm s.d. is presented, $***p < 0.001$. (C) Representative cell cycle profiles of shCtrl and shErk5 cells in asynchronous culture as well as after 18 h, 24 h and 28 h treatment with 2.5 mM thymidine, as analyzed by PI staining and flow cytometry. (Right) Quantification of the subG1 fraction in each condition, $n=6$, $**p < 0.01$. (D) Annexin V/DAPI analysis of cells after 18h treatment with 1.5 mM thymidine. (Right) Quantification of viability of shCtrl, shERK5 and shErk5+shErk5 cells $n=3$, $*p < 0.05$ for live cells. (E) Western blot of Erk5 in cell lines shCtrl, shErk5 and shErk5 transfected with Erk5. The blot was reprobbed with anti-Gapdh as loading control. (A-B) Unpaired Student's t-test, (C-D) Paired Student's t-test.

hydroxyurea (HU), a ribonucleotide reductase (RNR) inhibitor that causes depletion of dNTP pools, produced strong cell death in both cell types (Fig. 2A). These results suggest that knockdown of Erk5 make Jurkat cells more sensitive to replication stalling but particularly sensitive to thymidine.

Apoptosis in shErk5 cells treated with thymidine correlated with the presence of DNA damage as determined by phosphorylation of H2AX (Fig. 2B, 0 h-time point). After release from thymidine, shErk5 cells were defective in resolving phosphorylated H2AX, indicative of difficulty in repairing the extensive DNA damage (Fig. 2B). Moreover, a considerable fraction of shErk5 cells, but not control cells, were committed to death after release from thymidine (Fig. 2C).

shErk5 cells also exhibited hypersensitivity to a reduced concentration of thymidine. At 100 μ M, a concentration which decreased the proliferation of shCtrl and shErk5 cells (Fig. 3A), thymidine did increase phosphorylation of H2AX only in shErk5 cells (Fig. 3B). These results indicate that Erk5-depleted Jurkat cells are specifically sensitized to thymidine as evidenced by cumulative DNA damage and apoptosis.

Depletion of Erk5 is synergistic with thymidine in decreasing intracellular levels of dCTP

The strong sensitivity of Erk5-depleted cells to thymidine prompted us to analyze dNTP concentration under the various treatments. Exposure of cells to thymidine leads to increased intracellular dTTP that allosterically inhibits the production of deoxycytidine diphosphate (dCDP) by RNR.¹⁷ Since dCDP is the direct precursor of dCTP, the resulting starvation of dCTP slows DNA replication and activates the intra S phase checkpoint.²⁵

dNTP levels in shErk5 and control cells cultured under normal conditions were similar, with the exception of the dATP pool, which showed a higher basal level in shErk5 cells (Fig. 3C). Incubation of cells with thymidine increased dTTP levels in both shErk5 and control cells (Fig. 3D) (the absolute dNTPs values of a similar group of experiments are shown in supplementary material S1A). However, dCTP levels in thymidine-treated shErk5 cells decreased to \sim 1/7 of untreated cells, whereas dCTP levels in control shCtrl cells were \sim 1/3 of untreated cells (Fig. 3D, supplementary material S1A). The dTTP/dCTP ratio in thymidine-

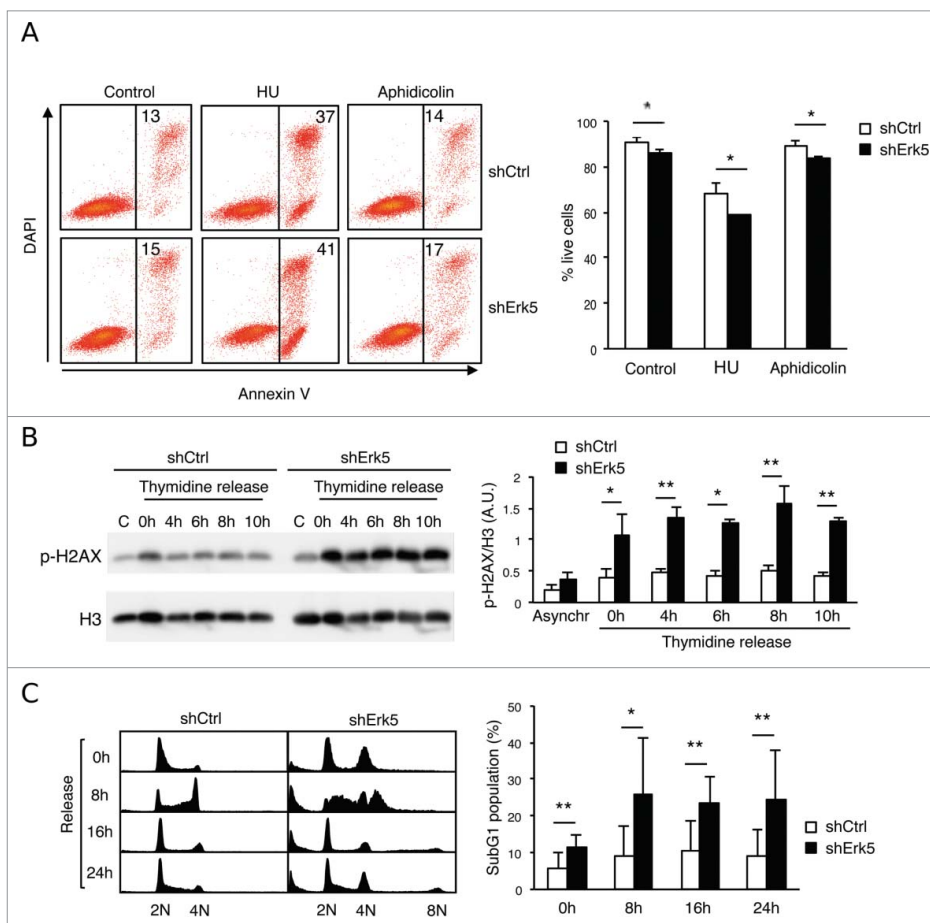


Figure 2. Thymidine increases DNA damage in Erk5-depleted Jurkat cells. (A) Viability of cells after 18 h treatment with 5 μ g/mL aphidicolin or 2 mM HU. (Left) Annexin V/DAPI analysis of cells treated with aphidicolin or HU. The numbers inside the plot indicate the percentage of annexin V-positive cells in this particular experiment. (Right) Quantification of apoptosis, $n=3$, $*p<0.05$. (B) Representative western blot showing phospho-H2AX (p-H2AX) in shCtrl and shErk5 cell lines at the indicated times after release from an 18 h thymidine block. Histone 3 was used as loading control. (Right) Densitometric analysis of the protein gel blot, the ratio phospho-H2AX:H3 \pm s.d. is shown, $n=3$. (C) Representative cell cycle profiles after 0 h, 8 h, 16 h or 24 h release from 18 h thymidine block, as analyzed by PI staining and flow cytometry. (Right) Quantification of subG1 fraction after release from thymidine block, $n=6$. A pool of 2 shCtrl or 2 shErk5 cell lines was used in these experiments (A-C). Paired Student's t-test, $*p<0.05$ $**p<0.01$.

treated shErk5 cells increased more than tenfold above control cell values (Fig. 3E, supplementary material S1B). Similarly, when cells were exposed to 0.1 mM thymidine, a subtoxic concentration, decreased dCTP levels and an increased dTTP/dCTP ratio were observed in Erk5-depleted cells but not in control cells (Fig. 4A, B).

The decrease in proliferation observed when cells were incubated with 0.1 mM thymidine (Fig. 3A) could be reversed by addition of deoxynucleosides to the cell culture in shCtrl and shErk5+Erk5 cells, but only partially in shErk5 cells (Fig. 3A), suggesting that shERK5 cells have a difficulty in processing exogenous deoxynucleosides. Reconstitution of Erk5 in shErk5 cells improved their proliferation in presence of 0.1 mM thymidine (supplementary Fig. S1C).

The DNA damage produced by inhibition of DNA replication triggers the phosphorylation and activation of Chk1.²⁶ We

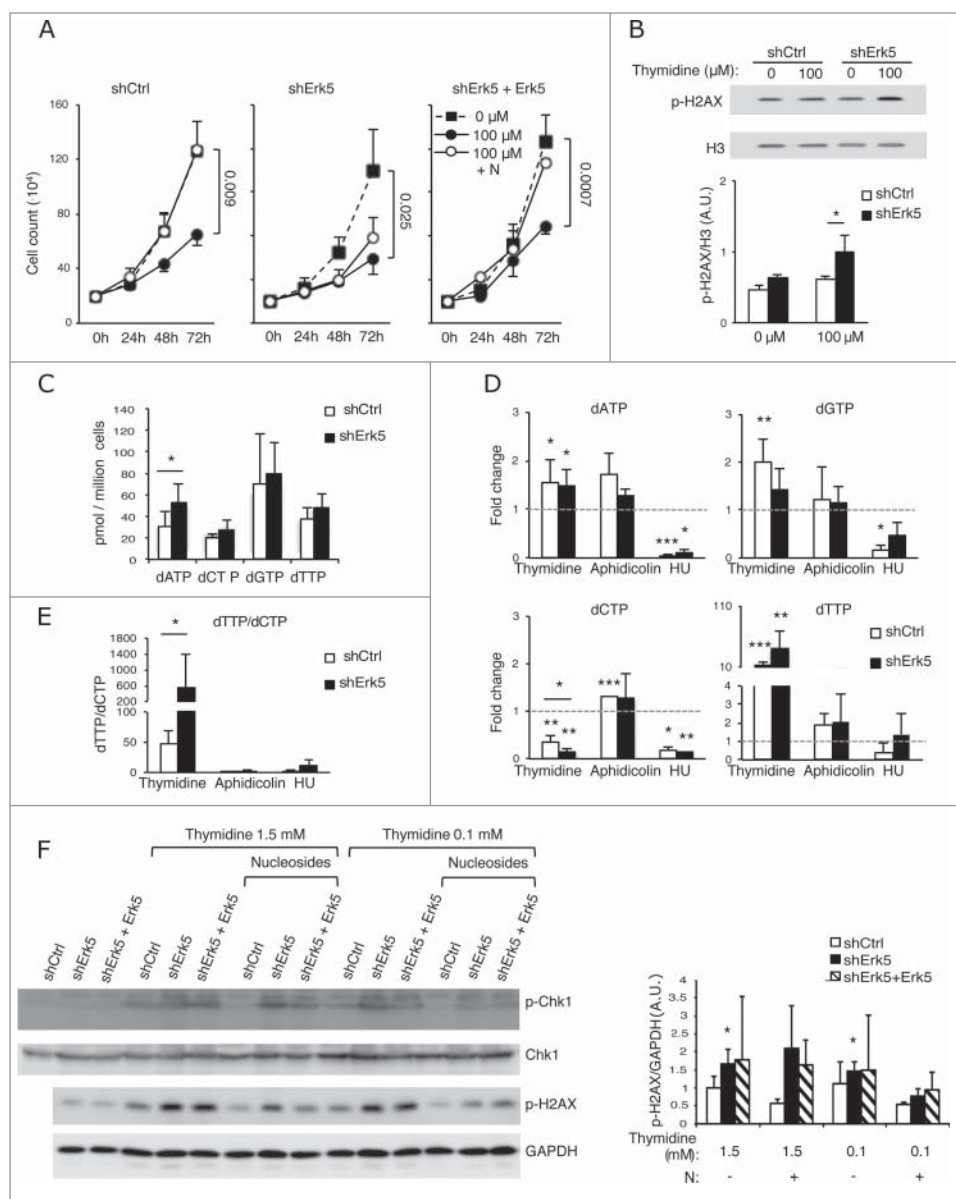


Figure 3. shErk5 cells are more sensitive to a low thymidine concentration. **(A)** Proliferation of shCtrl, shErk5 and shErk5+Erk5 cells cultured in medium containing 100 μ M thymidine \pm 1 μ M deoxynucleosides (N). Cells were seeded at a concentration of $0.2 \cdot 10^6$ /mL and counted at 24 h, 48 h and 72 h, $n=3$. **(B)** Representative western blot showing phospho-H2AX levels in shCtrl and shErk5 lines after 24 h incubation with 100 μ M thymidine. (Bottom) Quantification of the phospho-H2AX levels, mean \pm s.d., $n=3$. **(C)** dNTP levels in normally growing shCtrl and shErk5 cells, mean \pm s.d., $n=3$. **(D)** Thymidine strongly decreases dCTP in shErk5 cells. dNTP levels in shCtrl and shErk5 cells after 18 h treatment with thymidine, aphidicolin or HU. All values are normalized to the asynchronous control condition which has been given an arbitrary value of 1.0 (dotted gray line), $n=5$. **(E)** dTTP:dCTP ratio after 18 h treatment with thymidine, aphidicolin or HU, $n=5$. **(F)** Representative protein gel blots showing phospho-Chk1 and phospho-H2AX levels in shCtrl, shErk5 and shErk5+Erk5 lines after 18 h incubation with thymidine and deoxynucleosides as indicated. The blots were reprobated with Chk1 or GAPDH for loading control. (Bottom) Quantification of the phospho-H2AX levels, mean \pm s.d., $n=3$, unpaired Student's t-test, * $p < 0.05$ referred to the control sample shCtrl + 100 μ M thymidine + deoxynucleosides (basal phosphorylation of H2AX). One each shCtrl, shErk5 and shErk5+Erk5 cell lines were used in experiments **(A, F)**. Pools of 2 shCtrl or 2 shErk5 cell lines were used in experiments **(B, C, D, E)**. **(A-E)** Paired Student's t-test, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

analyzed the ATR-dependent Chk1 phosphorylation at Ser-317. Although both cell types, shCtrl and shErk5, showed an increase of Chk1 phosphorylation after incubation with thymidine, the increase was stronger in the latter (Fig. 3F). These results show the genomic stress produced by the arrest of replication with thymidine.

Given that $p21^{Waf1/Cip1}$ and Chk1 prevent apoptosis during replication stress by thymidine,²⁷ we next determined whether the increased death response of shErk5 cells to thymidine was due to absence of p21. We measured p21 RNA expression levels by real-time quantitative reverse transcriptase PCR because the regulation of expression of *p21 (Cdkn1a)* is principally transcriptional.²⁸ The increased death response of shErk5 cells to thymidine was not due to absence of $p21^{Waf1/Cip1}$ (supplementary material Fig. S2A) or Chk1 (Fig. 3F, supplementary material Fig. S2B).

During DNA replication, the presence of nucleotide imbalance leads to misincorporation, DNA damage and chromosomal instability.²⁹ Of note, there was an increase in DNA damage (H2AX phosphorylation) in Erk5-depleted cells incubated with thymidine (Figs. 2, 3). In line with a role for nucleotide imbalance as the origin of DNA damage and cell death in thymidine-treated shErk5 cells, the addition of nucleosides decreased the phosphorylation of H2AX and Chk1 (Fig. 3F), partially restored dCTP values (Fig. 4C, D) and partially restored cell viability (Fig. 4E).

Thus, Erk5 downregulation in Jurkat cells increased thymidine-mediated inhibition of dCTP production, resulting in severe dCTP depletion, DNA damage and apoptosis. Additionally, whereas inhibition of RNR with HU decreased dGTP levels in control cells, it did

not do so in Erk5-depleted cells (Fig. 3D). The lesser inhibitory effect of HU on the dGTP pool in shErk5 cells as compared to control cells, and the larger decrease in dCTP in thymidine-treated shErk5 cells, indicate that dNTP metabolism is altered in these cells.

Activity of the salvage pathway is not increased in shErk5 cells

The data presented thus far suggest a role for Erk5 in dNTP metabolism. Differences in RNR2 content were not responsible for the effect of thymidine on shErk5 cells (supplementary material Fig. S2C). We thus explored whether Erk5 regulates the activity of the salvage pathway. Metabolic flux through the salvage pathway is regulated by thymidine kinase 1 (TK1), which phosphorylates thymidine, and deoxycytidine kinase, which phosphorylates deoxycytidine, deoxyadenosine and deoxyguanosine.^{17,30,31} To test whether thymidine salvaging is increased in Erk5-depleted cells, we incubated cells with [³H]-thymidine and analyzed cellular uptake and TK activity in cell extracts. Although [³H]-thymidine uptake by shErk5 cells was slightly higher, TK activity in shErk5 and control cells was similar (supplementary material Fig. S2D,E). Moreover, no changes in deoxycytidine kinase 1 mRNA expression were observed in Erk5-depleted cells (supplementary material Fig. S2F). In addition, catabolism of dNTP by Samhd1 did not seem to be responsible for the observed differences (supplementary material Fig. S2G). These results indicate that the increase in the dTTP/dCTP ratio in shErk5 cells is independent of TK1, suggesting that other metabolic enzymes must be implicated.

Erk5 downregulation increases aneuploidy in Jurkat cells

The increased aneuploidy in Erk5-depleted cells (Fig. 1C) was investigated further. We observed that 16 out of 20 shErk5 cell lines generated in 2 independent transfections contained a higher percentage of polyploid cells (>4 n) than Jurkat lines expressing a scrambled shRNA (supplementary material Fig. S3A, B),

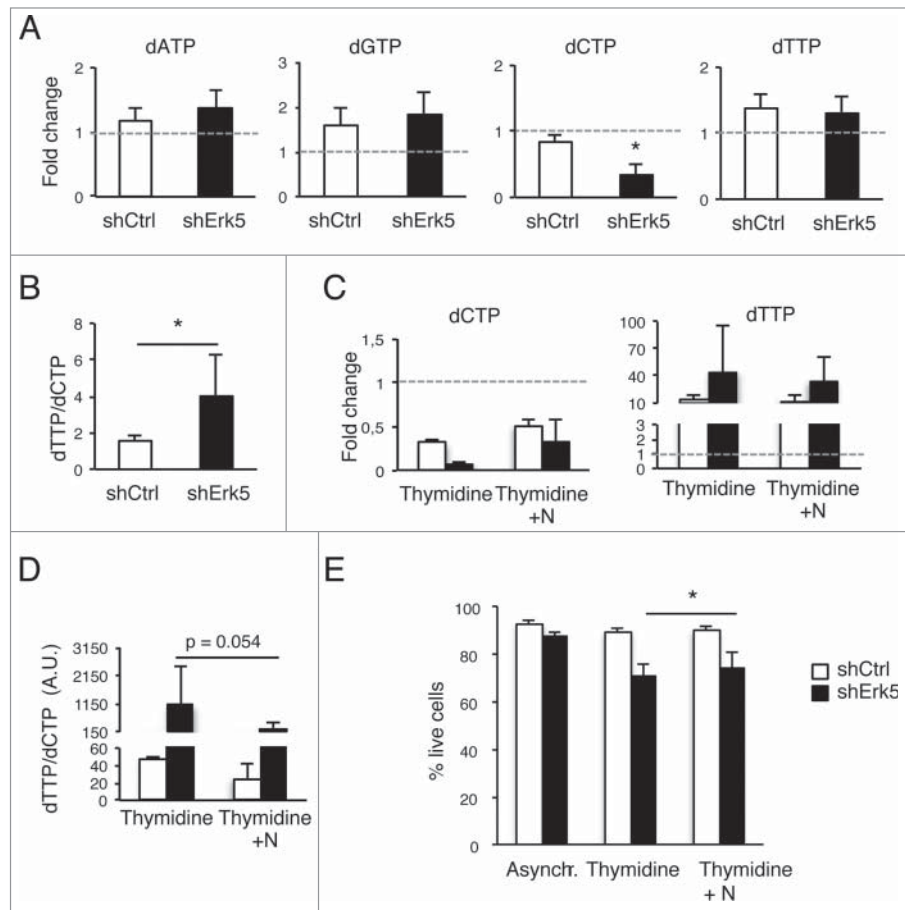


Figure 4. Low thymidine concentration decreased dCTP levels in shErk5 cells. (A) dNTP levels in shCtrl and shErk5 cells after 24 h treatment with 100 μ M thymidine. All values are normalized to the asynchronous control condition which has been given an arbitrary value of 1.0 (dotted gray line), n=4. (B) dTTP:dCTP ratio after 18 h treatment with thymidine, n=4. (C) The addition of 1 μ M deoxynucleosides (N: dA + dC + dG) rescues dCTP levels and decreases subG1 fraction in shERK5 cells. dNTP levels in shCtrl and shERK5 cells after 18 h treatment with 2.5 mM thymidine with or without the addition of deoxynucleosides. All values are normalized to the asynchronous control condition, which has been given an arbitrary value of 1.0 (dotted gray line), n=4. (D) dTTP:dCTP ratio after 18 h treatment with thymidine or thymidine + deoxynucleosides. (E) Cell viability after 18 h treatment with thymidine or thymidine + deoxynucleosides, n=3. Pools of 2 shCtrl or 2 shERK5 cell lines were used in experiments (A-D). One shCtrl and one shERK5 cell lines were used in experiments (E). Student's t-test *p<0.05.

supporting the notion that aneuploidy is promoted in Jurkat cells as a consequence of Erk5 downregulation.

Absence of PTEN or p53 in cells leads to genomic instability and polyploidisation.³²⁻³⁴ Jurkat cells lack p53 and PTEN function,^{35,36} and hence they are permissive for chromosomal alterations and the generation of aneuploidy. Erk5 was then downregulated in 3 additional p53-negative cell lines: U937, HL-60 and Hut-78.³⁷⁻³⁸ When the stable tetraploid and PTEN-negative U937 cells³⁹ were transfected with *shErk5*, a cell population with lower DNA content was observed (supplementary material Fig. S4). Erk5 downregulation in Hut-78 and HL-60 cells, which express PTEN,^{39,40} did not substantially modify the DNA content, though tetraploidy (or cells in the G2 phase) increased slightly in the former (supplementary material Fig. S4). These results support a role for Erk5 absence in accelerating the

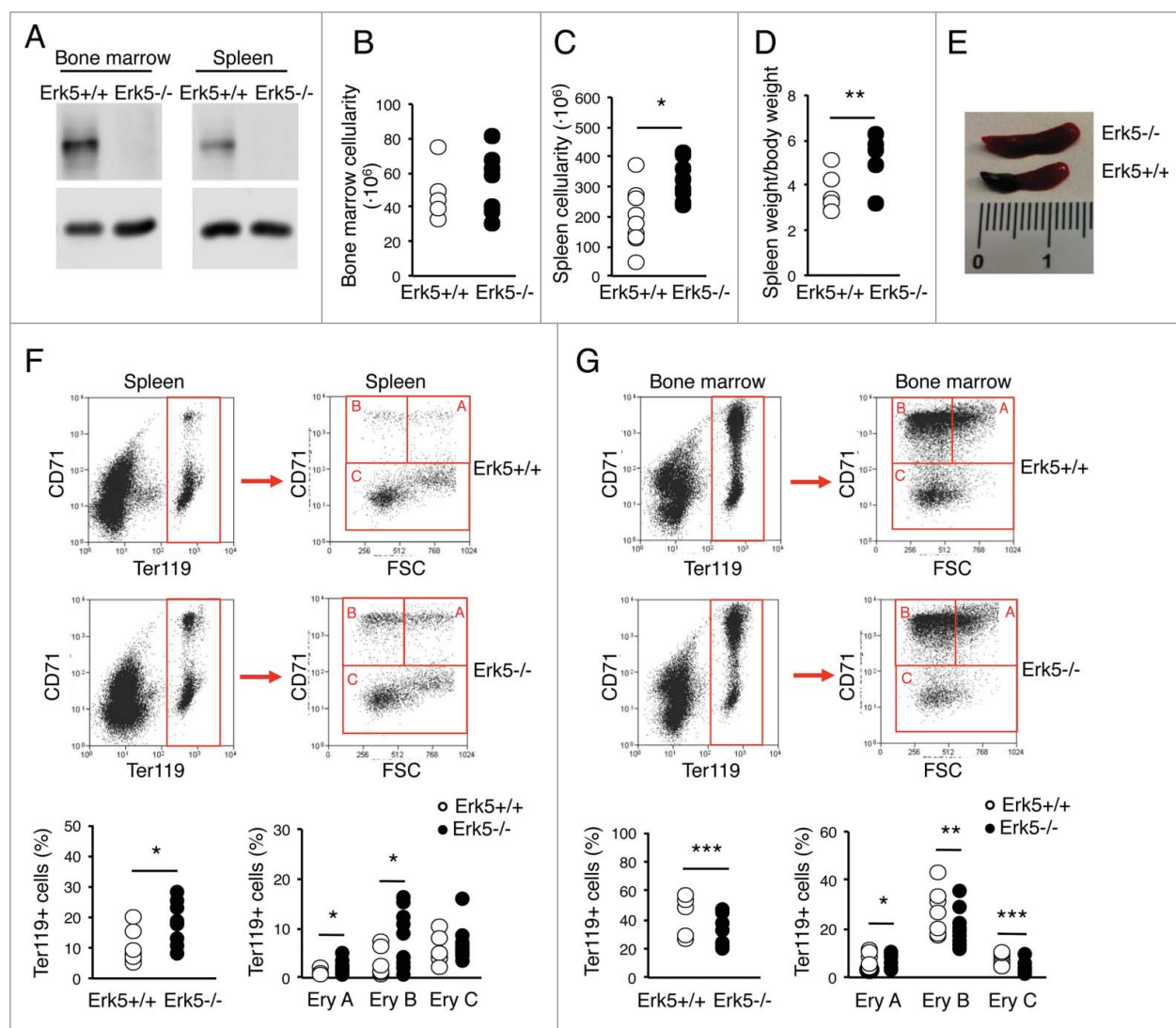


Figure 5. Ineffective erythropoiesis in mice with Erk5 deficiency in haematopoietic cells. (A) Representative western blot showing the absence of Erk5 protein in a total lysate of bone marrow cells (left) and splenocytes (right) from an $Erk5^{fl/fl}$ mouse and an $Erk5^{-/-}VavCre$ mouse. (B–C) Cellularity in bone marrow ($n \geq 6$) (B) and spleen ($n \geq 9$) (C) of $Erk5^{fl/fl}$ and $Erk5^{-/-}VavCre$ mice. (D) Splenic weight normalized to body weight ($n \geq 7$). (E) Representative spleens of $Erk5^{fl/fl}$ and $Erk5^{-/-}VavCre$ mice. (F) Splenic erythroid population. Dot plots representing erythroid precursor distribution (EryA, EryB, EryC) based on forward scatter (FSC) and CD71 expression (top right) in the ter119 positive population (top left). Percentage of ter119⁺ population in $Erk5^{fl/fl}$ and $Erk5^{-/-}VavCre$ bone marrow (bottom left), and percentage of ter119⁺ subpopulations EryA, EryB, EryC (bottom right), $n \geq 8$. (G) Bone marrow erythroid population. Dot plots representing erythroid precursor distribution (EryA, EryB, EryC) based on FSC and CD71 expression (top right) in the ter119⁺ population (top left). Percentage of ter119⁺ population in $Erk5^{fl/fl}$ and $Erk5^{-/-}VavCre$ bone marrow (bottom left), and percentage of ter119⁺ subpopulations EryA, EryB, EryC (bottom right), $n \geq 8$. Paired Student's t-test, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

chromosomal instability and aneuploidy brought about by absence of p53 and PTEN.

Mice with Erk5-deficient haematopoietic cells show ineffective erythropoiesis

Cell line experiments showed that downregulation of Erk5 synergised with thymidine in decreasing dCTP and generating replication stress. It is therefore conceivable that the elevated thymidine concentration naturally occurring in haematopoietic tissues¹⁹ could produce conditions for replication stress if Erk5 is absent. To test this notion, we bred loxP-flanked *Erk5* mice

($Erk5^{fl/fl}$ mice) with *Vav-Cre*-transgenic mice to generate an animal model with excision of *Erk5* in the haematopoietic lineage (here called $Erk5^{-/-}VavCre$) (Fig. 5A). The *Vav-Cre* transgene provides efficient excision during an early stage of haematopoietic development when many cell lineage precursors are actively proliferating.^{7,41}

Haematopoietic excision of *Erk5* resulted in enlarged spleen and increased spleen cellularity in mice aged 1–2 months old, whereas bone marrow cellularity was unaltered (Fig. 5B, C, D, E). The erythroid lineage precursors were enlarged in the spleen of $Erk5^{-/-}VavCre$ mice (Fig. 5F), including the highly proliferative

nucleated erythroblast cells EryA (ter119⁺, CD71⁺, FSC high) and their lineage descendants EryB (ter119⁺, CD71⁺, FSC low),⁴² indicative of increased extramedullary erythropoiesis. In contrast, the erythroid ter119⁺ population in *Erk5*^{-/-}*VavCre* bone marrow was decreased, including EryA, EryB and EryC progenitor cells (Fig. 5G). These results indicate that Erk5-depletion impairs erythroid development and causes ineffective erythropoiesis in bone marrow, promoting erythropoiesis in the spleen.

Absence of Erk5 induces a partial block in B cell development

Besides the erythroid lineage, bone marrow distribution of mature B cells (B220^{high} IgM⁺), but not B cell progenitors (B220^{low}), in *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice showed evidence of altered development (Fig. 6). The mature B220^{high} B cells were underrepresented in *Erk5*^{-/-}*VavCre* bone marrow (Fig. 6B). Despite this difference, the spleen of *Erk5*^{-/-}*VavCre* and control mice presented the same percentage of mature B cells (Fig. 6C).⁷ In contrast to B cell development, thymic T cell precursors in *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice showed a distribution similar to that in control mice^{7,42} (data not shown).⁴³

Cell cycle deceleration in bone marrow ter119⁺ cells of *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice

We further investigated the mechanism responsible for the alterations in erythroid development. The deficit of bone marrow EryA, EryB and EryC cells could be secondary to proliferation defects in Erk5-deficient cells, or to increased apoptosis. We analyzed the cell cycle profile of *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice. No differences in cell cycle distribution of total bone marrow cells were observable (Fig. 7A). However in ter119⁺ erythroid progenitors we found that in comparison to control mice, the percentage of *Erk5*^{-/-}*VavCre* cells in S phase shifted slightly toward G1 (Fig. 7B). In contrast, ter119⁺ cell cycle distributions in the spleen of *Erk5*^{-/-}*VavCre* and control mice were indistinguishable (Fig. 7D), indicating that the decreased proliferation of ter119⁺ cells

was a bone marrow-specific condition of *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice. A small increase in apoptosis levels of bone marrow ter119⁺ cells was detected in *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice (Fig. 7F).

In spleen of *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice, the amount of cycling cells was significantly higher than in control mice as evidenced by cell cycle profile analysis with PI (Fig. 7C) and by in vivo BrdU incorporation (Fig. 7E). This contrasts with no increase of S-phase cells in the splenic ter119⁺ population

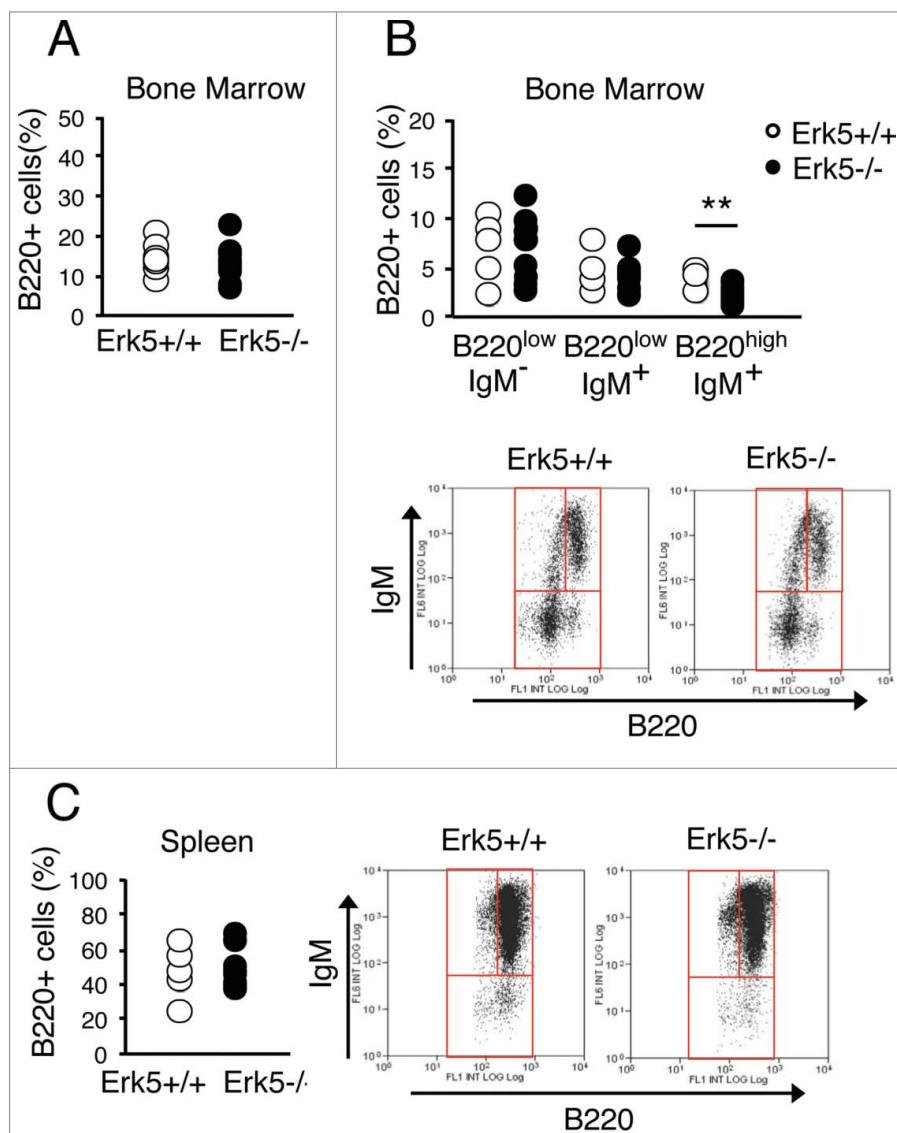


Figure 6. Distribution of B cell progenitors in bone marrow and spleen of *Erk5*^{-/-}*VavCre* and control *Erk5*^{fl/fl} mice. (A) Bone marrow B220⁺ population in *Erk5*^{fl/fl} (n=7) and *Erk5*^{-/-}*VavCre* (n=10) mice. (B) Percentage of bone marrow B cell precursors in *Erk5*^{fl/fl} (n=7) and *Erk5*^{-/-}*VavCre* (n=10) mice (top). Dot plots show lymphoid precursor distribution (B220^{low}IgM⁻, B220^{low}IgM⁺, B220^{high}IgM⁺) in the bone marrow population (bottom). (C) Percentage of splenic B cells (n≥7) (left). Dot plots show lymphoid precursor distribution (B220^{low}IgM⁻, B220^{low}IgM⁺, B220^{high}IgM⁺) in the splenic population (right). Paired Student's t-test, **p<0.01.

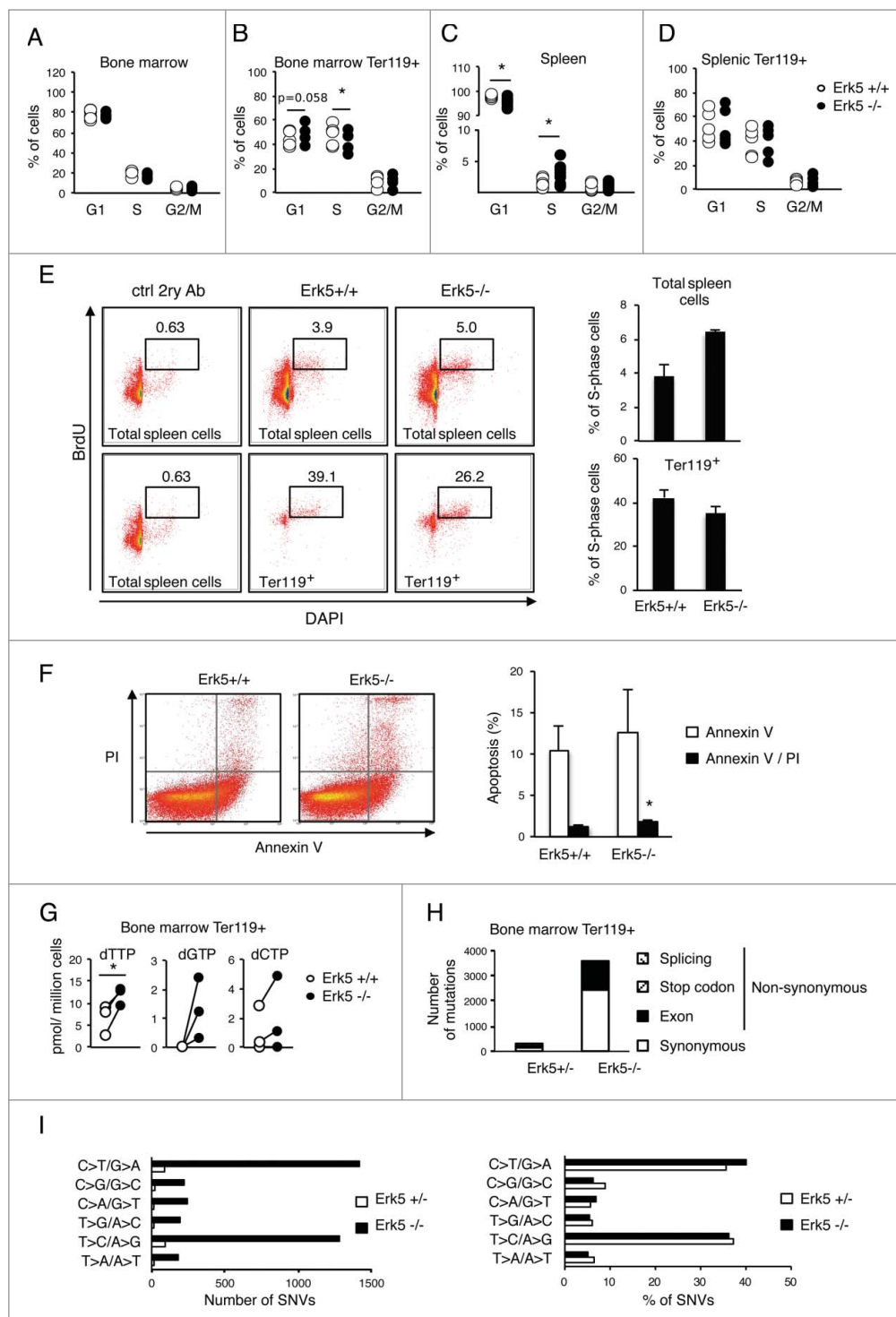


Figure 7. Absence of Erk5 alters cell cycle progression and increases mutation rate in erythroid precursors *in vivo*. (**A-D**) Percentage of bone marrow cells (**A**, $n \geq 8$), bone marrow ter119⁺ cells (**B**, $n \geq 8$), spleen cells (**C**, $n \geq 8$) and spleen ter119⁺ cells (**D**, $n \geq 8$) in each cell cycle phase of control *Erk5^{fl/fl}* and *Erk5^{-/-}VavCre* mice. (**E**) Percentage of cells in S/G2-phase in the spleen (top) and in the ter119⁺ fraction of the spleen (bottom). The numbers inside the plot indicate the percentage of cells BrdU⁺/DAPI⁺ (cells in S/G2-phase) in this particular experiment. The BrdU-positive cells were detected by incubation of permeabilized cells with mouse anti-BrdU antibody, followed by staining with Alexa 488-conjugated F(ab')₂ anti-mouse antibody and analysis by flow cytometry. (Right) Mean of 3 mice \pm SD. (**F**) Analysis of apoptosis in bone marrow by Annexin V and PI staining ($n=2$ for each genotype). Paired t-test $*p < 0.05$. (**G**) Intracellular dNTP levels in bone marrow ter119⁺ cells, $n=3$. dATP was undetectable in the samples. (**H-I**) Exome sequencing in ter119⁺ cells from the bone marrow. Number and type of mutations (**H**) and number and percentage (**I**) of single nucleotide variation (SNV) of a control heterozygous *Erk5^{+/-}VavCre* and *Erk5^{-/-}VavCre* mouse. Paired Student's t-test, $*p < 0.05$.

Erk5^{-/-}VavCre mice show altered dNTP levels in ter119⁺ population

Results from shErk5 cell lines showed that Erk5-depletion rendered Jurkat cells sensitive to thymidine, evidenced by further decreasing intracellular dCTP and leading to DNA damage and apoptosis. We surmised that the reduction in the ter119⁺ immature erythroid population in bone marrow of *Erk5^{-/-}VavCre* mice was related to changes in dNTP metabolism. Interestingly, dTTP levels in the ter119⁺ population in *Erk5^{-/-}VavCre* marrow increased (Fig. 7G), whereas no significant differences in the other dNTP were observed (dATP could not be detected), suggesting that Erk5-depleted cells have increased salvaging of

(Fig. 7E), was responsible for the increase in total cycling cells.

These data indicate that the lower amount of erythroid precursors in bone marrow of *Erk5^{-/-}VavCre* mice is mainly produced by their lesser proliferation and increased apoptosis.

thymidine and/or decreased catabolism of dTTP. The total dNTP content in bone marrow (as well as that in thymus and spleen) revealed no differences between genotypes, suggesting that the dTTP differences found in bone marrow *ter119*⁺ populations are cell-specific (data not shown).

Erk5^{-/-}VavCre mice show increased mutagenesis in *ter119*⁺ population

Changes in cellular dNTP concentration generate proliferative stress and increase mutagenesis by reducing the fidelity of DNA synthesis.¹⁷ One of the mechanisms explaining increased mutagenesis induced by imbalanced dNTP is misincorporation of incorrect dNTP by DNA polymerase.^{17,44} To test whether the higher thymidine concentration present in haematopoietic tissues could cause mutations in *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice, we sorted bone marrow *ter119*⁺ cells from *Erk5*^{-/-}*VavCre* and *Erk5*^{+/-}*VavCre* mice and performed exome sequencing to compare the single-base mutations in the coding regions of erythroid genomes. The results show that the mutation rate in *Erk5*^{-/-}*VavCre* was 14-fold higher than that in the *Erk5*^{+/-}*VavCre* mice (Fig. 7H, Table 1A, supplementary material Table S1). Classification of the mutated bases showed an increase for all types of mutations without preference for any single-nucleotide variation in comparison to control (Fig. 7I, Table 1B, supplementary material Table S1). These data indicate that erythroid precursors from *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice display a higher rate of mutagenesis, and suggest that increased intracellular dTTP in *Erk5*^{-/-}*VavCre* marrow could be the causative agent.

Discussion

The preservation of balanced dNTP pools in cells is necessary to avoid replication stress and genomic instability. dNTPs pools are generated by 2 cellular pathways, the *de novo* and salvage

pathways. Deoxynucleoside salvaging during B cell, T cell and erythroid development is necessary to fine tune dNTP levels and avoid replication stress in their highly proliferative progenitors.^{18,19}

The results presented here show that erythroid progenitors without Erk5 have higher dTTP levels, associated with enhanced mutagenesis and inefficient erythropoiesis in bone marrow, but not in the spleen. On average, bone marrow contains twice the amount of thymidine than spleen.¹⁹ Thymidine salvaging in bone marrow could generate replication stress in highly proliferative haematopoietic precursors of *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice if dNTP metabolism is not properly geared, and these are subsequently forced to immigrate to more permissive niches such as the spleen.¹⁸ In addition to erythroid progenitors, B cell development also showed signs of stress, as the mature B220^{high} B cell population was underrepresented in *Erk5*^{-/-}*VavCre* marrow. Of note, while this manuscript was being submitted the alterations of B-cell development reported here have been confirmed in another paper.⁴⁵ During B cell development Erk5 is necessary to link BAFF-dependent signals to expression of anti-apoptotic genes and cell survival.⁴⁵

We also explored the effect of Erk5 depletion in human leukemic cells. Interestingly, *Erk5* knockdown in Jurkat cells led to increased basal dATP level and to hypersensitivity to thymidine, increasing the dTTP/dCTP ratio and resulting in DNA damage and apoptosis. The hypersensitivity of human leukemic shErk5 cells to thymidine correlated with the data obtained for *Erk5*^{-/-}*VavCre* mice showing higher dTTP levels, and mutagenesis in bone marrow erythroid precursors.

Furthermore, depletion of Erk5 in human leukemic cells led to increased aneuploidy. The leukemic cells assayed here were *p53*^{-/-} and/or *pten*^{-/-}, which have intrinsic genomic instability^{32,33,46} and are permissive for polyploidisation.³⁴ The observed increase in aneuploidy induced by *Erk5* silencing could result

Table 1. Summary of the number and type of mutations identified in *Erk5*^{-/-}*VavCre* compared to a heterozygote control *Erk5*^{+/-}*VavCre* mouse.

| A. Total mutations identified | | | |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
| Type of mutation | <i>Erk5</i> ^{-/-} | <i>Erk5</i> ^{+/-} | Increased in <i>Erk5</i> ^{-/-} |
| Non-synonymous | 1149 | 103 | 11 |
| Exon | 1135 | 102 | 11 |
| Stop codon | 9 | 1 | 9 |
| Splicing | 5 | 0 | 5 |
| Synonymous | 2398 | 144 | 17 |
| Total | 3547 | 247 | 14 |

| B. Classification of mutated bases | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------------|--------------|-----|-----|-----|-------|
| Reference base | Mouse | Mutated base | | | | Total |
| | | A | C | G | T | |
| A | <i>Erk5</i> ^{-/-} | — | 97 | 659 | 96 | 852 |
| | <i>Erk5</i> ^{+/-} | — | 7 | 46 | 3 | 56 |
| C | <i>Erk5</i> ^{-/-} | 107 | — | 116 | 649 | 872 |
| | <i>Erk5</i> ^{+/-} | 11 | — | 13 | 39 | 63 |
| G | <i>Erk5</i> ^{-/-} | 772 | 106 | — | 137 | 1015 |
| | <i>Erk5</i> ^{+/-} | 49 | 9 | — | 3 | 61 |
| T | <i>Erk5</i> ^{-/-} | 85 | 626 | 97 | — | 808 |
| | <i>Erk5</i> ^{+/-} | 13 | 46 | 8 | — | 67 |

from initial dNTP misincorporation due to nucleotide imbalance, which may produce DNA damage and chromosomal instability,²⁹ presumably through mitotic nondisjunction.⁴⁷ An initial dNTP imbalance during the generation of shErk5 cells could later be compensated for by additional modifications to allow cell growth.

Curiously, yeast *Slr2*, the functional homolog of human *Erk5*, is required for appropriate regulation of RNR genes in response to DNA damage,⁴⁸ and is necessary for resistance to dNTP deficiency induced by HU.^{49,50} These data indicate different but related roles of Erk5 in mammals and yeast.

In summary, our study has established a central role of Erk5 in controlling DNA replication during murine haematopoiesis and in thymidine-stressed human T leukemia cells, linking Erk5 to the regulation of erythroid development as well as to the preservation of haematopoietic homeostasis. The Erk5 contribution to proper DNA replication was achieved by control of dNTP balance, although the connection linking Erk5 to the activity of key dNTP metabolic enzymes has not been ascertained in this study. These results identify for the first time a necessary role of Erk5 in control of dNTP metabolism in the haematopoietic system.

Materials and Methods

Mice

Erk5^{fl/fl} mice were kindly provided by Cathy Tournier (University of Manchester, Manchester, UK).⁷ Erk5^{fl/fl} mice were bred to Vav-Cre mice kindly provided by Thomas Graf (CRG, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain).⁴¹ All mice were treated in accordance with institutional guidelines and national laws and policies, and procedures were approved by the *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural of Generalitat de Catalunya*. Experiments were conducted on 4 and 8 week-old mice. To genotype mice, the following oligonucleotides were used: to detect floxed *Erk5*, forward 5'-tcctgctgtagtctcttgg -3', reverse 5'-agcggctgtgaagagtgaat -3' (floxed amplicon = 260bp, wild-type amplicon = 200bp). Presence of *Vav-Cre* was analyzed with the oligonucleotides: forward 5'-cgagtgatgaggttcgcaag-3', reverse 5'-atcttcagggtctgcgggaa -3'.

Cell culture and reagents

The cell lines used in this study were obtained from the European Collection of Cell Cultures. Human cell lines Jurkat E6.1, U937 and Hut 78 were grown in RPMI 1640 medium (ref. BE12-702F, Lonza) supplemented with 9% FBS, penicillin/streptomycin, and 2 mM L-glutamine. HL-60 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS and 2 mM L-glutamine. For thymidine/aphidicolin/HU block experiments, Jurkat E6.1 transfectant pools were used (2 shCtrl lines + 2 shERK5 lines).

For murine cell preparations, single cell suspensions were isolated from spleen and bone marrow of the mice. The suspension was counted to determine the cellularity of the organ, and then mature red blood cells were discarded from the suspension by overlaying cells on a solution of 16% iodixanol, 0.63% NaCl

and 10 mM Hepes and centrifuged at 900x g for 30 minutes. The mononuclear fraction of the density gradient was collected, washed with PBS, counted and stained or fixed.

Thymidine, aphidicolin, hydroxyurea (HU), deoxyadenosine, deoxycytosine, deoxyguanosine and roscovitine were all from (Sigma-Aldrich, Madrid Spain).

Stable transfections

In order to obtain stably transfected cell lines, Jurkat, HL60, U937 and Hut78 cell lines were transfected with a vector expressing either a scrambled shRNA (shCtrl) or a shRNA directed to a conserved sequence of the exon 2 of *Erk5* (shErk5) (ref. TRCN0000001354; Sigma-Aldrich). For each transfection, 1·10⁶ cells were electroporated (Multiporator, Eppendorf) and seeded in 10 wells of a 24-well plate. Selection of the lines expressing the shRNA was carried out by adding 0.3 µg/mL puromycin to the medium.

To replenish normal levels of Erk5 in shErk5 cells, one shErk5 cell line was stably transfected with a plasmid coding for *Erk5* (a kind gift of Dr. Simon Arthur, MRC Protein Phosphorylation Unit) generating several "shErk5+Erk5 cell" lines that were tested for Erk5 content.

Western blot

Cells were lysed in Laemmli buffer and loaded on acrylamide gels (8 to 12%, depending on the mass of the protein of interest). Transfer to nitrocellulose membranes and immunoblotting was performed as previously described.⁵¹ Incubation with primary antibody (goat anti-RNR2 diluted 1:1000, Santa Cruz Biotechnology #sc-10844; mouse anti-H2AX phosphorylated (S139) diluted 1:1500, Biologend #613401; rabbit anti-Chk1 phosphorylated (S317) diluted 1:1000, Bethyl #A304-673A; goat anti-Chk1 diluted 1:1000, Bethyl #A300-162A; rabbit anti-H3 diluted 1:1500, Biologend #601901) was performed overnight at 4°C under agitation. Next day, after washing, the membrane was incubated with the secondary antibody (anti-mouse IgG HRP conjugated 1:2000 Sigma; anti-rabbit HRP conjugated 1:2500 Dako; anti-Goat HRP conjugated Dako) for 1 hour, under agitation at room temperature. Western blots were quantified on a Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm). Densitometry analysis was performed using Fiji software.

Quantitative RT-PCR

Cells were lysed in RNA lysis buffer and RNA was extracted using the PureLink→ RNA Mini Kit (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse-transcribed to cDNA (SuperScriptIII, Invitrogen) and real-time PCR was performed using Sybr-green for detection (Promega). The oligonucleotides used in this study were the following: for quantitative determination of human *Erk5* cDNA, forward 5'-gcctatggagtggtctcctc-3'; reverse 5'-ggtcgtcttccatcaggtc-3'; for human p21 cDNA, forward 5'-cagcagaggaaagaccatgtg-3'; reverse 5'-ggcgtttggagtgta-gaa-3'; for human Chk1, forward 5'-caggggtgtttatctgcat-3'; reverse 5'-tcaacaacgctcagcatt-3'; for human deoxycytidine kinase 1, forward 5'-aagaggttctgcccttctcc-3'; reverse 5'-

gaaccacttcccaatcctca-3'; for human Samhd1, forward 5'-aggggtggggatctagcag-3'; reverse 5'-tggtcatgcgtccatttcac-3'.

Immunostaining

For extracellular labeling, splenocytes and bone marrow cells were stained with saturating amounts of primary antibodies conjugated to fluorochromes (anti-Ter119 FITC diluted 1:600, Biolegend; anti-CD71 PE diluted 1:600, Becton Dickinson; anti-B220 FITC diluted 1:25, Immunotools; anti-IgM diluted 1:500, Life Technologies) in PBS 2% FBS for 30 minutes at 4°C. After 30 minutes, cells were washed with PBS and analyzed using an FC500MPL or a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was added to the samples in order to discard the dead cells. Fluorescence was collected on the logarithmic scale. The cell population was selected by gating in a forward scatter vs. side scatter dot plot, excluding aggregates and cell debris, and by excluding the DAPI positive population.

Cell cycle analysis

In order to determine the cell cycle of Jurkat, Hut 78, U937 and HL-60 cell lines, $1 \cdot 10^6$ cells were fixed in 70% ethanol and stored at -20°C . Samples were washed once with PBS and incubated in 0.1% triton X100, 0.02% RNase A, 0.0005% PI in PBS for 30 minutes at room temperature in the dark. For cell cycle analysis of primary murine splenocytes and bone marrow cells, $1 \cdot 10^6$ cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, washed with PBS and stained with PI as above. Samples were analyzed in a Coulter XL cytometer and a subsequent cell cycle profile analysis was performed using cytometry summit or FlowJo software. We used 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation to study DNA synthesis. For this purpose, mice were given BrdU (17 mg/kg b.w. ip) 1 h prior to harvest of spleen tissue. Cells were permeabilized with 0.2% saponin and the DNA denatured with HCl according to.⁵²

Apoptosis assay

For apoptosis assessment in Jurkat cells, these were incubated with annexin V FITC (diluted 5:100, Immunotools) for 15 minutes. Then, PI or DAPI was added and cells were analyzed by flow cytometry. In order to determine the presence of apoptosis in the murine Ter119⁺ bone marrow population, bone marrow cells were stained with an anti-Ter119 FITC as indicated above, followed by annexin V phycoerythrin (or annexin V FITC) / DAPI staining. Samples were analyzed using a Gallios cytometer.

Sorting

Bone marrow cells were stained with anti-Ter119 FITC antibody, positive cells were sorted using a FACSaria (BD Biosciences), and purities of up to 95% were obtained.

Thymidine uptake and TK assays

Uptake assays were performed as described in⁵³ using [³H]-thymidine. A TK assay was performed as indicated in.⁵⁴

dNTP analysis

Cells were counted, resuspended in 0.5 mL ice-cold 70% methanol and stored at -20°C . Subsequent dNTP extraction and analysis were performed as described in.¹⁹

Exon sequencing

Exome sequences were mapped to the UCSC mouse reference genome, mm10, with Burrows-Wheeler Aligner software.⁵⁵ Data were processed using the Picard program for marking duplicates and indexing the resulting BAM files (<http://picard.sourceforge.net>), followed by indel realignment and base recalibration using GATK.⁵⁶ Variants were called by VarScan2⁵⁷ under the conditions of minimum coverage of 10, minimum variant frequency of 0.2, and minimum base quality of Phred score 30. Variants were also called with GATK HaplotypeCaller using the default parameters, and the genotyped variants were processed with GATK VariantRecalibrator for variant recalibration. The variants called by both programs were used for variant analysis. Annotations were performed using ANNOVAR with the software-provided mm10 databases.⁵⁸ Variant Effect Predictor was also used for annotating the variants using Ensembl databases.⁵⁹ Annotations by both methods were combined.

Statistics

Data are represented by the mean of biological replicates and standard deviation (s.d.). Statistical analysis was performed in GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA), as detailed in each figure legend. Differences were considered significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Cathy Tournier (University of Manchester, Manchester, UK) for providing *Erk5^{fl/fl}* mice. We wish to thank the technical staff of the FACS Facility and the staff of the Animal Facility (Facultat de Psicologia) for maintaining the mice.

Funding

This work was supported by grant FBG300412 from the Fundació Bosch i Gimpera, University of Barcelona (to M.R.). X.R.-C. and M.A.-I. were supported by a predoctoral fellowship from the Fundació Bosch i Gimpera (FBG300412).

Supplemental Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

Author Contributions

M.A.-I. and E.E. conceived, designed and performed most of the experiments. X.R.-C. and A.G. performed experiments. B.D.,

Y.C.K and S.M.W. performed and analyzed exome sequencing. M.A.-I., X.R.-C., E.E. analyzed the data. M.A.-I., X.R.-C., M.R. and E.E. wrote the manuscript.

References

1. Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 2000; 20:8382-9; PMID:11046135; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.22.8382-8389.2000>
2. Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:9248-53; PMID:12093914; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.142293999>
3. Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 2002; 277:43344-51; PMID:12221099; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M207573200>
4. Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JSC. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* 2003; 3:11; PMID:14675480; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-3-11>
5. Sohn SJ, Li D, Lee LK, Winoto A. Transcriptional regulation of tissue-specific genes by the ERK5 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 2005; 25:8553-66; PMID:16166637; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.19.8553-8566.2005>
6. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 1998; 395:713-6; PMID:9790194; <http://dx.doi.org/10.1038/27234>
7. Ananieva O, Macdonald A, Wang X, Mccoy CE, Mcilrath J, Tournier C, Arthur JSC. ERK5 regulation in naive T-cell activation and survival. *Eur J Immunol* 2008; 38:2534-47; PMID:18792406; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737867>
8. Díaz-Rodríguez E, Pandiella A. Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J Cell Sci* 2010; 123:3146-56; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.070516>
9. Inesta-Vaquera FA, Campbell DG, Tournier C, Gómez N, Lizcano JM, Cuenda A. Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal* 2010; 22:1829-37; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.07.010>
10. Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, Thilak L, Robson CN, Neal DE, Leung HY. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 2003; 22:1381-9; PMID:12618764; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206154>
11. Arias-González L, Moreno-Gimeno I, Del Campo AR, Serrano-Oviedo L, Valero ML, Esparis-Ogando A, la Cruz-Morcillo de MÁ, Melgar-Rojas P, García-Cano J, Cimas FJ, et al. ERK5/BMK1 is a novel target of the tumor suppressor VHL: implication in clear cell renal carcinoma. *Neoplasia* 2013; 15:649-59; <http://dx.doi.org/10.1593/neo.121896>
12. Esparis-Ogando A, Díaz-Rodríguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* 2002; 22:270-85; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.1.270-285.2002>
13. Madak-Erdogan Z, Ventrella R, Petry L, Katzenellenbogen BS. Novel Roles for ERK5 and Cofilin as Critical Mediators Linking ERAlpha-Driven Transcription, Actin Reorganization and Invasiveness in Breast Cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 12:714-27; PMID:24505128; <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0588>
14. Perez-Madriral D, Finegan KG, Paramo B, Tournier C. The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs). *Cell Signal* 2012; 24:2360-8; PMID:22917534; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.08.001>
15. Yang Q, Deng X, Lu B, Cameron M, Fearnis C, Patricelli MP, Yates JR, Gray NS, Lee J-D. Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* 2010; 18:258-67; PMID:20832753; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.008>
16. Yang Q, Liao L, Deng X, Chen R, Gray NS, Yates JR, Lee JD. BMK1 is involved in the regulation of p53 through disrupting the PML-MDM2 interaction. *Oncogene* 2013; 32:3156-64; PMID:22869143; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.332>
17. Reichard P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:349-74; PMID:3052277; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.002025>
18. Toy G, Austin WR, Liao H-I, Cheng D, Singh A, Campbell DO, Ishikawa T-O, Lehmann LW, Satyarnurthy N, Phelps ME, et al. Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:5551-6; PMID:20080663; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913900107>
19. Austin WR, Armijo AL, Campbell DO, Singh AS, Hsieh T, Nathanson D, Herschman HR, Phelps ME, Witte ON, Czernin J, et al. Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J Exp Med* 2012; 209:2215-28; PMID:23148236; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20121061>
20. Voeller D, Rahman L, Zajac-Kaye M. Elevated levels of thymidylate synthase linked to neoplastic transformation of mammalian cells. *Cell Cycle* 2004; 3:1005-7; PMID:15280655; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.3.8.1064>
21. Rahman L, Voeller D, Rahman M, Lipkowitz S, Allegra C, Barrett JC, Kaye FJ, Zajac-Kaye M. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. *Cancer Cell* 2004; 5:341-51; PMID:15093541; [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00080-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00080-7)
22. Xu X, Page JL, Surtees JA, Liu H, Lagedrost S, Lu Y, Bronson R, Alani E, Nikitin AY, Weiss RS. Broad overexpression of ribonucleotide reductase genes in mice specifically induces lung neoplasms. *Cancer Res* 2008; 68:2652-60; PMID:18413732; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5873>
23. Dobrovolsky VN, McGarrity LJ, VonTungeln LS, Mittelstaedt RA, Morris SM, Beland FA, Heflich RH. Micronucleated erythrocyte frequency in control and azidothymidine-treated Tk+/+, Tk+/- and Tk-/- mice. *Mutat Res* 2005; 570:227-35; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.006>
24. Mizunuma M, Hirata D, Miyahara K, Tsuchiya E, Miyakawa T. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* 1998; 392:303-6; PMID:9521328; <http://dx.doi.org/10.1038/32695>
25. Sørensen CS, Syljuåsen RG. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res* 2012; 40:477-86; PMID:21937510; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr697>
26. Zhang Y, Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer* 2014; 134:1013-23; PMID:23613359; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28226>
27. Rodriguez R, Meuth M. Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol Biol Cell* 2006; 17:402-12; PMID:16280359; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0594>
28. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 1999; 246:280-9; PMID:9925742; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1998.4319>
29. Mathews CK. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J* 2006; 20:1300-14; PMID:16816105; <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-5730rev>
30. Bohman C, Eriksson S. Deoxycytidine kinase from human leukemic spleen: preparation and characteristics of homogeneous enzyme. *Biochemistry* 1988; 27:4258-65; PMID:2844225; <http://dx.doi.org/10.1021/bi00412a009>
31. Sarup JC, Fridland A. Identification of purine deoxyribonucleoside kinases from human leukemia cells: substrate activation by purine and pyrimidine deoxyribonucleosides. *Biochemistry* 1987; 26:590-7; PMID:3030413; <http://dx.doi.org/10.1021/bi00376a034>
32. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005; 437:1043-7; PMID:16222300; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04217>
33. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, Yin Y. Essential Role for Nuclear PTEN in Maintaining Chromosomal Integrity. *Cell* 2007; 128:157-70; PMID:17218262; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.042>
34. Senovilla L, Vitale I, Galluzzi L, Vivet S, Joza N, Younes AB, Rello-Varona S, Castedo M, Kroemer G. p53 represses the polyploidization of primary mammary epithelial cells by activating apoptosis. *Cell Cycle* 2009; 8:1380-5; PMID:19342895; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.9.8305>
35. Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, Liu P, Liu Y, Schwartzberg PL, Wang RL. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol* 2000; 20:6945-57; PMID:10958690; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.20.18.6945-6957.2000>
36. Kamihira S, Terada C, Sasaki D, Yanagihara K, Tsukasaki K, Hasegawa H, Yamada Y. Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. *Eur J Haematol* 2009; 82:301-7; PMID:19220422; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01211.x>
37. Wolf D, Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:790-4; PMID:2858093; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.3.790>
38. Cheng J, Haas M. Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol Cell Biol* 1990; 10:5502-9; PMID:2144611; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.10.10.5502>
39. Aggerholm A, Grønbaek K, Guldberg P, Hokland P. Mutational analysis of the tumour suppressor gene MMAC1/PTEN in malignant myeloid disorders. *Eur J Haematol* 2000; 65:109-13; PMID:10966170; <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0609.2000.90181.x>
40. Xu Z, Stokoe D, Kane LP, Weiss A. The inducible expression of the tumor suppressor gene PTEN

- promotes apoptosis and decreases cell size by inhibiting the PI3K/Akt pathway in Jurkat T cells. *Cell Growth Differ* 2002; 13:285-96; PMID:12133897
41. Stadtfeld M, Graf T. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development* 2005; 132:203-13; PMID:15576407; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01558>
 42. Liu Y. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 2006; 108:123-33; PMID:16527892; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-11-4458>
 43. Rovira-Clavé X, Angulo-Ibáñez M, Tournier C, Reina M, Espel E. Dual role of ERK5 in the regulation of T cell receptor expression at the T cell surface. *J Leukoc Biol* 2015; (in press) :jlb.2A0115-034R.
 44. Kumar D, Abdulovic AL, Viberg J, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabes A. Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:1360-71; PMID:20961955; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq829>
 45. Jacque E, Schweighoffer E, Tybulewicz VLJ, Ley SC. BAFF activation of the ERK5 MAP kinase pathway regulates B cell survival. *J Exp Med* 2015; 212:883-92; PMID:25987726; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20142127>
 46. Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, Mansukhani M, Murty VVVS, Gaciong Z, Meek SEM, et al. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 2005; 7:193-204; PMID:15710331; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.009>
 47. Shi Q, King RW. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 2005; 437:1038-42; PMID:16222248; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03958>
 48. Bandyopadhyay S, Mehta M, Kuo D, Sung M-K, Chuang R, Jaehnig EJ, Bodenmiller B, Licon K, Copeland W, Shales M, et al. Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* 2010; 330:1385-9; PMID:21127252; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195618>
 49. Queralt E, Igual JC. Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2005; 171:1485-98; PMID:16118191; <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.045005>
 50. Soriano-Carot M, Bañó MC, Igual JC. The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div* 2012; 7:1; PMID:22296825; <http://dx.doi.org/10.1186/1747-1028-7-1>
 51. Rovira-Clavé X, Angulo-Ibáñez M, Reina M, Espel E. The PDZ-binding domain of syndecan-2 inhibits LFA-1 high-affinity conformation. *Cell Signal* 2014; 26:1489-99; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.03.012>
 52. Hammers HJ, Kirchner H, Schlenke P. Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers. *Cytometry* 2000; 40:327-35; PMID:10918283; [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0320\(20000801\)40:4%3c327::AID-CYTO8%3e3.0.CO;2-5](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0320(20000801)40:4%3c327::AID-CYTO8%3e3.0.CO;2-5)
 53. Shu CJ, Campbell DO, Lee JT, Tran AQ, Wengrod JC, Witte ON, Phelps ME, Satyamurthy N, Czernin J, Radu CG. Novel PET probes specific for deoxycytidine kinase. *J Nucl Med* 2010; 51:1092-8; PMID:20554721; <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.109.073361>
 54. Taylor AT, Stafford MA, Jones OW. Properties of thymidine kinase partially purified from human fetal and adult tissue. *J Biol Chem* 1972; 247:1930-5; PMID:5012768
 55. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; 26:589-95; PMID:20080505; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
 56. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011; 43:491-8; PMID:21478889; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.806>
 57. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; 22:568-76; PMID:22300766; <http://dx.doi.org/10.1101/gr.129684.111>
 58. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:e164-4; PMID:20601685; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq603>
 59. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 2010; 26:2069-70; PMID:20562413; <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq330>