



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

El paper de p27 a la regulació de la via de Notch

Rodrigo Durán Rodríguez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat en
Biomedicina

EL PAPER DE P27 A LA REGULACIÓ DE LA VIA DE NOTCH

Rodrigo Durán Rodríguez

Tesi dirigida pels

Dr. Oriol Bachs i Dra. María Jesús Pujol

2021

Membre de la

LE
RU

Reconeixement internacional de l'excel·lència



B:KC

Barcelona
Knowledge
Campus



Health Universitat
de Barcelona
Campus

Barcelona, Setembre 2021

Unitat de Biologia Cel·lular

Departament de Biomedicina

Programa de Doctorat en Biomedicina

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

El paper de p27 a la regulació de la via de Notch

Memòria presentada per

Rodrigo Durán Rodríguez

per optar al grau de

Doctor

per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció dels doctor Oriol Bachs Valdeneu i la doctora María Jesús Pujol Sobrieva a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biomedicina de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	11
1. Estructura de p27	13
2. Mecanisme de regulació de p27	16
2.1. Regulació transcripcional	16
2.2. Regulació post-transcripcional	17
2.2.1. Mecanismes traduccionals	17
2.2.2. Estabilitat i mecanismes proteolítics.....	17
3. Paper de p27 en diversos processos cel·lulars	21
3.1. Cicle cel·lular	21
3.2. Regulació metabòlica	25
3.3. Motilitat cel·lular.....	26
3.4. Transcripció.....	29
4. Rellevància clínica	33
5. La via de Notch	35
5.1. Components de la via	35
5.2. Senyalització.....	36
5.3. Paper tumoral de Notch.....	39
5.4. p27 a la ruta de Notch.....	43
OBJECTIUS	45
1. Hipòtesi de treball	47
2. Objectius	47
MATERIALS & MÈTODES	49
1. Biologia molecular	51
1.1. Vectors utilitzats.....	51
1.1.1. Vectors virals.....	51
1.1.2. Plasmidis	51
1.2. Cultius bacterians	52
1.2.1. Soques i medis de cultiu.....	52
1.2.2. Transformació bacteriana.....	52
1.3. Purificació de DNA.....	53

Índex

1.3.1. Subclonatge.....	53
2. Cultius cel·lulars.....	54
2.1. Models cel·lulars i medis de cultiu.....	54
2.2. Manipulació de cultius	54
2.2.1. Manteniment de cèl·lules en cultiu.....	57
2.2.2. Subcultiu de cèl·lules	57
2.2.3. Criopreservació de cèl·lules	57
2.3. Sincronització de cèl·lules	58
2.4. Transfecció de cèl·lules.....	59
2.5. Producció lentiviral i infecció cel·lular	59
2.6. Processament de cèl·lules	60
2.6.1. Lisi	61
2.6.2. Quantificació proteica	62
3. Anàlisi de proteïnes	62
3.1. Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE).....	62
3.2. Western Blot	64
3.2.1.1. Electrotransferència	64
3.2.1.2. Immunorevelat.....	64
3.3. Immunoprecipitació de proteïnes (IP).....	66
4. Anàlisi dels nivells de mRNA.....	68
4.1. Extracció RNA	68
4.2. Retrotranscripció	68
4.3. qPCR.....	68
4.4. Assaig luciferasa.....	69
5. Anàlisi de promotors	71
5.1. Eines bioinformàtiques.....	71
5.2. Immunoprecipitació de cromatina	72
6. Anàlisi estadístic	75
RESULTATS	77
CAPÍTOL 1: P27 & LA VIA DE NOTCH.....	79
1. La via de Notch en MEFs.....	81
1.1. Determinació dels nivells de mRNA de diferents components de la via de Notch en cèl·lules MEF quiescents.....	81
1.2. Determinació dels nivells de proteïna de diferents components de la via de Notch en cèl·lules MEF quiescents.....	82

1.3. Anàlisi d'expressió gènica i proteica de la via de Notch en cèl·lules MEF proliferant asincrònicament	83
2. Estudi en altres models cel·lulars.....	85
2.1. Determinació dels nivells de mRNA i proteïna de diferents components de la via de Notch en cèl·lules HCT116 deficientes en p27	85
2.1.1. Inducció de l'expressió de p27 en clons HCT ^{p27KO}	88
2.2. Determinació dels nivells de mRNA i proteïna de diferents components de la via de Notch en línies cel·lulars derivades de leucèmies	89
3. Paper dels complexos CDK-Ciclina i E2F4/p130 en la regulació de la via de Notch.....	90
CAPÍTOL 2: MECANISMES MOLECULARS DE REGULACIÓ	97
1. ChIP-Seq de p27 en cèl·lules de ratolí	99
2. Anàlisi bioinformàtic de potencials llocs d'unió de p27 als gens d'interès	100
3. Validació dels llocs d'unió de p27 als promotors de <i>Maml2</i> i <i>Hey2</i>	101
4. Assaig funcional luciferasa amb la regió del promotor de <i>Maml2</i>	102
5. Anàlisi dels nivells de <i>Maml2</i> en cèl·lules MEF deficientes per p27 o p130.....	103
DISCUSSIÓ.....	105
1. La disminució de p27 indueix l'activació de la via de Notch ..	108
2. La proteïna p27 regula l'expressió de <i>Jag1</i> a través del complex E2F4/p130.....	109
3. La proteïna p27 regula l'expressió de <i>Maml2</i>	111
4. La proteïna p27 regula directament l'expressió d'elements <i>downstream</i> de la via de Notch.....	112
4.1. L'expressió de <i>Hey2</i> està regulada per p27/E2F4.....	114

Índex

5. La proteïna p27 regula l'angiogènesi a través de la via de Notch	115
6. La proteïna p27 en la via de Notch i el càncer	116
7. Perspectives futures	120
CONCLUSIONS	123
BIBLIOGRAFIA	127
ABREVIACIONS	151

INTRODUCCIÓ

*What we know here is very little,
but what we are ignorant of is immense.*

Pierre Laplace

La proteïna p27^{Kip1} (en endavant, p27) va ser identificada per primera vegada com a un agent de resposta al TGF- β que impedia la progressió a través del cicle cel·lular mitjançant la inhibició dels complexos CDK-ciclina (Koff et al., 1993; K. Polyak et al., 1994; Slingerland et al., 1994; Toyoshima & Hunter, 1994). A més d'aquest paper inicial com inhibidor del cicle cel·lular, es va comprovar que la translocalització al citosol de p27 comportava una nova funció: remodelació del citoesquelet d'actina i promoure la migració cel·lular (Besson et al., 2004).

Allò va mostrar la dualitat de papers de p27. Per una banda, actuava com a supressor de tumors (inhibició de la proliferació), però per l'altra com a un oncogen (activació de la mobilitat cel·lular pròpia de la metastasi). Per arrodonir aquesta dicotomia, recentment s'ha afegit la capacitat de p27 d'interaccionar amb diversos factors transcripcionals i modular la seva activitat (Pippa et al., 2012; Yoon et al., 2019).

Per entendre aquestes diferents facetes de la mateixa proteïna, primer s'ha de conèixer la seva estructura i, segon, com la cèl·lula regula les diferents funcions

1. Estructura de p27

El gen *CDKN1B*, situat al cromosoma 12p13, conté tres exons que codifiquen els 198 aminoàcids que constitueixen la proteïna p27 (Ponce-Castañeda et al., 1995). Degut a la seva seqüència, p27 (**Fig. 1**) és una proteïna intrínsecament desordenada, és a dir, manca d'una estructura secundària estable, i les seves funcions són regulades mitjançant PTMs o per interaccions amb altres proteïnes (Galea et al., 2008).

Introducció

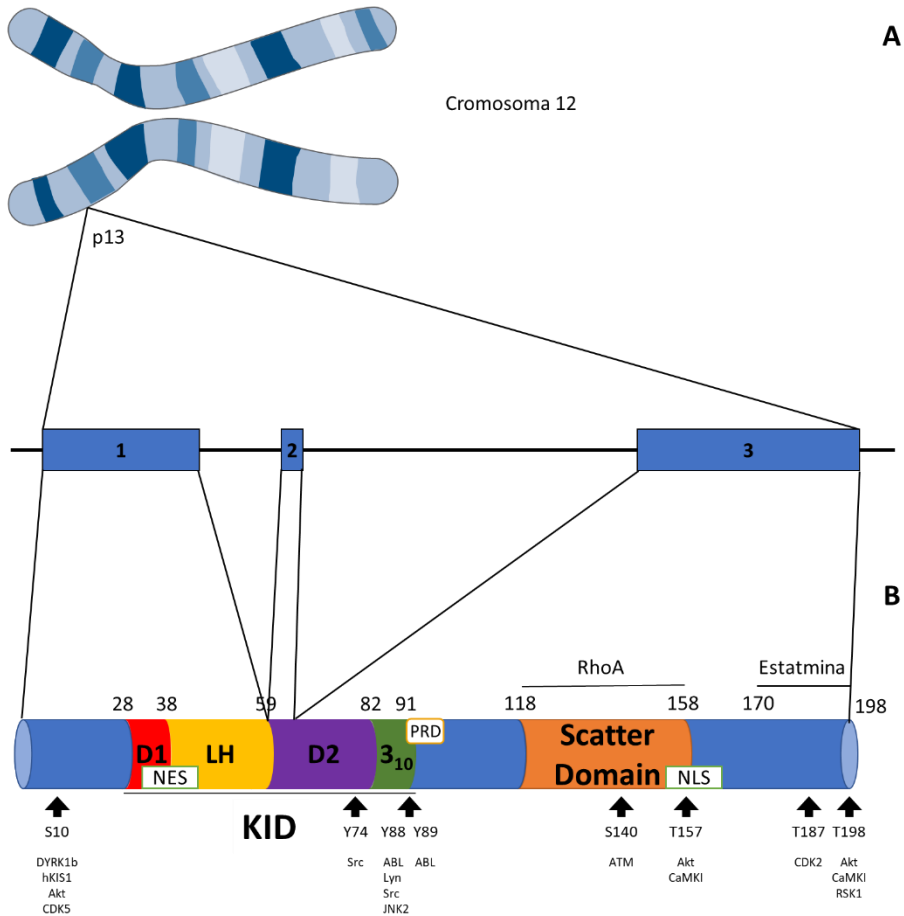


Figura 1. Organització genòmica de *CDK1B* i estructura de p27. (A) Es representa la localització al cromosoma humà (12, en ratolins és el 6) del gen *CDK1B* (12p13) i la disposició d'exons i introns al gen. (B) La regió N-terminal de p27 conté el KID (28-91), compost per el subdomini D1 (28-37, coil) i el subdomini D2 (60-82, forquilla β i làmina β), units pel subdomini LH (38-59, hèlix α), i l'hèlix 310 (83-91) d'unió al C-terminal. El NES (32-46) es troba amagat quan p27 interacciona amb el complex CDK-ciclina. El N-terminal sembla unir, a més, altres proteïnes, com Ngn-2 i Grb2. Aquest últim reconeix el PRD (89-96). El C-terminal manca d'estructura i conté la NLS (152-168) necessària per la importació del complex CDK-ciclina. El Scatter Domain (118-158) participa a la inhibició de l'estabilitat del polímers d'actina, pel que podria ser la zona d'unió a RhoA. La cua terminal (170-198) uneix estamina per estabilitzar els microtúbuls. **PTMs de p27.** Només es mostren les fosforilacions més rellevants i les quinases que hi participen.

Com s'observa a la **Fig. 1**, el seu extrem N-terminal presenta certa estructura secundària (Lacy et al., 2004; Sivakolundu et al., 2005) i conté el domini KID (residus 28-91), d'unió als complexos ciclina-CDK

(Russo et al., 1996). Aquesta regió consta d'un subdomini d'unió a ciclina (D1), un subdomini d'unió a CDK (D2) i un subdomini d'enllaç entre D1 i D2 (LH). A més, conté un subdomini hèlix 3_{10} de connexió amb el C-terminal.

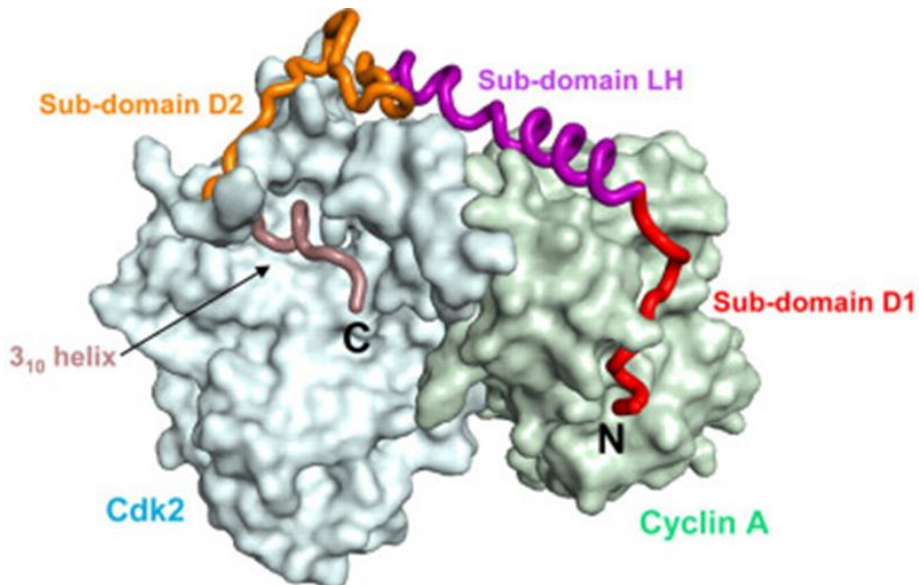


Figura 2. Estructura 3D de p27 unida al complex CDK2-CiclinaA. Es marquen amb diferents cors els dominis de la regió N-terminal de p27. Extret de Ou et al., 2011.

Per poder plegar-se i estabilitzar-se, p27 interacciona primer amb la ciclina mitjançant el subdomini D1, que desencadena un canvi conformational a la subregió LH que permet el plegament de p27 sobre la CDK (Russo et al., 1996). D'aquesta manera (**Fig. 2**), p27 bloqueja el centre catalític de la CDK al impedir la unió d'ATP, a més d'evitar la fosforilació activadora per CAK (Ray et al., 2009). Malgrat ser, en principi, un inhibidor universal del complexos ciclin-CDK, p27 té preferència per la interacció amb CDK4/6-CiclinaD i CDK2-CiclinaA/E (Polyak et al., 1994; Toyoshima & Hunter, 1994).

D'altra banda, el seu extrem C-terminal (residus 105-198) manca de estructura definida i té l'habilitat d'interactuar amb un ampli rang de

Introducció

diferents proteïnes. Conté la seqüència de importació nuclear (NLS), mentre la d'exportació (NES) es troba dins del domini KID. Després de la traducció, p27 interacciona amb CDK/ciclina al citosol i mitjançant importines ($\alpha 3$, $\alpha 5$ i β) entren al nucli (Alt et al., 2002; Sekimoto et al., 2004).

2. Mecanismes de regulació dels nivells de p27

Els nivells de p27 a la cèl·lula es regulen, principalment, per mecanismes post-transcripcionals i, de manera residual, transcripcionals, ja que, generalment, els nivells de mRNA de p27 no varien entre cèl·lules quiescents i proliferants ni al llarg del cicle (Polyak et al., 1994).

2.1. Regulació transcripcional

Hi ha diferents factors de transcripció implicats en la regulació de l'expressió gènica de p27, tant positius (FOXO, MENIN, E2F1) com negatius (c-myc, Hes1).

El regulador negatiu de la transcripció de p27 més estudiat és c-myc, un proto-oncogen que pot inhibir directament l'expressió de p27 per unió al seu promotor (Yang et al., 2001). A més, c-myc promou l'expressió de CUL1 i Skp2, components de l'E3 ubiquitin lligasa que porten en última instància a la degradació de p27 (Bretones et al., 2011; O'Hagan et al., 2000). Un altra repressor transcripcional de p27 es Hes1, repressor transcripcional diana de la via proliferativa de Notch (Murata et al., 2005).

En contraposició, entre els reguladors positius cal destacar la subfamília de proteïnes FOXO (FOXO4, FOXO3a, FOXO1a), que afavoreixen l'aturada del cicle cel·lular mitjançant l'expressió de p27 (Medema et al., 2000). De la mateixa forma, el supressor de tumors MENIN afavo-

reix l'expressió de p27 regulant la metilació del seu promotor (Karnik et al., 2005).

També el factor de transcripció E2F1, diana del complex CDK2-Cyclin, promou la expressió de p27, creant una retroalimentació negativa (C. Wang et al., 2005). Per últim, l'acció de la vitamina D3 mitjançant Sp1 combinat amb VDR o amb NFY afavoreix l'expressió de p27 (Huang et al., 2004; Inoue et al., 1999).

S'ha observat la interacció entre aquests mecanismes transcripcionals, ja que c-myc pot interactuar amb FOXO3a, impeding l'expressió de p27 (Chandramohan et al., 2008). A més, la fosforilació de FOXO3a (T32, S253) i FOXO1a (T24, S256, S319) pel proto-oncogen PIM1s inactiva aquests factors transcripcionals, inhibint la expressió de p27 (Morishita et al., 2008).

2.2. Regulació post-transcripcional

2.2.1. Mecanismes traduccionals

Malgrat nivells constants de mRNA al llarg de tot el cicle, la traducció proteica de p27 té un pic màxim en quiescència i la fase G₁ primerenca i decreix a la entrada de la fase S (Hengst & Reed, 1996; Millard et al., 1997). El extrem 5'UTR del gen CDKN1B regula aquesta traducció dependent de cicle (Göpfert et al., 2003). Conté un uORF i un IRES, que manté la traducció durant quiescència independent del 5'cap (Kullmann et al., 2002; Miskimins et al., 2001).

Entre les proteïnes que regulen la traducció de p27 mitjançant aquesta regió IRES es troben PTB, que l'activa (Cho et al., 2005), o membres de la família Elav (ELAV1, ELAV4), que l'inhibeixen (Kullmann et al., 2002; Millard et al., 2000). D'altra banda, s'ha vist que la inhibició

Introducció

de Rho (Vidal et al., 2002) o CDK4 (González et al., 2003) incrementa la traducció de p27 pel seu extrem 3'UTR.

Aquest 3'UTR pot ser diana de diferents miRNA que impedeixen la traducció del mRNA. S'ha descrit la regulació traduccional de p27 mitjançant miR-221 i miR-222, els quals son expressats per acció de c-myc (le Sage et al., 2007). Això demostra com aquest proto-oncogen promou a tots els nivells (transcripcional, traduccional i proteolític) la degradació de p27 per fer avançar el cicle.

2.2.2. Estabilitat i mecanismes proteolítics

La degradació via protosoma és el principal mecanisme establert per la regulació dels nivells de p27 a la cèl·lula (**Fig. 3**). Al principi del cicle cel·lular, una sèrie de PTMs porten a la ubiquitinació de p27 pel complex SCF-Skp2 (Carrano et al., 1999; Ganoth et al., 2001; Montagnoli et al., 1999), passant dels nivells màxims proteics a G₀ a desaparèixer un cop a la fase S.

Aquest procés de degradació s'inicia a la fase G₁ amb la fosforilació de p27 al residu Y88 (adicionalment, Y74 o Y89) per part de Tyr quinases lliures (c-Src, Lyn, ABL) o receptors quinasa (JAK2). Això provoca un canvi conformacional a la proteïna que permet deixar lliure el centre actiu de la CDK2 (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007; Jäkel et al., 2011; James et al., 2008), i, per tant, activar al complex CDK-ciclina. Una segona fosforilació al residu T187 per aquest complex actiu permet el reconeixement de p27 pel complex SCF-Skp2 i la seva poliubiquitinació i, finalment, degradació (Montagnoli et al., 1999).

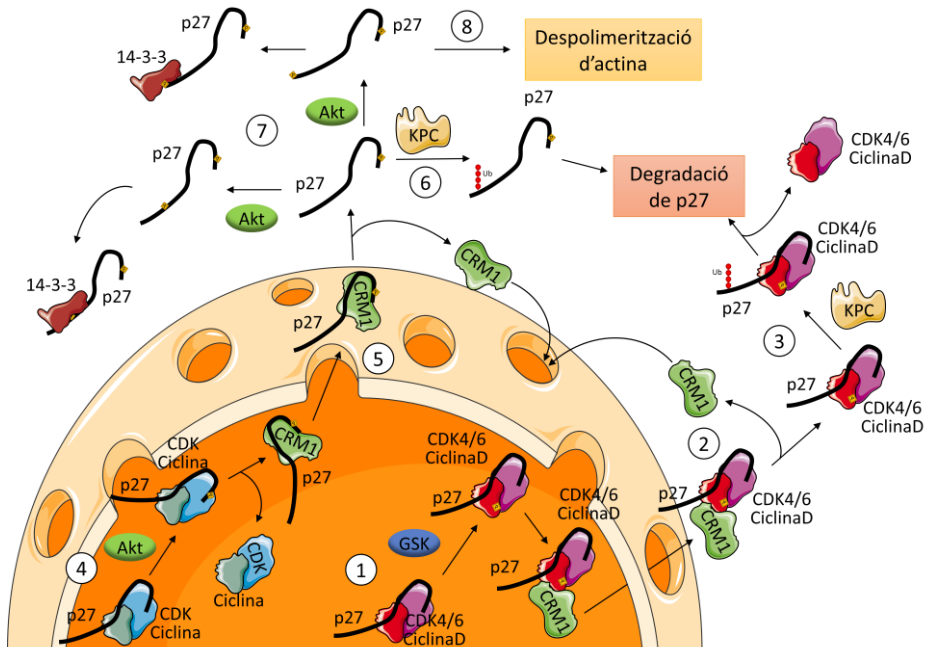


Figura 3. Mecanismes d'exportació citoplasmàtica i degradació. La fosforilació de la ciclina D per GSK (1) promou la seva exportació nuclear juntament amb la CDK4/6 i p27 mitjançant CRM1 (2). Un cop al citosol, CRM1 es desacobla i pot tornar al nucli. Mentre, p27 és poliubiquitinada per KPC (3) i, finalment, degradada. La ciclina D queda al citosol durant la resta de la interfase. D'altra banda, senyals mitogènics poden activar Akt, que fosforila el residu S10 de p27 (4). CRM1 reconeix aquesta p27 fosforilada i la transloca al citosol (5), on pot ser degradada prèvia poliubiquitinació de KPC (6). Al citosol, p27 pot ser novament fosforilada per Akt (T157, T198) i segrestada per proteïnes 14-3-3 (7). Aquests tres mecanismes durant la fase G₁ afavoreixen l'avanç del cicle. A més, al citosol p27 pot regular el citoesquelet de la cèl·lula (8).

Encara que la poliubiquitinació per Skp2 es realitza al nucli, p27 també pot ser exportada al citosol per ser poliubiquitinada i degradada. Durant la fase G₁ primerenca, diverses quinases (hKIS1, Akt,) fosforilen a p27 al residu S10. Aquesta fosforilació, a més de promoure l'estabilitat de p27 (Boehm et al., 2002; Nacusi & Sheaff, 2006), afavoreix la unió amb el complex exportador CRM1/Ran-GTP pel domini KID (Connor et al., 2003; Ishida et al., 2002). Altres quinases que estableixen a la p27 són la CDK5 (Kawauchi et al., 2006) i, durant la quiescència, la DYRK1b (Deng et al., 2004).

Introducció

Un cop translocada al citosol, p27 pot ser fosforilada als residus T157 i T198 per Akt, Pim o CAMKI (Fujita et al., 2002; Liang et al., 2002; Mallampalli et al., 2013; Morishita et al., 2008; Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002). La fosforilació al NLS (T157) i a l'aminoàcid terminal (T198) afavoreix el segrest per proteïnes 14-3-3 i, per tant, impedeix la reentrada al nucli (Fujita et al., 2002; Morishita et al., 2008; Sekimoto et al., 2004). Aquestes fosforilacions s'han lligat a un avanç del cicle, al decreïxer els nivells nuclears de p27 i, en teoria, impedir la inhibició de les CDKs, i també a la regulació de la motilitat cel·lular, al ser necessària la presència de p27 al citosol per això.

A més d'aquesta fosforilació a la S10, p27 pot ser translocada a citosol mitjançant la intervenció de la ciclina D₂ (Susaki et al., 2007). L'expressió d'aquesta ciclina es produeix al inici de G₁ abans dels altres subtipus de ciclina D (D₁, D₃) i el seu increment correlaciona amb el descens dels nivells proteics de p27. La fosforilació al residu T280 de la ciclina D₂ promou la translocació del complex trimèric p27-CDK4/6-ciclinaD₂ al citosol (Susaki et al., 2007). Un cop allà, p27 pot ser reconeguda per l'E3 ubiquitin lligasa KPC, poliubiquitinada i, finalment, degradada (Kamura et al., 2004; Susaki et al., 2007).

A més de KPC, durant la fase G₁, altre ubiquitin lligasa associada a l'eliminació de p27 és Pirh2, que es troba tant al nucli com al citosol (Hattori et al., 2007). També s'ha descrit la degradació protosomal de p27 per mediació de PCAF, que acetila el residu K100 de p27 i és independent de Skp2 (Pérez-Luna et al., 2012). És a dir, aquesta acetilació es produeix a l'inici de la fase G₁, al igual que les poliubiquitinacions de KPC i Pirh2 i a diferència de la ubiquitinació nuclear de p27 per Skp2, que ocorre des de la fase S/G₂ fins M (Malek et al., 2001;

Nakayama et al., 2004). Per tant, el possible mecanisme de recanvi proteic durant la quiescència encara està per dilucidar (Besson et al., 2006).

Així diverses PTMs controlen l'estabilitat, la localització i la funció de p27. Cal remarcar que la fosforilació de la S10 és la modificació més trobada (Ishida et al., 2000), probablement per ser l'única estabilitzada en contraposició a altres degradatives (T187) o segrestadores (T157, T198) i trobar-se a estadis quiescents i no només proliferatius (Y78, Y88, Y89, T157, T187, T198).

3. Paper de p27 en diversos processos cel·lulars

3.1. *Cicle cel·lular*

El cicle cel·lular es una sèrie d'esdeveniments per la qual la cèl·lula creix i replica el seu genoma per poder dividir-se. Hi ha quatre etapes (**Fig. 3**): primera fase de creixement cel·lular dependent de mitògens (G_1), un període de síntesi de DNA (S), una segona fase de creixement independent de mitògens (G_2) i una última en la que es divideix el DNA de forma equitativa i es separen els citoplasmes (M). Les cèl·lules que no entren en el cicle cel·lular queden en un estat de quiescència (G_0).

Aquest procés està regulat per una sèrie de quinases (CDKs) acoblades a oscil·ladors (ciclins), és a dir, a proteïnes que regulen la seva activitat però només s'expressen en determinats punts del cicle i per un període determinat. Les parelles que intervenen al cicle són (**Fig. 4**): CDK4/6-Ciclina D (G_1), CDK2/Ciclina E/A (G_1/S), CDK1/Ciclina A/B (G_2/M).

Introducció

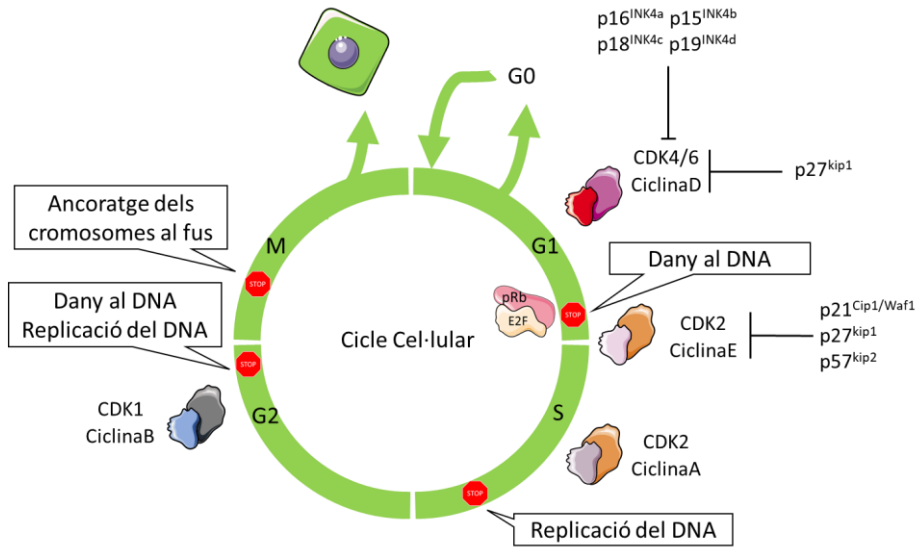


Figura 4. Representació esquemàtica del cicle cel·lular. El cicle cel·lular, que té una durada diferent segons el subtipus cel·lular, consta de quatre fases. A la fase G₁, la cèl·lula creix davant l'arribada de senyals mitogènics. Aquests senyals porten a la degradació dels CKI, com p27, i l'expressió dels reguladors de CDK, com la Ciclina D. L'acció seriada del complex CDK4/6-CiclinaD durant la fase mitjana de G₁ i del Complex CDK2-CiclinaE a la fase tardana porta al inici de la fase de replicació del DNA. En aquesta fase S intervé el complex CDK2-Ciclina A. Un cop acabada la duplicació del material genètic, la cèl·lula entra en la fase G₂, on creix i es prepara per la divisió. La entrada en fase M està regulada pel complex CDK1-CiclinaB. Durant la fase M, es condensen els cromosomes, s'alineen i es separen als pols oposats de la cèl·lula. Finalment, es produeix la citocinesi (separació del citoplasma) i es generen dues cèl·lules filles idèntiques. Al cas de la meiosi, quatre cèl·lules filles amb la meitat de dotació cromosòmica. Un cop acabada la fase M, la cèl·lula pot entrar de nou en cicle o sortir i quedar en una fase de quiescència (G₀), on es manté en repòs (no es divideix). A la imatge es marquen els quatre punts de control (check-points) del cicle.

A més, s'han descrit una sèrie de proteïnes que s'uneixen a les CDKs o als complexos CDK/ciclina i que els inhibeixen (CKI). Els primers són els inhibidors de la família INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) i impedeixen la unió de CDK4/6 amb la seva ciclina, mentre que p27, juntament amb p21^{cip1/waf1} i p57^{kip2}, pertanyen a la família CIP/KIP i poden interaccionar amb diversos complexos CDK/ciclina (Sherr & Roberts, 1999).

Concretament, p27 interacciona amb el complex CDK4/6-CiclinaD. Aquest complex és termodinàmicament inestable i requereix de la unió

de p27 pel seu assemblatge (Lacy et al., 2004) i manteniment al nucli (Cheng et al., 1999). A més, la inhibició d'aquest complex només es produeix en quiescència, ja que en cèl·lules proliferants p27 es troba fosforilada als residus de l'hèlix 3₁₀ (Y88, Y89) i, per tant, la CDK4/6 és activa (James et al., 2008).

Això va demostrar que p27 no era un simple inhibidor de CDKs, sinó més bé un modulador de l'activitat d'aquestes. En part necessari perquè poguessin fer les seves funcions i que els complexos trimèrics (p27-CDK-ciclina) podien ser actius.

L'arribada de senyals mitogènics a la cèl·lula porta a l'expressió de ciclina D i la fosforilació de p27 al residu Y88 (**Fig. 5**). D'aquesta forma, la ciclina D desplaça als INK4 per formar dímers actius i els complexos trimèrics p27-CDK4/6-ciclina D passen a ser actius. La CDK4/6 monofosforila al supressor de tumors pRb (Narasimha et al., 2014), que trenca la seva associació amb el factor de transcripció E2F. Així, s'expressen gens dependents d'E2F necessaris per l'avanç del cicle, com les ciclines E i A. El complex CDK2-CiclinaE, després de promoure la degradació de la p27 fosforilada prèviament al residu Y88, hiperfosforilaran a pRb per mantenir l'expressió dels gens requerits per entrar a la fase de síntesi de DNA

La hiperfosforilació de pRb constitueix el punt de restricció del cicle. Si es supera, la resta del cicle es independent de mitògens i només estarà controlat per punts de control (*check-point*), com que el DNA estigui sense dany (a la fase G₁), que s'hagi replicat completament i només una vegada (abans de finalitzar la fase S), que no estigui danyat després de la replicació i que estigui complerta (fase G₂) i que els cromosomes

Introducció

estiguin ben ancorats als microtúbuls i posicionats al mig de la cèl·lula (fase M).

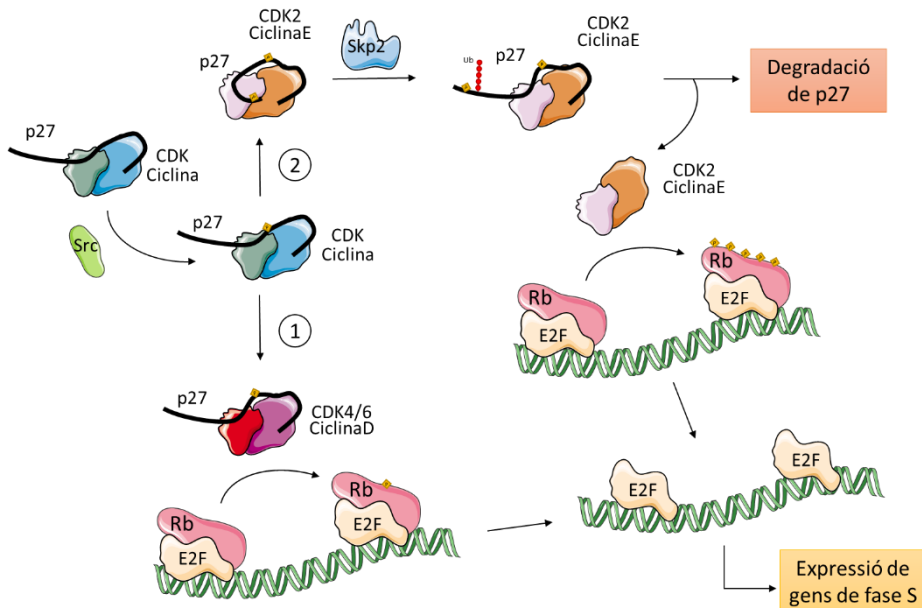


Figura 5. Regulació del ciclo cel·lular per p27. La activació de diverses quinases mitogèniques provoca la fosforilació al residu Y88 de p27, que canvia de conformació. Els trímers p27-CDK4/6-ciclinaD queden actius i monofosforilen pRb, que s'allibera d'E2F i s'expressen gens necessaris per l'avanç del cycle. Als trímers p27-CDK2-ciclina E, CDK2 pot fosforil·lar p27 al residu Y187 i permetre, així, la ubiquitinació de p27 per part de Skp2. Un cop degradada, el complex CDK2/CiclinaE pot hiperfosforil·lar pRb perquè s'acabin d'expressar tots els gens necessaris per la fase S.

Si no hi ha suficients senyals de creixement, la cèl·lula no podrà fosforil·lar a pRb i continuar el cycle. Això provoca una nova reentrada en quiescència, mitjançant la recuperació dels nivells previs de p27. D'altra banda, l'activació dels punts de control suposen l'aturada del cycle per intentar solucionar el problema o, en cas contrari, la mort de la cèl·lula per apoptosi.

Els danys de doble cadena al DNA provoquen l'activació de la quinasa ATM, encarregada de fosforil·lar diverses dianes amb un únic objectiu: aturar el cycle perquè la cèl·lula pugui reparar el dany. Al control de G₁, ATM fosforila p27 al seu residu S140 per augmentar la seva mida mitja

(Cassimere et al., 2016), mentre la fosfatasa Wip1 elimina aquest fosfat i el d'altres dianes d'ATM un cop s'ha reparat el dany (Choi et al., 2020).

3.2. Regulació metabòlica

La relació entre cicle cel·lular i metabolisme és estreta. No s'ha d'oblidar que la duplicació del DNA o la separació dels cromosomes són dos processos amb alta demanda energètica. El paper dels diferents complexos CDK/Ciclina o dels CKI encara no està ben dilucidat, però es sap, per exemple, la participació de p27 a l'autofàgia (Nowosad et al., 2020).

Aquest procés catabòlic consisteix a la degradació i el reciclatge dels components intracel·lulars per part dels lisosomes. El complex mTORC1 regula negativament l'autofàgia, al inhibir la formació i maduració de l'autofagosoma (Parzych & Klionsky, 2014).

En condicions de manca de nutrients, com glucosa o, especialment, aminoàcids, s'activa l'AMPK, que fosforila a p27 al residu T198 (Nowosad et al., 2020; White et al., 2018). Aquesta fosforilació durant períodes prolongats sense aminoàcids (>48h) provoca la relocalització de p27 prop dels lisosomes, on s'uneix a la subunitat LAMTOR1 del complex Ragulator-Rag (Nowosad et al., 2020; Zada et al., 2015). En condicions normals, aquest complex de la membrana lisosomal interacciona amb mTORC1 i l'activa. Per tant, en estats de deprivació, p27 bloqueja aquesta unió entre mTORC1 i el complex Ragulator-Rag, afavorint la formació de l'autofagosoma (Nowosad et al., 2020).

Així, p27 permet a la cel·lular degradar components interns per obtenir la suficient energia per poder continuar el cicle. Cal remarcar que

Introducció

l'autofàgia es un procés limitat i freqüent per el correcte funcionament d'una cèl·lula.

3.3. Motilitat cel·lular

La migració cel·lular és un procés dinàmic que juga un paper important en diverses funcions biològiques, com l'embriogènesi, la regeneració dels teixits o la vigilància immune, així com en els processos de malalties, inclosa l'aterosclerosi o la metàstasi del càncer. Entre les proteïnes que poden regular la mobilitat cel·lular, les més rellevants són la GTPasa RhoA i el seu efector ROCK1 per la seva acció sobre els diferents components de citoesquelet (**Fig. 6**) (Amano et al., 2010).

Per efecte d'alguns tipus de factors de creixement o d'interaccions entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular, es poden activar diversos GEFs. GEF promou l'alliberament de GDP de RhoA per substituir-ho per GTP. Així, RhoA pot activar diferents dianes proteïques, inclosa ROCK1. Un cop activa, la quinasa ROCK1 pot fosforilar a la quinasa LIM, que fosforila, a la sua vegada, a la cofilina. Aquesta cofilina fosforilada no pot unir-se a l'actina monomèrica, per la qual cosa els filaments d'actina s'estabilitzen i s'impedeix la migració cel·lular.

D'altra banda, ROCK1 fosforila la MLC i la MLC fosfatasa, augmentant l'activitat ATPasa de la miosina directa i indirectament. La miosina actua com a proteïna motora, ja que pot interactuar amb els filaments d'actina i afavorir la seva motilitat mitjançant la hidròlisi d'ATP. Així, les molècules de miosina poden moure filaments d'actina els uns contra els altres i, per tant, contraure la cèl·lula.

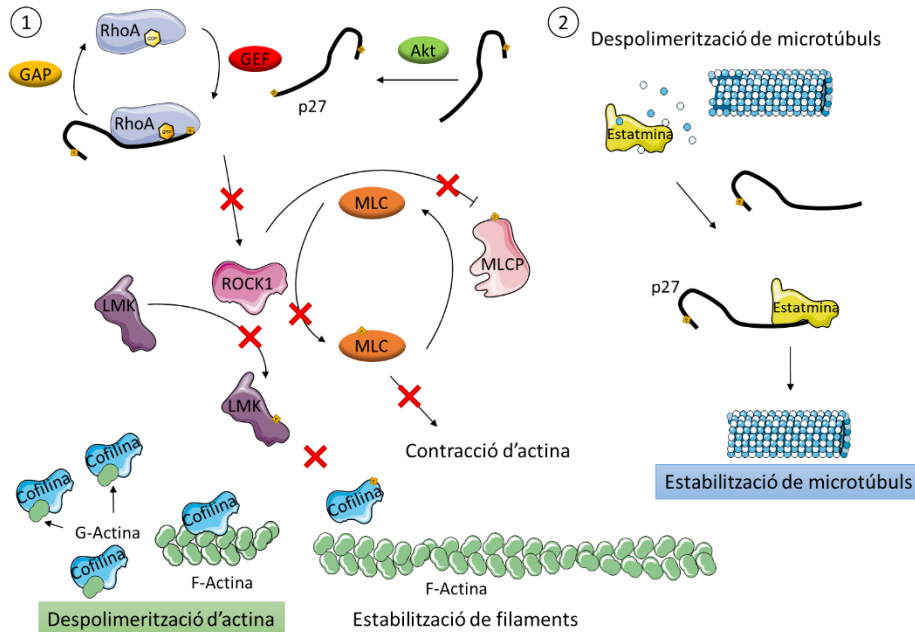


Figura 6. Regulació de la dinàmica del citoesquelet per p27. (1) Al citosol, RhoA activa a ROCK1, que fosforila diverses dianes: i) LMK, que fosforila a la cofilina i impedeix que uneixi actina, estabilitzant els filaments; ii) MLC, fomentant l'activitat ATPasa de la miosina i permetent la contracció dels filaments; iii) MLCP, que queda inactiva i s'evita que elimini el fosfat activador de la MLCK. La fosforilació per part d'Akt al residu terminal de p27 promou que aquesta última interaccioni amb RhoA, impedit tots els esdeveniments prèviament descrits. Per tant, es despolimeritzen els filaments d'actina i es promou la migració cel·lular. (2) D'altra banda, p27 pot interaccionar al citosol pel C-terminal amb l'estatmina. Com l'estatmina és un factor despolimeritzador de microtúbuls, p27 promou que s'estabilitzen i impedeix la migració cel·lular.

D'altra banda, ROCK1 fosforila la MLC i la MLC fosfatasa, augmentant l'activitat ATPasa de la MLC directa i indirectament. La miosina actua com a proteïna motora, ja que pot interactuar amb els filaments d'actina i afavorir la seva motilitat mitjançant la hidròlisi d'ATP. Així, les molècules de miosina poden moure filaments d'actina els uns contra els altres i, per tant, contraure la cèl·lula.

La inactivació de RhoA està regulada principalment per GAPs, que promouen la hidròlisi de GTP al estimular l'activitat GTPasa de RhoA. Tot i això, hi ha altres mecanismes que poden contribuir a inactivar RhoA, com la interacció amb p27. Després de ser fosforilada a la S10

Introducció

per ser exportada al citosol, p27 pot interactuar directament amb RhoA pel seu C-terminal i evitar l'intercanvi de GDP per GTP (Besson et al., 2004). Així, RhoA es manté inactiva i es promou la migració cel·lular. És a dir, s'inhibeix l'estabilització d'actina i s'afavoreix la seva despolimerització.

La quinasa RSK1, que es diana de vies mitogèniques com Ras/MAPK o PI3K/PDK1, pot fosforilar a p27 al seu residu terminal (Fujita et al., 2003). Encara que aquesta fosforilació, induïda per altre quinasa activada per la via PI3K/PDK1 com l'Akt (Fujita et al., 2002), va ser descrita com segrestadora (Fujita et al., 2003), es va demostrar que promouia la unió de p27 a RhoA (Larrea et al., 2009). Per tant, afavoria la despolimerització d'actina i la migració cel·lular.

D'altra banda, també s'ha descrit com al citosol p27 interacciona pel C-terminal amb l'estatmina, una proteïna desestabilitzadora de microtúbuls, i inhibeix la motilitat cel·lular (Baldassarre et al., 2005). En paral·lel a aquesta estabilització, p27 uneix ATAT1 per inhibir la seva degradació i promoure el tràfic cel·lular (Morelli et al., 2018). Entre les proteïnes afectades per aquesta regulació del transport vesicular al llarg dels microtúbuls estaria Ras-H (Fabris et al., 2015).

Per tant, al citosol p27 presenta una dualitat de papers que, probablement, l'estat fosforilatiu determina el rol predominant. L'estatmina interacciona pels últims residus del C-terminal de p27 (Baldassarre et al., 2005), mentre aquesta cua ha d'estar fosforilada (T198) per la unió amb RhoA/Rock al mig del C-terminal (Larrea et al., 2009).

També s'ha descrit la interacció del extrem C-terminal de p27 amb PRC1 (Perchey et al., 2018), impedint que pugui polimeritzar els mi-

crofúbul, o el seu paper a la ciliogènesi (Yukimoto et al., 2020) o la generació d'invadopodia (Chen et al., 2020; Jeannot et al., 2017).

3.4. *Paper de p27 en la regulació transcripcional*

A més de controlar la migració cel·lular amb el seu C-terminal al citosol i la activitat dels complexos CDK-ciclina al nucli pel ser extrem N-terminal, diferents evidències suggereixen el possible paper de p27 com un coregulador transcripcional independent de CDK, sobre tot en processos de desenvolupament.

El factor de transcripció del tipus bHLH neurogenina-2 promou en col·laboració amb p27 la neurogènesi cortical i la migració radial (Bertrand et al., 2002). Mentre aquesta última funció es regulada per l'extrem C-terminal de p27 i l'eix RhoA/ROCK (Nguyen et al., 2006), la diferenciació neuronal requereix l'extrem N-terminal de p27 (Nguyen et al., 2006; Vernon et al., 2003). D'una banda, p27 inhibeix la fosforilació per CDKs de neurogenina-2, afavorint la unió al DNA (Ali et al., 2011). D'altra, promou la seva estabilització independent de l'activitat CDK, encara que no s'ha demostrat la interacció directa (Nguyen et al., 2006).

També s'ha vist que la miogènesi està regulada per p27 en col·laboració amb MyoD (Vernon & Philpott, 2003). Els mioblasts immortalitzats de ratolí C2.C12 es diferencien a miòcits en confluència, però l'absència de p27 impedeix aquest procés (Messina et al., 2005). El mecanisme exacte de regulació és desconegut, però es independent de CDKs.

De forma semblat, l'extrem N-terminal de p27 independent de CDKs, promou la diferenciació cardíaca (Movassagh & Philpott, 2008). Altres

Introducció

procés de desenvolupament relacionats amb p27 són la diferenciació eritropoietica (Acosta et al., 2008; Muñoz-Alonso et al., 2005), l'ossificació endocondral (Yeh et al., 2007) o l'angiogènesi (Vidal et al., 2005).

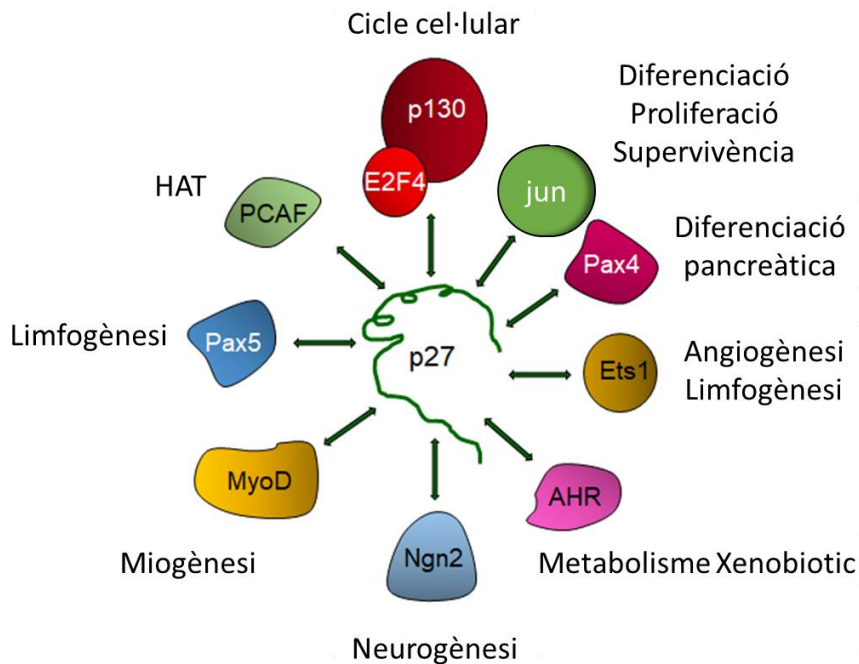


Figura 7. Factors de transcripció que interaccionen amb p27. Es representen els principals TF o elements reguladors de la transcripció i les seves funcions.

Recentment, s'ha determinat que p27 pot unir-se a diversos factors de transcripció (**Fig. 7**): E2F4/p130, Ets1 (Pippa et al., 2012); AHR, MyoD (Biçer et al., 2017); Pax5 (Perearnau et al., 2017); i c-jun (Yoon et al., 2019). La interacció tant amb c-jun com E2F4/p130 depèn de l'extrem C-terminal. Mentre l'activitat p27/c-jun s'ha lligat a la regulació del gen TGF- β 2 i l'EMT (Yoon et al., 2019), p27 col·labora amb E2F4/p130 a la repressió de diversos gens (Pippa et al., 2012).

El factor de transcripció E2F4 és el principal repressor i regulador del cicle cel·lular (Hsu & Sage, 2016). En cèl·lules quiescents, p27 estaria

al nucli juntament amb E2F4/p130 i altres proteïnes repressores com HDACs i SIN3A impeditint l'expressió de gens de cicle . La entrada en cicle promouria la fosforilació de p130, el trencament del complex E2F4/p130 i l'alliberament de E2F4 (Orlando et al., 2015). Així, p27 colocalitzaria al nucli els complexos CDK/ciclina amb E2F4/p130 i regularia l'entrada en cicle i la seva progressió de forma precisa (**Fig. 8**).

Cal remarcar que E2F4/p130 també té un paper important en la diferenciació cel·lular (Hsu & Sage, 2016), com al cas de l'ossificació endocondral abans mencionat (Yeh et al., 2007). S'ha descrit com E2F4 col·labora amb p27 per inhibir l'expressió de Sox2, un factor de transcripció necessari per mantenir la pluripotència pròpia de cèl·lules mare (H. Li et al., 2012). L'expressió de Sox9 també està regulada negativament per p27, però el TF que intervé és desconegut (Jeannot et al., 2015). Altres gens inhibits per p27-E2F4/p130 són Ptx2 (Gallastegui et al., 2017) o l' α -sinucleïna (Gallastegui et al., 2018).

La regulació positiva en cèl·lules proliferants de gens necessaris per l'EMT requereix la fosforilació de p27 al C-terminal (T157, T198) perquè pugui interaccionar amb c-jun i és independent de CDK (Yoon et al., 2019). Per tant, segons l'estat proliferatiu de la cèl·lula i les PTMs a p27, aquesta proteïna podria pivotar entre un paper més oncogènic o més supressor de tumors.

Introducció

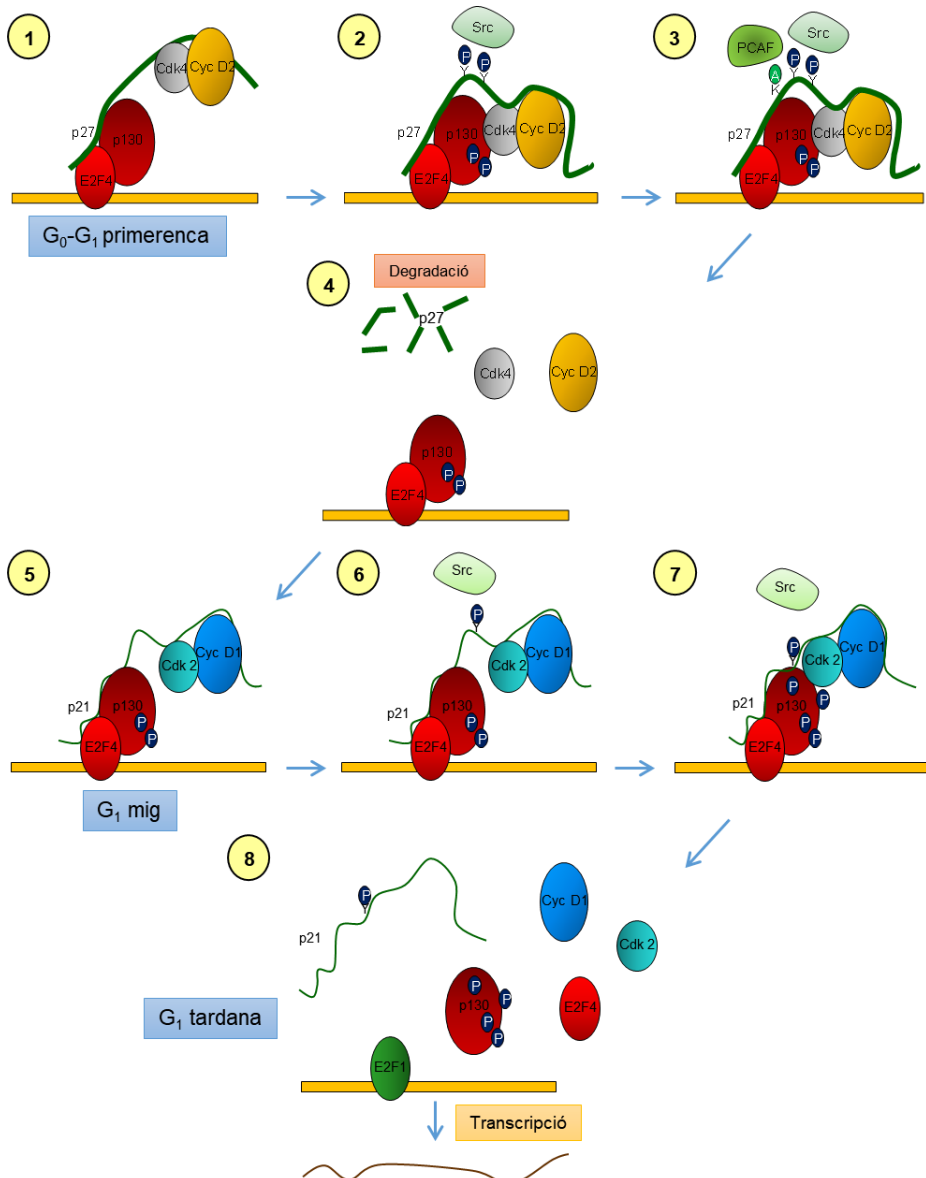


Figura 8. Model del paper de p27 i p21 en la regulació transcripcional dels gens reprimits per E2F4/p130. En cèl·lules quiescents, p27 s'associa amb p130 i E2F4 als promotors de gens diana pel seu domini C-terminal i amb el complex CDK4/ciclina D2/3 pel seu extrem N-terminal. A aquesta etapa, Cdk4 està inactiva, degut a la seva inhibició per p27 (1). Al inici de G₁, p27 és fosforilada per Tyr quinases als residus Y74 i Y88. Es desencadena un canvi conformacional que permet a la CDK ser activa i fosforilar a p130 (2). A més, Cdk4 fosforila la T187 de p27, facilitant la seva degradació. Aquesta degradació també és estimulada per la acetilació de la K100 per l'acetiltransferasa i coactivador transcripcional PCAF (3). La degradació de p27 porta a la eliminació del complex CDK4/CiclinaD2/3 dels promotors (4). Posteriorment, p21 s'associa amb E2F4/p130 reclutant el complex CDK2/CiclinaD1 (5). Després de la fosforilació de la Y77 de p21 (6), Cdk2 s'activa i hiperfosforila

p130 (7). Cdk2 també fosforila la S130 de p21, la qual cosa porta a la seva degradació. La degradació de p21 i la fosforilació de p130 desorganitzen els complexos repressius, permetent així la acció de factors de transcripció activadors, com E2F1, que inicien la transcripció de gens diana (8).

4. Rellevància clínica

Aquesta diversitat de rols dota a p27 d'una importància a nivell patològic, sobretot tumoral. Els ratolins p27^{-/-} mostren gigantisme i hiperplàsia multiorgànica, a més d'esterilitat femenina, displàsia retinal i tumors pituïtaris (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996). Totes aquestes funcions estarien lligades al paper inhibidor del cicle cel·lular que té p27.

Malgrat la possible funció de p27 com supressor de tumors, les seves mutacions són infreqüents (Pietenpol et al., 1995; Ponce-Castañeda et al., 1995), encara que cada vegada es descriuen més (Bencivenga et al., 2017). La leucèmia de cèl·lules piloses és un tipus de leucèmia limfoide crònica de cèl·lules B deguda en la gran majoria de casos a mutacions al proto-oncogen de b-Raf, sent la segona mutació més trobada al gen de p27 (Dietrich et al., 2015).

S'ha demostrat que la haploinsuficiència (p27^{+/-}) en ratolins és suficient per la generació de tumors davant radiació γ o carcinògens químics (Fero et al., 1998). A més, els ratolins amb una p27 deficiente per la unió de CKDs (p27^{CK-}) mostren tumorogènesi espontània en diferents òrgans, a més dels defectes ja prèviament descrits en ratolins KO (Besson et al., 2007). És a dir, p27^{CK-} té un paper oncogènic al pertorbar la homeòstasi normal de cèl·lules mare i promoure la seva expansió (Besson et al., 2007).

En conseqüència, la gran majoria de tumors mostren una reducció general dels nivells de p27 o deslocalització al citosol que correlaciona

Introducció

amb un mal pronòstic. S'ha relacionat agressivitat histològica i mortalitat amb càncer pulmonars, de cap i coll, colorectals, d'ovari o de mama (Chu et al., 2008), a més de melanomes, gliomes, sarcomes, leucèmies, entre altres (Slingerland & Pagano, 2000).

Src és una quinasa amb activitat augmentada en molts tumors (Mayer & Krop, 2010) i que es relaciona amb la baixada general dels nivells de p27 (Chu et al., 2007), al ser necessària per l'activació dels complexos CDK-ciclina i la posterior degradació de p27. L'increment de l'expressió de diferents ubiquitin lligases com Skp2 o Pirh2 en diversos tumors s'ha lligat al descens generalitzat de p27 (Bretones et al., 2011; Shimada et al., 2009). Els increments de c-myc, que redueix els nivells de p27 per diversos mecanismes, són habituals en diferents càncers (Bretones et al., 2011). De forma semblat, els miRNA-221 i miRNA-222, desregulats en molts tumors, correlacionen amb baixos nivells de p27 (le Sage et al., 2007).

D'altra banda, l'eix PI3K/AKT es troba també incrementat en molts càncer (Xia & Xu, 2015) i s'ha relacionat a la deslocalització nuclear de p27 en diferents tumors i un major potencial metastàtic degut a la inhibició de l'eix RhoA/ROCK (Larrea et al., 2009; Wu et al., 2006). Els elevats nivells de l'exportador nuclear CRM1 o de la quinasa PIM en diversos càncers també podrien contribuir a aquesta deslocalització (Morishita et al., 2008; Wang et al., 2014).

Per tant, diferents estratègies terapèutiques, com són els inhibidors de quinases per Src, Akt o PIM o inhibidors d'ubiquitin lligases per Skp2 o Pirh2, poden ser utilitzades per incrementar els nivells generals de p27 i revertir la translocació nuclear.

5. La via de Notch

La ruta de senyalització de Notch (**Fig. 9**) és una via proliferativa conservada evolutivament i associada al desenvolupament i el manteniment de cèl·lules mare. Participa en diferents processos embrionaris, com la neurogènesi, l'hematopoiesi o l'angiogènesi, i a l'homeòstasi tissular del intestí o la pell, entre altres. La desregulació de la via provoca diferents malalties genètiques, com la Síndrome d'Alagille o CADASIL, i tumorogènesi.

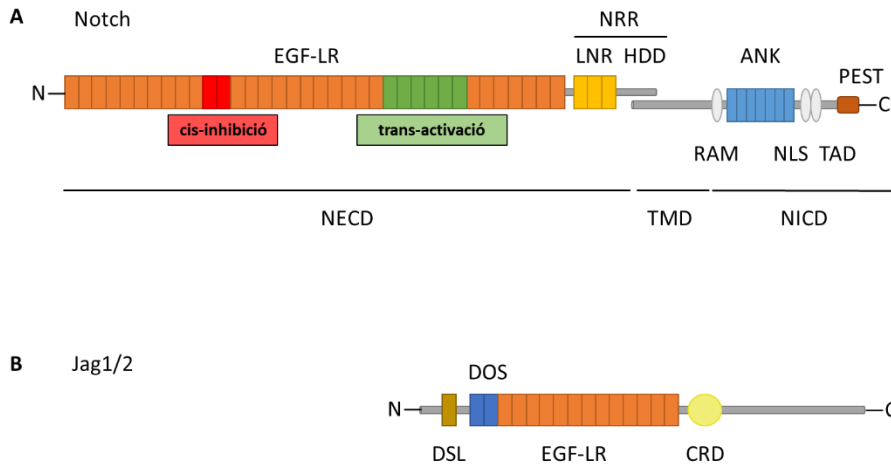


Figura 9. Estructura dels components *upstream* de la via de Notch. (A) Estructura del receptors Notch1 I Notch2. Els receptors Notch3 I Notch4 tenen menys dominis EGF-LR i manquen del TAD (no mostrat). Es marquen les regions que reconeixen al lligand (verd) i permeten la trans-activació del receptor, així com la regió del receptor que pot interaccionar amb altres receptors Notch de la mateixa cèl·lula i inhibir la senyalització (vermell). Al domini HDD es produeix el primer tall proteolític un cop s'activa el receptor. Els altres dos talls es situen entre el final del domini transmembrana (TMD) i el començament de NICD. (B) Estructura dels lligands Jag1 i Jag2. Els lligands tipus Dll tenen menys dominis EGF-LR i manquen del CRD (no mostrat). Els dominis DSL i DOS reconeixen els receptors Notch i activen la via de senyalització.

5.1. Components de la via

La via consta de quatre isoformes de receptor (Notch 1-4) i cinc lligands (Dll 1, 3 i 4; Jagged 1-2), a més d'un element d'unió a DNA (CSL). Tant els receptors com el lligands són proteïnes transmembrana

Introducció

d'un únic pas tipus I (**Fig. 9**). Els receptors de Notch presenten una estructura semblant: entre 29 i 36 repeticions en tàndem similars a EGF i tres LNR al domini extracel·lular, mentre al intracel·lular hi ha un domini d'unió a CSL (RAM), una seqüència PEST i set repeticions ANK. D'altra banda, els lligands tenen 6-16 repeticions EGF i un domini d'unió a Notch (DSL) a la part extracel·lular i un domini intracel·lular curt i molt variable.

Després de la seva síntesi, Notch és tallat parcialment a l'aparell de Golgi per la proteasa Furin. Així, es forma un fragment extracel·lular llarg i una petita porció corresponent a la regió transmembrana i intracel·lular, que s'uneixen per interaccions no covalents dependents de Ca^{2+} per conformar el heterodímer madur (Li et al., 2017).

Durant el seu pas pel Golgi, el domini extracel·lular pot sofrir diferents glicosilacions a les repeticions EGF, com addicions de fucosa, glucosa i N-acetilglucosamina per O-fucosiltransferases (POTUF1), O-glucosiltransferases (POGLUT 1) i GlcNac-transferases (EOGT1), respectivament. La monofucosa pot ser estesa amb N-acetilglucosamines per proteïnes Fringe (Lunatic, Manic, Radical), mentre la O-glucosa pot ser allargada amb xiloses per xilotransferases (GXYLT1/2, XXYLT1). Aquestes PTMs afavoreixen el plegament i l'exportació de Notch a la membrana plasmàtica i regulen la seva interacció amb els lligands (Hori et al., 2013; Kovall et al., 2017).

5.2. Senyalització

Un cop a la membrana plasmàtica, Notch pot interaccionar amb el lligand presentat per altra cèl·lula, produint-se la trans-activació (**Fig. 10**). L'endocitosi del lligand a la cèl·lula presentadora provoca en el receptor l'extensió de la regió NRR, compostat pel domini LNR i el

HD. Així, es permet el tall d'aquesta regió de Notch per metaloproteases (ADAM10 o ADAM17). El domini intracel·lular es tallat per un complex γ -secretasa dos cops i s'allibera un fragment soluble (NICD), que transloca al nucli.

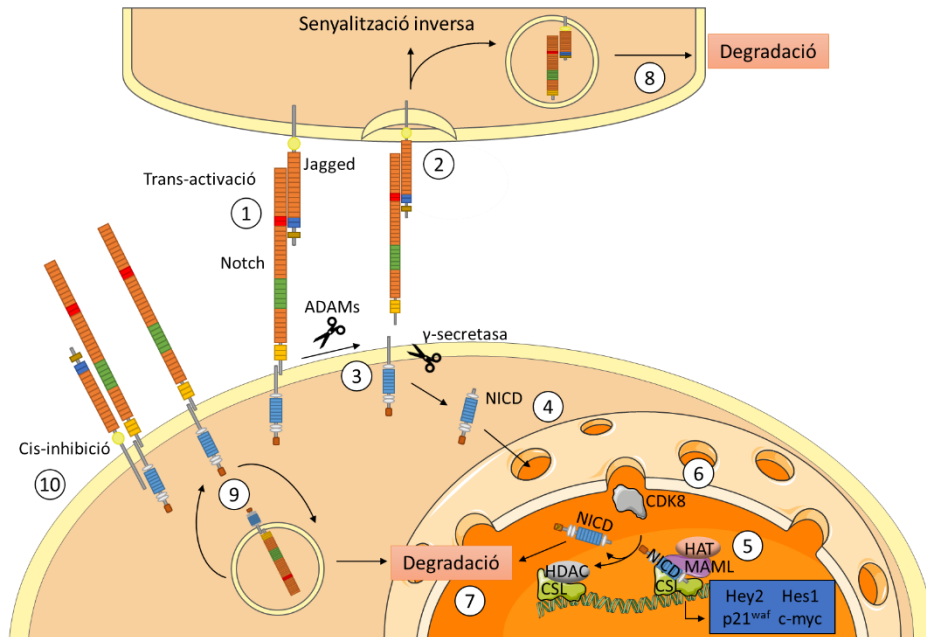


Figura 10. Via de senyalització de Notch. El reconeixement del lligand per part del receptor provoca la seva trans-activació (1). La endocitosis del lligand puja del domini extracel·lular del receptor (2), deixant al descobert el lloc de tall de les ADAMs (3). Un parell de talls més per la γ -secretasa al domini transmembrana del receptor provoquen l'alliberació de NICD (4), que transloca al nucli. La seva interacció amb CSL permet el canvi de HDACs pel coactivador MAML i diverses HATs (5). Així, s'expressen diferents gens diana, com membres de la família Hes i Hey, entre altres. La CDK8 fosforila la seqüència PEST de NICD (6) i afavoreix la seva degradació protosomal (7). A la cèl·lula presentadora, el lligand juntament amb el NICD també són degradats (8). Tant el lligand (no mostrat) com el receptor poden ser endocitats i, segons la necessitat de la cèl·lula, tornar un cop més a ser presentats o ser degradats via lisosomes (9). Malgrat que una cèl·lula presenti receptors i lligands al mateix temps, la seva interacció en cis és inhibidòria (10).

Al nucli, CSL està unit al DNA juntament amb HDACs i altres proteïnes repressores (NCoR/SMRT, Mint/Sharp/SPEN, FHL1, MTG8, CIR, PDCD4) (Siebel & Lendahl, 2017). L'arribada de NICD (Fig. 10) desplaça a aquests repressors i recluta el coactivador MAML, els modificadors de histones p300/CBP, PCAF i KAT2, entre altres (Yatim et al.,

Introducció

2012). Així, CSL s'activa i, en col·laboració amb altres factors de transcripció, permet la transcripció de diversos gens. La fosforilació de la seqüència PEST de NICD per CDK8 permet la seva posterior ubiquitinació per Fbw7 i subseqüent degradació protosomal, acabant així amb la senyal.

La via de Notch també es regula mitjançant el tràfic de membrana (**Fig. 10**). Tant el lligand (sol o unit al domini extracel·lular de Notch) com el receptor son ubiquitinats per E3 ubiquitin lligases (Mindbomb, Esqueletrofina i Neuralized 1-2 pels lligands; Deltex 1-4, Nedd4, Itch i Cbl pels receptors) i endocitats en vesícules de clatrina. Segons les proteïnes que es reclutin, aquestes vesícules es poden reciclar o ser degradades als lisosomes. Per exemple, Numb, en col·laboració amb NAK i ACBD3, és un regulador negatiu de Notch, ja que promou la degradació lisosomal del receptor.

Cal remarcar que la ruta de senyalització de Notch es trans-activada i cis-inhibida (**Fig. 10**). És a dir, la colocalització d'un receptor i un lligand a la mateixa cèl·lula, i en cas de que no hi hagi polaritat, impedeix que s'activin. Segons què predomini (lligand o receptor), la cèl·lula serà donadora o receptora de senyal. En qualsevol cas, es creu que el lligand un cop interacciona amb el receptor Notch també desencadena una senyalització inversa (Pelullo et al., 2019).

A més d'aquesta via de senyalització, s'ha descrit una ruta d'activació de Notch independent de CSL. En aquesta via no canònica poden participar lligands sense el domini DSL, com DNER, MAGP (1 i 2) o contactines (1 i 6), o ser independent de lligant. S'ha descrit que Notch sencer pot interaccionar amb β -catenina i impedir la seva translocació a nucli malgrat la presència de Wnt (Andersen et al., 2012).

Entre els diversos gens regulats per Notch, els més caracteritzats són els factors de transcripció bHLH (família Hes i Hey). Altres gens descrits són IL2RA, NRARP, Deltex-1, c-myc, ciclina D1, p21^{Cip1}, NFκB2, Ifi (202, 204 i D3), ADAM19, bcl-2, TCF3, HoxA (5, 9 i 10), ErbB2, MMP (2 i 9) i els propis Notch1 i Notch 3 (Borggreffe & Oswald, 2009; Li et al., 2017).

5.3. Paper tumoral de Notch

Degut a les seves propietats de manteniment de cèl·lules mare i la interacció amb altres vies proliferatives, s'ha vinculat la desregulació de la via de Notch a la tumorogènesi i el desenvolupament del càncer. Una major activitat de la ruta s'ha lligat a EMT i angiogènesi, creixement cel·lular, manteniment i renovació de CIC i resistència a la mort cel·lular.

El paper oncogènic de Notch es va identificar per primer cop en T-ALL, on es van trobar mutacions activants de *NOTCH1* a més de la meitat dels pacients (Weng et al., 2004). Les més importants estan al domini HD, afavorint l'activació independent de lligand, i a la seqüència PEST, incrementant l'estabilitat de NICD (Weng et al., 2004).

Encara que aquest paper oncogènic també s'ha descrit en tumors sòlids, com mama, colorectal, gàstric, melanoma, entre altres (Brzozowa-Zasada et al., 2017); en aquests tipus de càncers, les mutacions a la via de Notch son infreqüents (Ntziachristos et al., 2014). A més, les mutacions de *NOTCH1* trobades a T-ALL són insuficients, per se, per desenvolupar la malaltia (Chiang et al., 2008). Per tant, la tumorogènesi deguda a Notch requereix la activació d'altres oncogens (Andersen et al., 2012).

Introducció

D'altra banda, la via de Notch també pot actuar com a supressor de tumors en diferents càncers, tant sòlids com hematopoètics, incloent SSC, SCLC o B-ALL (Nowell & Radtke, 2017). A més, hi ha tumors on Notch sembla jugar papers contradictoris, com en HCC o medul·loblastoma (Ntziachristos et al., 2014), dependent del receptor implicat o el subtipus cel·lular, sense oblidar el paper del microambient tumoral.

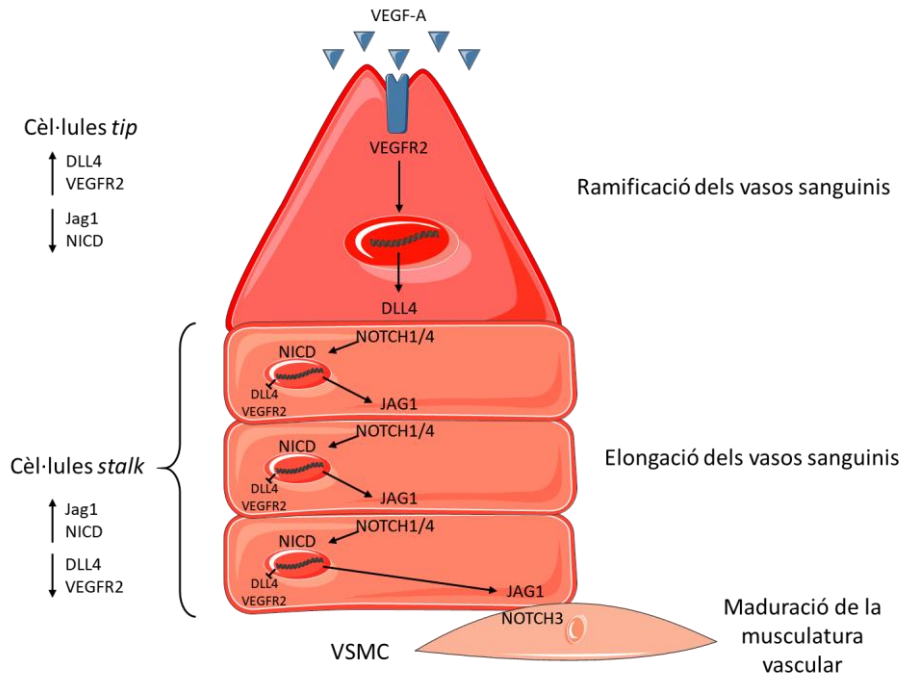


Figura 11. Regulació de l'angiogènesi per la via de Notch. La arribada de VEGF-A es reconeguda per la cèl·lula endotelial tip mitjançant VEGF-R2, que s'activa i porta a l'expressió del lligand DLL4. Aquesta cèl·lula tip presenta el lligand DLL4 a cèl·lules adjacents que presenten els receptors Notch1 i Notch4. L'activació en aquestes cèl·lules de la via de Notch inhibeix l'expressió de VEGF-R2 i DLL4 i promou l'expressió de Jag1. Aquest lligand Jag1 es presenta a altres cèl·lules adjacents, desencadenant la mateixa resposta (expressió de Jag1 i inhibició de VEGF-R2 i DLL4). Així, la cèl·lula *tip* impedeix que les cèl·lules adjacents tinguin el seu fenotip (limitació dels punts de ramificació als vasos sanguinis) i que adquireixin el fenotip *stalk*, el qual es potencia a la resta de cèl·lules i permet l'elongació del nou vas. A més, les cèl·lules *stalk*, mitjançant Jag1, promouen la maduració de les VSMC que les recobreixen.

La ruta de Notch pot ser activada des de l'estroma cap el tumor, des de el tumor cap a l'estroma i entre les cèl·lules de l'estroma (Meurette, 2020). A més de regular l'expressió de gens relacionat amb la EMT,

com snail-1 o E-cadherina (Sahlgren et al., 2008), la via de Notch està fortament relacionada amb l'angiogènesi (**Fig. 11**).

Notch i VEGF col·laboren en la generació de nous vasos sanguinis tant en processos fisiològics com als tumors, tenint un paper fonamental els lligands Jag1 i Dll4. La relació entre Jag1 i Dll4 es bastant complexa. En principi, tenen rols contradictoris (Benedito et al., 2009). Mentre les cèl·lules amb Dll4 (cèl·lules *tip*) comencen una nova branca de vasos sanguinis, les cèl·lules amb Jag1 (cèl·lules *stalk*) proliferen per augmentar la mida del nou vas.

En resposta a VEGF-A (**Fig. 11**), les cèl·lules endotelials *tip* expressen Dll4, que promou a les cèl·lules adjacents (*stalk*) l'activació de Notch i la inhibició de VEGF-R. Així, s'inhibiria un excés de ramificació. En canvi, l'expressió de Jag1 inhibeix l'expressió de Dll4 i VEGF-R, augmentant els nivells de Notch i reduint la resposta a VEGF. Per tant, Jag1 amplifica el senyal i promou el creixement de nous vasos sanguinis.

Un procés d'angiogènesi fisiològic requereix un equilibri entre Dll4 i Jag1, però els elevats nivells de Jag1 desemboquen en un fenotip híbrid de cèl·lula *tip/stalk* (Boareto et al., 2015). Així, es produiria una angiogènesi caòtica i amb vasos poc perfusats, típic de la vasculatura tumoral. No ha de resultar estrany, per tant, que els nivells incrementats de Jag1 o Notch1 correlacionen amb un mal pronòstic en diversos tipus tumorals (Brzozowa-Zasada et al., 2017; Li et al., 2007).

VEGF-A no només afavoreix l'expressió de Dll4, sinó també d'altres elements de la via de Notch, com Hey2 o el propi receptor Notch1 (Williams et al., 2006). Hey2 inhibeix la transcripció de VEGF-R2, pel que promouria el creixement cel·lular al afavorir la generació de vasos

Introducció

madurs i de baixa densitat (Williams et al., 2006). Sense Dll4/Hey2, s'inhibeix el creixement tumoral per una sobre-ramificació i la generació de vasos fins, fràgils i no funcionals (Ridgway et al., 2006).

La regulació tant de Hey2 com Dll4 en resposta a VEGF-A implica l'acció de la via PI3K/Akt i depèn de FOXC2 (**Fig. 12**) (H. Hayashi & Kume, 2008). Aquest factor de transcripció col·labora amb Notch per expressar Hey2 (H. Hayashi & Kume, 2008). A més, FOXC2 regula l'expressió de altres gens relacionats amb l'angiogènesi, com EphrinB2 o Ang-2, o la migració cel·lular, com CXCR4 i ZEB1 (Kume, 2008; Werden et al., 2016).

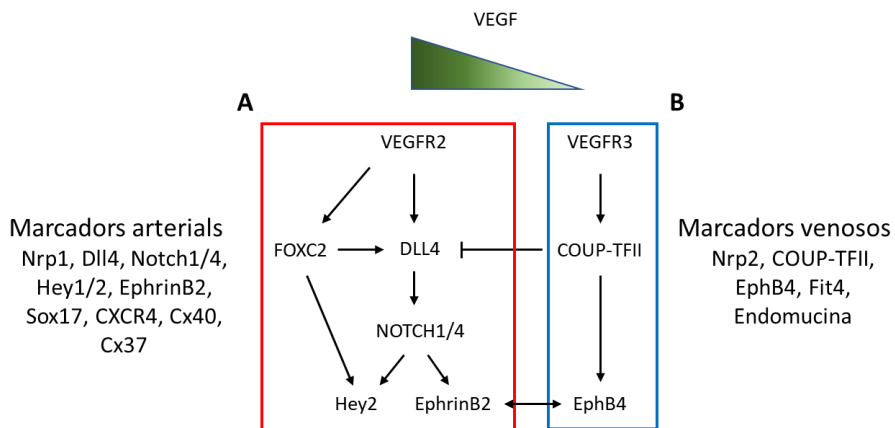


Figura 12. Diferenciació dels vasos sanguinis. (A) Els nivells de VEGF marquen el tipus de vas sanguini que es formarà. Una gran quantitat de VEGF activa el VEGFR2, que activa l'expressió de DLL4, directament i indirectament mitjançant FOXC2. El lligand DLL4 promou l'activació dels receptors Notch1 i Notch4 a les cèl·lules adjacents, permetent l'expressió de Hey2 i EphrinB2. A més, FOXC2 també activa l'expressió de Hey2 directament. Aquestes cèl·lules sotmeses a alts nivells de VEGF formaren artèries, que expressen Hey2 i EphrinB2 com marcadors característics. En canvi, el fenotip venós es desenvolupa sota baixos nivells de VEGF. (B) L'estimulació de VEGF-R3 porta a l'activació de COUP-TFII, un receptor nuclear que inhibeix l'expressió de DLL4 i promou la d'EphB4. El receptor EphB4 pot interaccionar amb el seu lligand EphrinB2, delimitant els fenotips arterial i venós.

EphrinB2 és un lligand transmembrana dels receptors EphB4, EphA3 i EphA4. La trans-activació d'aquests receptors desencadena la remodelació d'actina per acció de GTPases Rho (Noren & Pasquale, 2004).

D'altra banda, a la cèl·lula presentadora del lligand s'inicia una senyalització inversa que provoca l'activació de Src (Palmer et al., 2002). L'expressió d'EphA2, abundant en arteries, està relacionada amb l'angiogènesi, la remodelació del sistema limfàtic i amb l'estabilització de la vasculatura (Foo et al., 2006; Mäkinen et al., 2005).

S'ha de mencionar que l'activitat de FOXO2 està regulada positivament per CDK5 (Liebl et al., 2015) o les vies de PI3K/Akt i MAPK. Aquestes dues últimes poden ser activades per c-met, un receptor Tyr quinasa regulat per FOXO2 en col·laboració amb Ets1 (Cui et al., 2015; Gambarotta et al., 1996). Cal remarcar que tant CDK5 com Ets1 són dues proteïnes que interaccionen amb p27 i, curiosament, els nivells de FOXO2 en CIC varien al llarg del cicle, sent baixos a les fases G₁-S i alts durant G₂-M (Pietila et al., 2016).

5.4. p27 a la ruta de Notch

La relació entre p27 i la via de Notch no es massa coneguda, encara que es sap que Notch promou l'avanç al cicle mitjançant la sobreexpressió de Skp2, l'E3 ubiquitin lligasa encarregada de degradar p27 (Dohda et al., 2007; Sarmiento et al., 2005), i que inhibeix l'expressió directament de p27 per acció de Hey 2 (Havrda et al., 2006).

Diversos assaigs ChIP-Seq en diferents tipus cel·lulars de ratolí i humans han trobat que p27 s'uneix a la regió promotora del gen que codifica el coactivador MAML2 i Jag1 (Biçer et al., 2017; Yoon et al., 2019). A més, un anàlisi de *microarray* fet a aquest grup (**Taula 1**) comparant MEFs^{WT} versus MEFs^{p27^{KO}} va trobar l'alteració de diversos gens relacionats amb la via de Notch (Pippa et al., 2012). La major part dels gens de aquesta ruta estaven sobreexpressats en absència de p27, suggerint un paper de co-repressor transcripcional per part de p27 sobre

Introducció

la via de senyalització de Notch. És a dir, p27 actuaria com a un supressor de tumors, tal com fa en la seva implicació en el cicle cel·lular.

Taula 1. Gens relacionats amb la via de Notch trobats al *microarray* d'expressió en MEF.

GEN		PROTEÏNA	DESCRIPCIÓ	REGULACIÓ	CANVI
Ratolí	Humà				
<i>Efnb2</i>	<i>EFNB2</i>	EphrinB2	Gen diana Lligand dels receptors EphB4, EphA3 i EphA4 Angiogènesi Remodelació del citoesquelet	+	6,84
<i>Hey2</i>	<i>HEY2</i>	Hey2	Gen diana Factor de transcripció Angiogènesi	+	6,54
<i>Foxc2</i>	<i>FOXC2</i>	FOXC2	Factor de transcripció Regula i col·labora amb la via de Notch Angiogènesi EMT	+	3,48
<i>Dner</i>	<i>DNER</i>	Dner	Lligand no canònic Neurogènesi	+	3,38
<i>Jag1</i>	<i>JAG1</i>	Jagged1	Lligand canònic Angiogènesi Síndrome d'Alagille	+	3,2
<i>Cntn1</i>	<i>CNTN1</i>	Contactina1	Lligand no canònic de Notch Interaccions cel·lulars Neurogènesi	+	2,23
<i>Dtx4</i>	<i>DTX4</i>	Deltex4	Ring Finger E3 Ubiquitin Ligasa Regula endocitosis de Notch	+	2,04
<i>Notch2</i>	<i>NOTCH2</i>	Notch2	Receptor	+	1,58
<i>Tp63</i>	<i>TP63</i>	p63	Factor de transcripció de la família de p53 Regula positivament l'expressió de Jag1 i Jag2	+	1,57
<i>Wdr12</i>	<i>WDR12</i>	WDR12	Biogènesi ribosomal Possible regulació de la proliferació Interacciona amb NICD Relacionada amb problemes cardiovasculars	-	1,72
<i>Dtx3</i>	<i>DTX3</i>	Deltex3	Ring Finger E3 Ubiquitin Ligasa Regula endocitosis de Notch	-	1,59
<i>Notch3</i>	<i>NOTCH3</i>	Notch3	Receptor CADASIL	-	1,51

Per aquesta tesi es va decidir treballar amb les tres dianes (Ephb2, Hey2, Foxc2) i amb el lligand canònic (Jag1), al ser els gens que presentaven més canvis i tenir un paper ja establert en la tumorigènesi. Aquest gens estan lligats, com s'ha descrit abans, a un estadi pro-angiogènic i pro-metastàtic, és a dir, estadis més avançats de la tumorigènesi. Aquests estadis avançats, a més, correlaciona amb nivells reduïts de p27. Per tant, el descens dels nivells nuclears de p27 incrementaria l'expressió d'aquests gens, afavorint la metastasi i un mal pronòstic.

OBJECTIUS

The hardest part of research is always to find a question that is big enough that it is worth answering, but little enough that you actually can answer it.

Edward Witten

1. Hipòtesi de treball

Partint dels resultats previs obtinguts per aquest grup d'investigació, es planteja la següent hipòtesi de treball:

La proteïna p27 és un regulador de la via de Notch. Aquesta regulació es realitzaria, principalment, controlant la transcripció de diferents components d'aquesta ruta de senyalització, com per exemple el lligand Jag1 o el receptor Notch2. Tanmateix, es planteja que p27 podria regular l'expressió d'altres components d'aquesta via.

2. Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi és validar aquesta hipòtesi de treball en diferents línies cel·lulars. Per tal de fer-ho, s'han establert els següents objectius concrets:

1. Validar els resultats previs obtinguts en un *microarray* d'expressió realitzats en cèl·lules MEF deficientes en p27 vs. cèl·lules MEF control. En aquest *microarray* s'observava que els les cèl·lules MEF^{p27KO} tenien nivells més alts de mRNA de diferents components de la via de Notch respecte als controls.
2. Analitzar si la pèrdua de p27 indueix també un increment dels nivells de proteïna dels diferents components de la via de Notch.
3. Generar a partir de cèl·lules de càncer colorectal HCT116, clons p27KO mitjançant la tècnica CRISPR/CAS9 i analitzar en aquestes cèl·lules l'expressió de diferents components de la via de Notch, tant a nivell de mRNA com de proteïna.

Objectius

4. Analitzar el paper de p27 en l'expressió, tant a nivell de mRNA com de proteïna, de diferents elements de la via de Notch en línies cel·lulars derivades de leucèmies.
5. Estudi del paper dels complexos E2F4/p130 i CDK-Ciclina en la regulació de la via de Notch, seguint el model pre-establert en aquest grup.
6. Identificar quins dels components d'aquesta via estan directament regulats per p27.
7. Establir els mecanismes moleculars que participen en aquesta regulació.

MATERIALS & MÈTODES

It's not an experiment if you know it's going to work.

Jeff Bezos

1. Biologia molecular

1.1. *Vectors utilitzats*

1.1.1. Vectors virals

pVSV-G (Clontech): vector que expressa la glicoproteïna G del Virus de la Estomatitis Vesicular, una proteïna de càpsida vírica. S'utilitza juntament amb el vector pCMV- Δ R8.91 per a la infecció de cèl·lules eucariotes.

pCMV- Δ R8.91 (cedit per Dr. Didier Trono, EPFL): vector lentiviral de segona generació que conté diversos gens virals necessaris per a la formació de les partícules virals:

Gag (Group-specific antigen): poliproteïna que conformarà parts de la càpsida, la matriu y la nucleocàpsida viral.

Pol: transcriptasa inversa.

Rev: proteïna amb un senyal de localització nuclear que permet exportar el mRNA víric des del nucli.

1.1.2. Plasmidis

pEV833 (cedit per Dr. Eric Verdin, UCSF): vector d'expressió lentiviral utilitzat per la sobreexpressió proteica en cèl·lules eucariotes. Conté una seqüència LTR del VIH per la integració del plasmidi al genoma i el gen reporter GFP com a marcador de selecció. El gen de la resistència a l'ampicil·lina permet la selecció en cultius bacterians.

pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich): vector de expressió lentiviral utilitzat com a control negatiu als assaigs de silenciament gènic (*knock-down*), degut a l'absència d'un insert de shRNA. És l'esquelet de la resta de

Materials & Mètodes

plasmidis pels shRNA usats en aquesta tesi. Conté un gen de resistència a l'ampicil·lina i un altre a la puromicina per la selecció en cèl·lules bacterianes i eucariotes, respectivament.

pCMV-LacZ (Clontech): vector reporter que sobreexpressa la β -galactosidasa en cèl·lules de mamífer. Utilitzat per quantificar la taxa de transfecció als assaigs luciferasa.

pGL3-Promoter (Promega): vector reporter que conté el gen de la luciferasa. Conté una regió promotora constitutivament activa que pot ser regulada per *enhancers*.

1.2. *Cultius bacterians*

1.2.1. Soques i medis de cultiu

S'ha utilitzat bacteris competents de la varietat *Escherichia coli* DH5 α per l'expressió dels diferents vectors i posterior aïllament. El medi de cultiu usat tant en cultius en suspensió com sòlids ha estat el LB (Luria-Bertani).

Composició del medi LB: 10g/L Triptona, 5g/L extracte de llevat, 5g/L NaCl. Si calgués, antibiòtic 1 mg/mL (Ampicilina, Kanamicina o Cloramfenicol, segons la resistència codificada a cada vector d'interès). En el cas de les plaques de LB, s'hi addiciona 15g/L d'agar.

1.2.2. Transformació bacteriana

El protocol utilitzat per la incorporació de DNA plasmídic dins de cèl·lules bacterianes competents (transformació) ha estat el següent:

Descongelació de les cèl·lules competents en gel.

Afegir de 0,5-1 µg de DNA plasmídic en 100 µL de bacteris competents.

Incubació e gel 30 minuts i posterior xoc tèrmic (45 seg a 42°C). Es deixa el cultiu en gel durant dos minuts.

Afegir d'1 mL de medi LB sense antibiòtics. Incubar 1h a 37°C en agitació.

Centrifugar 1 min a 1700 G per descartar 900 µL de sobrenadant. Amb el medi restant, es re-suspenen els bacteris i es plaquen en plaques de LB amb l'antibiòtic corresponent per a la selecció de les colònies. Incubar tota la nit a 37°C.

Posteriorment, es fan amplificacions seriades a partir de la selecció d'un mínim de 4 colònies. Com control negatiu de la transformació es fa tot el procediment anterior en paral·lel amb una alíquota de cèl·lules bacterianes sense DNA plasmídic.

1.2.3. Purificació de DNA

Per obtenir i aïllar el DNA plasmídic d'aquests cultius bacterians, s'ha utilitzat el kit *Nucleospin® Plasmid QuickPure* per minipreps i el kit *NucleoBond® Xtra Midi Plus* per midipreps (ambdós *Macherey-Nagel*).

1.3. *Subclonatge*

Un cop obtinguts els vectors plasmídics d'interès, es realitzant les digestions específiques amb els enzims de restricció requerits tant al vector que conté el insert com al vector de destí. Es corren les mostres en un gel d'agarosa i es retallen les bandes resultants. Es purifica el DNA mitjançant el kit *QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)*.

Materials & Mètodes

Seguidament, es realitza una lligació entre el insert purificat i el vector receptor utilitzant la lligasa T4 (*Invitrogen*) a 16°C durant tota la nit. Posteriorment, es transforma la lligació en bacteris competents DH5 α , es purifica el DNA plasmídic i es comprova si s'ha produït la lligació desitjada per digestió amb enzims de restricció i anàlisi en gel d'agarosa. Com a control de re-lligació, es realitza el mateix procés en paral·lel però sense posar l'insert.

2. Cultius cel·lulars

2.1. Models cel·lulars i medis de cultiu

En aquesta tesi, s'han usat els següents models cel·lulars:

MEF (*aquest laboratori*): línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí. Cultivada en DMEM (*Biological Industries*), 10% sèrum fetal boví (*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

MEF^{p27KO} (*donada per Dr. Arnaud Besson, CNRS*): línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí deficientes per a la proteïna p27. Cultivada en DMEM (*Biological Industries*), 10% sèrum fetal boví (*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

MEF^{p130KO} (*donada per Dr. Anxo Vidal, USC*): línia cel·lular primària obtinguda de fibroblasts embrionaris de ratolí que manquen de la proteïna p130. Sense p130, E2F4 no pot mantenir-se unit al DNA i reprimir els seus gens diana. Per tant, s'utilitzen per estudiar la manca d'E2F4. Cultivada en DMEM (*Biological Industries*), 10% sèrum fetal boví

(*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

C17.2 (donada per Dr. Evan Snyder, SBP Discovery Institute): línia de cèl·lules progenitores neurals de ratolí immortalitzades. Establerta a partir de la transducció retroviral de l'oncogen myc aviar en cèl·lules del cerebel de ratolins nous de la soca CD1 x C57BL/6. Cultivada en DMEM (*Biological Industries*), 10% sèrum fetal boví (*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

HEK-293T (ATCC): línia procedent de cèl·lules de ronyó embrionari humà. Deriva de la línia cel·lular HEK-293, a la qual se li ha incorporat l'antigen T SV40. S'han utilitzat en tots els experiments de generació lentiviral emprats en aquesta tesi. Cultivada en DMEM (*Biological Industries*), 10% sèrum fetal boví (*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

HCT116 (ATCC): línia derivada d'un carcinoma de colon d'un pacient home de 48 anys. Útil per fer xenògrafts, el seu creixement pot ser inhibit per flavopiridol. Cultivada en una barreja 1:1 DMEM/Ham's F-12 (*Biological Industries* ambdós) suplementat amb 10% sèrum fetal boví (*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

Materials & Mètodes

HCT116^{p27KO} (aquest laboratori): línia derivada de HCT116 que ha sigut cotransfectada amb un plasmidi CRISPR/Cas9 control (sc-418922) i un plasmidi CRISPR/Cas9 p27KO (sc-400074), ambdós de Santa Cruz, usant Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen P/N 52887) i seguint el protocol del proveïdor. Per la generació estable de HCT116p27KO es va transfectar la línia comercial amb p27 Double Nickase Plasmid (sc-400074-NIC) i per la línia cel·lular control amb Control Double Nickase (sc-437281). Mitjançant *cell sorting* (FACSAriaII), es van aïllar individualment les colònies positives per GFP, es van sembrar en plaques de 96 pous i es van deixar créixer durant 2-3 setmanes fins arribar a la confluència. Es van subcultivar en plaques de 24, 12 i 6 pous amb la finalitat d'amplificar els cultius. Per a la validació de l'eficiència de la transfecció (supressió de l'expressió de la proteïna p27), es van realitzar western blots utilitzant anticossos anti-p27. Els clons HCT116p27KO seleccionats es van congelar en N_{2(l)} fins al moment de fer-los servir.

HL60: línia promielocítica derivada de la sang perifèrica d'una dona de 36 anys amb APL. Poden diferenciar-se en granulòcits amb els estímuls adequats. Cultivada amb RPMI (*Biological Industries*) suplementat amb 20% sèrum fetal boví (*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomicina (*Gibco*).

RS4;11: línia derivada del centre germinal de motlle ossi d'una dona de 32 anys amb ALL. Presenta l'anomalia cromosòmica t(4;11) i té una barreja de característiques de llinatge B i monocític. Cultivada amb RPMI (*Biological Industries*) suplementat amb 10% sèrum fetal boví

(*Biological Industries*), 2mM L-glutamina (*Merk*), 1mM àcid pirúvic (*Sigma*), 1% aminoàcids no essencials (*Biological Industries*) i 1% penicil·lina/estreptomina (*Gibco*).

2.2. Manipulació de cultius

2.2.1. Manteniment de cèl·lules en cultiu

Els cultius cel·lulars utilitzats en aquesta tesi s'han mantingut en incubadors (*Nuair*) a 37°C i a una pressió parcial de CO₂ del 5%. Totes les manipulacions s'han realitzat en condicions d'esterilitat en una cambra de flux laminar i amb el material prèviament autoclavat o ionitzat.

A més del material relatat en el subapartat anterior, s'ha utilitzat:

Xeringues (*ICO PLUS 3*) i filtres de 0,2 µm (*Millex*) per filtrar els diferents components que suplementaran al medi.

PBS per rentar les cèl·lules i eliminar detritus (restes de cèl·lules mortes) i medi amb sèrum. Composició: 7,65 g/L NaCl, 0,21 g/L KH₂PO₄ pH 7.2, 0,9 g/L Na₂HPO₄-2H₂O.

Tripsina-EDTA (*Gibco*) per disgregar les cèl·lules i desenganxar-les de la placa de Petri o flascó on es cultiven.

Plaques i flascons (*TPP*) de diferents mides pel manteniment i ampliació de cèl·lules.

2.2.2. Subcultiu de cèl·lules

Quan les cèl·lules estan en cultius subconfluents (al voltant del 70%) en creixement exponencial, es realitza el següent protocol de sembra:

Temperar prèviament el PBS, la solució de tripsina-EDTA 1x i el medi de cultiu.

Materials & Mètodes

Eliminar el medi del cultiu i rentar 1-3 cops amb PBS.

Treure el PBS i afegir un volum suficient de tripsina per cobrir la superfície de cultiu. Incubar a 37°C fins que les cèl·lules es desenganxin.

Neutralitzar la tripsina amb un volum equivalent de medi suplementat.

S'acaba de resusprendre les cèl·lules i, amb la dilució pertinent, es subcultiven segons els experiments requerits.

2.2.3. Criopreservació de cèl·lules

Amb el objectiu d'obtenir un stock de cèl·lules per preservar a -80°C o en N₂(l), es realitza el següent protocol de congelació:

Després de tripsinitzar les cèl·lules i neutralitzar-la, realitzar un comptatge en una càmera de Neubauer (*BRAND Blaubrand*) per determinar el número de cèl·lules/mL.

Centrifugar 5 min a 300 G la suspensió de cèl·lules i descartar el sobrenedant.

Resusprendre el pèl·let de cèl·lules amb el medi necessari per fer alíquotes de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL.

Afegir un 5-10% DMSO (*Sigma*), segons el tipus cèl·lular, i congelar a -80°C i, passat 2-3 dies, emmagatzemar en N₂(l).

En cas de voler recuperar un criovial, per descongelar es segueix el següent protocol:

Escalfar prèviament a 37°C el medi suplementat.

Posar el criovial en neu carbònica o un cooler i afegir el medi escalfat, passant de tant en tant el medi que es descongeli a un falcon amb medi.

Un cop tot el contingut del criovial hagi passat al falcon, centrifugar 5 min a 300 G.

Descartar el sobrenedant i resuspendre amb medi suplementat. Plauejar en un flascó F25 o una placa p60.

2.3. Sincronització de cèl·lules

Per poder estudiar cèl·lules en quiescència, es creix el cultiu fins la confluència (80-90%) i es manté en condicions de deprivació (medi en absència de FBS) durant 72h. L'èxit de la sincronització s'ha analitzat posteriorment a nivell proteic de marcadors específics de cicle cel·lular.

2.4. Transfecció de cèl·lules

Amb l'objectiu d'expressar una proteïna determinada en una línia cel·lular donada de forma transitòria (transfecció), s'utilitza el reactiu Lipofectamine 3000 (*Invitrogen*). La formació de liposomes que envolten el DNA d'interès (el plasmidi pEV833 buit o amb el gen de la proteïna concreta) permet la fusió amb la membrana plasmàtica de les cèl·lules i la introducció de aquest DNA plasmídic en la cèl·lula.

Cultivar les cèl·lules per tenir un 70-90% de confluència per dia de transfecció i deixar-les en medi de cultiu sense antibiòtics.

Preparar dos solucions en medi sense suplementar:

0,3-0,6% Lipofectamine 3000 Reagent

0,5-5 µg/µL DNA més 2 µL/µg DNA de P3000 Reagent

Materials & Mètodes

Barrejar ambdues solucions en proporció 1:1 i incubar durant 10-15 min a temperatura ambient.

Afegir els complexos DNA-lipídics a les cèl·lules. A les 24h post-transfecció, observar les plaques sota microscopi de fluorescència Axiovert 200M (*Zeiss*) per controlar l'eficiència de la transfecció.

Recollir el cultiu 48-72h després, coincidint amb la màxima expressió de la proteïna.

2.5. Producció lentiviral i infecció cel·lular

Per tal d'obtenir una expressió sostinguda durant el temps de un vector plasmídic determinat (infecció), primer s'ha de produir partícules lentivirals, capaces d'integrar-se al genoma cel·lular. Posteriorment, es recol·lecten els virus i s'incorporen a les cèl·lules d'interès. Finalment, es seleccionen mitjançant puromicina (*Sigma*).

Preparar una barreja amb els vectors virals i el plasmidi d'interès (relació 3:1:2 μg pCMV- $\Delta\text{R8.91}$:pVSV-G:shRNA, respectivament) en una solució de calci i HBS seguint el protocol de CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (*Takara*). D'aquesta forma, es neutralitzen les càrregues negatives del DNA i de la membrana plasmàtica i s'afavoreix la entrada dels vectors a la cèl·lula.

Després de 5-15 min d'incubació, afegir la barreja a les cèl·lules HEK-293T (confluència al 50-80%) i canviar el medi a les 8-16 hores.

A les 48-72 hores, recollir el medi que conté les partícules virals i filtrar-lo (0,45 µm, *Millex*).

Afegir el medi filtrat a les cèl·lules d'interès juntament amb 5 µg/ml Polybrene (*Sigma-Aldrich*), un polímer catiònic per optimitzar les possibilitats d'infecció.

A les 24h, fer la primera selecció per puromicina (10µg/ml). A les 48h, canviar el medi i afegir novament puromicina. Recollir les cèl·lules i analitzar per western blot l'èxit del silenciament.

2.6. Processament de cèl·lules

Per poder obtenir un pèl·let amb el que treballar:

Després de tripsinitzar el cultiu i neutralitzar la tripsina, recollir el volum de la placa i centrifugar 5 minuts a 4°C i 300 G.

Rentar el pèl·let de cèl·lules amb PBS i centrifugar. Repetir.

Guardar el pèl·let a -80°C.

2.6.1. Lisi

Per analitzar el patró d'expressió proteica, es segueix el següent protocol d'extracció:

Resuspendre els pèl·lets amb un volum adient de tampó de lisi i incubar 15-30 min a 95°C en agitació.

Centrifugar les mostres 10 minuts a 4°C i 11000 G per sedimentar les restes cel·lulars no solubilitzades així com el DNA. El sobrenedant es transfereix a un tub de microcentrífuga i es guarda a -20°C.

- Composició tampó de lisi: 80 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS

Materials & Mètodes

2.6.2. Quantificació proteica

Mitjançant el kit DC Protein Assay (*Bio-Rad*), que utilitza un mètode semblant a l'assaig Lowry, es quantifica la concentració proteica. A diferència de l'assaig de Bradford, la reacció de Lowry no es veu afectada per la presència de SDS. L'assaig de Lowry és una tècnica colorimètrica que es basa en la reacció de ions de coure amb enllaços peptídics i l'oxidació de residus aromàtics. Seguint el protocol, es mesura en una placa de 96 pous a 750 nm al lector de plaques Synergy 2 (*Biotek*).

Realitzar una recta patró amb concentracions de BSA creixents (1-8 µg/pou). Fer duplicats.

Pipetejar 1 µL de la mostra. Fer duplicats.

Afegir 25 µL de la barreja A/S (20 µL solució S per cada 1 mL solució A) i 200 µL reactiu B.

Després de 15 min, mesurar a 750 nm.

3. Anàlisi de proteïnes

3.1. Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Per analitzar el patró d'expressió proteica, es separen las proteïnes segons el seu pes molecular en un gel SDS-PAGE en condicions desnaturalitzants seguint el mètode de Laemmli. Les proteïnes desnaturalitzades i amb una càrrega neta negativa per acció del SDS es desplacen a través d'una matriu d'acrilamida i bis-acrilamida impulsades per la força d'un camp elèctric. Segons el pes molecular de les proteïnes, la seva mobilitat variarà.

Com les molècules d'aquest detergent iònic s'uneixen a les proteïnes en proporció a la seva mida, la relació massa/càrrega es sempre igual, in-

dependentment de la proteïna. Per tant, totes les proteïnes migren cap al pol positiu del camp elèctric generat amb la mateixa força, però la seva velocitat de migració dependrà de la facilitat per migrar a través de la xarxa d'acrilamida i bis-acrilamida que componen el gel. És a dir, segons la mida, ja que les proteïnes petites passen més ràpids pels porus de la matriu i arribaran abans que les grans al final del gel.

El gel consta de una secció empaquetadora de baix percentatge d'acrilamida (3,6%) i un pH lleugerament àcid (6.8), que permet que totes les mostres es compacten i les proteïnes comencen a corre a la vegada, i una secció resolutiva amb pH bàsic (8.8) i de diferents percentatges d'acrilamida (6-15%) en funció de la mida de las proteïnes a separar (alt percentatge d'acrilamida per proteïnes de baix pes molecular i viceversa).

Per preparar el gel resolutiu, barrejar els components, abocar la solució entre els vidres de muntatge. Per sobre, afegir aigua o isopropanol per evitar el contacte entre el gel i l'oxigen, un inhibidor de la reacció de polimerització.

Una vegada polimeritzat, decantar l'aigua o l'isopropanol abocar la solució empaquetadora. Col·locar una pinta abans de que polimeritzi i que permetrà la formació de pous.

Després de que hagi polimeritzat, treure la pinta i posar el gel en una cubeta Mini Protean (*Bio-Rad*). Afegir el tampó electròlit.

Els lisats prèviament quantificats es dilueixen en tampó de mostra prèviament escalfat i s'escalfen les mostres 5 min a 95°C. D'aquesta manera, es desnaturalitzen les proteïnes per acció del SDS, es redueixen els ponts de disulfur per efecte del DTT, s'incrementa la densitat de la

Materials & Mètodes

mostra perquè no difongui gràcies al glicerol i es tenyeix amb blau de bromofenol per indicar el front d'avanç proteic. Es carregen 50 µg de proteïna per pou previ spin a la microcentrífuga Minispin (*Eppendorf*) i es marca un voltatge inicial de 80-100 V per promoure l'empaquetament de les mostres. Quan hagin entrat al gel resolutiu, s'augmenta fins 120-150 V. El marcador de pes molecular utilitzat ha estat el Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards (*Bio-Rad*).

3.2. Western Blot

3.2.1. Electrotransferència

Un cop finalitzada l'electroforesi, las proteïnes es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa (Schleicher & Schurell) seguint el mètode descrit per Renart (Renart et al, 1979) i Towbin (Towbin et al, 1979).

S'hidraten les membranes de nitrocel·lulosa (Trans-Blot® Transfer Medium, *Bio-Rad*) i el gel d'acrilamida en tampó de transferència. Es munten les plaques de transferència (*sandwich*) i es col·loquen dins del sistema Mini Trans-Blot® Electroforesis Transfer Cell (*Bio-Rad*) en tampó de transferència i aplicant un voltatge constant de 90 V durant 90 minuts. Com la membrana està al pol positiu del camp i el gel al pol negatiu, les proteïnes carregades negativament pel SDS migren cap a la membrana, on queden retingudes. Posteriorment, es tenyeix amb Pon-ceau S (*Sigma*) les membranes per comprovar l'èxit de la transferència.

3.2.2. Immunorevelat

Per detectar les proteïnes d'interès transferides a la membrana de nitrocel·lulosa, es segueix el següent protocol:

Taula 2. Llistat de solucions emprades durant l'assaig electroforètic i el Western Blot.

TAMPÓ	COMPOSICIÓ (CASA COMERCIAL)
Solució 1	750 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,2% SDS
Solució 2	30% Acrilamida, 0,8% Bis-acrilamida
Solució 3	250 mM Tris-HCl pH 8, 192 mM Glicina, 0,1% SDS
APS 13%	(Bio-Rad)
TEMED	(Bio-Rad)
Tampó de mostra (4X)	60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.5 mg/ml DTT, 10% Glicerol, 0.1 mg/ml Blau de Bromofenol
Tampó electròlit	10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.1% SDS, 76,8 mM Glicina
Tampó transferència	25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0.02% SDS, 20% Etanol
TBS-T	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20
Solució de bloqueig	5% llet en pols diluït en TBS-T
Solució d'anticòs primari [†]	1% BSA, 0,5% llet en pols, 0,1% azida sòdica en TBS

[†]En alguns casos, la solució d'anticòs primari ha estat un 5% BSA en TBS-T, seguint les indicacions del proveïdor.

Incubar amb solució de bloqueig durant 1h en agitació a temperatura ambient per impedir la unió inespecífica dels anticossos.

Incubar amb l'anticòs primari corresponen (reconec la proteïna d'interès) a 4°C durant tota la nit en agitació o estàtic.

Rentar amb tampó TBS-T tres cops durant 5 minuts per treure el excés d'anticòs.

Incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa, que reconec la part constant del anticòs primari, 1h a temperatura ambient i en agitació. Utilitzat una dilució 1:2000 en una solució de 0,5% llet en pols dissolta en TBS-T .

Rentar amb tampó TBS-T tres cops durant 10 minuts per treure el excés d'anticòs secundari.

Per a una detecció quimioluminiscent de la reacció Ag-Ab, s'incuba la membrana amb una barreja dels líquids del kit Cla-

Materials & Mètodes

rity ECL (*Bio-Rad*) durant un minut. Aquest kit conté peròxid d'hidrogen, substrat de la peroxidasa, i una solució que potencia la luminescència produïda.

Retirar l'excés de líquid i es col·loca la membrana dins d'un plàstic transparent. A una cambra fosca, es posa un film d'autoradiografia Medical X-Ray Film (*Agfa*) dins d'un *cassette* de revelar, protegit de la llum. Després d'un temps d'exposició determinat, utilitzar la màquina de revelar Curix 60 (*Agfa*).

Taula 3. Llistat de anticossos utilitzats als Western Blots.

ANTICOS PRIMARI	REFERÈNCIA COMERCIAL	HOSTE	DILUCIÓ
Maml2 (D41E6)	Cell Signaling No. 6988	Conill	1:500
Jag1	Thermo Fisher Scientific No. MA5-15012	Conill	1:500
Notch2 (D76A6)	Cell Signaling No. 5732	Conill	1:5000
FOXC2 (G7)	Santa Cruz Biotechnology No. sc-515234	Ratolí	1:500
Hey2	Origene No. TA315251	Conill	1:500
EphrinB2	Santa Cruz Biotechnology No. sc-398735	Conill	1:500
p27	BD Transduction Laboratories No. 610242	Ratolí	1:1000
p130 (C20)	Santa Cruz Biotechnology No. sc-317	Conill	1:500
γ -tubulina	Sigma-Aldrich No. T5192	Conill	1:1000

3.3. Immunoprecipitació de proteïnes (IP)

Per detectar possibles interaccions entre proteïnes en un lisat cel·lular, es precipita una proteïna d'interès amb un anticòs específic (immunoprecipitació) i amb la tècnica d'immunorevelat es comprova quines proteïnes interaccionaven directa o indirectament amb la proteïna d'interès.

Materials & Mètodes

Lisar els pèl·lets cel·lulars amb tampó Co-IP durant 15 minuts a 25°C amb DNAsa i 45 minuts més a 4 °C en agitació.

Centrifugar durant 5 minuts a 600 G a 4 °C.

Recollir el sobrenedant i quantificar la concentració de proteïna com s'ha descrit prèviament.

Incubar 1 mg de lisat proteic amb 4 µg de l'anticòs d'interès o IgG (control) i afegir tampó Co-IP fins els 500-600 µl per tub. Deixar en agitació a 4°C durant tota la nit. D'altra banda, separar un tub amb l'input, que contindrà 50 µg de la mostra, guardar a -20 °C amb tampó de mostra.

Addicionar 20 µl de boles magnètiques Dynabeads (*Invitrogen*), prèviament rentades amb PBS, unides a proteïna A o G, segons el anticòs utilitzat. Incubar durant 1 hora en agitació a 4 °C.

Posar les mostres en un imant durant 2 minuts i guardar el sobrenedant com a fracció no unida.

Rentar les *beads* 5 cops amb tampó Co-IP, usant l'imant per succionar, per eliminar unions no específiques.

Eluir les proteïnes unides a les *beads* amb 30 µl d'una solució de citrat 2,5 M durant 2 minuts.

Afegir 10 µl de tampó de mostra 4X i 1-2 µl de 1M Tris per neutralitzar el pH àcid.

Carregar l'input i les mostres en un gel SDS-PAGE, transferir i immunorevelar.

Materials & Mètodes

- Composició tampó Co-IP: 1 mM EDTA, 100 μ M Na₃VO₄, 0.5% Tritó X-100, 20 mM β -Glicerol fosfat, 0.2 mM PMSF; tot en PBS.

4. Anàlisi d'expressió

4.1. Extracció RNA

A partir de pèl·lets cel·lulars, s'extrau el mRNA mitjançant el High Pure RNA Isolation kit (*Roche*). Es lisa el pèl·let amb el tampó de lisi proporcionat pel kit i es transfereix aquest lisat a una columna, on queden retinguts els àcids nucleics al filtre. S'incuba durant 15 min amb DNAsa per eliminar el DNA genòmic i mitocondrial. Després de rentar els filtres, s'elueix el RNA i es quantifica en un espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (*Thermo Scientific*).

4.2. Retrotranscripció

Utilitzant el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystems*), es retrotranscriu 1 μ g del mRNA prèviament obtingut a cDNA mitjançant PCR.

4.3. qPCR

La PCR quantitativa o en temps real permet detectar els nivells d'expressió d'un gen donat en una mostra qualsevol a partir del cDNA retrotranscrit. En cada cicle de PCR, es mesura la fluorescència de la mostra. Degut a l'amplificació exponencial, la quantitat de DNA es proporcional al nombre de cicles necessaris per detectar fluorescència per sobre d'un llindar prèviament establert (CT).

S'utilitza el kit Express Syber Green qPCR Supermix (*Invitrogen*). En cada pou d'una placa de 96 pous (*Agilent Biosystems*) es pipetegen 0,3

μM primers (*forward* i *reverse*) (**Taula 4**), 1 μg cDNA, la *Supermix 2X* i la DNA polimerasa del kit. La placa es col·loca en un termociclador Mx3005P (*Stratagene*) i es programa la PCR amb el següent perfil:

- i. 5 minuts a 95°C
- ii. 15 segons a 95 °C
- iii. 60 segons a 60 °C (punt de lectura)
- iv. Repetició des de el pas ii, 40 cicles
- v. 1 minut a 95°C
- vi. Disminució gradual de la temperatura fins a 55 °C (lectures constants per a la corba de dissociació)
- vii. Manteniment a 4°C

Se obtenen valors en unitats de CT, que representant de forma inversa la quantitat de DNA. Quant més baix és el número de CT, més quantitat de DNA té la mostra i viceversa. Com a control de la tècnica, s'utilitza un gen que estigui expressat de forma constitutiva en totes les mostres.

4.4. Assaig luciferasa

Per analitzar la modificació de l'expressió d'un determinat gen, es subclona una regió donada en el pGL3-promoter. Mitjançant Lipofectamine 3000, aquest vector pGL3 clonat es co-transfecta juntament amb el vector pCMV-LacZ en les cèl·lules d'interès. De forma paral·lela, es cotransfecta un vector pGL3 buit amb el plasmidi pCMV-LacZ. D'aquesta manera, es controla la taxa de transfecció segons la expressió de galactosidasa i els canvis en la luminiscència degut a la regió clonada en comparació al vector pGL3 sense modificar.

En una placa de 6 pous, co-transfectar les cèl·lules segons el protocol de Lipofectamine 3000.

Materials & Mètodes

Taula 4. Llistat de primers utilitzats en qPCR en ratolí (Gen) i en humà (GEN).

<i>Jag1</i>	F	5' -GAATTACTGTGGGACTCATC
	R	5' -GAGAACACTCACACTCAAG
<i>Notch2</i>	F	5' -AGGACAATAAGGAAGAGACAC
	R	5' -CTGGGAGTCACGTTATACTC
<i>Foxc2</i>	F	5' -ACCAGGCTATTTTGTTCCTG
	R	5' -ATTTTATCATGGTGACGTGG
<i>Hey2</i>	F	5' -AGAAAAGGAGAGAGGGATCATAAC
	R	5' -CCTTTCTAACTTGGCAGATCC
<i>Efnb2</i>	F	5' -GGGTCTAGAATTTTCAGAAGAAC
	R	5' -CTTGTCCAACTTTCATGAGG
<i>Gapdh</i>	F	5' -ACCCAGAAGACTGTGGATGG
	R	5' -ACACATTGGGGGTAGGAAC
<i>JAG1</i>	F	5' -ACTACTACTATGGCTTTGGC
	R	5' -ATAGCTCTGTTACATTCCGGG
<i>NOTCH2</i>	F	5' -GATGACCATGGAAAATCTGC
	R	5' -TTGGCAAAAATGGTCTAACAG
<i>FOXC2</i>	F	5' -CTACGACTGCACGAAATAC
	R	5' -CTTAATTGTCTGGTTGGGTC
<i>HEY2</i>	F	5' -GGATTATAGAGAAAAGGCG
	R	5' -GTTTTTCAAAGCAGTTGGC
<i>EFNB2</i>	F	5' -AAAGTTGGACAAGATGCAA
	R	5' -TGTACCAGCTTCTAGTTCTG
<i>GAPDH</i>	F	5' -ACAGTTGCCATGTAGACC
	R	5' -TTTTTGGTTGACCACAGG
<i>B2M</i>	F	5' -GACTTGTCTTTCAGCAAGGA
	R	5' -ACAAAGTCACATGGTTTACACA

Després de 48-72h, aspirar el medi i rentar amb PBS, mantenint la placa en gel.

Afegir 150 µl/pou de Reporter Lysis Buffer (*Promega*) i resuspendre les cèl·lules.

Recol·lectar la suspensió en tubs de microcentrífuga i congelar a -80°C durant 30 minuts o més.

Descongelar en gel i centrifugar 10 minuts a 11000 G i 4°C.

Passar el sobrenedant a un nou tub.

Per mesurar l'activitat β -galactosidasa en una placa de 96 pous, carregar per pou 20 μ l de mostra i 50 μ l ONPG (*Sigma*), substrat de l'enzim i que s'hidrolitza en un compost cromogènic. Incubar la reacció durant 30 minuts o més i llegir absorbància a 420 nm al lector de plaques. Fer duplicats.

Per mesurar l'activitat luciferasa en una placa de 96 pous opaca, carregar 10 μ L de mostra per pou. Amb un luminòmetre GLO-MAX 96m (*Promega*), afegir 50 μ L Luciferase Assay Reagent (*Promega*) i llegir l'absorbància.

L'anàlisi de l'assaig luciferasa es basa en la relació luciferasa/ β -galactosidasa, obtenint unitats relatives de luciferasa (RLU).

5. Anàlisi de promotors

Per determinar les regions d'unió al DNA de diferents proteïnes i poder fer un posterior assaig luciferasa, s'han analitzat els promotors dels gens d'interés mitjançant eines bioinformàtiques per acotar seqüències de 2 kb a fragments menors. Es generen una sèrie de primers per amplificar per PCR aquestes regions més petites, que es purifiquen per assaigs de immunoprecipitació de cromatina.

5.1 Eines bioinformàtiques

Per identificar possibles llocs d'unió dels factors de transcripció E2F4 i Ets1 a la regió *upstream* i promotora de diversos gens, s'utilitzen diversos programes bioinformàtics per trobar regions in silico que poguessin unir aquets factors.

Materials & Mètodes

Després de l'obtenció de motius consens a la base de dades JASPAR dels factors de transcripció d'interès, s'analitza en FIMO the Meme Suit les seqüències promotores per cadascú dels motius consens amb una significació de 0,01 o 0,001.

D'aquestes regions de possible unió del factors, es dissenyen primers amb el programa Primer3 per amplificar per PCR després de realitzar un assaig ChIP (**Taula 5**).

Taula 5. Llistat de primers utilitzats per la qPCR als assaigs ChIP.

Hey2	F	5' -GAGAGATCACGGCTTGCAG
	R	5' -CGGTGTGGCTTTCTATTGGT
Maml2	F	5' -AGCCTGGTCCTAGCACCTTT
	R	5' -AGGCCACACCTCCTAATCCT

5.2. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)

Per determinar si una proteïna donada pot regular la expressió d'un gen determinat, es realitza la tècnica de ChIP per trobar les regions d'unió al DNA genòmic d'aquesta proteïna donada. Els tampons utilitats es detallen a la **Taula 6**.

Fixació dels cultius cel·lulars (Crosslink)

Afegir la solució Crosslink (1:10) a diverses plaques p150. Deixar 15 minuts en agitació a temperatura ambient.

Afegir la solució STOP (1:10) a les plaques. Deixar 10 minuts en agitació a 25 °C.

Rentar 2 vegades amb PBS estèril (*Sigma*).

Afegir 2 ml de PBS estèril amb 5mM EDTA (*Sigma*) i 1:50 cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (*Roche*) per placa. Amb

l'ajuda d'un *scraper* recollir les cèl·lules mentre la placa està sobre gel.

Rentar 3 cops amb PBS estèril, centrifugant a 600 G i disgregant bé el pèl·let de cèl·lules cada cop.

Descartar el sobrenedant. Congelar a -80 °C o continuar amb el protocol.

Taula 6. Llistat de solucions i tampons emprats a l'assaig de ChIP.

TAMPÓ	COMPOSICIÓ
Buffer 5X	250 mM Hepes pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA
Solució Crosslinking	Buffer 5X, 1 % formaldehid
Solució STOP	10 mM Tris pH 8, 1,5 M glicina
Tampó de lisi (ChIP)	10 mM Tris pH 8, 0,4% Tritó X-100, 10 mM EDTA
Tampó de sonicació	10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1mM EDTA
Tampó RIPA	10 mM Tris pH 8, 0,5% deoxicolat sòdic, 150 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 0,1% SDS, 2 mM EDTA
Tampó Liti	10 mM Tris pH 8, 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% DOC, 1 mM EDTA
Tampó TE	10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA

Lisi i sonicació

Afegir 1 ml de tampó de lisi per cada 0,1 mL de pèl·let i deixar-ho 30 minuts a 4 °C en agitació.

Rentar 3 vegades amb PBS estèril, centrifugant a 600 G i disgregant bé el pèl·let.

Afegir 500 µl de tampó de sonicació amb 1% SDS i PIC per 0,1 mL de pèl·let.

Sonicar la mostra durant 10-20 minuts a amplitud alta, en cicles de 30 segons, amb 30 segons de descans entre cicles, en el Biorupor Sonicator (*Diagenode*). Aquestes condicions són adequades per tal d'obtenir fragments de DNA entre 0,5-1,5 Kb.

Materials & Mètodes

Comprovar, mitjançant un gel d'agarosa al 1%, el resultat de la sonicació. Els fragments de DNA han de tenir al voltant de 1000 pb. Usar el estàndard de DNA Hyperladder I (*Bioline*).

Incubació

Mesurar la concentració de DNA a l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000.

De la mostra, guardar 5 µg com a input a -20°C. Incubar 25 µg de cromatina amb 16 µl de Magna ChIP Protein A/G beads magnètiques (*Millipore*) i 4 µg de l'anticòs d'interès (fer una incubació control sense anticòs). Afegir deoxicolat sòdic (*Sigma*), Tritó X-100 (*Sigma*) i NaCl (*Sigma*) per convertir el tampó de sonicació en tampó RIPA. Deixar en agitació a 4°C durant tota la nit.

Rentar 3 vegades amb Tampó RIPA durant 2 minuts a 4 °C en agitació.

Rentar 3 vegades amb Tampó RIPA 1M NaCl durant 2 minuts a 4 °C en agitació.

Rentar 2 vegades amb Tampó Liti durant 2 minuts a 4 °C en agitació.

Rentar 2 vegades amb Tampó TE durant 2 minuts a 4 °C en agitació.

De-crosslinking i elució

Utilitzar el kit IPure (*Diagenode*) per obtenir i purificar el DNA immunoprecipitat. Guardar les mostres a -20°C per al posterior

anàlisi per qPCR, usant els *primers* pels gens *Hey2* i *Maml2* descrits a la **taula 5**.

6. Anàlisi estadístic

L'anàlisi de dades s'ha realitzat mitjançant SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) i GraphPad Prism 6.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). Mentre el primer s'ha utilitzat als anàlisis de normalitat, amb el GraphPad s'han aplicat els anàlisis "T de Student" para determinar las diferències significatives i la realització de les gràfiques. Els p-valors inferiors a 0,05 s'han considerat significatius i s'han marcat amb un asterisc (* per p-valor < 0,05; ** per p-valor < 0,01; *** per p-valor < 0,001). Tots els experiments compten amb, al menys, tres mostres independents analitzades.

RESULTATS

We must trust to nothing but facts.

Antoine Lavoisier

CAPITOL 1

p27 & LA VIA DE NOTCH

1. La via de Notch en MEFs

1.1. Determinació dels nivells de mRNA de diferents components de la via de Notch en cèl·lules MEF quiescents

En primer lloc, es van realitzar experiments per tal de validar els resultats que s'havien obtingut en el *microarray* d'expressió dut a terme en cèl·lules MEF (WT i p27KO) quiescents. En aquest experiment, s'ha establert com al centre d'estudi els gens que presentaven els nivells de mRNA més elevats en les cèl·lules MEFp27KO respecte als controls. Concretament, gens diana de la via (*Efnb2*, *Hey2*), elements reguladors (*Foxc2*), a més d'un receptor (*Notch2*) i un lligand (*Jag1*). Així doncs, es va determinar els nivells de mRNA d'aquests components de la via de Notch emprant tècniques de qPCR. Els resultats (**Fig. 13**) indiquen que, de manera semblant als observats en el *microarray*, hi ha un increment en l'expressió d'aquests gens.

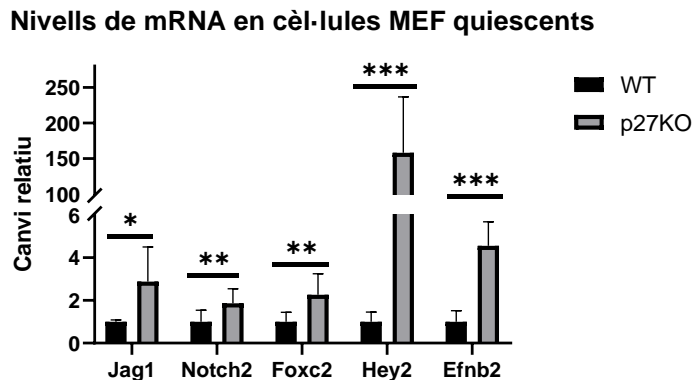


Figura 13. Expressió en quiescència. Comparativa entre MEF^{WT} i MEF^{p27KO} dels nivells d'expressió de mRNA de diferents elements de la via de Notch. Els valors significatius es marquen amb un asterisc (* per p-valor<0.05; ** per p-valor<0.001; *** per p-valor<0.0001).

Com es pot observar a la **Fig. 13**, els cinc gens d'estudi presentaven major nivells d'expressió en les cèl·lules MEF^{p27KO} respecte a les

Resultats

cèl·lules MEF^{WT}. A tots els casos, els increments eren significatius. Destacava la pujada del gen Hey2 (gairebé 160 cops més).

1.2. Determinació dels nivells de mRNA de diferents components de la via de Notch en cèl·lules MEF quiescents

A continuació, es va voler determinar si aquests augments en els nivells de mRNA observats en les cèl·lules MEFp27KO repercutien en un augment dels nivells de proteïna codificada pels gens anteriorment descrits (**Fig. 14**). L'anàlisi per western blot indica que els nivells de proteïna del lligand Jag1 incrementen en les cèl·lules MEF^{p27KO} respecte a les cèl·lules MEF^{WT}. En el cas de Notch2, es va analitzar la seva forma truncada i activa (NICD2). Tal i com es pot veure a la **Fig. 14**, també s'observa un increment de NICD2 en les cèl·lules p27KO.

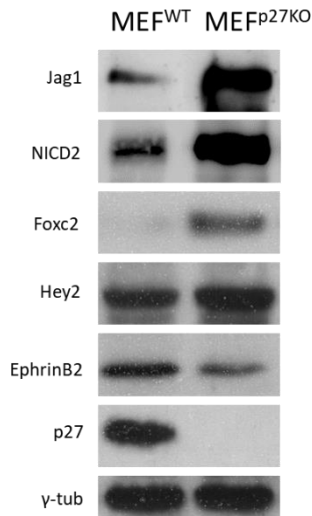


Figura 14. Expressió proteica en MEF quiescent. Al western blot es comparen els nivells dels diferents elements de la via de Notch entre MEF^{WT} i MEF^{p27KO}.

Això indica que en cèl·lules quiescents, l'absència de p27 promou l'expressió d'elements *upstream* de la via de Notch (ligand Jag1 i receptor Notch2). L'increment de Jag1 seria suficient per activar la via,

pel que s'observa amb l'increment de la forma activa del receptor Notch2 (NICD2).

De manera semblant al que s'observa amb els nivells d'expressió gènica, els nivells d'una diana d'aquesta via (Hey2) i un element regulador positiu (FOXC2) també es troben incrementats a les cèl·lules MEF^{p27KO}. En canvi, en aquestes cèl·lules s'observa un descens dels nivells proteics d'EphrinB2, contràriament a l'increment observat a nivell de mRNA. Això suggereix l'existència d'algun mecanisme addicional de regulació dels nivells d'aquesta proteïna.

1.3. Determinació dels nivells de mRNA de diferents components de la via de Notch en cèl·lules MEF proliferant asincrònicament

Una vegada analitzada la via de Notch2 en les cèl·lules quiescents, es van realitzar estudis en cèl·lules proliferant asincrònicament. En aquest cas, també es van determinar els nivells de mRNA i de proteïna d'aquests components de la via de Notch en cèl·lules MEF^{WT} i MEF^{p27KO}. Cal tenir en compte que les cèl·lules que proliferen asincrònicament tenen nivells més baixos de p27 que les cèl·lules quiescents. Així doncs, amb aquets experiments es volia comprovar si aquest aspecte (menors nivells de p27) podia fer modificar les diferències d'expressió observades entre les cèl·lules MEF^{WT} i MEF^{p27KO} quiescents.

Tal com es pot veure a la **Fig. 15A**, els nivells de mRNA del lligand Jag1 i del receptor Notch2 incrementen lleugerament en les cèl·lules MEF^{p27KO} respecte els controls. Si es comparen aquest resultat amb els obtinguts en cèl·lules quiescents (**Fig. 13**), es pot veure que els increments en les cèl·lules proliferants són clarament menors. Aquest resul-

Resultats

tat es pot interpretar pel fet que les cèl·lules MEF^{WT} proliferants tenen una quantitat de p27 molt menor que les cèl·lules quiescents. Malgrat els increments d'expressió dels elements *upstream* (Jag1, Notch2) no són gaire elevats, si que es produeixen increments significatius dels nivells de mRNA dels tres elements *downstream* analitzats (*Efrnb2*, *Hey*, *Foxc2*).

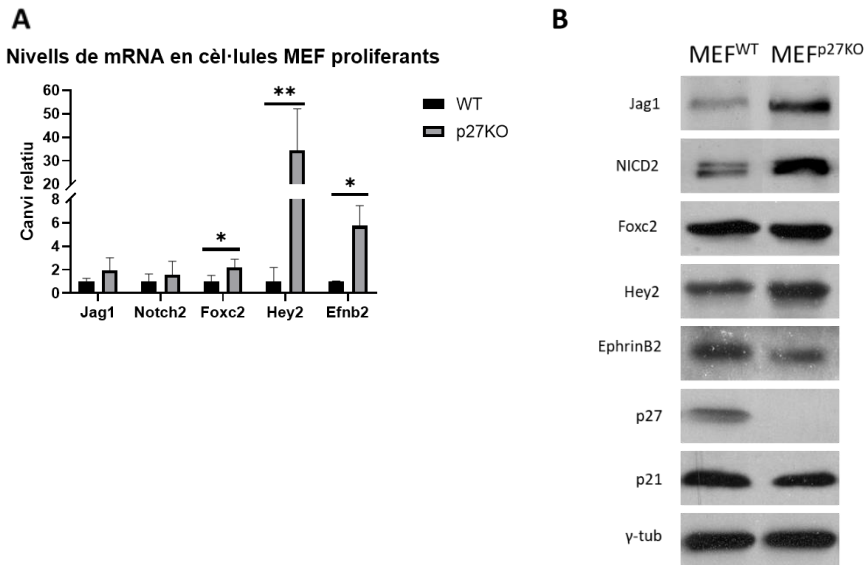


Figura 15. Estudi de la via de Notch en MEF proliferants. (A) Nivells d'expressió gènica comparant MEF^{WT} i MEF^{p27KO}. Els valors significatius es marquen amb un asterisc (* per p-valor<0005; ** per p-valor<0.001). (B) Western blot representatiu del patró d'expressió en MEF^{WT} i MEF^{p27KO}.

Quan es van determinar els nivells de proteïna d'aquests components es va observar que els nivells de Jag1 i de NICD2 estaven clarament incrementats en les cèl·lules MEF^{p27KO} (**Fig. 15B**). Això indica que en aquestes cèl·lules també es produeix una activació de la via quan els hi manca p27.

A la **Fig. 15B**, també es pot observar que dels elements *downstream*, solament Hey2 mostra un increment dels seus nivells proteics en les cèl·lules MEF^{p27KO} comparat als controls. Les altres dues proteïnes tenen comportaments diferents: mentre que FOXC2 manté uns nivells

semblants al que les cèl·lules WT, els d'EphrinB2 baixen. Així doncs, a nivell de proteïna, els resultats són relativament semblants als observats en les cèl·lules quiescents. La única diferència és que els nivells de FOXC2 no incrementen, degut a la pujada de les cèl·lules MEF^{WT} (en quiescència no es detectava aquesta proteïna).

Aquests resultats semblant indicar que la manca de p27 activa la via de Notch, tant en cèl·lules quiescents com proliferants. La diferència és que que a les cèl·lules proliferants aquesta activació sembla ser menor. Això podria ser degut a que les cèl·lules WT, al tenir menys nivells de p27, tenen parcialment la via activa. Per tant, les diferències entre cèl·lules MEF^{WT} i MEFp^{27KO} no serien tan destacables com passa en quiescència.

2. Estudi en altres models cel·lulars

Deguda la rellevància de la via de Notch en l'oncogènesi colorectal i leucèmica, es va ampliar l'anàlisi del paper de p27 en la regulació de la via de Notch a altres línies cel·lulars. Concretament, es van escollir tres línies cel·lulars establertes: HCT116 (derivada d'un càncer colorectal), RS4;11 (derivada d'un Limfoma de Hodgkin) i HL-60 (derivada d'una APLM).

2.1. Determinació dels nivells de mRNA i de proteïna de diferents components de la via de Notch en cèl·lules HCT16 deficients en p27.

Per tal d'analitzar l'efecte de p27 sobre la via de Notch en la línia de càncer colorectal HCT116, en primer lloc es van generar clons d'aquesta línia cel·lular que fossin deficients per p27. Per tal d'aconseguir-ho, es va utilitzar la tecnologia CRISPR/Cas9. De tots els

Resultats

clons generats mitjançant aquesta tecnologia, pocs d'ells mostraven una deficiència total de p27. Molts dels clons generats presentaven formes més o menys truncades de la proteïna. A la **Fig. 16** es poden veure tres clons d'aquesta línia que es van obtenir amb aquesta tecnologia i que presenten una deficiència total de p27. En endavant, es refereix en aquesta tesi com HCT^{p27KO}.

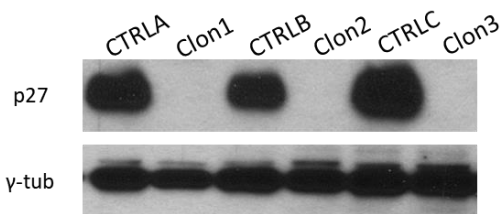


Figura 16. Validació de l'eficàcia de la tècnica CRISPR/Cas9. Comprovació per western blot de l'eliminació de p27 en tres clons (1, 2, 3) respecte a tres controls (A, B, C).

Tal com es pot veure a la **Fig. 17A**, de manera semblant al que s'havia observat en les cèl·lules MEF, tant els nivells de mRNA del lligand *JAG1* com del receptor *NOTCH2* estan clarament incrementats en els clons HCT^{p27KO} respecte als controls. De la mateixa forma, l'expressió dels tres elements *downstream* de la via (*EPHRB2*, *HEY2*, *FOXC2*) també es troba augmentada.

Posteriorment, es van determinar els nivells de les proteïnes codificades per aquest gens. A la **Fig. 17B** es pot observar que tant els nivells del lligand Jag1 com de la forma activa del receptor Notch2 es troben incrementats en els clons deficients en p27. Respecte als elements *downstream* de la via, també s'observen augments de tots ells en les cèl·lules HCT^{p27KO}.

Així doncs, els resultats obtinguts indiquen clarament que en aquestes cèl·lules HCT116, la proteïna p27 també regula l'activitat de la via de Notch, actuant com un repressor d'aquesta via. Els resultats observats

en aquestes cèl·lules son molt similars als observats en les cèl·lules MEF proliferants (**Fig. 15**).

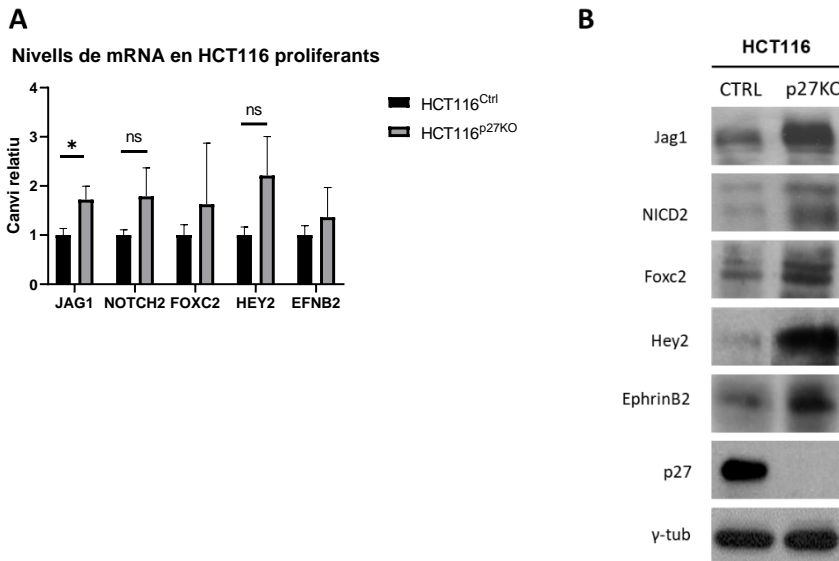


Figura 17. Anàlisi de la via de Notch en cèl·lules HCT proliferants deficients per p27. (A) Expressió gènica comparada entre HCT^{Ctrl} i HCT^{p27KO} dels diferents elements de la ruta de senyalització. Es van marcar els valors significatius amb un asterisc (* per p-valor<0.05). (B) Patró d'expressió proteica representatiu de HCT^{Ctrl} i HCT^{p27KO}.

A nivell de mRNA, els resultats son idèntics. A nivell proteic, els nivells de Jag1 i Notch2 segueixen el mateix patró (increment a les cèl·lules p27KO), però hi ha algunes diferències als elements *downstream* de la via. Mentre que a les HCT^{p27KO} el nivell de proteïna de tots tres augmenta, en les cèl·lules MEF proliferants els nivells de FOXC2 son similars en WT i p27KO i els de EphrinB2 disminueixen a les cèl·lules MEFp27KO.

Les diferències dels nivells d'aquestes proteïnes observades entre ambdós tipus cel·lulars podrien ser degudes a diferents mecanismes de control de la síntesi, l'estabilitat o la degradació proteica que poden haver-hi en aquests dos tipus cel·lulars. No obstant, el que és important remarcar és que en ambdós línies, p27 regula l'activitat de la via de

Resultats

Notch, actuant com repressor transcripcional de gens clau d'aquesta via, com són el lligand Jag1 i el receptor Notch2.

2.1.1. Inducció de l'expressió de p27 en clons HCT^{p27KO}

A continuació, es va voler confirmar el paper de p27 en la regulació de la via de Notch i validar que els canvis d'expressió dels diferents components d'aquesta via observats en els clons HCT^{p27KO} eren deguts a l'absència de p27. Amb aquest objectiu, es va induir la sobreexpressió de p27 en els clons HCT^{p27KO} i es va analitzar l'efecte d'aquest increment de p27 sobre els nivells proteics dels diferents elements de la via de Notch.

Com es pot observar a la **Fig. 18**, la sobreexpressió de p27 a les cèl·lules HCT^{p27KO} provoca una disminució dels nivells de proteïna de tots els elements estudiats de la via de Notch. Aquests resultats confirmen clarament que p27 actua com un repressor d'aquesta via.

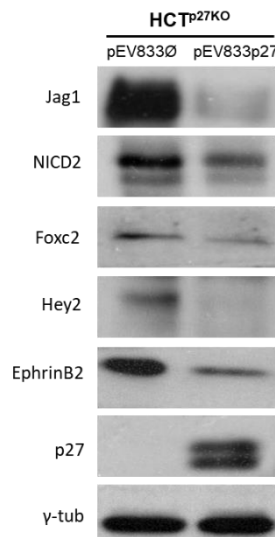


Figura 18. Patró d'expressió proteica després de la reintroducció lentiviral de p27. Western blot dels diversos elements de la via de Notch en HCT^{p27KO} i en HCT^{p27KO} reexpressant p27 de forma exògena.

2.2. Determinació dels nivells de mRNA i de proteïna de diferents components de la via de Notch en línies cel·lulars derivades de leucèmies

Posteriorment, es va estendre els estudis sobre el paper de p27 en la regulació de la via de Notch en línies cel·lulars derivades de leucèmies. En aquest cas, l'aproximació experimental va ser lleugerament diferents. En primer lloc, es va determinar els nivells proteics de p27 en una sèrie de línies cel·lulars establertes de leucèmia: Nalm6, RS4;11, Molt4, KG-1 α i HL-60.

Com es pot observar a la **Fig. 19**, els nivells de p27 eren elevats a les línies Nalm6, Molt-4 i KG-1 α , mentre que les línies RS4;11 i HL-60 presenten nivells molt més baixos, especialment aquesta última. Així doncs, es van seleccionar les dues línies cel·lulars amb menors nivells de p27 (RS4;11, HL-60) i es va induir la sobreexpressió de p27 en ambdues (**Fig. 20 i 21**).

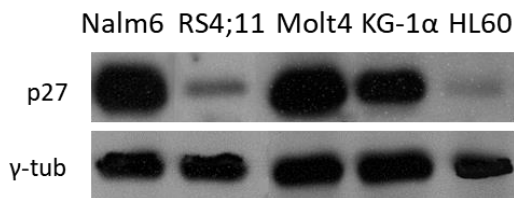


Figura 19. Nivells proteics de p27 en diferents línies cel·lulars de leucèmia. Es mostren cinc línies cel·lulars de diferents subtipus de leucèmia: tipus B (Nalm6, RS4;11), tipus T (Molt4) i mieloide (KG-1 α , HL60).

Tal com es pot observar a la **Fig. 20A**, l'increment de p27 en les cèl·lules RS4;11 induïx una disminució significativa de l'expressió gènica de tots els components de la via de Notch. De manera similar, aquesta sobreexpressió de p27 es tradueix en una descens clar dels nivells proteics dels diversos elements de la via (**Fig. 20B**). De forma anàloga, la sobreexpressió de p27 a les cèl·lules HL-60 (**Fig. 21**) pro-

Resultats

voca descensos dels nivells de mRNA (**Fig. 21A**) i de proteïna (**Fig. 21B**) de tots els elements de la via de Notch estudiats.

Així doncs, els resultats obtinguts en els clons d'HCT116 deficientes per p27 (**Fig. 18**) i en les línies cel·lulars derivades de leucèmies (**Fig. 20-21**) suggereixen que p27 actua com a repressor transcripcional de la via de senyalització de Notch.

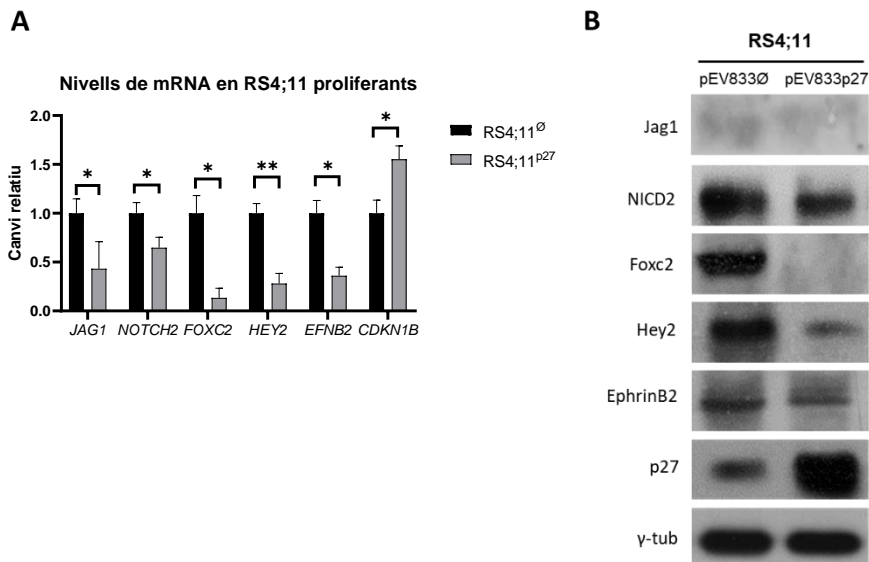


Figura 20. Inhibició de la via de Notch per sobreexpressió de p27 a les cèl·lules RS4;11. (A) Nivells de mRNA comparats a les cèl·lules RS4;11 després de la reintroducció de p27. Es van marcar els valors significatius amb un asterisc (* per p-valor<0.05; ** per p-valor<0.001). (B) Efecte a nivell proteic de la sobreexpressió de p27 sobre la via de Notch a les cèl·lules RS4;11.

3. Paper dels complexos CDK-Ciclina i E2F4/p130 en la regulació de la via de Notch

Tal com s'ha descrit a la introducció, aquest grup d'investigació ha elaborat un model de regulació transcripcional en el que participen p27, diferents complexos CDK-Ciclina i el complex repressor transcripcional E2F4/p130 (**Fig. 8**).

En primer lloc, es va estudiar si aquest complex repressor E2F4/p130 participava conjuntament amb p27 en la regulació de la via de Notch.

Per aquest estudi s'han utilitzat cèl·lules MEFp130KO. Es coneguda que la manca de p130 impedeix que el repressor transcripcional E2F4 pugui unir-se al DNA i, per tant, aquest no pot exercir la seva funció repressora. Així doncs, s'esperaria que, de manera similar al que s'ha observat a les cèl·lules MEFp27KO, les cèl·lules MEFp130KO presentarien nivells més alts d'expressió dels diferents components de la via de Notch.

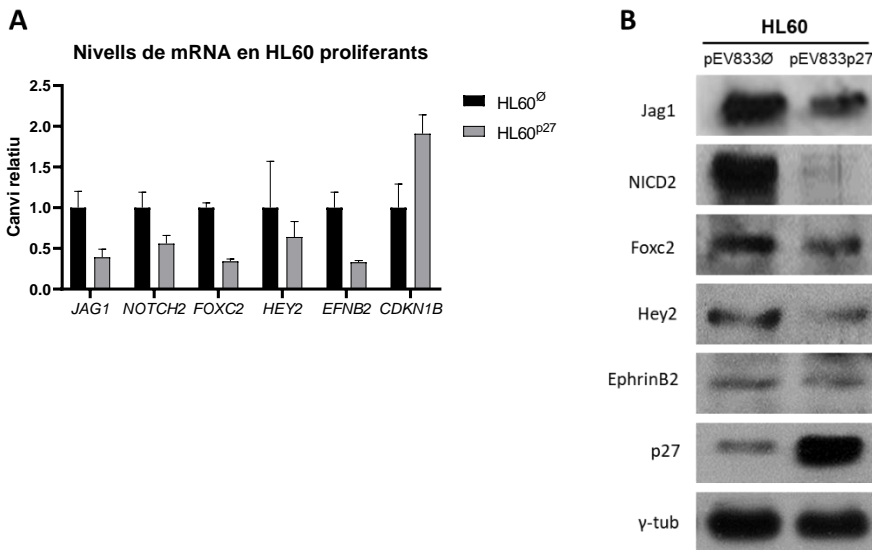


Figura 21. Inhibició de la via de Notch per sobreexpressió de p27 a les cèl·lules HL60. (A) Nivells de mRNA comparats a les cèl·lules HL60 després de la reintroducció de p27. (B) Efecte a nivell proteic de la sobreexpressió de p27 sobre la via de Notch a les cèl·lules RS4;11.

Amb aquest objectiu, es van analitzar els nivells de mRNA i de proteïna en cèl·lules MEFp130, tant quiescents (**Fig. 22A i B**) com proliferants (**Fig. 22 C i D**). Però, aquest estudi es va limitar als tres elements de la via que havien mostrat un comportament semblant en tots els models analitzats: el lligand Jag1, el receptor Notch2 i el gen diana Hey2.

Tal com es pot observar a la **Fig. 22A**, els nivells de mRNA d'aquest tres elements de la via estan incrementats en les cèl·lules MEF^{p130KO} respecte a les MEF^{WT}. De forma similar, l'anàlisi proteic mostra un

Resultats

increment dels nivells del lligand Jag1, la forma activa del receptor Notch2 i de la diana Hey2 en les cèl·lules MEFp130KO. Aquest patró d'increments es repeteix en les cèl·lules p130KO proliferants (**Fig. 22 C i D**).

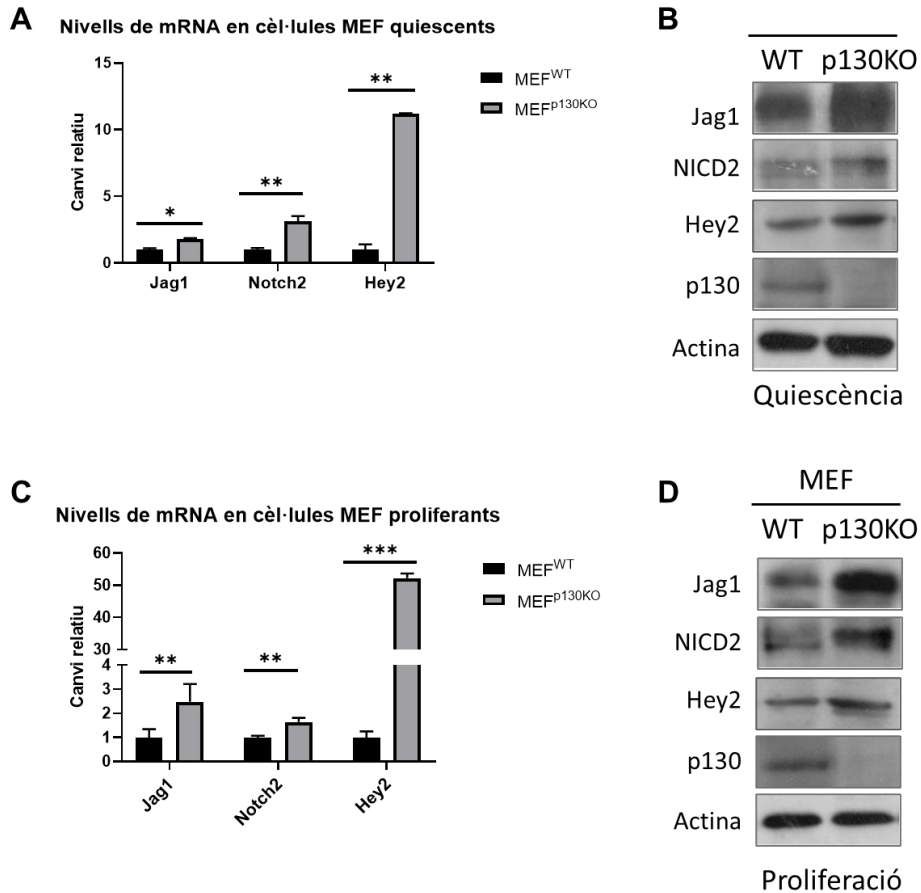


Figura 22. Nivells d'expressió de la via de Notch en cèl·lules MEFp130KO. (A) Nivells de mRNA de *Jag1*, *Notch2* i *Hey2* en cèl·lules en quiescència. (B) Nivells proteics en quiescència (C) Nivells d'expressió en cèl·lules en proliferació asincrònica. (D) Nivells de proteïna en cèl·lules proliferants.

Per confirmar que els canvis observats a les cèl·lules MEFp130KO són mediats per E2F4 i tenint en compte que els diferents models cel·lulars emprats es comportaven de manera semblant, es van seleccionar les cèl·lules HCT116, molt més senzilles de transfectar, per a estudiar l'efecte del silenciament d'E2F4 sobre la via de Notch.

Com es pot observar a la **Fig. 23**, en aquestes cèl·lules la disminució dels nivells de proteïna d'E2F4 comporta un increment proteic del lligand Jag1 i la forma activa del receptor Notch2 (NICD2). És a dir, una activació de la via, com s'havia observat prèviament a les cèl·lules MEFp130KO (**Fig 22**) i les diferents línies deficientes per p27 (**Fig. 13-15 i 17**).

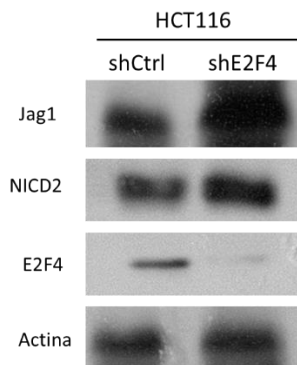


Figura 23. Efecte del silenciament d'E2F4 sobre la via de Notch en cèl·lules HCT116. Western blot en el que es compara els nivells de Jag1 i NICD2 en un knock-down d'E2F4 respecte al control.

Aquest resultat demostra que el complex E2F4/p130 participa en la regulació de la via de Notch, de manera similar a com fa p27. És a dir, ambdós actuen com repressors d'aquesta ruta de senyalització.

Seguint el model descrit en aquest grup (**Fig. 8**) i d'acord amb la hipòtesi generada, una inhibició dels complexos CDK-Ciclina previndria la hiperfosforilació de p130 u, en última instància, l'activació dels gens reprimits per E2F4. Així doncs, per confirmar una possible regulació a través de l'activació d'aquests complexos CDK-Ciclina, es van tractar les cèl·lules proliferants durant 16h amb roscovitina 20µM, un inhibidor universal de les CDKs (**Fig. 24**). Es van escollir les cèl·lules p27KO per tractar de contrarestar l'efecte activador que té la manca de p27 sobre la via de Notch.

Resultats

Tal com es pot observar a la **Fig. 24A**, el tractament amb roscovitina genera a nivell de mRNA una disminució generalitzada en els elements de la via estudiats en les cèl·lules MEF^{p27KO}. Aquest mateix efecte es tradueix també a nivell proteic tant en les cèl·lules MEFp27KO (**Fig. 24B**) com en les cèl·lules HCT^{p27KO} (**Fig. 24C**). En ambdós casos, els nivells del lligand Jag1 i de la forma activa del receptor Notch2 (NICD2) estan disminuïts després del tractament.

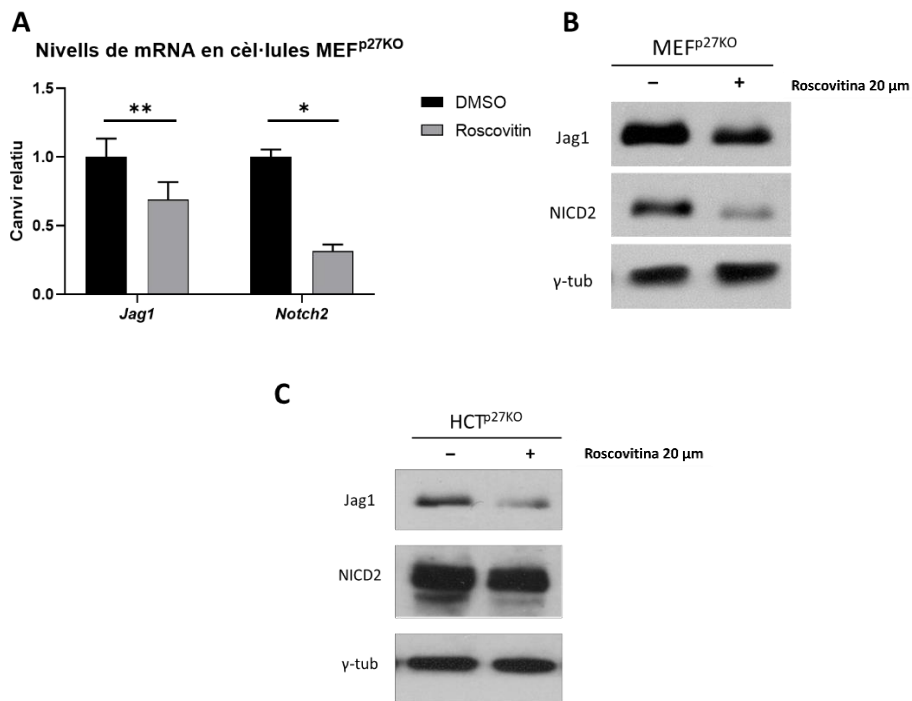


Figura 24. Efecte de la roscovitina sobre la via de Notch en diverses línies cel·lulars en proliferació. (A) Nivells de mRNA en cèl·lules MEF^{p27KO}. (B) Nivells proteics en cèl·lules MEFp27KO. (C) Nivells de proteïna en cèl·lules HCT^{p27KO}.

Per tant, la roscovitina induïx un descens en els nivells proteics del lligand Jag1 i de la forma activa del receptor Notch2, indiciant un paper important dels complexos CDK-Ciclina com a activadors de la via de Notch.

En resum, els resultats presentats en aquest capítol demostren un paper actiu de p27 en la regulació dels diversos elements de la via de Notch2,

tal com s'havia observat a partir d'anàlisi del *microarray* d'expressió comparant cèl·lules MEF^{p27KO} vs MEF^{WT}. És a dir, p27 actua com a un repressor transcripcional de la via de Notch2. Tant la seva absència com la d'E2F4 o la de p130 permeten la sobre activació d'aquesta ruta de senyalització, mentre que la inhibició dels complexos CDK-Ciclina mitjançant roscovitina condueix a una menor activació de la via de Notch.

No obstant això, els mecanismes moleculars d'aquesta regulació en gens concrets han de ser estudiats més detalladament mitjançant anàlisi de promotors, assaigs ChIP i assajos de luciferasa que seran descrit en el següent capítol.

CAPITOL 2
MECANISMES MOLECULARS
DE REGULACIÓ

1. ChIP-Seq de p27 en cèl·lules de ratolí

Per identificar potencials gens regulats per p27, es va fer un assaig ChIP-Seq en cèl·lules de ratolí quiescents. Es van utilitzar diverses línies (MEF, C17.2, C2.C12), però els resultats obtinguts van ser molt semblants (**Fig. 25**).

Encara que no es va trobar la presència de p27 propera a algun dels promotors dels gens que apareix al *microarray* d'expressió, si es va identificar un gen de la via: *Maml2*. A les tres línies, el pic d'unió estava al voltant de la posició -2000 pb contant des del TSS (**Fig. 25A**).

A

Cell Type	Inside Feature	Distance to Feature
MEF	Upstream	-1989
NSC	Upstream	-2030
C2.C12	Upstream	-2098

B

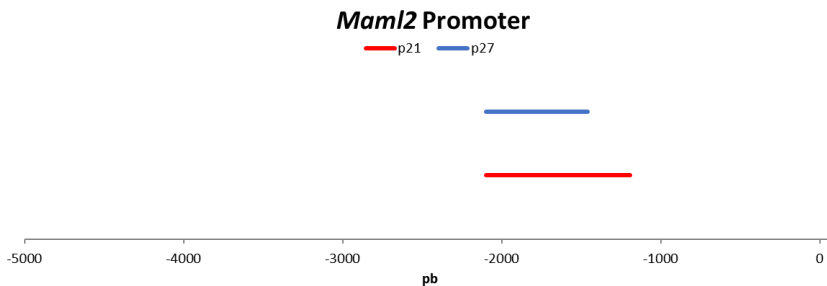


Figura 25. Resum del ChIP-Seq en cèl·lules de ratolí. (A) Taula que mostra les línies cel·lulars utilitzades als diferents ChIP-Seq i la posició relativa al TSS on es va trobar el pic. (B) Representació esquemàtica del promotor de *Maml2* i la posició dels llocs d'unió de p27 i p21 identificats al ChIP-Seq.

Davant la relació entre p27 i p21, es va fer un ChIP-Seq d'aquesta última en cèl·lules C17.2 proliferants. Tampoc es va trobar que p21 s'uneixi a algun dels gens descrits al *microarray*, però es va identificar

Resultats

un cop més a *Maml2*. El lloc d'unió de p21 estava contingut al pic de p27 (Fig. 25B).

2. Anàlisi bioinformàtic de potencials llocs d'unió de p27 als gens d'interès

Utilitzant la eina JASPAR, que proporciona les matrius d'unió de diferents TF, i FIMO MEME, que busca en una seqüència determinada correspondència amb les matrius aportades, es van estudiar si algun dels TF amb els que p27 interacciona s'unia a la regió identificada de *Maml2* (Fig. 26A). A més, aquest anàlisi bioinformàtic es va estendre a dos elements identificats al *microarray* d'expressió: *Hey2* (Fig. 26B) i *Foxc2* (Fig. 26C).

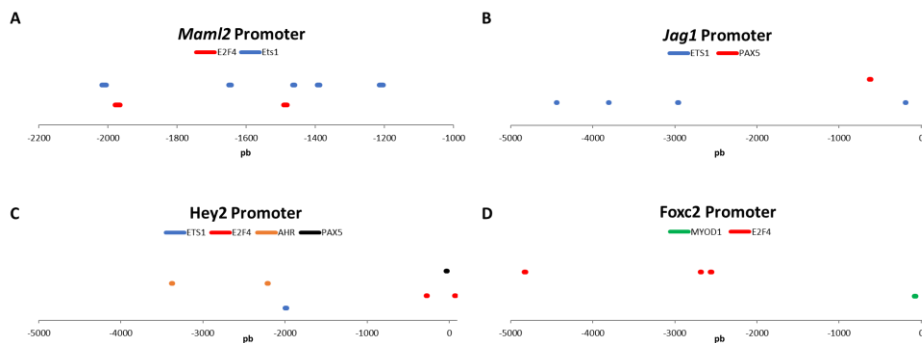


Figura 26. Representació esquemàtica de la cerca de TF. (A) Posicions dels TF trobats a la regió del promotor de *Maml2* identificada per ChIP-Seq. (B) Posició dels TF trobats al promotor de *Jag1*. (C) Posició dels TF trobats al promotor de *Hey2*. (D) Posició dels TF trobats al promotor de *FoxC2*. En tots els casos, només es van representar les posicions amb un p-valor < 0.0001.

Dels possibles *partners* descrits de p27, a la regió de *Maml2* només es van trobar dos: E2F4 i Ets1 (Fig. 26A). Al promotor de *Jag1* també es va identificar possibles llocs d'unió per Ets així com Pax5 (Fig. 26B). Encara que es van trobar regions on E2F4 podia interaccionar, no es representant gràficament, ja que el p-valor era superior a 0.0001. Al promotor de *Hey2* es van identificar fins a quatre TF *partners* de p27

(Fig. 26C) mentre al promotor de *Foxc2* només es van identificar dos TF molt significatius (Fig. 26D).

3. Validació dels llocs d'unió de p27 als promotors de *Maml2* i *Hey2*

Per traduir aquest estudi teòric amb fets demostrables, es va procedir a realitzar assajos ChIP en cèl·lules MEF quiescents. Al cas de *Maml2*, es va voler validar la unió de p27 ja detectada als ChIP-Seq i, d'altra banda, dilucidar quin és el TF que participa en aquesta unió (Fig. 27).

Pel que fa als altres dos gens (*Hey2*, *Foxc2*), només es va realitzar els assajos ChIP a la regió més propera al TSS de *Hey2* (Fig. 28) i es va prescindir de l'estudi de *Foxc2*.

Enriquiments al promotor de *Maml2*

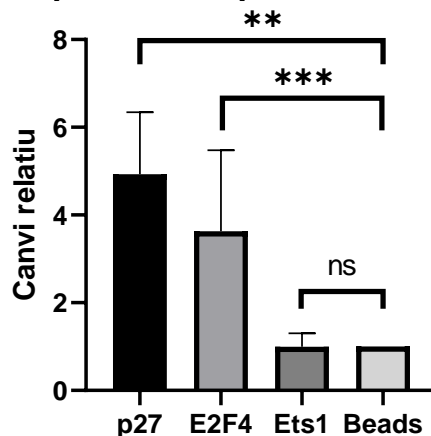


Figura 27. Representació gràfica dels assaigs ChIP. Es representen els enriquiments al promotor de *Maml2* amb respecte al control (Beads). Els valors significatius es van marcar amb un asterisc (** per p-valor<0.001; *** per p-valor<0.0001).

Com es pot veure a la Fig. 22, tant p27 com p21 interaccionen a la regió del promotor de *Maml2* identificada per ChIP-Seq. Però, dels dos TF trobats per anàlisi bioinformàtica, només es detectaven canvis amb

Resultats

el ChIP d'E2F4, mentre el ChIP d'Ets1 tenia valors semblants al control negatiu.

Per altra banda, com s'observa a la **Fig. 23**, p27 i E2F4 colocalitzen a la regió de Hey2 identificada per anàlisi bioinformàtic.

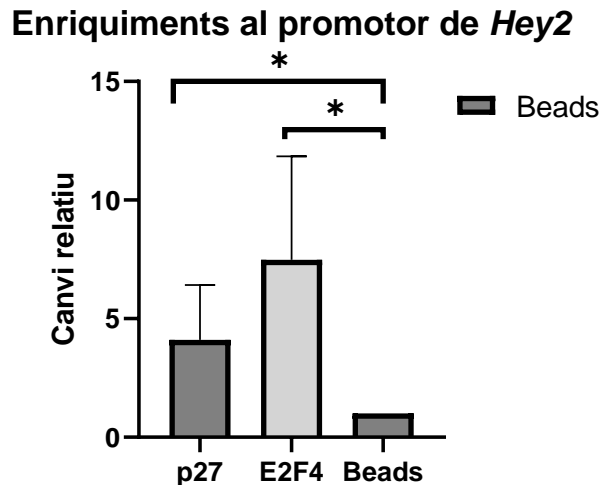


Figura 28. Representació gràfica dels assaigs ChIP. Es representen els enriquiments al promotor de Hey2 amb respecte al control (Beads). Els valors significatius es van marcar amb un asterisc (* per p-valor<0.05).

4. Assaig funcional luciferasa amb la regió del promotor de *Maml2*

Es va clonar la regió del promotor de Maml2 identificada per ChIP-Seq en un vector pgL3 amb luciferasa i es va introduir en cèl·lules C17.2 modificades per CRISPR/Cas9 per eliminar l'expressió de p27 (**Fig. 29A**). Així, es va voler valorar a nivell genètic si p27 tenia una funció inhibidòria o activadora.

Com es pot observar a la **Fig. 29B**, la quantitat de luciferasa detectada va disminuir a les C17.2^{p27KO} respecte al control.

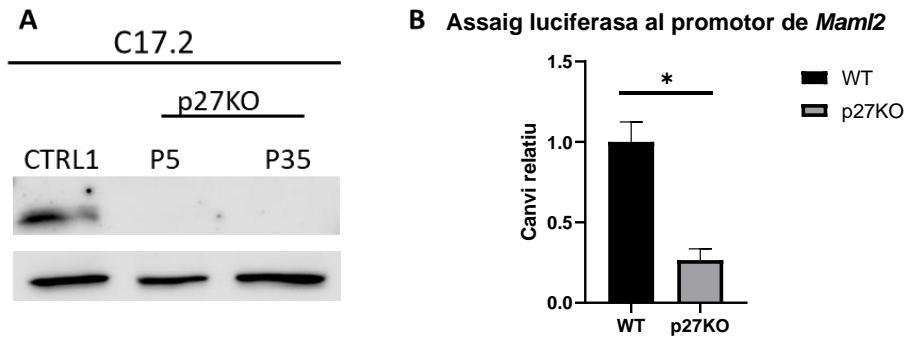


Figura 29. Estudi de la regió d'unió de p27 al promotor de *Maml2*. (A) Generació de clons p27KO a partir de cèl·lules C17.2. (B) Representació gràfica de l'assaig luciferasa. Es compara la quantitat relativa als clons C17.2^{p27KO} respecte a les C17.2^{WT}. Els valors significatius es van marcar amb un asterisc (* per p-valor<0.05).

5. Anàlisi dels nivells de *Maml2* en cèl·lules MEF deficients per p27 o p130

Per últim, es va fer l'estudi proteic en MEF de *Maml2* (Fig. 30). A les cèl·lules MEF^{p27KO} quiescents (Fig. 30A), *Maml2* és indetectable, de la mateixa forma que a les cèl·lules MEF^{p27KO} proliferants (Fig. 30B). De forma anàloga, tant les cèl·lules MEF^{p130KO} quiescents (Fig. 30C) com les cèl·lules MEF^{p130KO} proliferants (Fig. 30D) hi ha descens de l'expressió proteica de *Maml2* com respecte al control.

Resultats

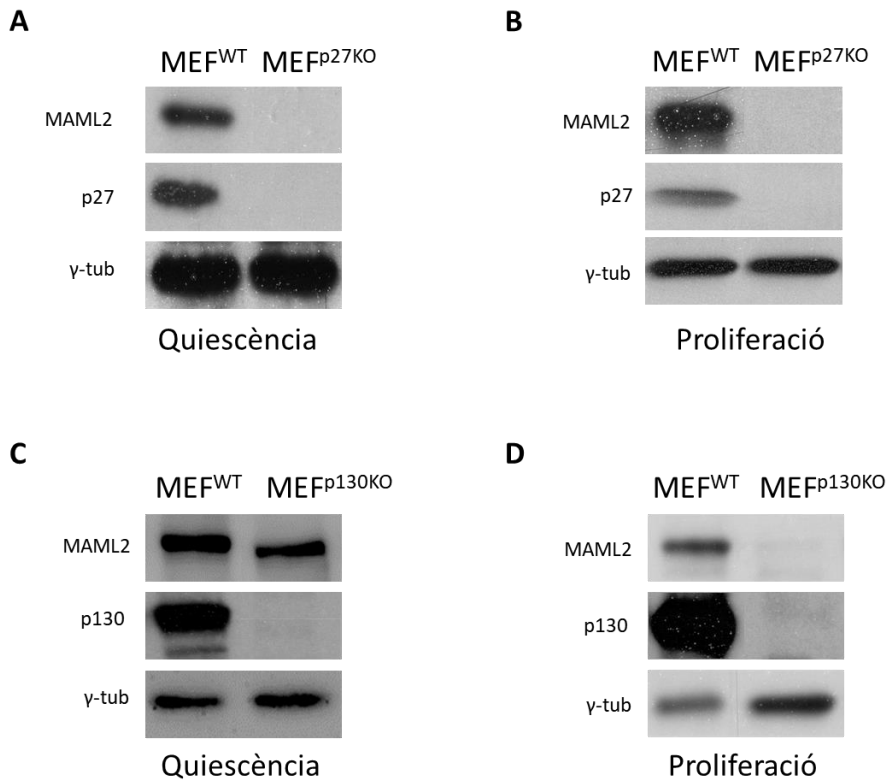


Figura 30. Nivells proteics de Maml2. (A) Efecte de la absència de p27 en cèl·lules quiescents sobre Maml2. (B) Wester blot representatiu del nivells de Maml2 en cèl·lules MEF^{p27KO} proliferants. (C) Nivells proteics de Maml2 a les MEF^{p130KO} quiescent. (D) Patró d'expressió proteica de Maml2 en les MEF^{p130KO} proliferants.

DISCUSSIÓ

Science is not about making predictions or performing experiments. Science is about explaining

Bill Gaede

Després de més d'un quart de segle d'investigació sobre la proteïna p27, el seu paper inicial com a un simple inhibidor de l'activitat dels complexos CDK-ciclina ha quedat superat per una sèrie de noves funcions descrites durant els darrers anys, tals com la seva implicació en el control de la motilitat cel·lular, en el tràfic vesicular, en la regulació metabòlica o en la regulació de la transcripció. El seu paper en aquestes funcions encara no està totalment aclarit. Aquesta tesi vol portar una mica de llum a aquesta mar obscura d'incertesa, concretament en el que fa en seu possible nou paper de p27 com a regulador transcripcional.

Per tal d'identificar els programes transcripcionals regulats per p27, en el grup de recerca on s'ha realitzat aquesta tesi, es va dur a terme un *mi-croarray* d'expressió comparant MEF^{WT} vs MEF^{p27KO}. Els resultats d'aquest assaig van mostrar que p27 participa en la regulació d'un nombre molt elevat de processos cel·lulars (Biçer et al., 2017). Entre aquests processos regulats per p27 hi estava la via de senyalització de Notch (**Taula 1**). Donada la rellevància d'aquesta ruta en diversos processos biològics de desenvolupament i homeòstasi cel·lular i la seva implicació en la generació tumoral, es va plantejar l'estudi del possible paper de p27 en la regulació d'aquesta via de senyalització.

En aquest treball s'ha demostrat que la manca de p27 produeix increments significatius dels nivells de mRNA i de proteïna de diferents components d'aquesta via de senyalització: el lligand Jag1, el receptor Notch2, els gens diana Hey2 i EphrB2 i el factor de transcripció FOXC2. Aquests increments s'observen tant en MEFs quiescents (**Fig. 13-14**) com proliferants (**Fig. 15**). A més, aquest increments no només s'observen a les cèl·lules MEF, ja que es van veure en altres subtipus cel·lulars d'origen humà, com les cèl·lules HCT116 procedents d'un

Discussió

càncer colorectal, les cèl·lules HL-60 derivades d'una leucèmia i les cèl·lules RS4;11 originades d'un limfoma (**Fig. 17-21**).

1. La disminució de p27 indueix l'activació de la via de Notch a través de la inducció de l'expressió del lligand Jag1

Son especialment rellevants els resultats dels anàlisis dels nivells del receptor Notch2, realitzats per western blot, en les cèl·lules p27KO vs WT. Aquests resultats assenyalen que la forma truncada i activa d'aquest receptor està incrementada en les cèl·lules p27KO. Això indica clarament que la via de Notch està activada en les cèl·lules deficientes en p27. Aquests resultats plantegen, per tant, la pregunta de com s'activa aquesta via quan es produeix una deficiència de la proteïna p27.

Per a respondre aquesta pregunta es important destacar la observació de que el lligand Jag1 incrementa la seva expressió (tant a nivell de mRNA com de proteïna) en les cèl·lules amb nivells baixos de p27. Aquest increment del lligand Jag1 podria ser l'element determinant per tal d'induir l'activació d'aquesta via de senyalització en les cèl·lules deficient per a p27.

Així doncs, es pot postular que p27 actua com a repressor transcripcional del lligand Jag1. Per tant, la pèrdua de p27 induiria un increment en la seva expressió i en conseqüència, aquest increment de Jag1, facilitaria la seva unió al receptor Notch2. Així doncs, aquest increment de la interacció Jag1-Notch2 induiria l'activació del receptor i en conseqüència es produiria un increment de l'activació d'aquesta via de senyalització.

A més, també val la pena comentar que els resultats també indiquen que a les cèl·lules p27KO es produeix un lleuger, però significatiu, increment dels nivells (tant de mRNA com de proteïna) del receptor Notch2. Aquesta observació indica que p27 també actuaria com un repressor transcripcional del receptor Notch2. Així doncs, l'increment de Notch2 a les cèl·lules p27KO també facilitaria l'activació d'aquesta via.

Així doncs, es pot postular que p27, actuant com un repressor transcripcional del lligand Jag1 així com del receptor Notch2, regula l'activitat de la via de Notch. Per tant, la pèrdua de p27 en les cèl·lules, produirà un augment tant del lligand Jag1 com del receptor Notch2 que conduiran a l'activació de la via. No obstant això, postulem que l'element clau de l'activació de la via a les cèl·lules deficientes en p27, es l'increment de l'expressió de Jag1 ja que sense aquest augment (malgrat Notch2 incrementés) l'activació de la via de Notch2 no seria efectiva.

Aquesta teoria queda corroborada amb els resultats presentats a les **Fig. 18, 20 i 21** de l'anterior capítol, on es pot observar com la sobreexpressió de p27 en les cèl·lules HCT116 p27KO, HL-60 i RS4;11 respectivament, provoca una disminució dels nivells de mRNA o de proteïna dels elements estudiats de la via de Notch2.

2. La proteïna p27 regula l'expressió de Jag1 a través del complex repressor E2F4/p130

Aquest grup havia descrit prèviament un mecanisme a través del qual p27 regula la transcripció mitjançant la seva interacció amb el complex E2F4/p130 (Orlando et al., 2015). Tal com s'il·lustra a la **Fig. 8**, p27

Discussió

interacciona pel seu extrem C-terminal amb aquest complex quan està unit a les regions repressores dels gens. Una vegada unida, p27 recluta els complexos CDK-Ciclina. Per acció de Tyr quinases de la família Src, p27 és fosforilada i sofreix un canvi conformacional que permet l'activació dels complexos CDK-Ciclina. Així, aquest complex pot fosforilar p130 perquè es desacobli el complex repressor E2F4/p130 u es produeixi l'expressió dels gens diana.

Així doncs, es va voler analitzar si p27 està regulant l'expressió de Jag1 a través d'aquest mecanisme. Per una banda, els resultats obtinguts a aquesta tesi demostren que les cèl·lules MEF^{p130KO} presenten increments significatius de Jag1 i que els nivells de la forma activa de Notch2 també incrementen en aquestes cèl·lules. Es a dir la disminució de p130 produeix els mateixos resultats que la pèrdua de p27. Per altra banda, s'han observat resultats similars induint la disminució d'E2F4. Per tant, es pot concloure que p27 regula l'expressió de Jag1 a través del complex E2F4/p130.

Seguidament, es va voler analitzar si els complexos CDK-Ciclina, tal com postula el model d'aquest grup, també participen en la regulació de l'expressió de Jag1 per part de p27. En aquesta tesi demostrem que el tractament de les cèl·lules amb roscovitina, un inhibidor general dels complexos CDK-Ciclina indueix el bloqueig de l'expressió de Jag1. En les cèl·lules tractades amb roscovitina, també s'observa una disminució dels nivells de la forma activa de Notch2, induint, per tant, una disminució de l'activació de la via.

3. La proteïna p27 regula l'expressió de Maml2, un coactivador transcripcional de la via de Notch

Resultats previs del grup emprant la tècnica de ChIP-seq (**Fig. 25A**) indicaven que en tres línies cel·lulars de ratolí, p27 s'unia a una regió (al voltant dels -2000 pb) del TSS del promotor de Maml2. Aquesta proteïna es un coactivador transcripcional de la via de Notch, imprescindible perquè NICD (la forma activa de Notch) pugui activar la transcripció dels seus gens diana. Aquests resultats suggerien que p27 podria està regulant l'expressió de Maml2, malgrat en el *microarray* d'expressió comparant en MEF^{WT} vs MEF^{p27KO} no s'observava cap canvi dels nivells del mRNA de Maml2. Així doncs, es va voler estudiar el paper de p27 sobre la regulació d'aquest gen.

Mitjançant assajos ChIP (**Fig. 27**), s'ha confirmat que efectivament p27 s'uneix a aquesta regió del promotor de Maml2. A més, s'ha demostrat que en aquesta regió també s'hi uneix E2F4. Tot feia pensar doncs que p27 podia regular l'expressió de Maml2. L'assaig luciferasa confirma aquesta possibilitat (**Fig. 29**). Concretament, l'absència de p27 o d'E2F4 reduïa l'expressió de Maml2 en aquest tipus d'assaig, confirmant que la unió de p27 i E2F4 al promotor de Maml2 era necessària per a la seva expressió. A més, es va comprovar que cèl·lules deficientes en p27 o E2F4 els nivells proteics de Maml2 estaven significativament disminuïts (**Fig. 30**).

Aquests resultats, sorprenentment, indicarien que, en aquest cas, p27 actua com un activador transcripcional a diferència del que passa en la regulació de l'expressió de Jag1, on p27 actua com a repressor transcripcional.

Discussió

Aquests resultats, sorprenents, suggereixen que l'activació de la via de senyalització de Notch observada en cèl·lules deficientes en p27 no es produeix a través del coactivador Maml2, sinó de Maml1 o Maml3.

4. La proteïna p27 regula directament l'expressió d'elements *downstream* de la via de Notch

Tal com s'ha comentat anteriorment, la pèrdua de p27 provoca un increment de l'expressió de Jag1 que activa la via de senyalització de Notch i per tant, això comportaria un augment de l'expressió de diverses dianes d'aquesta via (Hey2, EphrinB2) identificades prèviament al *microarray* d'expressió realitzat en aquest grup. Per tant, la idea inicial era que l'increment d'expressió d'aquestes dianes seria conseqüència de l'activació de Notch2 produït per l'augment dels nivells proteics del lligand Jag1.

Això estaria refermat pel fet que a totes les cèl·lules estudiades, tant d'origen murí com humanes (MEFs quiescents, MEFs proliferants, HCT116, RS4;11 i HL60), s'observa un increment dels nivells de mRNA d'aquestes dianes en les cèl·lules deficientes per p27. En general, això comporta també increments dels nivells d'aquestes proteïnes, encara que hi ha excepcions. Concretament, en les cèl·lules MEF proliferants s'ha observat que, malgrat l'increment dels nivells de mRNA de tots els elements *downstream* de la via de Notch2 a les cèl·lules deficientes en p27, els nivells proteics d'alguns d'aquests elements no es responien. Mentre en el cas de Hey2 es produeix un increment dels nivells proteics, pel que fa a Ephrinb2 s'observa una clara disminució dels seus nivells de proteïna en les cèl·lules MEF^{p27KO}, just el contrari del que s'esperaria. Amb respecte a FOXC2, no s'observa cap augment i els nivells resten similars al de les cèl·lules MEF^{WT} proliferants.

Per explicar aquesta disparitat de resultats, es postulen varies possibilitats:

1. Els nivells de proteïna estan relacionats amb el nivells de mRNA, però hi ha que l'activitat traduccional pot ser diferents en les diferents condicions cel·lulars.
2. Els nivells de degradació proteica també poden ser diferents.
3. En el cas concret de FOXC2, s'ha descrit que els seus nivells de proteïna estan clarament relacionats amb la fase del cicle cel·lular on es troben les cèl·lules (Pietila et al., 2016). Així doncs, s'ha descrit que els nivells proteics de FOXC2 van pujant a mesura que avança el cicle fins el seu pic màxim a la fase G2, disminuint dràsticament durant la mitosi. Aquest efecte podria ser explicat, en part, per la dinàmica de p27 durant el cicle (**Fig. 31**), que es l'oposada (alts nivells al inici de la fase G1, disminució progressiva a la fase G1 tardana i a la transició G1/S, mantenint els nivells baixos a la resta de las fases). Així, seria coherent que p27 sigui un repressor de l'expressió de FOXC2

Així, seria coherent que p27 sigui un repressor de l'expressió de FOXC2. Durant la quiescència, com p27 està tota localitzada al nucli, els nivells proteics de FOXC2 son baixos (com passa a les MEF^{WT}). Un cop la cèl·lula entra en cicle, els nivells de p27 van baixant, a mesura que els de FOXC2 pujant. En cèl·lules en proliferació, encara que la població més nombrosa és la G₁, no arriba a ser el 50% del total. Per tant, es difícil apreciar les possibles diferències en un western blot, igualant-se els nivells detectats de FOXC2 en MEF^{WT} i MEF^{p27KO}.

Discussió

- Una altra explicació possible es que en les cèl·lules MEF proliferants la regulació de la traducció proteica sigui diferent a la de les cèl·lules quiescents. Per tant, malgrat els nivells de mRNA de FOXC2 incrementin a les cèl·lules deficientes en p27, en aquestes cèl·lules això no implicaria un increment en la seva traducció. Més aviat al contrari, probablement els mecanismes de degradació d'aquesta proteïna estiguessin incrementats.

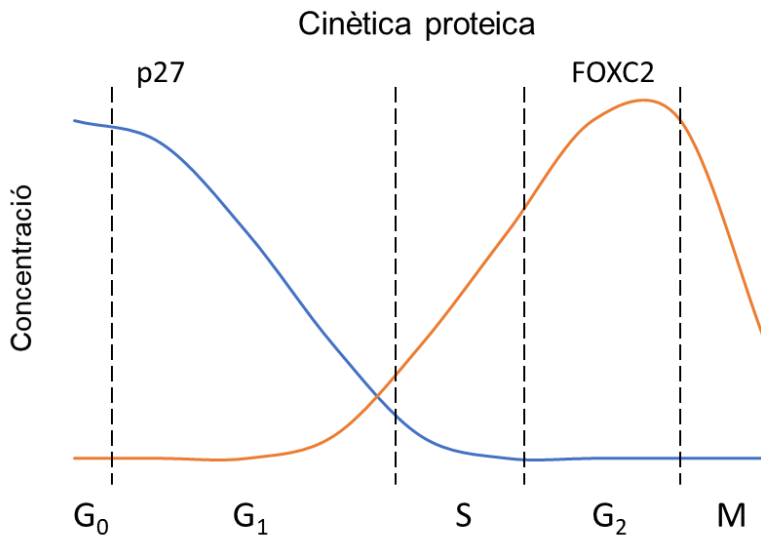


Figura 31. Cinètica al llarg del cicle de p27 i FOXC2. A la fase G₀, els nivells de p27 són màxims i els de FOXC2 mínims. A mesura que avança el cicle, la quantitat de p27 disminueix, sent indetectable des del començament de la fase S. En canvi, els nivells de FOXC2 augmentant exponencialment durant aquesta fase, sent màxims a la fase G₂.

3.1. L'expressió de *Hey2* està regulada per p27/E2F4

Al capítol 1 de Resultats es va observar que la pèrdua de p27 o la de p130 provocava un increment de l'expressió de *Hey2*, una de les dianes de la via de Notch. L'anàlisi bioinformàtic sobre possibles llocs d'unió de factors de transcripció que interaccionen amb p27 en regions promotores d'elements de la via de Notch va mostrar que, curiosament, a la

regió promotora de Hey2 hi havia diferents llocs d'unió per a E2F4. Per assaigos CHIP es va confirmar aquesta unió. Tant p27 com E2F4 co-localitzen a la mateixa regió promotora de Hey2. Malgrat no haver pogut continuar aquest estudi, aquests experiments suggereixen clarament la possibilitat de que Hey2 pogués estar addicionalment regulat directament per p27, a través del complexE2F4/p130. No obstant, això resta per confirmar-se.

5. La proteïna p27 regula l'angiogènesi a través de la via de Notch

Tant FOXC2 com Hey2, així com EphrinB2, son marcadors arterials (**Fig. 11**). Mentre l'expressió d'EphrinB2 depèn indirectament de FOXC2 (mitjançant l'expressió de Dll4, que activa la via de Notch i porta a l'expressió d'EphrinB2), la regulació de Hey2 és, a més, directa (H. Hayashi & Kume, 2008). Si a això sumen que p27 s'uneix al promotor Hey2 i inhibeix la seva expressió, p27 sembla tenir un paper anti-angiogènic. A més, cal recordar que Hey2 inhibeix l'expressió de p27 (Havrdá et al., 2006). Per tant, un cop els nivells de p27 baixen i s'expressa Hey2, aquesta última manté baixa la quantitat de p27 per poder mantenir les seves funcions.

Totes aquestes dades indiquen un alt nivell de complexitat en la regulació de la via de Notch2 i, per tant, resta molta feina a fer per tal d'esbrinar amb detall el paper que juga p27 en la regulació d'aquesta via de senyalització.

Prèviament, s'havia relacionat la angiogènesi amb p27 (Vidal et al., 2005), però els mecanismes exactes eren desconeguts. A aquesta tesi es demostra que un marcador angiogènic (Hey2) està regulat directament

Discussió

per p27 i una altra proteïna necessària per aquest procés (FOXC2) mostra dependència pels nivells de p27. Que l'activitat de FOXC2 depengui de Cdk5 (Liebl et al., 2015), la qual està regulada per p27 (Zhang et al., 2010), i que FOXC2 actuï conjuntament amb Ets1 (Gambarotta et al., 1996), TF al que s'uneix p27 (Pippa et al., 2012), pot donar una idea dels múltiples punts d'interconnexió entre FOXC2 i p27.

Per tant, per ser un inhibidor de FOXC2 i la via de Notch, p27 actuaria com a un factor anti-angiogènic. Aquest paper de supressor de tumors quadraria amb els baixos nivells nuclears de p27 vist als tumors i la desregulació de l'angiogènesi característica d'aquests. La mala prognosi associada a poca quantitat de p27 podria ser deguda a un augment desregulat de l'angiogènesi mitjançant l'activació de la via de Notch. Això està en consonància amb els alts nivells de la via de Notch trobats en diverses línies tumorals KO per p27 (**Fig. 17**).

Així, l'increment dels nivells de Hey2, degut a la deficiència de p27, al seu torn promouria el manteniment de baixos nivells de p27 i, en conseqüència, l'expressió constant de proteïnes angiogèniques, com FOXC2 o la mateixa Hey2. Per tant, es generarien de forma persistent i desordenada vasos sanguinis, una característica típica dels tumors malignes.

6. La proteïna p27 en la via de Notch i el càncer

La via de Notch és una ruta de senyalització molt complexa, amb múltiples rols, molts dels quals a vegades entren en contradicció. Tal com es pot apreciar a la **Taula 7**, Notch pot tenir efectes oncogènics així com anti-oncogènics.

Per exemple, Notch1 i Notch2 tenen efectes oposats en el pronòstic del càncer colorectal (D. Chu et al., 2011), sent de pitjor pronòstic Notch1. En canvi, en els tumors de bufeta, Notch2 té un paper oncogènic en comparació al rol de supressor tumoral de Notch1 (T. Hayashi et al., 2016).

Taula 7. El paper de la via de Notch en diferents tumors. La taula representa amb cors les funcions de diferents receptors i lligands de la via de Notch: oncogènic (vermell), principalment oncogènic (groc), tant oncogènic com supressor de tumor (verd) i només supressor de tumor (blau).

	Notch1	Notch2	Notch3	Notch4	Jag1	Jag2	DLL1	DLL3	DLL4	Inespecífic
Leucèmia Mieloide Aguda										
Leucèmia Limfoblàstica Aguda de cèl·lules B										
Leucèmia Limfocítica Crònica de cèl·lules B										
Leucèmia Mielomonocítica Crònica										
Leucèmia Limfocítica Crònica										
Limfoma de Cèl·lules B Grans Difús										
Limfoma de Zona Marginal										
Mieloma Múltiple										
Leucèmia Limfoblàstica Aguda de Cèl·lules T										
Adenocarcinoma pulmonar										
Càncer de mama										
Càncer de cèrvix										
Colangiocarcinoma										
Càncer colorectal										
Càrcinoma escamós cutani										
Glioblastoma múltiple										
Carcinoma de cap i coll										
Carcinoma hepàtic										
Carcinoma de cèl·lula escamosa pulmonar										
Melanoma										
Càncer pulmonar de cèl·lula no escamosa										
Càncer d'ovari										
Càncer pancreàtic										
Càncer prostàtic										
Carcinoma renal										
Càncer pulmonar de cèl·lula petita										

També, en el cas del mateix subtipus de receptor, segons sigui el lligand de la cèl·lula presentadora, es desencadena un fenotip o un altre. Aquest és el cas dels lligands Jag1/Dll4 amb Notch1 en el procés de l'angiogènesi (**Fig. 10**). Mentre que Jag1 inhibeix la ramificació i afavoreix la proliferació cel·lular, Dll4 té l'efecte contrari (Benedito et al.,

Discussió

2009). Per tant, en un *loop* retroalimentat, Jag1 y Dll4 es van alternant per dur a terme una correcta formació dels vasos sanguinis.

En el cas dels coactivadors de la via, la família Maml presenta tres subtipus. La bibliografia es escassa, sobre tot pel que fa referència a Maml2. S'ha descrit que Maml2 es troba sobre-expressat en limfomes de cèl·lules B (Köchert et al., 2011). A més, s'ha observat que en un tipus de càncer de cap i coll molt concret, el carcinoma mucoepidermoide salivari es produeix una translocació $t(11:19)(q14-21;912-13)$, que porta a la fusió del exons 1 i 2 del coactivador transcripcional *CRTC1* situat en el cromosoma 19p13 amb el gen de *MAML2* en el cromosoma 11q21 (Coca-Pelaz et al., 2015). Aquesta translocació es clarament oncogènica.

S'ha descrit que Maml2 no pot compensar els efectes suprimits dels altres membres de la familiar Maml i, per tant, es suposa que la seva participació en el desenvolupament és limitada. A més, també s'ha observat que els seus nivells són baixos en cèl·lules embrionàries, en comparació amb diferents tipus cel·lulars adults (Oyama et al., 2011). Aquesta mínima participació en el desenvolupament embrionari, pot ser degut a que Maml2 té preferència per l'activació de Notch3 i Notch4 (Lin et al., 2002), els dos receptors de la via de Notch amb una expressió limitada a uns teixits molt concrets (Bellavia et al., 2018).

Concretament, els nivells de Notch3 disminueixen en el MEF^{p27^{KO}} respecte als controls, segons es va observar en el *microarray* d'expressió realitzat a aquest grup. (**Taula 1**). S'ha descrit que Notch3 també participa a la angiogènesi, però el seu rol està limitat a les cèl·lules de la musculatura llisa (VSMC) (Hosseini-Alghaderi & Baron, 2020). Mentre que Notch2 inhibeix la proliferació d'aquestes cèl·lules, Notch3 té

un paper anti-apoptòtic i estimulador de la proliferació (Baeten & Lilly, 2015).

Aquests fets suggereixen que p27 podria tenir diferents papers en els mecanismes angiogènics (**Fig. 32**). D'una banda, p27 podria ser un activador de la diferenciació de la musculatura llisa vascular, al afavorir l'expressió de Notch3 i Maml2. D'altra banda, podria actuar com a inhibidor del fenotip arterial, al bloquejar Hey2 i FOXC2.

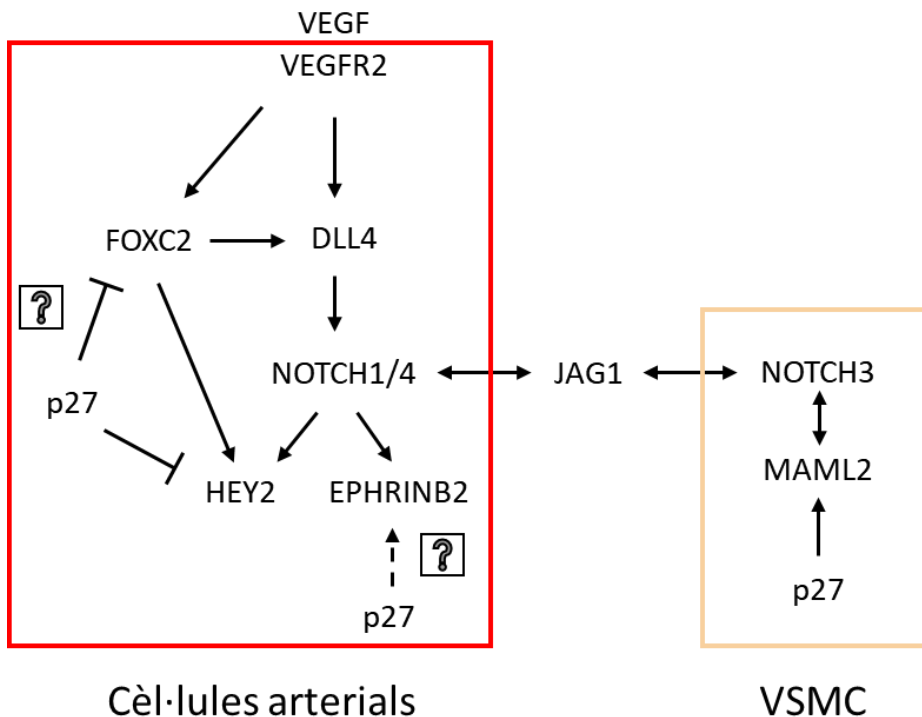


Figura 32. Possible paper de p27 al procés angiogènic. La diferenciació arterial està regulada per FOXC2, directament mitjançant l'expressió de Hey2, com indirectament, al promoure l'expressió del lligand DLL4. La regulació negativa sobre aquest procés per part de p27 es produeix a nivell de Hey2 i, molt probablement, FOXC2. Sobre EphrinB2, el paper de p27 sembla contradictori. La proliferació dels vasos sanguines està mediada per Jag1, que també promou la maduració a les VSMC. En aquest procés intervé Notch3, probablement mitjançant el coactivador Maml2, el qual està regulat positivament per p27.

Discussió

Cal remarcar que en el *microarray* d'expressió comparant MEF^{WT} vs MEF^{p27KO}, es van trobar altres elements relacionats amb el procés de diferenciació dels vasos sanguinis (**Taula 8**). Es va observar que la Neuropilina 2 (*Nrp2*), un receptor transmembrana associat a VEGF-R, es trobava incrementat 4,8 vegades en les cèl·lules p27KO, mentre l'expressió de COUP-TFII (*Nrf2*), un receptor nuclear orfe implicat en la diferenciació dels vasos sanguinis a venes, estava disminuïda 1,67 vegades en aquestes mateixes cèl·lules. És a dir, els marcadors angiogènics arterials es troben incrementats, però els venosos redueixen la seva expressió.

Taula 8. Gens relacionats amb l'angiogènesi trobats al *microarray* d'expressió en MEF^{WT} vs MEF^{p27KO}.

GEN		PROTEÏNA	DESCRIPCIÓ	REGULACIÓ	CANVI
Ratolí	Humà				
<i>Nrp2</i>	<i>NRP2</i>	Neuropilina 2	Receptor transmembrana Angiogènesi i neurogènesi	+	4,8
<i>Notch3</i>	<i>NOTCH3</i>	Notch 3	Receptor transmembrana Maduració VSMC CADASIL	-	1,51
<i>Nr2f2</i>	<i>NR2F2</i>	COUP-TFII	Receptor nuclear Angiogènesi (entre altres)	-	1,67

7. Perspectives futures

Encara que aquesta tesi ha trobat diferents gens de la via de Notch que es veuen afectats pels nivells de p27, alguns temes han quedat per resoldre

Respecte a l'angiogènesi, el mecanisme exacte pel qual p27 regula l'expressió de FOXC2 o altres elements de la via, és a dir, els factors de transcripció que participen conjuntament amb p27 en aquest procés, encara estan per dilucidar.

A més d'aquest apartat purament mecanístic, l'estudi *in vivo* de l'angiogènesi en embrions de ratolí KO per p27 seria una nova aproximació per intentar aclarir el paper de p27 sobre l'angiogènesi i si es

troben majors nivells tissulars de Hey2 o FOXC2 en aquests embrions o si presenten una formació arterial anòmala. Per últim, comprovar el procés angiogènic amb cèl·lules tumorals, on els alts nivells de Hey2 i FOXC2 són habituals (Liu et al., 2017; T. Wang et al., 2018).

També en relació amb l'angiogènesi, queda per establir un possible eix p27-MamL2-YAP al desenvolupament i, més concretament, el paper de p27-MamL2 a la diferenciació de les VSMC.

Finalment, queda pendent estudiar si la inhibició de Jag1 i Notch2 són per acció directa de p27 sobre els seus promotors gènics o si és un efecte colateral per la regulació d'altres elements, com per exemple Hey2.

CONCLUSIONS

Science never solves a problem without creating ten more.

George Bernard Shaw

1. La manca de p27 porta a la desregulació de diferents elements de la via de Notch en cèl·lules MEF. En general, l'absència de p27 provoca un augment a nivell gènic i proteic del lligand (Jag1), el receptor (Notch2), gens diana (Hey2) i elements col·laboratius (FOXC2).
2. L'eliminació o la sobreexpressió de p27 en cèl·lules tumorals afecta al patró gènic i proteic d'aquesta via segons s'ha descrit al punt anterior.
3. Tant l'eliminació de p130 com la d'E2F4 té efectes semblants a la manca de p27 (sobreexpressió dels diferents elements de la via de Notch).
4. El tractament amb roscovitina, un inhibidor universal de CDKs, suprimeix la sobre activació de la via de Notch en cèl·lules deficientes en p27.
5. La proteïna p27 colocalitza amb E2F4 però no Ets1 al promotor de Maml2, un coactivador de la via de Notch. Tant en quiescència com a cèl·lules proliferants, p27 i E2F4 són necessaris per l'expressió de Maml2.
6. La proteïna p27 colocalitza amb E2F4 al promotor de Hey2, un gen diana de la via de Notch.
7. La proteïna p27 podria regular l'expressió de FOXC2, degut a la relació inversa durant el cicle i la sobreexpressió de FOXC2 en cèl·lules quiescents KO per p27.

BIBLIOGRAFIA

All I have learned, I learned from books.

Abraham Lincoln

- Acosta, J. C., Ferrandiz, N., Bretones, G., Torrano, V., Blanco, R., Richard, C., O'Connell, B., Sedivy, J., Delgado, M. D., & Leon, J. (2008). Myc Inhibits p27-Induced Erythroid Differentiation of Leukemia Cells by Repressing Erythroid Master Genes without Reversing p27-Mediated Cell Cycle Arrest. *Molecular and Cellular Biology*, 28(24), 7286–7295. <https://doi.org/10.1128/mcb.00752-08>
- Ali, F., Hindley, C., McDowell, G., Deibler, R., Jones, A., Kirschner, M., Guillemot, F., & Philpott, A. (2011). Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development*, 138(19), 4267–4277. <https://doi.org/10.1242/dev.067900>
- Alt, J. R., Gladden, A. B., & Alan Diehl, J. (2002). p21Cip1 promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8517–8523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108867200>
- Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 67(9), 545–554. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>
- Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L. T., & Kwon, C. (2012). Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 5, pp. 257–265). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.003>
- Baeten, J. T., & Lilly, B. (2015). Differential regulation of NOTCH2 and NOTCH3 contribute to their unique functions in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(26), 16226–16237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655548>
- Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M. S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V., & Colombatti, A. (2005). p27Kip1-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell*, 7(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.025>
- Bellavia, D., Checquolo, S., Palermo, R., & Screpanti, I. (2018). The Notch3 Receptor and Its Intracellular Signaling-Dependent Oncogenic Mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_10

Bibliografia

- Bencivenga, D., Caldarelli, I., Stampone, E., Mancini, F. P., Balestrieri, M. L., Della Ragione, F., & Borriello, A. (2017). p27Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein. *Cancer Letters*, *403*, 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.031>
- Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R. H. (2009). The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell*, *137*(6), 1124–1135. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.025>
- Bertrand, N., Castro, D. S., & Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 3, Issue 7, pp. 517–530). <https://doi.org/10.1038/nrn874>
- Besson, A., Assoian, R. K., & Roberts, J. M. (2004). Regulation of the cytoskeleton: An oncogenic function for CDK inhibitors? *Nature Reviews Cancer*, *4*(12), 948–955. <https://doi.org/10.1038/nrc1501>
- Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K. S., Kemp, C. J., & Roberts, J. M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes and Development*, *20*(1), 47–64. <https://doi.org/10.1101/gad.1384406>
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., & Roberts, J. M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes & Development*, *18*(8), 862–876. <https://doi.org/10.1101/gad.1185504>
- Besson, A., Hwang, H. C., Cicero, S., Donovan, S. L., Gurian-West, M., Johnson, D., Clurman, B. E., Dyer, M. A., & Roberts, J. M. (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes and Development*, *21*(14), 1731–1746. <https://doi.org/10.1101/gad.1556607>
- Biçer, A., Orlando, S., M M K Islam, A. B., Gallastegui, E., Besson, A., Aligué, R., Bachs, O., & Jesús Pujol, M. (2017). *ChIP-Seq analysis identifies p27(Kip1)-target genes involved in cell adhesion and cell signalling in mouse embryonic fibroblasts*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187891>
- Boareto, M., Jolly, M. K., Ben-Jacob, E., & Onuchic, J. N. (2015).

- Jagged mediates differences in normal and tumor angiogenesis by affecting tip-stalk fate decision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(29), E3836–E3844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511814112>
- Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G. J., & Nabel, E. G. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *The EMBO Journal*, 21(13), 3390–3401. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf343>
- Borggrefe, T., & Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(10), 1631–1646. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8668-7>
- Bretones, G., Acosta, J. C., Caraballo, J. M., Ferrándiz, N., Gómez-Casares, M. T., Albajar, M., Blanco, R., Ruiz, P., Hung, W. C., Albero, M. P., Perez-Roger, I., & León, J. (2011). SKP2 oncogene is a direct MYC target gene and MYC down-regulates p27 KIP1 through SKP2 in human leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9815–9825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165977>
- Brzozowa-Zasada, M., Piecuch, A., Michalski, M., Segiet, O., Kurek, J., Harabin-Słowińska, M., & Wojnicz, R. (2017). Notch and its oncogenic activity in human malignancies. *European Surgery : ACA : Acta Chirurgica Austriaca*, 49(5), 199–209. <https://doi.org/10.1007/s10353-017-0491-z>
- Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A., & Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology*, 1(4), 193–199. <https://doi.org/10.1038/12013>
- Cassimere, E. K., Mauvais, C., & Denicourt, C. (2016). *p27 Kip1 Is Required to Mediate a G1 Cell Cycle Arrest Downstream of ATM following Genotoxic Stress*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162806>
- Chandramohan, V., Mineva, N. D., Burke, B., Jeay, S., Wu, M., Shen, J., Yang, W., Hann, S. R., & Sonenshein, G. E. (2008). c-Myc represses FOXO3a-mediated transcription of the gene encoding the p27Kip1 cyclin dependent kinase inhibitor. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(6), 2091–2106.

Bibliografia

<https://doi.org/10.1002/jcb.21765>

- Chen, X., Cates, J. M. M., Du, Y.-C., Jain, A., Jung, S. Y., Li, X.-N., Hicks, J. M., & Man, T. (2020). Mislocalized cytoplasmic p27 activates PAK1-mediated metastasis and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Molecular Oncology*, *14*(4), 846–864. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12624>
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., & Sherr, C. J. (1999). The p21 Cip1 and p27 Kip1 CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. In *The EMBO Journal* (Vol. 18, Issue 6).
- Chiang, M. Y., Xu, L., Shestova, O., Histen, G., L’Heureux, S., Romany, C., Childs, M. E., Gimotty, P. A., Aster, J. C., & Pear, W. S. (2008). Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(9), 3181–3194. <https://doi.org/10.1172/JCI35090>
- Cho, S., Kim, J. H., Back, S. H., & Jang, S. K. (2005). Polypyrimidine tract-binding protein enhances the internal ribosomal entry site-dependent translation of p27Kip1 mRNA and modulates transition from G1 to S phase. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(4), 1283–1297. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1283-1297.2005>
- Choi, B.-K., Fujiwara, K., Dayaram, T., Darlington, Y., Dickerson, J., Goodell, M. A., & Donehower, L. A. (2020). *Cell Cycle WIP1 dephosphorylation of p27 Kip1 Serine 140 destabilizes p27 Kip1 and reverses anti-proliferative effects of ATM phosphorylation*. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1717025>
- Chu, D., Zhang, Z., Zhou, Y., Wang, W., Li, Y., Zhang, H., Dong, G., Zhao, Q., & Ji, G. (2011). Notch1 and notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Annals of Oncology*, *22*(11), 2440–2447. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq776>
- Chu, I. M., Hengst, L., & Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *8*(4), 253–267. <https://doi.org/10.1038/nrc2347>
- Chu, I., Sun, J., Arnaout, A., Kahn, H., Hanna, W., Narod, S., Sun, P., Tan, C. K., Hengst, L., & Slingerland, J. (2007). p27

- Phosphorylation by Src Regulates Inhibition of Cyclin E-Cdk2. *Cell*, 128(2), 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.049>
- Coca-Pelaz, A., Rodrigo, J. P., Triantafyllou, A., Hunt, J. L., Alessandra, ·, Primož, R. ·, Missak, S. ·, William, H. ·, Mendenhall, M., Takes, R. P., Poorten, V. Vander, & Ferlito, A. (2015). Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 272, 799–819. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3053-z>
- Connor, M. K., Kotchetkov, R., Cariou, S., Resch, A., Lupetti, R., Beniston, R. G., Melchior, F., Hengst, L., & Slingerland, J. M. (2003). CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27Kip1 involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Molecular Biology of the Cell*, 14(1), 201–213. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-06-0319>
- Cui, Y. M., Jiao, H. L., Ye, Y. P., Chen, C. M., Wang, J. X., Tang, N., Li, T. T., Lin, J., Qi, L., Wu, P., Wang, S. Y., He, M. R., Liang, L., Bian, X. W., Liao, W. T., & Ding, Y. Q. (2015). FOXC2 promotes colorectal cancer metastasis by directly targeting MET. *Oncogene*, 34(33), 4379–4390. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.368>
- Deng, X., Mercer, S. E., Shah, S., Ewton, D. Z., & Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G0 by Mirk/dyrk1B Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22498–22504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400479200>
- Dietrich, S., Hüllelin, J., Lee, S. C. W., Hutter, B., Gonzalez, D., Jayne, S., Dyer, M. J. S., Oleś, M., Else, M., Liu, X., Słabicki, M., Wu, B., Troussard, X., Dürig, J., Andrulis, M., Dearden, C., Von Kalle, C., Granzow, M., Jauch, A., ... Zenz, T. (2015). Recurrent CDKN1B (p27) mutations in hairy cell leukemia. *Blood*, 126(8), 1005–1008. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-643361>
- Dohda, T., Maljukova, A., Liu, L., Heyman, M., Grandér, D., Brodin, D., Sangfelt, O., & Lendahl, U. (2007). Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Experimental Cell Research*, 313(14), 3141–3152. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.027>
- Fabris, L., Berton, S., Pellizzari, I., Segatto, I., D'Andrea, S., Armenia,

Bibliografia

- J., Bomben, R., Schiappacassi, M., Gattei, V., Philips, M. R., Vecchione, A., Belletti, B., & Baldassarre, G. (2015). p27kip1 controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(45), 13916–13921. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508514112>
- Fero, M. L., Randel, E., Gurley, K. E., Roberts, J. M., & Kemp, C. J. (1998). The murine gene p27(Kip 1) is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, *396*(6707), 177–180. <https://doi.org/10.1038/24179>
- Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., Kaushansky, K., & Roberts, J. M. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27Kip1-deficient Mice. *Cell*, *85*(5), 733–744. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81239-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81239-8)
- Foo, S. S., Turner, C. J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D., & Adams, R. H. (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell*, *124*(1), 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.034>
- Fujita, N., Sato, S., Katayama, K., & Tsuruo, T. (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 28706–28713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203668200>
- Fujita, N., Sato, S., & Tsuruo, T. (2003). Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(49), 49254–49260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306614200>
- Galea, C. A., Nourse, A., Wang, Y., Sivakolundu, S. G., Heller, W. T., & Kriwacki, R. W. (2008). Role of Intrinsic Flexibility in Signal Transduction Mediated by the Cell Cycle Regulator, p27Kip1. *Journal of Molecular Biology*, *376*(3), 827–838. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.016>
- Gallastegui, Biçer, A., Orlando, S., Besson, A., Pujol, M. J., & Bachs, O. (2017). p27Kip1 represses the Pitx2-mediated expression of p21Cip1 and regulates DNA replication during cell cycle

- progression. *Oncogene*, *36*(3), 350–361.
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.200>
- Gallastegui, E., Domuro, C., Serratosa, J., Larrieux, A., Sin, L., Martinez, J., Besson, A., Morante-Redolat, J. M., Orlando, S., Aligue, R., Fariñas, I., Pujol, M. J., & Bachs, O. (2018). p27Kip1 regulates alpha-synuclein expression. *Oncotarget*, *9*(23), 16368–16379. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24687>
- Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Andò, M., Stella, M. C., & Comoglio, P. M. (1996). Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene*, *13*(9), 1911–1917.
- Ganoh, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., & Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCFSkp2-mediated ubiquitinylation of p27. *Nature Cell Biology*, *3*(3), 321–324. <https://doi.org/10.1038/35060126>
- González, T., Seoane, M., Caamaño, P., Viñuela, J., Domínguez, F., & Zalvide, J. (2003). Inhibition of Cdk4 activity enhances translation of p27kip1 in quiescent Rb-negative cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(15), 12688–12695.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207530200>
- Göpfert, U., Kullmann, M., & Hengst, L. (2003). Cell cycle-dependent translation of p27 involves a responsive element in its 5'-UTR that overlaps with a uORF. *Human Molecular Genetics*, *12*(14), 1767–1779. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg177>
- Grimmler, M., Wang, Y., Mund, T., Cilenšek, Z., Keidel, E. M., Waddell, M. B., Jäkel, H., Kullmann, M., Kriwacki, R. W., & Hengst, L. (2007). Cdk-Inhibitory Activity and Stability of p27Kip1 Are Directly Regulated by Oncogenic Tyrosine Kinases. *Cell*, *128*(2), 269–280.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.047>
- Hattori, T., Isobe, T., Abe, K., Kikuchi, H., Kitagawa, K., Oda, T., Uchida, C., & Kitagawa, M. (2007). Pirh2 promotes ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Cancer Research*, *67*(22), 10789–10795.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2033>
- Havrda, M. C., Johnson, M. J., O'Neill, C. F., & Liaw, L. (2006). A novel mechanism of transcriptional repression of p27kip1 through Notch/HRT2 signaling in vascular smooth muscle cells.

Bibliografia

- Thrombosis and Haemostasis*, 96(3), 361–370.
<https://doi.org/10.1160/TH06-04-0224>
- Hayashi, H., & Kume, T. (2008). Foxc transcription factors directly regulate Dll4 and hey2 expression by interacting with the VEGF-notch signaling pathways in endothelial cells. *PLoS ONE*, 3(6), e2401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002401>
- Hayashi, T., Gust, K. M., Wyatt, A. W., Goriki, A., Jäger, W., Awrey, S., Li, N., Oo, H. Z., Altamirano-Dimas, M., Buttyan, R., Fazli, L., Matsubara, A., & Black, P. C. (2016). Not all NOTCH is created equal: The oncogenic role of NOTCH2 in bladder cancer and its implications for targeted therapy. *Clinical Cancer Research*, 22(12), 2981–2992. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2360>
- Hengst, L., & Reed, S. I. (1996). Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*, 271(5257), 1861–1864. <https://doi.org/10.1126/science.271.5257.1861>
- Hori, K., Sen, A., & Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 10), 2135–2140. <https://doi.org/10.1242/jcs.127308>
- Hosseini-Alghaderi, S., & Baron, M. (2020). Notch3 in development, health and disease. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 3, p. 485). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10030485>
- Hsu, J., & Sage, J. (2016). Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle*, 15. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1234551>
- Huang, Y. C., Chen, J. Y., & Hung, W. C. (2004). Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3. *Oncogene*, 23(28), 4856–4861. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207621>
- Inoue, T., Kamiyama, J., & Sakai, T. (1999). Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D3 in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32309–32317. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32309>
- Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., & Nakayama, K. I. (2000). Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 275(33), 25146–25154.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M001144200>
- Ishida, Noriko, Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., & Nakayama, K. I. (2002). Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14355–14358.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C100762200>
- Jäkel, H., Weinl, C., & Hengst, L. (2011). Phosphorylation of p27Kip1 by JAK2 directly links cytokine receptor signaling to cell cycle control. *Oncogene*, 30(32), 3502–3512.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.68>
- James, M. K., Ray, A., Leznova, D., & Blain, S. W. (2008). Differential Modification of p27Kip1 Controls Its Cyclin D-cdk4 Inhibitory Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 498–510. <https://doi.org/10.1128/mcb.02171-06>
- Jeannot, P., Callot, C., Baer, R., Duquesnes, N., Guerra, C., Guillermet-Guibert, J., Bachs, O., & Arnaud, B. (2015). Loss of p27Kip1 promotes metaplasia in the pancreas via the regulation of Sox9 expression. *Oncotarget*, 6(34), 35880–35892.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5770>
- Jeannot, P., Nowosad, A., Perchey, R., Callot, C., Bennana, E., Katsube, T., Mayeux, P., Guillonneau, F., Manenti, S., & Besson, A. (2017). P27kip1 promotes invadopodia turnover and invasion through the regulation of the PAK1/cortactin pathway. *ELife*, 6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.22207>
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., & Nakayama, K. I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27Kip1 at G1 phase. *Nature Cell Biology*, 6(12), 1229–1235.
<https://doi.org/10.1038/ncb1194>
- Karnik, S. K., Hughes, C. M., Gu, X., Rozenblatt-Rosen, O., McLean, G. W., Xiong, Y., Meyerson, M., & Kim, S. K. (2005). Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14659–14664.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503484102>

Bibliografia

- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. I., & Hoshino, M. (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biology*, 8(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/ncb1338>
- Köchert, K., Ullrich, K., Kreher, S., Aster, J. C., Kitagawa, M., Jöhrens, K., Anagnostopoulos, I., Jundt, F., Lamprecht, B., Zimmer-Strobl, U., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., & Mathas, S. (2011). High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*, 30(15), 1831–1840. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.544>
- Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J. M., & Massagué, J. (1993). Negative regulation of G1 in mammalian cells: Inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β . *Science*, 260(5107), 536–539. <https://doi.org/10.1126/science.8475385>
- Kovall, R. A., Gebelein, B., Sprinzak, D., & Kopan, R. (2017). The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. In *Developmental Cell* (Vol. 41, Issue 3, pp. 228–241). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.001>
- Kullmann, M., Göpfert, U., Siewe, B., & Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes and Development*, 16(23), 3087–3099. <https://doi.org/10.1101/gad.248902>
- Kume, T. (2008). Foxc2 Transcription Factor: A Newly Described Regulator of Angiogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(6). <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.11.003>
- Lacy, E. R., Filippov, I., Lewis, W. S., Otieno, S., Xiao, L., Weiss, S., Hengst, L., & Kriwacki, R. W. (2004). p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(4), 358–364. <https://doi.org/10.1038/nsmb746>
- Larrea, M. D., Hong, F., Wander, S. A., Da Silva, T. G., Helfman, D., Lannigan, D., Smith, J. A., & Slingerland, J. M. (2009). RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805057106>

- le Sage, C., Nagel, R., Egan, D. A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C., Maira, G., Mercatelli, N., Ciafrè, S. A., Farace, M. G., & Agami, R. (2007). Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *The EMBO Journal*, *26*(15), 3699–3708. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601790>
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C. J., Cañ, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martínez, G., Vidal, A., Lovell-Badge, R., & Serrano, M. (2012). p27 Kip1 Directly Represses Sox2 during Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*, *11*, 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.014>
- Li, J. L., Sainson, R. C. A., Shi, W., Leek, R., Harrington, L. S., Preusser, M., Biswas, S., Turley, H., Heikamp, E., Hainfellner, J. A., & Harris, A. L. (2007). Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Research*, *67*(23), 11244–11253. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0969>
- Li, L., Tang, P., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C., & Liu, Y. (2017). Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Medical Oncology*, *34*(10), 180. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1039-6>
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. hwa, Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., & Slingerland, J. M. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature Medicine*, *8*(10), 1153–1160. <https://doi.org/10.1038/nm761>
- Liebl, J., Zhang, S., Moser, M., Agalarov, Y., Demir, C. S., Hager, B., Bibb, J. A., Adams, R. H., Kiefer, F., Miura, N., Petrova, T. V., Vollmar, A. M., & Zahler, S. (2015). Cdk5 controls lymphatic vessel development and function by phosphorylation of Foxc2. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8274>
- Liu, Z., Sanders, A. J., Liang, G., Song, E., Jiang, W. G., & Gong, C. (2017). Hey factors at the crossroad of tumorigenesis and clinical therapeutic modulation of hey for anticancer treatment. In *Molecular Cancer Therapeutics* (Vol. 16, Issue 5, pp. 775–786). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0576>

Bibliografia

- Mäkinen, T., Adams, R. H., Bailey, J., Lu, Q., Ziemiecki, A., Alitalo, K., Klein, R., & Wilkinson, G. A. (2005). PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes and Development*, *19*(3), 397–410. <https://doi.org/10.1101/gad.330105>
- Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakidis, T. R., & Roberts, J. M. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*, *413*(6853), 323–327. <https://doi.org/10.1038/35095083>
- Mallampalli, R. K., Kaercher, L., Snavelly, C., Pulijala, R., Chen, B. B., Coon, T., Zhao, J., & Agassandian, M. (2013). Fbxl12 triggers G1 arrest by mediating degradation of calmodulin kinase I. *Cellular Signalling*, *25*(10), 2047–2059. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.05.012>
- Mayer, E. L., & Krop, I. E. (2010). Advances in targeting Src in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 16, Issue 14, pp. 3526–3532). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1834>
- Medema, R. H., Kops, G. J. P. L., Bos, J. L., & Burgering, B. M. T. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27(kip1). *Nature*, *404*(6779), 782–787. <https://doi.org/10.1038/35008115>
- Messina, G., Blasi, C., La Rocca, S. A., Pompili, M., Calconi, A., & Grossi, M. (2005). p27Kip1 acts downstream of N-cadherin-mediated cell adhesion to promote myogenesis beyond cell cycle regulation. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(3), 1469–1480. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-07-0612>
- Meurette, O. (2020). Shaping of the Tumor Microenvironment by Notch Signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1223*, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35582-1_1
- Millard, S. S., Vidal, A., Markus, M., & Koff, A. (2000). A U-Rich Element in the 5' Untranslated Region Is Necessary for the Translation of p27 mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(16), 5947–5959. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.16.5947-5959.2000>

- Millard, S. Sean, Yan, J. S., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H., & Koff, A. (1997). Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 7093–7098. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.7093>
- Miskimins, W. K., Wang, G., Hawkinson, M., & Miskimins, R. (2001). Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), 4960–4967. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.15.4960-4967.2001>
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A., & Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes & Development*, 13(9), 1181–1189. <https://doi.org/10.1101/gad.13.9.1181>
- Morelli, G., Even, A., Gladwyn-Ng, I., Le Bail, R., Shilian, M., Godin, J. D., Peyre, E., Hassan, B. A., Besson, A., Rigo, J. M., Weil, M., Brône, B., & Nguyen, L. (2018). p27Kip1 Modulates Axonal Transport by Regulating α -Tubulin Acetyltransferase 1 Stability. *Cell Reports*, 23(8), 2429–2442. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.083>
- Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T., & Fujita, N. (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Research*, 68(13), 5076–5085. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0634>
- Movassagh, M., & Philpott, A. (2008). Cardiac differentiation in *Xenopus* requires the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Xic1. *Cardiovascular Research*, 79(3), 436–447. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn105>
- Muñoz-Alonso, M. J., Acosta, J. C., Richard, C., Delgado, M. D., Sedivy, J., & León, J. (2005). p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), 18120–18129. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500758200>
- Murata, K., Hattori, M., Hirai, N., Shinozuka, Y., Hirata, H., Kageyama, R., Sakai, T., & Minato, N. (2005). Hes1 directly

Bibliografia

- controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(10), 4262–4271. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.4262-4271.2005>
- Nacusi, L. P., & Sheaff, R. J. (2006). Akt1 sequentially phosphorylates p27kip1 within a conserved but non-canonical region. *Cell Division*, 1, 11. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-11>
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D. Y., & Nakayama, K. I. (1996). Mice Lacking p27Kip1 Display Increased Body Size, Multiple Organ Hyperplasia, Retinal Dysplasia, and Pituitary Tumors. *Cell*, 85(5), 707–720. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81237-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81237-4)
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., & Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Developmental Cell*, 6(5), 661–672. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00131-5](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00131-5)
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono- phosphorylation Life without a wall or division machine in Bacillus subtilis. *ELife*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.02872>
- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J. M., & Guillemot, F. (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes & Development*, 1511–1524. <https://doi.org/10.1101/gad.377106>. Cyclin-dependent
- Noren, N. K., & Pasquale, E. B. (2004). Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. In *Cellular Signalling* (Vol. 16, Issue 6, pp. 655–666). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.10.006>
- Nowell, C. S., & Radtke, F. (2017). Notch as a tumour suppressor. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 3, pp. 145–159). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.145>
- Nowosad, A., Jeannot, P., Callot, C., Creff, J., Perchey, R. T., Joffre, C., Codogno, P., Manenti, S., & Besson, A. (2020). p27 controls Ragulator and mTOR activity in amino acid-deprived cells to regulate the autophagy–lysosomal pathway and coordinate cell

- cycle and cell growth. *Nature Cell Biology*, 22(9), 1076–1090.
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-0554-4>
- Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., & Aifantis, I. (2014). Cancer Cell Perspective From Fly Wings to Targeted Cancer Therapies: A Centennial for Notch Signaling. *Cancer Cell*, 25, 318–334.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.018>
- O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., De Alboran, I. M., Alt, F. W., Kaelin, W. G., & DePinho, R. A. (2000). Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes and Development*, 14(17), 2185–2191. <https://doi.org/10.1101/gad.827200>
- Orlando, S., Gallastegui, E., Besson, A., Abril, G., Aligu, R., Pujol, M. J., & Bachs, O. (2015). P27Kip1 and p21Cip1 collaborate in the regulation of transcription by recruiting cyclin-Cdk complexes on the promoters of target genes. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6860–6873. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv593>
- Ou, L., Ferreira, A. M., Otieno, S., Xiao, L., Bashford, D., & Kriwacki, R. W. (2011). Incomplete folding upon binding mediates Cdk4/cyclin D complex activation by tyrosine phosphorylation of inhibitor p27 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30142–30151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244095>
- Oyama, T., Harigaya, K., Sasaki, N., Okamura, Y., Kokubo, H., Saga, Y., Hozumi, K., Suganami, A., Tamura, Y., Nagase, T., Koga, H., Nishimura, M., Sakamoto, R., Sato, M., Yoshida, N., & Kitagawa, M. (2011). Mastermind-like 1 (MamL1) and mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo. *Development*, 138(23), 5235–5246. <https://doi.org/10.1242/dev.062802>
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U., & Klein, R. (2002). EphrinB phosphorylation and reverse signaling: Regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Molecular Cell*, 9(4), 725–737.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00488-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00488-4)
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 20, Issue 3, pp. 460–473). Antioxid Redox Signal. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pelullo, M., Nardoza, F., Zema, S., Quaranta, R., Nicoletti, C.,

Bibliografía

- Besharat, Z. M., Felli, M. P., Cerbelli, B., d'Amati, G., Palermo, R., Capalbo, C., Talora, C., Marcotullio, L. Di, Giannini, G., Checquolo, S., Screpanti, I., & Bellavia, D. (2019). Kras/ADAM17-dependent Jag1-ICD reverse signaling sustains colorectal cancer progression and chemoresistance. *Cancer Research*, *79*(21), 5575–5586. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0145>
- Perchey, R. T., Serres, M. P., Nowosad, A., Creff, J., Callot, C., Gay, A., Manenti, S., Margolis, R. L., Hatzoglou, A., & Besson, A. (2018). p27 Kip1 regulates the microtubule bundling activity of PRC1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1865*(11), 1630–1639. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.010>
- Perearnau, A., Orlando, S., Islam, A. B. M. M. K., Gallastegui, E., Martínez, J., Jordan, A., Bigas, A., Aligué, R., Pujol, M. J., & Bachs, O. (2017). p27Kip1, PCAF and PAX5 cooperate in the transcriptional regulation of specific target genes. *Nucleic Acids Research*, *9*, 1–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx075>
- Pérez-Luna, M., Aguasca, M., Perearnau, A., Serratos, J., Martínez-Balbas, M., Jesús Pujol, M., & Bachs, O. (2012). PCAF regulates the stability of the transcriptional regulator and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1. *Nucleic Acids Research*, *40*(14), 6520–6533. <https://doi.org/10.1093/nar/gks343>
- Pietenpol, J. A., Bohlander, S. K., Sato, Y., Papadopoulos, N., Liu, B., Friedman, C., Trask, B. J., Roberts, J. M., Kinzler, K. W., & Rowley, J. D. (1995). Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Research*, *55*(6), 1206–1210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882309>
- Pietila, M., Vijay, G. V., Soundararajan, R., Yu, X., Symmans, W. F., Sphyris, N., & Mani, S. A. (2016). FOXC2 regulates the G2/M transition of stem cell-rich breast cancer cells and sensitizes them to PLK1 inhibition. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep23070>
- Pippa, R., Espinosa, L., Gundem, G., García-Escudero, R., Dominguez, A., Orlando, S., Gallastegui, E., Saiz, C., Besson, A., Pujol, M. J., López-Bigas, N., Paramio, J. M., Bigas, A., & Bachs, O. (2012). p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene*, *31*(38), 4207–4220. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.582>

- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., & Koff, A. (1994). p27(Kip1), a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes and Development*, 8(1), 9–22. <https://doi.org/10.1101/gad.8.1.9>
- Polyak, Kornelia, Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., & Massagué, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90572-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90572-X)
- Ponce-Castañeda, M. V., Lee, M. H., Latres, E., Polyak, K., Lacombe, L., Mathew, S., Sheinfeld, J., Massague, J., Cordon-Cardo, C., Lee, M. H., Massague, J., Montgomery, K., & Krauter, K. (1995). p27Kip1: Chromosomal Mapping to 12p12–12p13.1 and Absence of Mutations in Human Tumors. *Cancer Research*, 55(6), 1211–1214.
- Ray, A., James, M. K., Larochelle, S., Fisher, R. P., & Blain, S. W. (2009). p27 Kip1 Inhibits Cyclin D-Cyclin-Dependent Kinase 4 by Two Independent Modes. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 29(4), 986–999. <https://doi.org/10.1128/MCB.00898-08>
- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chantry, Y., Kowalski, J., Watts, R. J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J. A. S., De Sauvage, F., Plowman, G., & Yan, M. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444(7122), 1083–1087. <https://doi.org/10.1038/nature05313>
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27(Kip1) cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), 325–331. <https://doi.org/10.1038/382325a0>
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., & Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6392–6397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802047105>
- Sarmiento, L. M., Huang, H., Limon, A., Gordon, W., Fernandes, J., Tavares, M. J., Miele, L., Cardoso, A. A., Classon, M., &

Bibliografia

- Carlesso, N. (2005). Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27Kip1 degradation. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 157–168. <https://doi.org/10.1084/jem.20050559>
- Sekimoto, T., Fukumoto, M., & Yoneda, Y. (2004). 14-3-3 Suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27Kip1. *EMBO Journal*, 23(9), 1934–1942. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600198>
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. In *Genes and Development* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1501–1512). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>
- Shimada, M., Kitagawa, K., Dobashi, Y., Isobe, T., Hattori, T., Uchida, C., Abe, K., Kotake, Y., Oda, T., Suzuki, H., Hashimoto, K., & Kitagawa, M. (2009). High expression of Pirh2, an E3 ligase for p27, is associated with low expression of p27 and poor prognosis in head and neck cancers. *Cancer Science*, 100(5), 866–872. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01122.x>
- Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N. young, Bakin, A. V., Baselga, J., & Arteaga, C. L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature Medicine*, 8(10), 1145–1152. <https://doi.org/10.1038/nm759>
- Siebel, C., & Lendahl, U. (2017). Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiological Reviews*, 97(4), 1235–1294. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2017>
- Sivakolundu, S. G., Bashford, D., & Kriwacki, R. W. (2005). Disordered p27 Kip1 Exhibits Intrinsic Structure Resembling the Cdk2/Cyclin A-bound Conformation. *Journal of Molecular Biology*, 353, 1118–1128. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.074>
- Slingerland, J. M., Hengst, L., Pan, C. H., Alexander, D., Stampfer, M. R., & Reed, S. I. (1994). A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6), 3683–3694. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3683>
- Slingerland, J., & Pagano, M. (2000). Regulation of the Cdk inhibitor

- p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 183(1), 10–17. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200004\)183:1<10::AID-JCP2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200004)183:1<10::AID-JCP2>3.0.CO;2-I)
- Susaki, E., Nakayama, K., & Nakayama, K. I. (2007). Cyclin D2 Translocates p27 out of the Nucleus and Promotes Its Degradation at the G0-G1 Transition. *Molecular and Cellular Biology*, 27(13), 4626–4640. <https://doi.org/10.1128/mcb.00862-06>
- Toyoshima, H., & Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90573-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90573-8)
- Vernon, A. E., Devine, C., & Philpott, A. (2003). The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. In *Development* (Vol. 130, Issue 1, pp. 85–92). The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.00193>
- Vernon, A. E., & Philpott, A. (2003). A single cdk inhibitor, p27Xic1, functions beyond cell cycle regulation to promote muscle differentiation in *Xenopus*. In *Development* (Vol. 130, Issue 1, pp. 71–83). The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.00180>
- Vidal, A., Sean Millard, S., Miller, J. P., & Koff, A. (2002). Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16433–16440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112090200>
- Vidal, A., Zacharoulis, S., Guo, W., Shaffer, D., Giancotti, F., Bramley, A. H., De La Hoz, C., Jensen, K. K., Kato, D., MacDonald, D. D., Knowles, J., Yeh, N., Frohman, L. A., Rafii, S., Lyden, D., & Koff, A. (2005). p130Rb2 and p27kip1 cooperate to control mobilization of angiogenic progenitors from the bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6890–6895. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405823102>
- Viglietto, G., Motti, M. L., Bruni, P., Melillo, R. M., D'alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschliiss, P., Bellacosa, A., Fusco, A., & Santoro, M. (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Medicine*, 8(10), 1136–1144. <https://doi.org/10.1038/nm762>

Bibliografia

- Wang, C., Hou, X., Mohapatra, S., Ma, Y., Cress, W. D., Pledger, W. J., & Chen, J. (2005). Activation of p27Kip1 expression by E2F1: A negative feedback mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12339–12343. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400536200>
- Wang, T., Zheng, L., Wang, Q., & Hu, Y. W. (2018). Emerging roles and mechanisms of FOXC2 in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 479(November 2017), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.019>
- Wang, Y., Wang, Y., Xiang, J., Ji, F., Deng, Y., Tang, C., Yang, S., Xi, Q., Liu, R., & Di, W. (2014). Knockdown of CRM1 inhibits the nuclear export of p27Kip1 phosphorylated at serine 10 and plays a role in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Cancer Letters*, 343(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.002>
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris IV, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., & Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694), 269–271. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>
- Werden, S. J., Sphyris, N., Sarkar, T. R., Paranjape, A. N., Labaff, A. M., Taube, J. H., Hollier, B. G., Ramirez-Penã, E. Q., Soundararajan, R., Den Hollander, P., Powell, E., Echeverria, G. V., Miura, N., Chang, J. T., Piwnica-Worms, H., Rosen, J. M., & Mani, S. A. (2016). Phosphorylation of serine 367 of FOXC2 by p38 regulates ZEB1 and breast cancer metastasis, without impacting primary tumor growth. *Oncogene*, 35(46), 5977–5988. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.203>
- White, J. P., Billin, A. N., Campbell, M. E., Russell, A. J., Huffman, K. M., & Kraus, W. E. (2018). The AMPK/p27Kip1 Axis Regulates Autophagy/Apoptosis Decisions in Aged Skeletal Muscle Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11(2), 425–439. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.06.014>
- Williams, C. K., Li, J. L., Murga, M., Harris, A. L., & Tosato, G. (2006). Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*, 107(3), 931–939. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1000>
- Wu, F. Y., Wang, S. E., Sanders, M. E., Shin, I., Rojo, F., Baselga, J., & Arteaga, C. L. (2006). Reduction of cytosolic p27Kip1 inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer*

- Research*, 66(4), 2162–2172. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3304>
- Xia, P., & Xu, X. Y. (2015). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: From basic research to clinical application. In *American Journal of Cancer Research* (Vol. 5, Issue 5, pp. 1602–1609). E-Century Publishing Corporation.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L. P., & Sonenshein, G. E. (2001). Repression of transcription of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*, 20(14), 1688–1702. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204245>
- Yatim, A., Benne, C., Sobhian, B., Laurent-Chabalier, S., Deas, O., Judde, J. G., Lelievre, J. D., Levy, Y., & Benkirane, M. (2012). NOTCH1 Nuclear Interactome Reveals Key Regulators of Its Transcriptional Activity and Oncogenic Function. *Molecular Cell*, 48(3), 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.022>
- Yeh, N., Miller, J. P., Gaur, T., Capellini, T. D., Nikolich-Zugich, J., de la Hoz, C., Selleri, L., Bromage, T. G., van Wijnen, A. J., Stein, G. S., Lian, J. B., Vidal, A., & Koff, A. (2007). Cooperation between p27 and p107 during Endochondral Ossification Suggests a Genetic Pathway Controlled by p27 and p130. *Molecular and Cellular Biology*, 27(14), 5161–5171. <https://doi.org/10.1128/mcb.02431-06>
- Yoon, H., Kim, M., Jang, K., Shin, M., Besser, A., Xiao, X., Zhao, D., Wander, S. A., Briegel, K., Morey, L., Minn, A., & Slingerland, J. M. (2019). p27 transcriptionally coregulates cJun to drive programs of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 7005–7014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817415116>
- Yukimoto, H., Miyamoto, T., Kiyono, T., Wang, S., Matsuura, S., Mizoguchi, A., Katayama, N., Inagaki, M., & Kasahara, K. (2020). A novel CDK-independent function of p27 Kip1 in preciliary vesicle trafficking during ciliogenesis. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.048>
- Zada, S., Noh, H. S., Baek, S. M., Ha, J. H., Hahm, J. R., & Kim, D. R. (2015). Depletion of p18/LAMTOR1 promotes cell survival via activation of p27^{Kip1}-dependent autophagy under starvation. *Cell*

Bibliografia

Biology International, 39(11), 1242–1250.
<https://doi.org/10.1002/cbin.10497>

Zhang, J., Li, H., & Herrup, K. (2010). Cdk5 Nuclear Localization Is p27-dependent in Nerve Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 14052–14061.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068262>

ABREVIACIONS

A bon entenedor, poques paraules.

Dita popular

Acrònim	Significat
ACBD3	Acyl-CoA Binding Domain Containing 3
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AHR	Aryl Hidrocarbon Receptor
AMPK	Adenosine MonoPhosphate activated Protein Kinase
Ang-2	Angiogenin-2
ANK	ANKyrin
APML	Acute ProMyelocytic Leukemia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated S/T kinase
B-ALL	B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
Blc-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
CADASIL	Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CAMKI	CALcium/calModulin dependent protein Kinase I
Cbl	Casitas B-Lineage Lymphoma proto-oncogene
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CIC	Cancer-Iniciating Cells
CIP/KIP	CDK Interacting Protein / Kinase Inhibitory Protein
CIR	Corepressor Interacting with RBPJ- κ
CKI	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated protein 9)
CRM1	ChRosomal Maintenance 1
CRTC1	CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) Regulated Transcription Coactivator 1
CSL	CBF-1/RBPJ- κ (<i>Homo sapiens</i> / <i>Mus musculus</i>) Suppressor of Hairless (<i>Drosophila melanogaster</i>) <i>Lag-1</i> (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor 4
Dll 1-4	Delta-like Drosophila 1-4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
DNER	Delta/Notch Like EGF Repeat containing
DSL	Delta/Serrate/Lag-2

Abreviacions

Acrònim	Significat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELAV	Embryonic Lethal, Abnormal Visual, <i>Drosophila</i>
ErbB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
Fbxw7	F-Box and WD repeat domain Containing 7
FHL1/KyoT2	Four and a Half LIM domains protein 1
FOXC	Forkhead boX C
FOXO	Forkhead boX O
GAP	GTPase-Activating Protein
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanin nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAT	Histone AcetylTransferase
HCC	HepatoCellular Carcinoma
HD	Heterodimerization Domain
HDAC	Histone DeAcetylase
hKIS1	human S/T-protein Kinase Interacting with Stathmin 1
HOXA	Homeobox A
Ifi	Interferon-activable protein
IL2RA	Interleukin 2 Receptor subunit Alpha
INK4	INHibitors of cdK4
IRES	Internal Ribosome Entry Site
Itch	Itchy E3 ubiquitin protein ligase
K	Lysine
KAT2/GCN5	Lysine (K) AcetylTransferase 2 / General Control of amiNo-acid synthesis 5-like 2 (Yeast)
KID	Kinase Inhibitory Domain
KO	Knock-Out
KPC	Kip1 ubiquitination-Promoting Complex protein 1
LH	Linker Helix
LIMK	LIM Domain Kinase
LNR	Lin-12/Notch Repeat

Acrònim	Significat
LTR	Long-Terminal Repeats
MAGP	Microfibril-Associated Glycoprotein
MAML	MAsterMind Like transcriptional coactivator
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MENIN	Multiple Endocrine Neoplasia proteIN
Mint/Sharp/SPEN	Msx2-INTeracting protein / SMART/HDAC1-Associated Repressor Protein / protein SPlit ENds homolog
miRNA	micro RiboNucleic Acid
MLC	Myosin Light Chain
MMP	Matrix Metalloprotease
mRNA	messenger RiboNucleic Acid
MTG8/ETO	Myeloid Translocational Gene 8 protein / translocation Eight-Twenty-One
mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MyoD	Myoblast Determination
NAK	Numb-Associated Kinase
NcoR/SMRT	Nuclear receptor co-Repressor / Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid-hormone receptor
NECD	Notch ExtraCellular Domain
Nedd4	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4, E3 ubiquitin protein ligase
NES	Nuclear Export Signal
NFY	Nuclear Transcription Factor Y
NFκB2	Nuclear Factor Kappa B Subunit 2
NICD	Notch IntraCellular Domain
NLS	Nuclear Location Signal
NRARP	Notch Regulated Ankyrin Repeat Protein
NRR	Negative Regulatory Region
p300/CBP	Histone acetyltransferase p300/CREB-Binding protein
PAK1	p21-Activated Kinase 1
Pax5	Paired Box 5
PCAF	P300/CBP-Associated Factor
PDCD4	Programmed Cell Death 4
PDK1	3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1

Abreviacions

Acrònim	Significat
PEST	Proline-Glutamat-Serine-Threonine
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PIM1s	S/T-protein kinase PIM1 Short form
Pirh2/RCHY1	p53-Induced RING-H2 protein / RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1
PRC1	Protein Regulator if Cytokinesis 1
PTB	Polypyrimidine Tract-Binding protein
PTM	Post-Translational Modification
R	Arginin
RAM	RBPJ- κ -Associated-Molecule
pRb	Proteína del Retinoblastoma
RhoA	Ras Homolog family member A
ROCK1	RhO-associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Serine
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SCF	Skp, Cullin, F-box containing Complex
SCLC	Small Cell Lung Carcinoma
Skp2	S-phase Kinase-associated Protein 2
Sp1	Specific Protein 1 transcription factor
T	Threonin
T-ALL	T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia
TCF3/E2A	Transcription factor 3 / E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47
TF	Transcription Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Tyr	Tyrosin
uORF	upstream Open-Reading Frame
UTR	UnTranslated Region
VDR	Vitamin D Receptor
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
VEGF-R2	Vascular Epidermal Growth Factor Receptor 2
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
Wnt	Wingless-Type

Abreviacions

Acrònim	Significat
Y	Tyrosin
YAP	Yes-Associated Protein
ZEB1	Zinc finger E-box-Binding homeobox 1

