



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicació de la proteïna P27 en la regulació de la respiració cel·lular

Jonatan Martínez Martín

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat en Biomedicina
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

IMPLICACIÓ DE LA PROTEÏNA P27 EN LA REGULACIÓ DE LA RESPIRACIÓ CEL·LULAR

Jonatan Martínez Martín

Tesi realitzada sota la direcció del
Dr. Oriol Bachs i la Dra. Maria Jesús Pujol
en Barcelona, Juny 2022

Membre de la

LE
RU

Reconeixement internacional de l'excel·lència



B:KC

Barcelona
Knowledge
Campus



Health Universitat
de Barcelona
Campus

ABREVIACIONES

ABREVIACIONS

ANOVA: Anàlisi de la variància

Brk: Breast tumor related kinase

BSA: Bovine sèrum albumine

Cdk: cyclin-dependent kinase

CDKN: cyclin-dependent kinase inhibidor

cDNA: complementary DNA

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

CI, II, III, IV i V: Complex I, II, III, IV i V

Cit C: citocrom C

CK: Cicle de Krebs

CKI: cyclin-dependent kinase inhibidor

CoQ o Q: Coenzim Q o ubiquinona

CoQH₂ o QH₂: Ubiquinol

CRABP1: Cellular retinoic acid-binding protein

CRM: cadena respiratòria mitocondrial

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sulfòxid

D-R-2HG: D-R-2-hydroxyglutarate

dsDNA: double-stranded DNA

EPD: Eukaryotic promotor data base

ETC: Electron transport chain

EZ-ECL:

FBS: Fetal Bovine Serum

FIMO: Find Individual Motif Occurrence

FMN: Flavin mononucleotide

G1: Gap1

G2: Gap2

GAP: GTPase-activating protein

G-CSF: factor estimulant de colònies dels granulòcits

GEF: Guanine exchange factor

GOT1: Glutamic-oxaloacetic transaminase 1

HEK293T: human embryonic kidney 293T

HIF1- α : Hipoxia Inducible factor 1 alpha

HRE: Hypoxia response element

HSD: Honestly-significant-difference

IC50: Concentració inhibidora semimàxima

IDH: Isocitrate dehydrogenase

IDP: Intrinsically disordered protein

INK4: Inhibitors of CDK4

KID: Kinase-inhibitory domain

KIP: Kinase inhibitory Protein

KPC: Kip1 ubiquitylation promoting complex

MDH2: malat deshidrogenasa 2

MCM: minichromosome maintenance

MDM2: Malat dehidrogenase

MEF: Mouse embryonic fibroblast

MEN: múltiple endocrine neoplàsia

miRNA: microRNA	SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate-
mtDNA: mitochondrial DNA	polyacrilamide gel electrophoresis
NBT: Nitroblau de tetrazole	shRNA: short hairpin RNA
ND-: NADH deshydrogeanse	ssDNA: single-stranded DNA
nDNA: nuclear DNA	Suc: Succinate
NDU-: NADH dehydrogenase ubiquinone	TCA: Tricarboxylic acid cycle
NES: Nuclear exportation signal	TFAM: mitochondrial transcription factor A
NLS: Nuclear localization signal	T _M : Temperatura melting
NTC: Non-template control	TSS: Transcription Start Site
OXPPOS: Oxidative phosphorylation	UDG: Uracil-DNA glycosylase
PBS: Phosphate Buffered Saline	VSV: Vesicular stomatitis virus
PKD: Pyruvate dehydrogenase quinase	WB: Western Blot
PFK/FBPase:6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	α-KGDH: α-ketoglutarate dehydorgenase
PINK1: PTEN-induced kinase 1	
PK: Pyruvate kinase	
PKA: Protein kinase A	
qPCR: quantitative polymerase chain reaction	
RISC: RNA-induced silencing complex	
RNAi: RNA interferència	
RNF: Ring finger protein	
ROCK1: Rho-associated protein kinase	
ROS: Reactive oxygen species	
RT-qPCR: Reverse transcription-qPCR	
SCF: Skp1/Cdc53(Cullin)/F-box	

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	13
1.1. Cicle cel·lular	13
1.1.1. Regulació del cicle cel·lular: complexos ciclins-cdk	14
1.1.2. Proteïnes CKI: inhibidores de les quinases dependents de ciclina	16
1.2. p27: estructura gènica i proteica	17
1.2.1. Regulació dels nivells proteics de p27	18
1.2.1.1. Mecanismes transcripcionals	19
1.2.1.2. Mecanismes traduccionals	20
1.2.1.3. Mecanismes proteolítics	21
1.2.1.4. Mecanismes de localització subcel·lular	23
1.2.2. Funcions de p27.....	24
1.2.2.1. p27 en la regulació del cicle cel·lular	24
1.2.2.2. p27 com a regulador transcripcional	27
1.2.2.3. p27 i motilitat cel·lular	28
1.2.3. Models ratolins p27 <i>knock out</i> i <i>knock-in</i>	31
1.2.4. p27 i càncer	32
1.3. Introducció al metabolisme cel·lular	35
1.3.1. Cadena respiratòria mitocondrial.....	36
1.4. Complex I (CI).....	37
1.4.1. Complex I com a font de producció de radicals lliures	41
1.4.2. Complex I i patologia	42
1.4.3. Modificacions post-traduccionals del complex I	44
1.5. Metabolisme del càncer	45
1.5.1. Complex I i càncer.....	50
1.6. Reguladors del cicle cel·lular en el metabolisme	53
2. OBJECTIUS	58
2.1. Hipòtesi.....	58
2.2. Objectius.....	58
3. MATERIALS I METODOLOGIA	62
3.1. Plasmidis.....	62
3.2. Cultius cel·lulars	62
3.2.1. Condicions de cultiu.....	63
3.2.2. Procediments habituals en sala de cultius	64
3.2.3. Sincronització dels cultius cel·lulars per privació sèrica i confluència	65
3.2.4. Silenciament de l'expressió gènica: <i>knockdown</i> de p27	65

3.3. Extracció i quantificació d'àcids nucleics	67
3.3.1. Extracció de RNA	67
3.3.2. Extracció de DNA	67
3.3.3. Extracció de DNA plasmídic.....	68
3.3.4. Extracció de DNA en gels d'agarosa.....	70
3.3.5. Anàlisi espectrofotomètric: quantificació en Nanodrop	71
3.4. Clonació de vectors	71
3.4.1. Transformació bacteriana	71
3.4.2. Digestió amb enzims de restricció i lligació del vector	72
3.5. Anàlisi de l'expressió gènica	73
3.5.1. Retrotranscripció	73
3.5.2. RealTime-qPCR o PCR a temps real	73
3.6. Manipulació i anàlisi de proteïnes	76
3.6.1. Quantificació de proteïna pel mètode Lowry.....	76
3.6.2. Western Blot	76
3.6.2.1. Electroforesis unidimensional de proteïnes.....	77
3.6.2.2. Electrotansferència	78
3.6.2.3. Immunodetecció.....	78
3.7. Immunoprecipitació de cromatina.....	78
3.7.1. Fixació dels complexos DNA-proteïna (<i>cross-linking</i>)	79
3.7.2. Sonicació	80
3.7.3. Immunoprecipitació	80
3.7.4. Reversió de l'entrecreuament (<i>decrosslinking</i>) i purificació.....	81
3.8. Quantificació de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria	82
3.9. Quantificació dels nivells de lactat i piruvat	83
3.10. Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial.....	84
3.11. Quantificació del DNA mitocondrial: relació mtDNA/nDNA.....	85
3.12. Assaigs farnacològics.....	85
3.12.1. Corbes dosis-resposta i assaigs de citotoxicitat cel·lular.....	85
3.12.2. Tractament dels cultius cel·lulars amb roscovitina	85
3.13. Bioinformàtica: anàlisi dels promotors gènics <i>in silico</i>	87
3.14. Estadística	88
4. RESULTATS	92
4.1. Anàlisi del paper de p27 en l'expressió de les subunitats del CI	92
4.1.1. Validació del <i>microarray</i> d'expressió en MEFs quiescents	92

4.1.2. P7 regula l'expressió de NDUF en quiescència	94
4.1.3. P27 regula l'expressió de Nduf durant el cicle cel·lular	95
4.1.4. P27 participa en l'expressió de Nduf en cèl·lules asincròniques.....	97
4.1.5. L'activitat del CI es troba regulada per p27	98
4.2. Anàlisi del paper de p130 en l'expressió de les subunitats del CI.....	99
4.2.1. P130 regula l'expressió de Nduf en quiescència	99
4.2.2. P130 regula l'expressió de Nduf durant el cicle cel·lular	100
4.2.3. P130 participa en l'expressió de nduf en cèl·lules asincròniques	103
4.3. P27 i p130 regulen el metabolisme en altres models cel·lulars	103
4.3.1. C17.2 com a model biològic murí	103
4.3.2. HCT116 com a model biològic humà	105
4.4. P27 s'unix a la regió promotora de Ndufs3	107
4.5. P27 i p130 intervenen en la replicació del genoma mitocondrial	108
4.5.1. P27 regula l'expressió de TFAM en cèl·lules quiescents	108
4.5.2. P130 regula l'expressió de TFAM en cèl·lules quiescents	109
4.5.3. P27 regula el número de còpies del mtDNA	110
4.6. Implicació de p27 en el metabolisme de la glucosa.....	111
4.6.1. P27 regula l'expressió de gens associats amb el metabolisme glicolític	111
4.6.2. Els nivells de p27 al llarg del cicle cel·lular correlacionen negativament amb l'expressió de gens glicolítics	113
4.6.3. P27 s'associa a motius E2F en el promotor de <i>Pfk-p</i>	114
4.6.4. Els complexos ciclina-cdk i p130 participen en l'expressió de gens glicolítics ...	115
4.6.5. La producció de lactat i piruvat depèn de p27	117
4.7. El dèficit de p27 dóna lloc a estrés oxidatiu	119
4.8. Assaigs farmacològics.....	120
4.8.1. Corbes dosis-resposta en línies de càncer colorectal	120
ANNEX.....	125
5. DISCUSSIÓ	129
6. CONCLUSIONS	146
7. BIBLIOGRAFIA	149

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Cicle cel·lular

El cicle cel·lular és el nom que reben el conjunt d'esdeveniments necessaris per a la generació de dues cèl·lules genèticament idèntiques a partir d'una cèl·lula preexistent, a excepció de les cèl·lules germinals, les quals donen lloc a cèl·lules genèticament diferents mitjançant el procés de meiosi. Es tracta d'un procés altament ordenat en el que es produeix de manera seqüencial el creixement, desenvolupament i reproducció cel·lulars, moltes vegades sota una paral·lelisme conegut comunament com a cicle vital. Així doncs, la cèl·lula emprèn un programa biològic ben definit i complex en què es troben involucrats dos processos indispensables: la duplicació del material genètic (replicació del DNA) i la segregació cromosòmica (mitosis). Aquests fenòmens s'acompanyen de la replicació de part dels orgànuls intracel·lulars i l'escissió del citoplasma (citocinesi) per tal de donar lloc a cèl·lules filles amb dotacions equivalents quant als constituents cel·lulars (Norbury et al., 1992).

El fets que tenen lloc durant el procés de divisió eucariota s'organitzen cíclicament en quatre períodes o etapes que poden reiniciar-se en cadascuna de les cèl·lules resultants. Aquestes fases es denominen, ordenadament, G1, S, G2 i M, l'extensió de les quals varia en funció del tipus cel·lular i factors externs com la temperatura i la disponibilitat de nutrients. Les fases S i M corresponen a les etapes de Síntesi del DNA i Mitosis, respectivament, intercalades per fases preparatòries d'anabolisme, creixement i reorganització del contingut intracel·lular anomenades *Gap1* i *Gap2* (G1 i G2) (Alberts 2014, Lodish 2016).

Les cèl·lules poden optar per sortir del cicle cel·lular front l'aparició de dany i/o estrès cel·lular i consolidar un estat de latència o repòs que rep el nom de quiescència o fase G0. La duració d'aquesta situació vegetativa pot ésser indefinida i resulta molt característica de cèl·lules en cultiu com a resposta a una elevada densitat cel·lular i/o privació nutricional. Fisiològicament, les cèl·lules mare presents en un teixit es troben en un estat no replicatiu que esdevé reversible i d'especial rellevància en regeneració tissular, renovant la població cel·lular afecta després de cicles continus de divisió cel·lular ininterrompuda. Tanmateix, la major part de cèl·lules assoleixen un nivell de diferenciació i especialització complert (maduració) i esdevenen irreversiblement quiescents dins el propi programa de desenvolupament (Alberts 2014, Lodish 2016).

La transició en cadascuna de les etapes del cicle cel·lular es troba controlada per una diversitat de mecanismes sensors que limiten o promouen la seva progressió, descrivint-se com a punts

de control o *checkpoints*. Així doncs, els punts de control s'estableixen en les transicions G1/S, G2/M i en el punt que marca la sortida mitòtica o *Mitotic Exit*. En totes elles, examinen i asseguren el bon estat de les funcions i estructures intracel·lulars alhora que integren les senyals del microambient extracel·lular per efectuar la resposta biològica més adient. Particularment, el *checkpoint* a finals de G1 correspon el únic punt de restricció del cicle cel·lular on es compromet irreversiblement la finalització del procés de divisió un cop passat, i la cèl·lula resta insensible a les senyals de proliferació presents (Alberts 2014, Lodish 2016).

1.1.1. Regulació del cicle cel·lular: complexos ciclins-CDK

L'entrada i progressió del cicle cel·lular es troba orquestrada pels complexos ciclina-cdk (*cyclin-dependent kinase*), heterodímers amb activitat serina/treonina quinasa que reben i integren senyals tant intracel·lulars com extracel·lulars per oferir una resposta coordinada als esdeveniments biològics que constitueixen el procés de divisió cel·lular. Així doncs, formen part dels mecanismes efectors que promouen l'avenç d'una fase a un altre en el transcurs del cicle vital de la cèl·lula (Morgan et al., 1997).

Es distingeixen CDK específiques de fase en organismes superiors i intricades combinacions amb subunitats ciclina per desencadenar els processos essencials de replicació genòmica i mitosis. Ho duen a terme desencadenant fosforilacions en multitud de proteïnes per regular la seva activitat, amb un control espai-temporal sobre les mateixes (Malumbres et al., 2005; Malumbres et al., 2014). Per exemple, les ciclins-cdk associades a fase M dirigeixen els canvis estructurals i preparatius necessaris per iniciar la mitosis, entre els quals destaquen la condensació dels cromosomes, la desestabilització de l'embolcall nuclear i l'assemblatge del fus mitòtic, entre d'altres (Álvarez-Fernández et al., 2014).

El grup de quinases dependents de ciclina que participen en cada fase del cicle cel·lular es troba ben definit i s'ha establert un model de regulació del mateix comunament acceptat a data d'avui. Les senyals proliferatives en les fases primerenques del cicle cel·lular (G1) resulten en l'activació de Cdk4 i Cdk6 per acció de les ciclins D, les quals inicien el procés de fosforilació de les proteïnes de la família del retinoblastoma (Rb, p107 i p130) (Kato et al., 1993; Ewen et al., 1993). Per consegüent, s'alliberen els factors de transcripció E2F i s'activen els programes transcripcionals associats, els gens dels quals codifiquen elements necessaris per a la duplicació del DNA i la progressió del cicle cel·lular (Lees et al., 1993; Weinberg 1995). Un dels gens de resposta inicials codifica per la ciclina E que, en associació a Cdk2, induïx un estat d'hiperfosforilació en la família Rb i completa l'alliberament dels factors E2F dependents (Koff et al., 1992). En aquest moment, se supera el punt de restricció en G1 i es dona pas, de

manera irreversible, a les etapes inicials de síntesi del DNA, on el complex ciclina A-Cdk2 hi juga un paper clau fosforilant proteïnes dels orígens de replicació (Bertoli et al., 2013). És durant la transició G₂/M i la mitosis quan esdevenen fonamentals els complexos ciclina A-cdk2 i ciclina B-cdk1, respectivament. Aquests són els encarregats de promoure el conjunt de remodelacions estructurals nucleo-citoplasmàtiques necessàries per a la segregació cromosòmica i la citocinesi (King et al., 1994) (Figura 1).

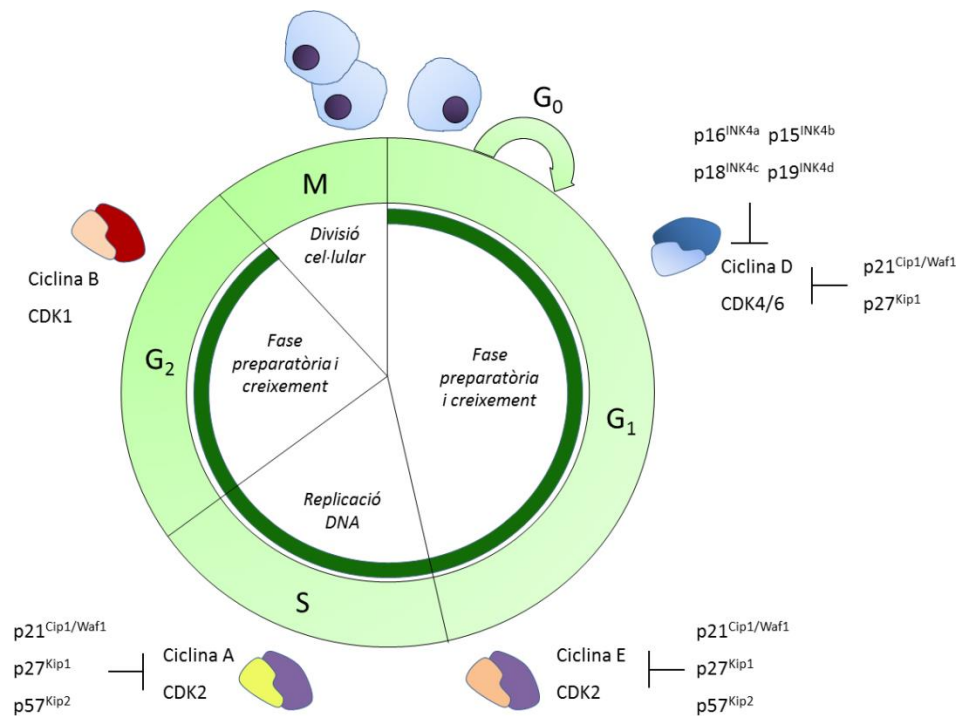


Figura 1. Representació esquemàtica de les diferents fases del cicle cel·lular i els complexos ciclina-cdk que participen en la seva regulació. La progressió del cicle cel·lular depèn de l'activitat de complexos ciclina-cdk específics que regulen les transicions de fase: l'acció seqüencial dels complexos ciclina D-CDK4/6 i ciclina E-CDK2 comporta la hiperfosforilació de pRb i l'entrada a fase S, on té lloc la replicació del material genètic per acció del complex ciclina A-CDK2. Després d'un procés preparatori marcat per la duració de G₂, l'activació dels complexos ciclina B-CDK1 emprèn el conjunt de remodelacions del DNA i el citoesquelet que caracteritzen el procés de divisió cel·lular en fase M. S'adjunten els membres CKI de la família INK i/o Cip/Kip que modulen diferencialment l'activitat dels complexos ciclina-cdk en cadascuna de les fases del cicle cel·lular.

L'activitat dels complexos ciclina-cdk es troba altament regulada i coordinada per múltiples mecanismes. La interacció amb la subunitat reguladora, les ciclins, dota d'especificitat de substrat a la quinasa dependent i representa el sistema de regulació principal. Altres mecanismes de control sobre la funció dels complexos ciclina-cdk són la presència de modificacions post-traduccionals de caràcter activador o repressor, la localització intracel·lular i l'associació amb inhibidors específics coneguts per les sigles CKIs (derivat de la terminologia anglesa *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*) (Lew et al., 1996; Malumbres et al., 2014).

1.1.2. Proteïnes CKI: inhibidores de les quinases dependents de ciclina

Les CKIs són proteïnes que regulen negativament l'activitat del complex ciclines-cdk i prevenen la progressió de les diferents fases que componen el cicle cel·lular. Així doncs, eviten la progressió a fase S i impedeixen la transició de la fase G2 a mitosis a través de la inhibició de CDK específiques (Sherr et al., 1999). Les proteïnes inhibidores dels complexos ciclines-cdk es classifiquen en dues subfamílies d'acord a la seva estructura i mecanisme d'acció: la família INK4 (*Inhibitors of CDK4*), comprenent p16^{INK4a} (Serrano et al., 1993), p15^{INK4b} (Hannon et al., 1994), p18^{INK4c} (Guan et al., 1994), p19^{INK4d} (Hirai et al., 1995), capaces de promoure el desacoblament del complex ciclina D-cdk per mitjà de la interacció directa amb les subunitats catalítiques de CDK4 i CDK6; i la família Cip/Kip, constituïda per p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}, les quals poden regular l'activitat de diferents complexos ciclines-cdk per interacció directa a ambdues subunitats. Aquesta heterogeneïtat de substrat es relaciona amb l'efecte en la capacitat d'aquestes proteïnes per induir la parada del cicle cel·lular una vegada són sobreexpressades i que s'ha observat en gran majoria de línies cel·lulars a data d'avui (Besson et al., 2008). Per tant, les CKIs es consideren generalment supressors tumorals que actuen com a inhibidors de la proliferació cel·lular i adquireixen especial rellevància en contextos de diferenciació cel·lular i estrès genotòxic.

Les proteïnes Cip/Kip es caracteritzen per presentar dominis d'unió a ciclines i CDK altament conservats en la regió N-terminal així com també estructures i propietats funcionals divergents en l'extrem C-terminal, suggerint així la presència d'activitats biològiques diferencials en cadascun dels membres (Besson et al., 2008). La regió distal de p21 (aa 143–160) presenta de forma exclusiva, per exemple, selectivitat de substrat per PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), un cofactor nuclear de la DNA polimerasa δ amb implicació en la replicació i reparació del DNA (Waga et al., 1994; Luo et al., 1995). A més, els extrems C-terminal no representen les úniques propietats diferencials de les proteïnes Cip/Kip ja que presenten especificitat de resposta front a diferents senyals mitòtiques i mitostàtiques, és a dir, efectuen respostes biològiques úniques front a determinats estímuls.

Multitud d'estímuls desencadenen la resposta dels mecanismes de control de cicle, entre els quals es troben, per exemple, el dany al DNA i la privació de factors de creixement. Aquests estímuls actuen a través de factors de transcripció per promoure l'expressió de membres de la família INK4 o Cip/Kip. En aquest sentit, l'expressió de p21 té lloc com a resposta biològica al dany del DNA a través d'un mecanisme dependent de p53 i en cèl·lules post-mitòtiques completament diferenciades per mitjà d'un procés biològic diferent (El-Diery et al., 1993;

Brugarolas et al., 1995; Parker Science 1995). Per tant, els membres de la família Cip/Kip presenten funcions i regulacions diferents que els atorga especificitat de funció i resposta.

1.2. p27: estructura gènica i proteica

p27^{Kip1} (p27), referenciada també com *cyclin-dependent kinase inhibitor 4* (CDKN4), *kinase interacting protein 1* (KIP1), *multiple endocrine neoplasia 1B* (MEN1B) o 4 (MEN4), és un supressor tumoral codificat pel gen *CDKN1B* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B*) amb localització citogenètica en el locus chr12p13.1 en l'humà i chr6qG1 en ratolí (Pietenpol et al., 1995; Ponce-Castaneda et al., 1995). El gen consta de dos exons codificants i un tercer exó no codificant, el cDNA del qual manté un percentatge d'identitat del 90% amb el corresponent en ratolí (Phillip-Staheli et al., 2001). *CDKN1B* és responsable de sintetitzar aquesta proteïna de 27 kDa i 198 aminoàcids d'extensió, la qual fou descrita inicialment en resposta a l'aturada de cicle induïda per TFG- β o contactes cèl·lula-cèl·lula (Polyak et al., 1994a; Polyak et al., 1994b, Toyoshima et al., 1994) (Figura 2).

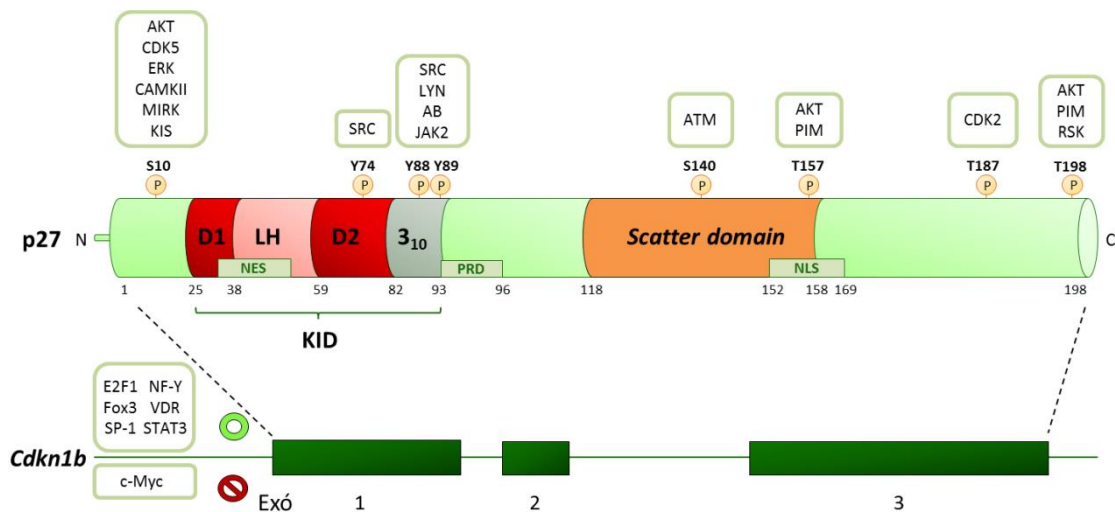


Figura 2. Organització gènica de *CDKN1B* i estructura de p27. La part inferior representa esquemàticament la distribució i extensió dels exons-introns que configuren el gen *CDKN1B* i mostra els factors de transcripció que regulen positivament (verd) i negativament (vermell) la seva expressió. En quant a la proteïna, es mostren els residus fosforilats i dominis de p27 així com les quinases responsables d'introduir dites modificacions i l'extensió en aminoàcids de cadascun del dominis. La regió N-terminal de p27 conté el domini inhibidor dels complexos ciclina-cdk (KID) el qual, al seu torn, es troba subdividit en les regions d'unió a ciclina (D1), Cdk (D2), un domini nexa (LH) i la zona que s'inserta en el centre catalític de la Cdk (3₁₀). El domini C-terminal es considera intrínsecament desordenat i engloba la seqüència d'importació nuclear (NLS). Consisteix la regió d'interacció a proteïnes relacionades amb la reorganització del citoesquelet com RhoA i estatmina, entre d'altres.

Els estudis cristal·logràfics permeten obtenir informació sobre l'estructura tridimensional de macromolècules amb una resolució atòmica i abordar els aspectes més bàsics de la biologia

molecular. Les tècniques cristal·logràfiques permeteren caracteritzar els dominis funcionals de p27 i les seves propietats fisicoquímiques. Així doncs, es definí en els aminoàcids 25-93 domini d'unió a ciclina i CDK (*kinase inhibitory domain* or KID), el qual interacciona amb el lloc d'unió al substrat present en la ciclina mentre s'insereix simultàniament al centre catalític de la CDK per l'hèlix 3₁₀ a través d'un canvi conformacional. Per un efecte mimètic, s'impossibilita la unió d'ATP en el centre actiu de la CDK i, consegüentment, l'activitat quinasa associada queda compromesa (Russo et al., 1996). Com s'ha fet esmena anteriorment, p27 comparteix homologia de seqüència amb altres membres de la família Cip/Kip en la regió N-terminal. Concretament, aquest domini KID és el que es troba conservat entre els membres i resulta suficient per reprimir l'activitat dels complexos ciclina-cdk i promoure l'aturada de cicle (Besson et al., 2008).

P27 és reconeguda com una proteïna intrínsecament desordenada (IDP), per la qual cosa presenta regions sense una estructura secundària definida quan es troba lliure en solució. L'extrem C-terminal reté aquestes propietats i és capaç d'adoptar conformacions terciàries específiques després d'interaccionar amb altres proteïnes. Aquesta plasticitat estructural explica la capacitat d'unió a diferents complexos ciclina-cdk, adaptant-se estructuralment en llocs d'unió similars però topològicament diferents. A més, modificacions post-traduccionals específiques són responsables de plegaments proteics determinats i permeten modular la funció de p27, essent un exemple, el caràcter activador o repressor que exerceix sobre els complexos ciclina-cdk. La fosforilació en les Tyr-74, -88 i/o -89 disminueix la potència de p27 per inhibir el complexos ciclina D-CDK4 ja que aquests residus formen part de l'hèlix 3₁₀ que s'introdueix en el centre actiu de CDK. Com a IDP, p27 pot interaccionar amb diferents proteïnes i aquesta propietat correlaciona directament amb la multifuncionalitat descrita a data d'avui. En aquest sentit, p27 s'integra com a proteïna diana en múltiples vies de senyalització cel·lular no relacionades amb la regulació del complexos ciclina-cdk, les quals són reconegudes actualment com a funcions no canòniques (Dyson et al., 2005; Besson et al., 2008; Babu et al., 2016).

1.2.1. Regulació dels nivells de proteïnes de p27

L'expressió proteica es troba subjecte a un procés altament complex i regulat on es troben involucrats la transcripció, el processament del mRNA i la traducció. Al seu torn, els nivells finals de proteïna es troben controlats per mecanismes involucrats en la seva estabilitat i degradació. En el cas de p27, la comunitat científica indica que la regulació de la seva expressió es troba principalment sotmesa al control dels mecanismes proteolítics associats.

L'activitat de p27 presenta mecanismes addicionals de regulació i, per tant, pot ser regulada per la seva localització subcel·lular i associació amb diferents complexos ciclins-cdk (seqüestració).

1.2.1.1. Mecanismes transcripcionals

Els mecanismes que promouen la progressió del cicle cel·lular desencadenen, alhora, senyals de retroalimentació negativa que radiquen, precisament, en induir l'expressió de reguladors positius de la transcripció de p27. De fet, l'expressió induïda d'E2F1 durant el cicle cel·lular activa el promotor de *CDKN1B* com a mecanisme compensatori o contrarrestant (Wang et al., 2005).

Existeixen múltiples factors de transcripció que s'uneixen i regulen el promotor de *CDKN1B*. Proteïnes de la família FoxO (FoxO4, FoxO3a i FoxO1a) actuen com a principals reguladors positius de la transcripció de p27 i són considerades inductores de l'aturada de cicle en G₀/G₁. Tanmateix, aquests factors de transcripció integren les senyals proliferatives derivades de les vies de senyalització PI3K/AKT i RAS i, en conseqüència, veuen alterada la seva activitat sobre la transcripció gènica de p27 (Dijkers et al., 2000; Graff et al., 2000; Medema et al., 2000; Trotman et al. 2006). Per exemple, en línies cel·lulars derivades de tumors prostàtics s'observa que AKT bloqueja la transcripció gènica de p27 a través de la fosforilació i inactivació de FoxO3 (Dijkers et al., 2000). Contràriament, el factor de transcripció MYC reprimeix la transcripció gènica a través de la unió del domini *MYC homology box II* al promotor. Concretament, el motiu iniciador CCAGACC, situat el lloc d'inici de la transcripció, constitueix el punt de transactivació de l'heterodímer Myc/Max. (Yang et al., 2001). Amb aquestes dades, la via de senyalització PI3K/AKT presenta dues branques per regular coordinada i recíprocament l'expressió de p27: la cascada de senyalització quinasa controla la transcripció de p27 per acció simultània i inversa de l'activador (FoxO3a) i el repressor de p27 (c-Myc). Així doncs, l'activació constitutiva de la via PI3K/AKT promou la transformació neoplàsica a través de la inhibició de FoxO3a i la inducció de c-Myc (Chandramohan et al., 2004).

D'altra banda, MENIN és capaç de promoure la transcripció gènica de p27 per mitjà de mecanismes acoblats al reclutament de proteïnes histona metiltransferases en la regió promotora, és a dir, mitjançant mecanismes epigenètics que involucren modificacions histona (Milne et al., 2005a; Milne et al., 2005b; Karnik et al., 2005). MENIN modula l'activitat histona metiltransferasa d'un complex nuclear i activa la transcripció gènica de p27, concretament, a través de la metilació del residu lisina 4 (Lys-4) present en la histona H3 associada al promotor de *CDKN1B* (Karnik et al 2005).

El processos de determinació i diferenciació cel·lular es troben íntimament lligats al cicle cel·lular. En efecte, els mecanismes que governen el control del cicle cel·lular troben intersecció amb les decisions de destí cel·lular i, per exemple, els complexos ciclines-cdk són capaços de regular factors de transcripció relacionats amb el desenvolupament i el compromís de llinatge cel·lular. Contràriament, els agents del control de cicle també són regulats durant el procés de diferenciació i, de fet, l'aturada del cicle cel·lular és un fenomen que es relaciona amb l'activació de programes transcripcionals de diferenciació (Liu et al., 1995). En aquest sentit, diversos estudis demostren que els factors de transcripció SP1, NF-Y i el receptor VDR intervenen en la sobreexpressió de p27 durant el procés de diferenciació induïble per vitamina D3, concretament, mitjançant la seva unió a regions reguladores en el promotor (Liu et al., 1995; Inoue et al. 1999; Huang et al., 2004). En resposta al factor estimulant de colònies dels granulòcits (G-CSF) i a IL-6, els nivells de p27 incrementen per mecanismes dependents de la unió de STAT-3 en el promotor i controlen, parcialment, la diferenciació mielòide (Kortylewski et al., 1999; de Koning et al., 2000).

1.2.1.2. Mecanismes traduccionals

Durant el cicle cel·lular, les variacions en els nivells de p27 tenen lloc per mecanismes postraduccionals que afecten, en part, a la seva traducció. Els nivells de p27 són màxims en quiescència i a principis de G1 i decauen mentre les cèl·lules progressen a fase S després de ser estimulades per agents mitògens, essent pràcticament indetectables durant aquesta i les darreres fases del procés de divisió. Tanmateix, els nivells de mRNA es mantenen invariables al llarg del cicle vital de la cèl·lula, indicant que les variacions en els nivells de p27 tenen lloc per mecanismes independents de la transcripció. Diversos estudis assenyalen que en la traducció té lloc part de regulació dels nivells de p27, especialment durant la quiescència i les fases primerenques de G1 (Hengst et al., 1996; Millard et al., 1997; Millard et al., 2000).

La traducció de p27 es produeix per elements presents en la regió no traduïda 5' o 5'-UTR (*UnTranslated Region*): un lloc intern d'entrada al ribosoma o IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) i un domini ric en G/C amb una petita porció d'un uORF (*Upstream Open Reading Frame*) que constitueix un element de resposta al cicle cel·lular (Millard et al., 2000; Kullman et al., 2002; Gopfert et al., 2003).

En quiescència, la síntesis de p27 es troba subjecte a un control traduccional que segueix una distribució polirribosòmica d'alta densitat i aïllada dels mecanismes convencionals de reconeixement de 5'-cap per eIF4E. Aquest fenomen és dependent de la seqüència IRES, la qual promou el reclutament de ribosomes actius al mRNA i representa una manera més

eficient de traducció en aquestes circumstàncies (Millard et al., 1997; Miskimins et al., 2001; Kullman M 2002). Aquesta regió IRES segueix essent responsable de la traducció de p27 en cèl·lules proliferants i precisa de proteïnes d'unió a RNA (*Ribosome-binding protein* o RBPs), entre les quals es troben HuR (p33) i hnRNP C1/C2 (p40/p41). La disponibilitat citosòlica d'aquestes proteïnes és dependent de fase i resulta d'especial rellevància per a modular la traducció de p27 (Millard et al., 2000).

Altres mecanismes implicats en el control de la expressió gènica de p27 radica en els microRNA (miRNAs), fragments curts de RNA que s'uneixen per homologia de seqüència a cadenes mRNA complementàries i interfereixen en la traducció per mitjà del complex RISC (Gregory et al., 2005). El silenciament de p27 es duu a terme per miR-221 i miR-222 i resulta una de les estratègies emprades per cèl·lules canceroses per promoure la proliferació descontrolada. Així doncs, una de les formes per les quals MYC interfereix sobre l'expressió de p27 és a través de la transcripció de miR-221 i miR-222. L'ablació dirigida de p27 en cèl·lules canceroses estimula la seva proliferació (Le Sage et al., 2007; Pineau et al., 2010).

1.2.1.3. Mecanismes proteolítics

Tot i que es troben ben definits nombrosos mecanismes implicats en l'expressió gènica de p27, els mecanismes postraduccionals constitueixen els principals elements reguladors. Així doncs, diverses modificacions postraduccionals i mecanismes proteolítics dependents d'ubiquïtina es troben relacionats amb el control dels nivells proteics de p27 (Pagano et al., 1995; Chu et al., 2008).

Una de les vies de degradació millors definides es troba present en el nucli i la duu a terme el complex ubiquïtina lligasa SCF^{SKP2} (Skp1/Cdc53(Cullin)/F-box) durant la transició G1/S. SCF^{SKP2} és un multímer enzimàtic amb activitat E3-ubiquïtina lligasa i, per tant, catalitza la ubiquïtinització de fosfoproteïnes destinades a la degradació pel proteasoma 26S. Pertany a la classe *RING finger*, la qual consta de 3 subunitats centrals (RBX1, Skp1, Cul-1) i una proteïna F-box (SKP2) variable que connecta amb el nucli del complex i defineix l'especificitat de substrat. SKP2 es caracteritza per repeticions riques en leucina en tàndem que intervenen en la interacció o reconeixement amb el substrat (Nakayama et al., 2006). L'ubiquïtinització i la degradació subsegüent de p27 pel sistema ubiquïtina lligasa depèn d'un esdeveniment de fosforilació que facilita, al seu torn, la interacció de SKP2 amb el substrat.

La fosforilació en el residu Thr¹⁸⁷ fou una de les primeres modificacions postraduccionals identificades i demostra que p27 és, a la vegada, substrat del complex ciclina E/A-CDK2 (Sheaff

et al., 1997; Vlach et al., 1997, Montagnoli et al., 1999). Aquesta modificació es troba directament relacionada amb l'estabilitat de p27 ja que resulta una senyal de reconeixement per la proteïna SKP2, la qual promou la degradació nuclear de p27 dependent d'ubiquitina (Carrano et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999). En conseqüència, la substitució del residu T187 a Ala o Gly atorga resistència a la degradació i promou l'aturada de cicle en G1 en MEFs (Sheaff et al., 1997; Tsvetkov et al., 1999; Montagnoli et al., 1999). Per a una ubiquitinització eficient de p27 no solament es precisa de la fosforilació en T187, es requereix la formació d'un complex trimèric amb les subunitats ciclina i CDK (Montagnoli et al., 1999). Aleshores, el grup fosfat en la treonina 187 és reconegut, seguidament, pel domini d'unió a fosfat de la proteïna accessòria Cks1, la qual uneix p27 a la interfície CKS1/SKP2 (Hao et al., 2005).

La fosforilació de p27 per CDK2 és un mecanisme que compromet a la cèl·lula a prosseguir amb el cicle cel·lular independentment de la taxa transcripcional del gen *CDKN1B*. Es tracta d'un tipus de regulació que es veu amplificat, de forma accelerada, per un circuit de retroalimentació positiva basat en la formació de complexos ciclina-CDK2 actius per a la degradació de p27. En aquesta línia, el complex SCF^{SKP2} intervé irreversiblement en la proteòlisi de p27 a finals de G1 i és responsable de promoure la transició G1/S per un sistema que, com s'ha comentat, involucra la cascada de fosforilacions dels complexos ciclina associats a CDK2 i l'activació dels programes transcripcionals subordinats a pRB, entre els quals destaca, precisament, la transcripció de SKP2 per E2F. Així doncs, la degradació de p27 constitueix un mecanisme regulador per a l'entrada a fase S i és un dels esdeveniments intracel·lulars més rellevants per a la progressió del cicle cel·lular (Sheaff et al., 1997; Tsvetkov et al., 1999; Montagnoli et al., 1999; Yung et al., 2007). Tanmateix, sabem que la unió de p27 prevé l'activitat catalítica dels complexos ciclinaE/A-CDK2 durant la fase G₁ i es requereix la formació d'un complex trimèric amb activitat quinasa per fosforilar eficientment p27 en T187. La fosforilació en la Y89 per acció de les tirosina quinases de la família Src, JAK2 o Abl, promou l'expulsió de l'hèlix 3₁₀ del centre actiu de CDK2. Conseqüentment, es restaura parcialment l'activitat quinasa i es desencadena la modificació pT187-p27 (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007).

La proteòlisi de p27 pot tenir lloc per mecanismes independents a la degradació proteasomal de SCF^{SKP2} tal i com s'evidencia en cèl·lules SKP2 KO (Malek et al., 2001; Hara T 2001). El complex KPC (*Kip1 Ubiquitylation-Promoting Complex*), constituït per KPC1 i KPC2, regula la degradació dependent d'ubiquitina de p27 durant la fase primerenca de G1 (Kamura et al., 2004). En aquest sistema, KPC1 s'uneix al domini d'unió de CDK present en p27 i KPC2 promou la poliubiquitinització citoplasmàtica en un procés també dependent de fosforilació.

Curiosament, el complex ciclinaE-CDK2 prevé la interacció de KPC amb p27 i evita la seva poliubiquitinització, exhibint així una relació de competitivitat per accedir al domini CDK de p27 (Kotoshiba et al., 2005). A més, l'exportació nuclear de p27 per CRM1 és un acció necessària per a la proteòlisi de p27 en el citoplasma, essent KPC el responsable final d'aquesta proteòlisi (Kamura et al., 2004).

Recentment, un estudi amb cèl·lules tumorals prostàtiques involucrà l'E3 ubiquitina lligasa RNF6 (*Ring Finger Protein 6*) en la degradació de p27. Aquestes cèl·lules promouen la progressió del cicle cel·lular actuant com a regulador negatiu de p27 perquè, de fet, el knockdown de RNF6 incrementa l'estabilitat de p27 i arresta les cèl·lules en G1. A nivell mecanístic, RNF6 interactua amb p27 per mitjà del domini KIL i es caracteritza, sorprenentment, per la independència de l'estatus de fosforilació de p27 (Deshmukh et al., 2022).

A banda de les fosforilacions descrites abans, l'acetilació en el residu K100 de p27 per l'acetiltransferasa PCAF, a principis de G1, indueix la seva ubiquitinització i posterior degradació via proteasoma independentment de SKP2. S'ha demostrat que PCAF, a través del seu domini catalític HAT, s'uneix directament entre els residus 91-120 de p27 i acetila el residu K100 (Pérez-Luna et al., 2012).

1.2.1.4. Mecanismes de localització subcel·lular

La localització subcel·lular juga un paper fonamental en la funció de p27, essent el nucli el lloc on fa ús de la seva activitat anti-proliferativa. El seu posicionament citoplasmàtic exerceix, d'altra banda, un paper fonamental en les activitats relacionades amb la reorganització del citoesquelet, la motilitat cel·lular i l'autofàgia, alhora que possibilita la seva degradació pels mecanismes proteasomals associats.

p27 conté una seqüència de localització nuclear (*Nuclear Localization Signal* o NLS) en la regió C-terminal, la qual es troba compresa entre els aminoàcids 152-169 (Reynisdóttir et al., 1997). Aquesta permet guiar p27 al nucli a través procés actiu d'importació en el que es troben involucrades importines, i el complex del por nuclear, entre d'altres (Sekimoto et al., 2004). En el nucli, p27 pot dur a terme les funcions relacionades amb la inhibició del cicle cel·lular.

A l'inici de G1, la fosforilació en Ser10 és responsable de l'exportació de p27 al citoplasma. Aquesta fosforilació facilita la unió de p27 a l'exportina 1 o CRM1, la qual uneix a p27 a través de la regió NES (*Nuclear Export Signal*) i la transloca al citoplasma. La substitució de la Ser10 per Ala (S10A-p27) inhibeix la re-localització citoplasmàtica mentre que els mutants fosfo-

mimètics (S10D-p27 i S10E-p27) promouen la seva exportació en resposta a estímuls sèrics (Ishida et al., 2002; Connor et al., 2003; Wang et al., 2014). Diverses quinases poden introduir grups fosfat en aquest residu, essent principalment AKT/PKB, CDK5, MIRK, KIS, CaM quinasa II, entre d'altres (Jäkel et al., 2012).

La fosforilació de p27 en els residus Thr157 i Thr198 es produeix en condicions d'estimulació mitogènica i prevé l'importació nuclear de p27, és a dir, promou la seva retenció citoplasmàtica (Jäkel et al., 2012; Hnit et al., 2015). El residu Thr157 es troba localitzat dins la NLS i la seva fosforilació endarrereix el transport de p27 al nucli en un procés en què es troben involucrades les proteïnes 14-3-3. Les proteïnes 14-3-3 contenen motius de reconeixement a residus serina/treonina fosforilats i impedeixen la translocació nuclear de p27 per un mecanisme basat en la competició del substrat amb la Importina $\alpha 5$ (Sekimoto et al., 2004). La fosforilació de Thr198 fomenta, de la mateixa manera, el segrest citosòlic de p27 per la unió amb proteïnes 14-3-3 (Fujita et al., 2002). Les vies de senyalització proliferatives es troben implicades en la fosforilació de Thr157 i Thr198 a principis de G1 i les quinases AKT/PKB, p90rsk, Sgk1, Ampk i els membres de la família Pim (Pim1, Pim2 i Pim3) són les responsables descrites a data d'avui (Jäkel et al., 2012; Hnit et al., 2015).

1.2.2. Funcions de p27

1.2.2.1. p27 en la regulació del cicle cel·lular

Com s'ha comentat en apartats anteriors, p27 fou identificada i definida inicialment com a inhibidor de l'activitat del complex ciclina E-CDK2 en cèl·lules quiescents aturades per TFG- β o inhibició per contacte. Així doncs, els primers estudis revelaren que les senyals antiproliferatives i/o de diferenciació extracel·lular incrementen els nivells de p27 per mitjançar l'aturada de cicle a través de la inhibició dels complexos ciclina E-CDK2 (Koff et al., 1993; Polyak 1994a; Slingerland et al., 1994). Tanmateix, l'expressió de p27 esdevé essencial per definir l'estatus de quiescència o aturada de cicle en cèl·lules confluents, privades de factors de creixements i/o en presència de molècules de senyalització inhibidores de la proliferació. Així doncs, p27 s'integra com una proteïna reguladora clau en els processos biològics d'inhibició per contacte i transducció de senyals per molècules antimitogèniques. Les cèl·lules amb una elevada densitat cel·lular i/o exposades a factors antimitotòtics com la rapamicina (o bé sirolimus), IFN- γ i TFG- β , expressen elevats nivells de p27 i resten aturades en G1 per inhibició dels complexos ciclina-CDK (Coats et al., 1996; Nourse et al., 1994; Reynisdóttir et al., 1995). De fet, la inhibició de la seva expressió prevé l'aturada del cicle cel·lular en condicions de depleció mitogènica. El mutant p27CK-, el qual presenta mutacions

puntals per als lloc d'unió a ciclina (Arg30 i Leu62) i CDK (Phe62 i Phe64), revela que aquests contactes són essencials per inhibir aquests factors i induir l'aturada de cicle en G1 (Coats et al., 1996, Vlach et al., 1997). Per tant, p27 s'estableix com un element efector comú en les vies que connecten les senyals mitogèniques i el punt de restricció en G1; essent essencial l'activitat com a regulador de les CDKs específiques de G1 per regular la progressió cap a la fase S.

L'espectre d'acció de p27 recau en multitud de substrats ja que és capaç de modular l'activitat de les quinases dependents de les ciclines D, E i A, a través del domini N-terminal (H Toyoshima et al., 1994; LaBaer et al., 1997). Una de les formes d'analitzar el paper de p27 en la fase G2-M és per mitjà de models ratolins SKP2 KO. Com s'ha comentat, SCF^{SKP2} forma part del sistema de degradació proteasomal dependent d'ubiquïtina que s'encarrega de degradar p27 predominantment en la transició G1-S i, lògicament, les cèl·lules SKP2 KO presenten nivells alts de p27 en el període G2-M. Un estudi observà que la manca d'activitat de CDK1 en aquestes condicions es veu acompanyada de fenòmens d'endoreduplicació, poliploïdia, amplificació centromèrica i apoptosi, probablement, en un intent frustrat de promoure la mitosis. Aquest fenotip reverteix amb l'ablació concomitant de p27 (Nakayama et al., 2004). Es demostra, per tant, que p27 és capaç de regular la progressió del cicle cel·lular per mitjà del control addicional sobre l'activitat dels complexos ciclines-cdk associats a la transició G2-M.

Diversos estudis descriuen a p27 com a factor d'assemblatge dels complexos ciclinaD-CDK4/6. A meitat de G1, la fosforilació transitòria de p27 en les Thr157 i 198 per acció de l'eix PI3K/AKT és responsable de la importació i associació del complexos ciclines-CDK de tipus D al nucli, permetent la seva activació quan es fosforilen en residus tirosina Y74 per SRC o bé Y88 i Y89 per BCR-ABL (Labaer et al., 1997; Larrea et al., 2008; James et al., 2007). De manera similar, la introducció de grups fosfat en residus tirosina del domini KID és responsable de convertir p27, com a inhibidor dels complexos ciclina E/A-CDK2, a activador dels mateixos (James et al., 2007). La fosforilació en Y88 desorganitza l'estructura de la làmina β híbrida p27/CDK2 i, subsegüentment, l'hèlix 3₁₀ surt del centre catalític de CDK2 (Russo et al., 1996; Rath et al., 2016). La flexibilitat intrínseca, és a dir, les fluctuacions dinàmiques en l'estructura de p27 permeten integrar diferents *inputs* de senyalització i ser fosforilada en residus de tirosina, estructuralment oclusius (Y88 i Y98) i de treonina distals (T187) (Tsytlonok et al., 2019). En qualsevol cas, la progressió del cicle cel·lular es troba subjecte a la fosforilació de p27 per ciclinaE/A-CDK2 i la seva subsegüent degradació proteasomal, i és imprescindible per oferir continuïtat a un cicle cel·lular convencional.

Les primeres evidències que p27 presenta funcions independents com a CKI (amb efecte supressor tumoral) en la regulació del cicle cel·lular, involucren domini d'unió a altres proteïnes. El domini ric en prolines (aminoàcids 91-96) interacciona amb el domini SH-3 de GRB2, proteïna transductora de senyals en la via Ras/MAPK. p27 regula negativament aquesta via de senyalització impedit la unió de GRB2 a SOS, un factor intercanviador de guanina que catalitza la conversió GDP-GTP per activar Ras. Les cèl·lules p27KO mantenen els complexos GRB2-SOS durant significativament més temps però no s'evidencien efectes sobre l'activació de la via en aquest estudi. No s'ha trobat, doncs, una significació biològica d'aquesta interacció i és probable que altres elements de control estiguin involucrats en la desregulació de Ras-MAPK. Així doncs, la pèrdua dels nivells de p27 podrien comprometre el control de Ras en determinats contextos cel·lulars (Moeller et al., 2003). En relació a aquest punt, un estudi recent revela una major activació de la via Ras-MAPK en MEFs p27 KO. S'evidencia una major activació de les quinases efectores ERK1/2 i un increment en la transcripció dels gens de resposta Erg1, Jun-B, c-Fos i ciclina D1. Aquesta hiperactivació de MAPK promou una entrada més ràpida al cicle cel·lular en cèl·lules p27 KO respecte les salvatges. Curiosament, el mecanisme descrit per aquest fenomen relaciona p27 amb l'estabilitat i dinàmica dels microtúbuls. Així doncs, p27 efectua la resposta motriu de la cèl·lula interaccionant i modulant l'activitat d'estatmina, una proteïna desestabilitzadora de microtúbuls. La co-ablació de estatmina en cèl·lules p27 KO reverteix els efectes en la proliferació i els seus derivats (Fabris et al., 2015).

Un altre estudi recolza que p27 controla la progressió del cicle cel·lular per altres mecanismes independents a la seva activitat com a CKI, concretament, a través de la interacció amb elements participants de la síntesis de DNA. En aquest cas, implicarien a la regió C-terminal que comprèn els aminoàcids 148-198, la qual s'uniria i probablement inhibiria l'activitat de MCM7 (*minichromosome maintenance-7*), subunitat de les forquilles de replicació necessària per iniciar la duplicació del material genètic (Nallamshetty et al., 2005). En *Xenopus*, la proteïna homòloga de p27 es troba present juntament amb proteïnes MCM en els orígens de replicació i la seva degradació es troba especialment controlada per un complex en el que es troben presents components del multímer SCF, complexos ciclina-CDK2 i factors de pre-iniciació de la replicació (Furstenenthal et al., 2001). Per tant, p27 podria exercir com a regulador negatiu de la replicació del DNA prevenint, probablement, la iniciació prematura de la fase S per mitjà de dos mecanismes diferents: inhibint l'activitat proteïnes reguladores de la replicació (complexes ciclines-CDK) així com de les subunitats presents en els orígens de replicació (complex MCM2-7).

Diferents treballs dels últims anys demostren que p27 és una proteïna polifacètica amb funcions que s'estenen més enllà de les relacionades amb la inhibició dels complexos ciclina-CDK: exerceix com a regulador transcripcional de gens implicats en diversos processos biològics i es troba involucrat en el control de la migració cel·lular.

1.2.2.2. p27 com a regulador transcripcional

En cèl·lules quiescents, p27 es troba preferentment en el nucli i co-localitza amb diversos co-repressors transcripcionals (mSIN3A i HDACs) en promotors gènics específics. Aquesta troballa suggereix que p27 exerceix funcions nuclears independents de les relacionades exclusivament amb el manteniment dels complexos ciclina E-CDK2 en estat inactiu (Pippa et al., 2012).

Durant el cicle cel·lular, la implicació de p27 en el control de la transcripció té lloc per mitjà de mecanismes acoblats a la seva activitat com a CKI. Concretament, p27 actua com a regulador transcripcional mitjançant el reclutament selectiu de complexos ciclins-CDK en els promotors de gens relacionats amb múltiples funcions cel·lulars, entre les quals destaquen el processament i maduració (*splicing*) del mRNA, la respiració i biogènesis mitocondrial, la progressió del cicle cel·lular i la traducció. Un anàlisi bioinformàtic dels promotors va identificar potencials seqüències d'unió per a E2F4, ETS1, GABP, ELF1 i RBP2, els quals foren validats per assaig ChIP-on-ChIP (Pippa et al., 2012; Bachs et al., 2018). Concretament, el grup dirigit per Oriol Bachs estudia la relació funcional entre p27 i els complexos p130/E2F4 en aquests promotors i estableix un model de regulació transcripcional concret.

El model de regulació transcripcional dependent de p130/E2F4 es troba subjecte a la presència de dues etapes seqüencials marcades pel reclutament de complexos ciclins-CDK específics en els promotors gènics i resulta essencial per a la regulació de la transició G1/S (Pippa et al., 2012; Orlando et al., 2015; Bachs et al., 2018). Primerament, p27 s'associa a p130/E2F4 pel domini C-terminal en els promotors dels gens diana i recluta selectivament els complexos ciclina D2/D3-CDK4 a través de l'extrem N-terminal a principis i mitjans de G1. S'ha descrit que la fosforilació específica de dos residus tirosina (Y74 i Y88) per membres de la família tirosina quinases SRC promou un canvi conformacional que altera la interacció de p27 amb el centre catalític de CDK, restituint l'activitat quinasa associada (Chu et al., 2007; Grimmier et al., 2007; James et al., 2008; Larrea et al., 2008). En aquest punt, malgrat l'associació amb p27, els complexos ciclins-CDK són parcialment actius i desencadenen la fosforilació de p130 (Pippa et al., 2012; Bachs et al., 2018). De forma similar, p21 pot ésser fosforilada en Y76 per membres de la mateixa família i veure's reduïda la capacitat inhibidora sobre els complexos ciclina D1-CDK2 (Orlando et al., 2015; Bachs et al., 2018). En aquest punt, es produeix la

hiperfosforilació de p130 a finals de G₁ i, conseqüentment, la transcripció dels gens diana (Figura 3). Per tant, p27 i p21 exerceixen un paper crucial en la transició G₁/S, col·laborant seqüencialment en la transcripció de gens reprimits pels complexos p130/E2F4 a través d'un mecanisme molecular compartit. Ambdues proteïnes recluten i regulen l'activitat dels complexos ciclines-cdk selectivament en els promotors dependents de p130/E2F4 controlant el *timing* transcripcional en G₁ per fosforilacions específiques en p130 (Orlando et al., 2015; Bachs et al., 2018). Per tant, p27 es consolida com una proteïna essencial per definir l'entrada i progressió del cicle cel·lular a través de funcions que radiquen no solament en la seva activitat com a CKI sinó com a regulador transcripcional de gens relacionats amb la progressió del cicle cel·lular.

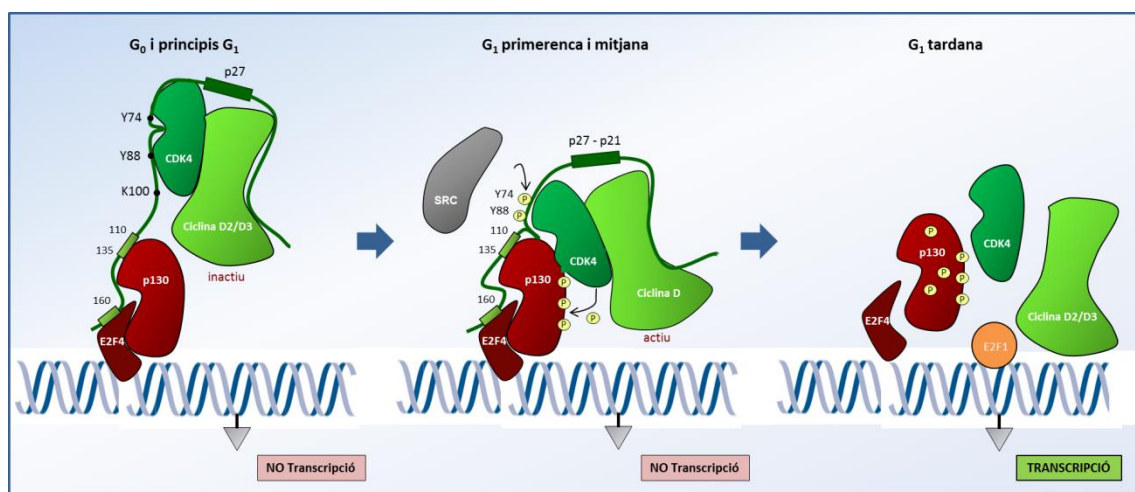


Figura 3. Regulació transcripcional de gens dependents de p130/E2F4 per acció combinada de p27 i p21. En cèl·lules quiescents, p27 reprimeix l'expressió gènica a través del reclutament de p130 i E2F4 en els promotors mentre acobla, simultàniament, la formació de complexos ciclina D2/D3-Cdk4 a través de l'extrem N-terminal. A mesura que avança la fase G₁, p27 és fosforilada en els residus tirosina 74 i 88 desencadenant l'alliberació de l'hèlix 3₁₀ i l'activació del complex ciclina-cdk associats. Després de la fosforilació de p130 per aquests complexos, p21 s'incorpora en les mateixes regions de la cromatina i introdueix novament grups fosfat en p130 per un mecanisme redundat que involucra, específicament, la presència de complexos ciclina D1-Cdk2 i la fosforilació en Y77. A finals de G₁, una vegada degradats p27 i p21 per un mecanisme dependent de fosforilació pels complexos ciclina-cdk associats, la hiperfosforilació de p130 desorganitza el complex i es promou l'expressió dels gens diana per unió de factors de transcripció activadors com E2F1.

1.2.2.3. p27 i motilitat cel·lular

La migració cel·lular es un procés altament complex, coordinat i cíclic en el que es troben involucrades remodelacions constants del citoesquelet cel·lular al llarg de l'eix antero-posterior. La cèl·lula ha de combinar contínuament l'extensió de protrusions (lamel·lipodis, filopodis) i formació de noves adhesions focals en l'extrem anterior o directriu alhora que allibera els punts de contacte i retrau la part més posterior. Amb tot això, el desplaçament

cel·lular juga un paper important en multitud de fenòmens fisiològics i patològics com poden ser el desenvolupament embrionari, la renovació cel·lular, la cicatrització, la resposta immune, l'angiogènesi i la metàstasi (SenGupta et al., 2022).

Les GTPases de la família Rho es troben implicades en la regulació i sincronització dels esdeveniments de remodelació citoesquelètica durant el procés de migració cel·lular. Aquest tipus de proteïnes troben regulada la seva activitat per acció dels denominats factors intercanviadors de nucleòtids (GEFs) i proteïnes activadores de GTPasa (GAPs), els quals s'encarreguen d'oscil·lar a la forma activa (amb GTP) i inactiva (amb GDP), respectivament. Algunes de les proteïnes més estudiades són RhoA, Rac1 i Cdc42, cadascuna d'elles amb funcions especialitzades sobre la motilitat cel·lular (Hall et al., 1998).

Les primeres evidències que relacionen p27 amb la motilitat cel·lular daten dels estudis realitzats a finals del segle XX, els quals demostren que l'expressió induïda de p27 per vectors virals és suficient per estimular la migració en cèl·lules tumorals (Nagahara et al., 1998). Estudis posteriors detallen que la localització citoplasmàtica de p27 promou la motilitat cel·lular a través de la interacció amb Rac i els efectes subsegüents en la remodelació del citoesquelet d'actomiosina. El domini *scatter* de p27 present en la regió C-terminal, comprès entre els residus 118-158, és necessari per activar Rac i induir efectes positius sobre la polimerització d'actina i la migració cel·lular, encara que per mecanismes desconeguts (McAllister et al., 2003).

Adicionalment, la regió C-terminal de p27 prevé l'activació de RhoA en el citoplasma interferint la seva interacció amb els activadors GEFs associats. En conseqüència, les cèl·lules p27 KO exhibeixen un nombre major de fibres d'estrès i adhesions focals en comparació amb les p27 WT, defectes migratoris que són reversibles amb la reintroducció de p27 en aquestes cèl·lules. En cèl·lules p27 KO, l'activació de RhoA i els canvis associats en el citoesquelet d'actina esdevenen a través de la proteïna efectora ROCK1 (*Rho-Associated Protein Kinase*), la qual inicia una cascada de senyalització sobre la que es coneix comunament com la via de senyalització de Rho. Seguint amb aquesta línia, ROCK1 fosforila la quinasa LIMK que, al seu torn, incorpora grups fosfat en ADP/cofilina, proteïnes d'unió a actina responsables de la despolimerització i inestabilitat dinàmica pròpies dels filaments d'actina. La fosforilació d'ADP/cofilina bloqueja la seva capacitat per despolimeritzar els filaments d'actina i, en conseqüència, incrementa el número de microfilaments alhora que es tornen limitats els monòmers necessaris per continuar amb la migració cel·lular. En conjunt, la major estabilitat dels filaments d'actina i la pèrdua dels seus monòmers contribueixen a una menor migració de

la cèl·lula (Besson et al., 2004). De fet, les formes de migració es troben influenciades, en part, per l'activitat dels membres de la família de GTPases RhoA: l'activitat de RhoA afavoreix un fenotip migrador de tipus ameboide mentre que l'activació de Rac1 promou un moviment mesenquimal (Sahai et al., 2003). En consonància, p27 citoplasmàtica promou la migració mesenquimal per mitjà de la inhibició de RhoA i l'activació de Rac1 mentre que cèl·lules p27 KO tendeixen a adoptar un mode de migració ameboide. Experiments amb models ratolins mutants per p27 i siRNA específics mostren que la localització citoplasmàtica de p27 promou una migració mesenquimal per mitjà de la inhibició de RhoA (Gui et al., 2014). Aquesta via és important per propiciar la migració de macròfags originaris de la medul·la òssia i el desenvolupament de neurones corticals en condicions fisiològiques; i és emprada per cèl·lules tumorals amb l'objectiu de fomentar la migració cel·lular i la invasió (Godin et al., 2012; Gui et al., 2014; Wu et al., 2006). Estudis posteriors indiquen que p27 promou la transició epiteli-mesènquima per mitjà de la unió a JAK2 i l'activació de STAT3 (Zhao et al., 2015). En conjunt, les funcions de p27 relacionades amb la remodelació del citoesquelet d'actina i la motilitat cel·lular són independents de la seva activitat com a CKI; les cèl·lules WT i p27 CK- mostren pertorbacions motrius indistintament.

Estudis recents involucren p27 en les propietats invasives de les cèl·lules tumorals a través de la formació dels denominats invadopodis. Els invadopodis són protrusions de membrana plasmàtica riques en actina que promouen la degradació de la matriu extracel·lular adjacent mitjançant l'alliberació de metal·loproteases. La seva formació té lloc en els punts d'ancoratge a substrat i es requereix de la seva desestabilització per tal d'oferir continuïtat al procés de migració cel·lular. Per tant, aquestes estructures són altament dinàmiques i requereixen d'una remodelació constant del citoesquelet per coordinar la degradació de la matriu extracel·lular i la migració dins del microambient tissular. Un dels elements crítics per a l'organització, maduració i desacoblament dels invadopodis recau en cortactina, una proteïna amb una funció molt estreta amb el citoesquelet d'actina (MacGrath et al., 2012; Murphy et al., 2011).

Cortactina és una proteïna clau en el cicle vital dels invadosomes i la seva activitat es troba regulada estretament per modificacions post-traduccionals específiques, les quals determinen els seus efectes sobre la polimerització i l'estabilitat dels microfilaments. p27 regula l'activitat de cortactina en el citoplasma fomentant la seva interacció amb PAK1, la qual desencadena la seva fosforilació en S113, S150 i/o S282. El mecanisme d'acció encara es desconeix tot i que aquestes fosforilacions podrien probablement estar relacionades amb una disminució de l'afinitat per l'actina, la qual cosa podria desestabilitzar i desorganitzar conseqüentment els

invadopodis. Així doncs, la inhibició de la via PAK1/cortactina en cèl·lules p27 KO estabilitza els invadopodis i promou una major degradació proteolítica de la matriu extracel·lular. Sorprenentment, aquest fenotip s'acompanya per una reducció dràstica en la capacitat d'aquestes cèl·lules per envair, la qual cosa suggereix que es requereix d'una renovació o reorganització dels invadosomes per una invasió eficient. Per tant, la localització citoplasmàtica de p27 promou directament la invasió cel·lular a través de la via PAK1/cortactina (Moshfegh et al., 2014; Jeannot et al., 2017).

1.2.3. Models ratolins p27 *knock out* i *knock-in*

Una de les formes d'estudiar la importància de les CKI en la regulació del cicle cel·lular és a través dels fenotips de ratolins mancants per cadascuna d'aquestes proteïnes. Els models ratolins de p27KO foren obtinguts i caracteritzats per diferents grups d'investigació a finals del segle XX, els quals definiren unes característiques fenotípiques comunes (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996).

Els ratolins p27KO són viables i no experimenten alteracions durant l'embriogènesi. En el seu lloc, evidencien una major mida durant les primeres setmanes (increment de entre 20-30%) com a resultat d'una hiperplàsia múltiple dels òrgans interns, especialment el timus, la melsa i la pituïtària. Aquests resultats revelen la importància de p27 en limitar el creixement i denoten certa especificitat tissular, ja que els òrgans més afectats són aquells que presenten majors nivells de p27 en ratolins control. Els experiments de biologia molecular en aquests teixits indiquen un efecte directe de p27 en la proliferació cel·lular ja que el percentatge de cèl·lules en fase S i l'activitat quinasa associada a ciclina E es troben ambdós incrementats en ratolins p27KO respecte al control. A més, no s'evidencien indicis de mort cel·lular ja que el número de cèl·lules apoptòtiques en assaigs TUNEL resta invariable entre ratolins control i p27KO (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996).

Les proves immunohistoquímiques mostren una localització de p27 preferentment nuclear i restringida a cèl·lules no proliferants, i no s'identificaren anormalitats histològiques en gran part de teixits p27KO. Curiosament, s'observaren transformacions neoplàsiques adenomatoses (adenomes) en pituïtària i un increment en el número de progenitors hematopoètics, fenòmens acompanyats d'esterilitat en el cas de les femelles per defectes en la formació del cos luti. Aquestes troballes suggereixen un efecte de p27 durant la determinació de llinatge i la diferenciació cel·lular en l'hematopoesi i la fol·liculogènesi (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996).

Sorprenentment, els ratolins hemizigots $p27^{+/-}$ mostren un fenotip intermedi en quant a la mida dels ratolins, suggerint un efecte en la proliferació dependent de dosis gènica. De fet, els resultats d'un estudi posterior revelen que la incidència tumoral incrementa significativament en ratolins $p27^{+/-}$ gamma-irradiats o exposats a un agent carcinogen respecte el control, indicant que la tumorigènesi es veu afavorida en presència de nivells reduïts de p27. A més, els anàlisis genètics i bioquímics dels tumors deficients per p27 no mostren alteracions genètiques (mutacions) ni alteracions (silenciament) en l'expressió de l'al·lel romanent, diferint d'altres models murins deficients per altres supressors tumorals (Fero et al., 1998; Philipp-Staheli et al., 2001). Per tant, p27 es tracta d'un gen supressor tumoral que exhibeix haploinsuficiència, és a dir, la disfunció monoal·lèlica de p27 és suficient per promoure la formació de neoplàsies. En aquest sentit, p27 no pot identificar-se com un gen supressor tumoral clàssic perquè no compleix el criteri de doble mutació establert per Knudson (Knudson et al., 1971).

En resum, el paper crític de p27 com a regulador negatiu del cicle cel·lular s'evidencia en el fenotip dels ratolins KO i deficients, els quals exhibeixen un fenotip hiperproliferatiu en múltiples teixits i major susceptibilitat al desenvolupament de tumors en comparació als animals salvatges. Els efectes de p27 sobre la proliferació són autònoms a nivell cel·lular i es troben directament relacionats amb la biologia molecular de p27. Tanmateix, els models murins *knock-in* p27 S10A i p27 CK- evidencien nous aspectes de p27 relacionats amb la tumorigènesi. Els ratolins *knock-in* p27S10A amb localització nuclear de p27 mostren certa resistència a la formació de tumors i, contràriament, defectes en la capacitat d'unió per unir ciclines es relacionen amb una major susceptibilitat a desenvolupar tumors espontanis i induïts en comparació a ratolins WT (Kotake et al., 2005; Besson et al., 2007). Per tant, la localització subcel·lular de p27 i el seu rol en altres processos cel·lulars poden ser claus per definir el caràcter de p27 com a oncogen o com supressor tumoral.

1.2.4. p27 i càncer

Es requereix un control rigorós del cicle cel·lular per mantenir l'homeòstasi de la cèl·lula, la pèrdua del mateix promou la transformació cel·lular i la tumorigènesi en mamífers. La implicació de p27 en càncer es relaciona directament amb el paper que exerceix sobre els principals elements governadors del cicle cel·lular. Així doncs, les alteracions en p27 desregulen l'activitat dels complexos ciclines-cdk de tal forma que es veu descontrolada la proliferació de la cèl·lula. S'han estudiat els canvis en el gen *CDKN1B* en una gran varietat de tumors amb la finalitat de caracteritzar i analitzar les conseqüències fenotípiques associades. Totes les alteracions genètiques descrites a data d'avui comporten la pèrdua funcional de p27

essent, principalment, delecions i mutacions puntuals *missense* amb caràcter negatiu sobre la seva activitat (Slingerland et al., 2000; Chu et al., 2008).

Les mutacions germinals descrites en *CDKN1B* presenten una extremada baixa freqüència i són responsables de l'aparició de la denominada neoplàsia endocrina múltiple de tipus 4 (MEN4) en humans i MENX en ratolins (Pellegata et al., 2006). Aquesta patologia presenta una herència autosòmica dominant amb mutacions en heterozigosis i cursa amb el desenvolupament de neoplàsies endocrines en paratiroides i pituïtària principalment, similar a les característiques fenotípiques descrites prèviament en ratolins *CDKN1B*^{-/-} (Alrezk et al., 2017).

Les mutacions somàtiques de *CDKN1B* són presents en escassos tumors: les delecions en homozigosi només es reserven en un percentatge extremadament reduït de neoplàsies hematològiques. En canvi, les alteracions genètiques inactivadores per mutació puntual són pròpies de d'un subgrup de neoplàsies mamàries de tipus luminal i alguns tipus de tumors hematològics de cèl·lula T (Morosetti et al., 1995; Spirin et al., 1996)

Com s'ha comentat, la capacitat de p27 com a supressor tumoral depèn críticament dels nivells absoluts d'expressió. A diferència d'altres supressors tumorals com p53 o Rb, els esdeveniments neoplàsics derivats de l'alteració en els nivells de p27 es presenten en haploinsuficiència. Dit d'una altra manera, *CDKN1B* confereix tumorogènicitat quan un dels al·lels es troba afectat i la producció proteica romanent resulta insuficient per garantir la seva activitat. En aquest sentit, com ja s'ha fet esmena abans, p27 no es reconeix com a supressor tumoral pròpiament ja que no compleix el criteri de doble inactivació (*two-hit hypothesis*) establert per Knudson, el qual identifica els gens supressors tumorals com a recessius a nivell cel·lular (Fero et al., 1998; Philipp-Staheli et al., 2001).

En resum, la inactivació de p27 en càncer es produeix rarament per mutació tot i que permet definir un petit col·lectiu de tumors, essent més coneguts els casos hereditaris de MEN4 i algunes variants familiars de càncer prostàtic. Amb ajut de les tecnologies de seqüenciació massiva en paral·lel, estudis recents amplien el panorama mutacional i estableixen que *CDKN1B* es troba mutada en un percentatge significatiu de tumors mamaris de tipus luminal i en tumors neuroendocrins de l'intestí prim, revertint parcialment aquesta concepció.

La pèrdua d'heterozigositat de p27 és una característica present en múltiples tumors humans, entre els quals es troben la leucèmia mieloide crònica, la leucèmia linfoblàstica aguda, el càncer d'ovari i pròstata, entre d'altres. Els nivells de p27 es troben disminuïts en gairebé el 50% de tumors i correlacionen amb una major agressivitat histològica i mortalitat en pacients,

motiu pel qual es considera un marcador de mal pronòstic en varietat de tumors. La reducció dels seus nivells es produeix, principalment, per acció de mecanismes post-traduccionals involucrats en la seva degradació en un procés de proteòlisis accelerada,. En consonància, el dèficit de p27 s'associa a una sobreexpressió de SPK2, Cks1 i una major degradació proteasomal, essent present en tumors de pròstata, colon, mama i pulmó, entre d'altres. Les mutacions inactivadores de PTEN contribueixen a la pèrdua de p27 per sobreexpressió de SKP2, tot i que en la major part de tumors els nivells de p27 es redueixen per mecanismes independents (Slingerland et al., 2000; Philipp-Staheli et al., 2001; Chu et al., 2008, Bencivenga et al., 2017).

La localització nuclear o citoplasmàtica de p27 determina interaccions i funcions característiques entre les quals es troben la regulació de la transcripció, la organització del citoesquelet i l'autofàgia; amb un impacte sobre la proliferació, la supervivència, la motilitat i la invasió. La deslocalització subcel·lular és una eina emprada per les cèl·lules tumorals per fomentar l'activitat oncogènica de p27. Concretament, les cèl·lules tumorals potencien la retenció de p27 en el citoplasma des d'on remodela el citoesquelet per afavorir la motilitat i la invasió limitant, alhora, la seva funció inhibidora en el nucli. De fet, la localització aberrant de p27 en el citoplasma s'associa directament amb el potencial metastàtic i cursa amb una major significació patològica. En aquest procés, la fosforilació dependent de Akt en Thr157 juga un paper clau i es troba altament estudiada en tumors mamaris (Lianget al., 2002; Shin 2002; Viglietto et al., 2002). Tanmateix, el context cel·lular determina el rol de p27 com a activador o inhibidor de la motilitat cel·lular ja que, en cèl·lules de fibrosarcoma i fibroblasts, p27 inhibeix la migració cel·lular impedit la unió de tubulina a la proteïna desestabilitzadora de microtúbuls estatmina. Així doncs, la sobreexpressió de p27 o bé la manca d'expressió d'estatmina resulta en la inhibició de la motilitat cel·lular. Les cèl·lules amb aquestes modificacions exhibeixen una major adhesió als constituents de la matriu extracel·lular i no poden efectuar moviments complexos ja que la migració involucra processos de polimerització i despolimerització de microtúbuls de manera cíclica (Baldassarre t al., 2005). En el cas de cèl·lules derivades d'hepatocarcinomes, p27 colocalitza amb Rac en el citoplasma i estimula la migració cel·lular a través de la remodelació del citoesquelet d'actina. Els MEFs p27KO cursen, consegüentment, amb activació de RhoA i formació d'adhesions focals que entorpeixen la migració cel·lular (Besson et al., 2004)

1.3. Introducció al metabolisme cel·lular

Organismes unicel·lulars com els bacteris es troben sotmesos a una elevada pressió evolutiva en termes de reproducció quan els nutrients es troben disponibles, de manera que intenten duplicar-se el més ràpidament possible en aquestes condicions. Per aquesta raó, han desenvolupat sistemes de control metabòlic orientats a reconèixer l'aprovisionament de nutrients suficient i canalitzar-los adequadament per a crear blocs estructurals i poder-se dividir. En condicions d'escassetat de nutrients, les cèl·lules interrompen la producció de biomassa i adapten el metabolisme per obtenir el màxim rendiment energètic dels recursos disponibles i sobreviure durant el transcurs d'aquest període d'inanició. En els organismes multicel·lulars, la major part de cèl·lules es troben exposades a un subministrament continu de nutrients, per la qual cosa precisen, contràriament, de sistemes de control encarregats de prevenir la proliferació cel·lular aberrant. Així doncs, la internalització de nutrients en cèl·lules de mamífer és un procés dependent de la presència de factors de creixement. Tot i així, els organismes unicel·lulars i les cèl·lules d'organismes multicel·lulars exhibeixen un mecanisme conservat evolutivament que els dota de fenotips metabòlics similars sota condicions ambientals similars (Vander Heiden et al., 2009).

En condicions microambientals hostils, els microbis i les cèl·lules diferenciades dels organismes multicel·lulars utilitzen la glicòlisis per convertir la glucosa en piruvat. Seguidament, el piruvat entra en el mitocondri on és convertit en AcetilCoA i metabolitzat via cicle de Krebs produint equivalents reductors que són utilitzats en la cadena respiratòria mitocondrial per generar ATP. Tanmateix, en condicions proliferants, les cèl·lules dirigeixen el seu metabolisme des d'un metabolisme aeròbic cap a un de tipus anaeròbic o fermentatiu, convertint el piruvat en lactat. Amb aquesta compensació, les cèl·lules continuen generant ATP (encara que menys eficientment) en un intent de satisfer les demandes energètiques durant aquest període. La conservació evolutiva d'aquest mecanisme suggereix algun tipus d'avantatge en aquestes condicions (Vander Heiden et al., 2009).

Per unitat de glucosa, la glicòlisis és una manera ineficient de generar ATP en comparació amb la quantitat obtinguda per la respiració mitocondrial. El metabolisme de la glucosa a lactat genera únicament 2 molècules d'ATP per molècula de glucosa mentre que el procés d'oxidació completa n'origina un total de 36 (Lehninger et al., 2005). Tanmateix, la taxa metabòlica de la glucosa a través de la glicòlisis és de 10-100 vegades més ràpida que la seva oxidació completa en el mitocondri. En aquest sentit, la quantitat d'ATP sintetitzada en un determinat període de temps és equiparable entre ambdues vies. Des d'un punt de vista evolutiu, una major rapidesa

en el consum de glucosa ofereix avantatge selectiu dins el context de competició per a fonts d'energia compartides i limitades, com és en el cas del microambient tumoral, ja que ofereix una major accessibilitat a aquest nutrient (Liberti et al., 2016). Tot i aquests avantatges, la denominada glicòlisi aeròbica, independent de la presència d'oxigen, s'emmarca dins de la resposta fisiològica de qualsevol cèl·lula en estat de proliferació.

Tot i que el conjunt de vies metabòliques es troben ben definides, les cèl·lules expressen xarxes d'enzims metabòlics específiques de llinatge i factors reguladors que recolzen les funcions tissulars. Les cèl·lules cardíques o miòcits es troben en quiescència però es troben subjectes una alta demanda d'energia, raó per la qual fonamenten el seu metabolisme en un procés de fosforilació oxidativa que pretén obtenir eficientment ATP. En el cas de les cèl·lules immunitàries, transiten d'un estat de quiescència a un altament proliferatiu on les demandes metabòliques es veuen modificades. Les cèl·lules passen, d'un estat de baixa captació nutricional que manté les funcions basals, a un estat d'elevat consum i activació de vies anabòliques el qual facilita el creixement ràpid i la divisió (Metallo et al., 2013).

El microambient cel·lular i les pertorbacions farmacològiques provoquen respostes adaptatives que multipliquen el número de fenotips metabòlics possibles en una cèl·lula donada. La disponibilitat de nutrients pot ésser limitant en ocasions i la cèl·lula pot optar per iniciar una estratègia d'adaptació basada en reduir el consum de glucosa i estimular la respiració mitocondrial emprant altres fonts nutricionals, com són aquelles que resulten de la degradació d'aminoàcids i àcids grassos. Addicionalment, l'activació de vies catabòliques per al consum de macromolècules disponibles dins la cèl·lula i la macro-autofàgia constitueixen eines disponibles per al manteniment de la homeòstasis quan els nutrients i/o factors de creixement es troben limitats. Per tant, els aspectes metabòlics intrínsecs al tipus cel·lular juntament amb el microambient determinen el fenotip metabòlic en una cèl·lula donada i impacten sobre els esdeveniments reguladors que tenen lloc en estats normals o patològics, per la qual cosa es considera que les respostes metabòliques són dependents de context (Metallo et al., 2013).

1.3.1. Cadena respiratòria mitocondrial

El catabolisme de glúcids (via glicòlisi i oxidació del piruvat), lípids (via β -oxidació) i proteïnes (via desaminació i transaminació) comprèn el conjunt de reaccions destinades a l'obtenció d'energia. Amb aquest propòsit, les molècules derivades d'aquestes processos ingressen en el cicle de Krebs (CK) o cicle dels àcids tricarboxílics (TCA del terme anglès *tricarboxylic acid cycle*), on es generen, al seu torn, més substrats per a la cadena de transport d'electrons (ETC del terme anglès *electron transport chain*). En aquest sistema, els electrons extrets de les

reaccions catabòliques són transportats en forma d'equivalents reductors NADH i FADH₂ creant, simultàniament, un gradient electroquímic que estimula la producció d'ATP. El conjunt de reaccions redox que comprèn la cadena de transport d'electrons i la síntesis d'ATP per quimiosmosis constitueix el procés de fosforilació oxidativa o OXPHOS (*oxidative phosphorylation*) (Lehninger et al., 2005)

El sistema OXPHOS o cadena respiratòria mitocondrial (CRM) consisteix en dos transportadors d'electrons mòbils, ubiquinona (coenzim Q, CoQ) i citocrom c (cit c); i un total de cinc complexos multi-heteromèrics encastrats en la membrana mitocondrial interna: NADH deshidrogenasa o complex I (CI), succinat deshidrogenasa o complex II (CII), ubiquinol-citocrom c oxidoreductasa o complex III (CIII), citocrom C oxidasa o complex IV (CIV) i l'ATP sintasa o complex V (CV). La conjunció dels quatre primers complexos i els transportadors d'electrons mòbils comprèn la denominada cadena de transport d'electrons (Lehninger et al., 2005).

El transport d'electrons al llarg de la ETC genera energia i és emprada, en part, en els complexos I, III i IV per bombejar protons a través de la membrana mitocondrial interna. L'aflux de protons des de la matriu mitocondrial a l'espai inter-membrana genera diferència de potencial electroquímic (gradient electroquímic) al llarg de la membrana mitocondrial interna, el qual s'empra en forma de força motriu protònica per acoblar el transport d'electrons amb la síntesis d'ATP. Concretament, l'enzim que rep el nom d'ATP sintasa és el responsable de catalitzar la formació d'ATP a partir d'ADP i fosfat inorgànic en aquest procés (Lehninger et al., 2005).

1.4. Complex I

El complex I de la CRM rep el nom també de NADH:ubiquinona oxidoreductasa o NADH dehidrogenasa i es tracta d'una macro-proteïna multimèrica implicada en el metabolisme energètic de la cèl·lula. De naturalesa multi-enzimàtica, constitueix el primer complex de la cadena respiratòria mitocondrial i el punt d'entrada dels electrons procedents del NADH. A nivell funcional, catalitza la transferència d'electrons procedents del NADH al coenzim Q10 o ubiquinona en un procés de varies etapes que combina, alhora, la translocació de protons a través de la membrana mitocondrial interna. L'aflux de protons del CI des de la matriu mitocondrial a l'espai inter-membrana contribueix, en major part, al manteniment del gradient electroquímic al llarg de la membrana mitocondrial interna i a la generació de força motriu protònica, la qual s'empra per acoblar el transport d'electrons amb la síntesis d'ATP (Mitchell 1961)

La biogènesis del CI presenta orígens genètics duals o divergents, essent necessàries les actuacions i aportacions dels genomes mitocondrial i nuclear. Un total de 7 subunitats es troben codificades pel genoma mitocondrial mentre que la gran majoria (un total de 38) tenen la seva representació dins el genoma nuclear. Les subunitats de codificació mitocondrial presenten propietats altament hidrofòbiques i la traducció d'aquestes té lloc en zones pròximes a la membrana mitocondrial interna per facilitar la seva translocació. Les subunitats estructurals d'origen nuclear segueixen els mecanismes d'expressió habituals i es troben subjectes a un procés d'importació dirigit (Mai et al., 2017). En quant a la nomenclatura dels components estructurals, les subunitats humanes de codificació nuclear contenen el prefix NDU- (*NADH-deshidrogenase ubiquinona*) i les d'origen mitocondrial precedeixen de ND- (*NADH-deshidrogenase*) (Mimaki et al., 2012).

El CI correspon a la proteïna multimèrica de major dimensió de la CRM ja que consta d'un total de 45 subunitats i presenta una massa total de 970 kDa. Macroscòpicament, el CI presenta una morfologia en forma de "L": consta d'un domini amb caràcter lipofílic, embegut en la membrana mitocondrial interna, i una protrusió o extensió hidrofílica en forma de braç que s'estén a la matriu mitocondrial, ambdós disposats gairebé perpendicularment entre sí. El domini perifèric conté els centres actius responsables de les reaccions redox i la transferència electrònica; l'altre braç conté la maquinaria translocadora de protons. A nivell bioquímic, un total de catorze subunitats es troben altament conservades en bacteris) i són considerades essencials perquè intervenen directament en la catàlisi: set subunitats del braç hidrofílic (NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 i NDUFS8) contenen els centres actius redox FMN i Fe-S; les set subunitats romanents (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 i ND4L) constitueixen els canals de protons presents en el domini hidrofòbic o trans-membrana i, a la vegada, el lloc d'unió a ubiquinona. Les trenta-una subunitats romanents es consideren accessòries o supernumeràries i es distribueixen al voltant del *core* catalític, les quals exerceixen un paper important en l'assemblatge i estabilitat del complex (Hunte et al., 2010; Mimaki et al., 2012; Vinothkumar et al., 2014; Zhu et al., 2016; Signes et al., 2018; Stroud et al., 2016). De fet, les cèl·lules KO per alguna de les subunitats accessòries cursen amb defectes en altres subunitats residents en el mateix mòdul estructural, és a dir, existeixen correlacions estructurals clares entre la pèrdua d'una subunitat i la desestabilització del mòdul associat, amb menor presència de les subunitats associades (Stroud et al., 2016).

A nivell molecular, la transferència electrònica s'inicia amb la captació de dos electrons procedents de l'oxidació del NADH per un grup prostètic flavin mononucleòtid (FMN) que es troba unit no covalentment a la subunitat NDUFV1 de l'enzim. En aquest punt, els electrons

són subsegüentment transmesos de forma successiva per una sèrie de clústers de vuit nuclis Fe-S, els quals actuen com a transportadors unitaris d'electrons, fins a l'acceptor ubiquinona present en NDUF57. Un total de 5 subunitats comprenen els vuit nuclis: NDUF51 comprèn 5 nuclis (N1b, N4 i N5), NDUF58 n'engloba 2 (N6a i N6b) i les subunitats NDUFV1, NDUFV2 i NDUF53 tenen associats 1 nucli N3, 1 nucli N1 i 1 nucli N2, respectivament. Els electrons oxidats en el braç perifèric de la matriu es condueixen a la intersecció del braç perifèric i el domini de membrana fins a l'acceptor electrònic ubiquinona. Així doncs, es genera una forma reduïda d'aquest enzim amb el nom de semiquinona que, immediatament, incorpora l'altre electró per donar lloc a la seva forma totalment reduïda, l'ubiquinol (QH₂ o CoQH₂). En aquest estat, l'ubiquinol se separa del CI i, amb l'objectiu d'oferir continuïtat a la cadena de transport d'electrons, difon lliurement per la membrana mitocondrial interna fins al complex III gràcies a les seves propietats liposolubles. La transferència electrònica final ve acompanyada de canvis conformacionals en la part del domini hidròfil més pròxim a la membrana. Aquests canvis es transmeten a la regió transmembrana, provocant desplaçaments de les seves hèlix que obren pas de protons des de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana (Vinothkumar et al., 2014; Zhu et al., 2016). La reacció química subjacent a la catàlisi del CI presenta els coeficients estequiomètrics que s'indiquen en l'equació química $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CoQ} + 4\text{H}^+_{\text{matriu}} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQH}_2 + 4\text{H}^+_{\text{espai intermembrana}}$, on és remarcable la producció de 4 protons per cada dos electrons.

Estructuralment, el CI presenta clàssicament quatre dominis o mòduls funcionals: 1) el domini NADH o domini N engloba la meitat distal del braç hidrofílic i és responsable de la interacció i oxidació del NADH; conté, com a mínim, les subunitats NDUFV1, NDUFV2 i NDUF51 2) el domini ubiquinona (domini Q) o domini ND1 constitueix la meitat proximal del braç hidrofílic i duu a terme la transferència electrònica al llarg dels *clústers* Fe-S fins l'ubiquinona. Es troba constituït per NDUF52, NDUF53, NDUF57 i NDUF58, mínimament. 3) el domini de bomba proximal o domini PP (*proximal pump*) s'encarrega de la translocació protònica juntament amb 4) el domini de bomba distal (Mimaki et al., 2012; Vinothkumar et al., 2014; Zhu et al., 2016) (Figura 4).

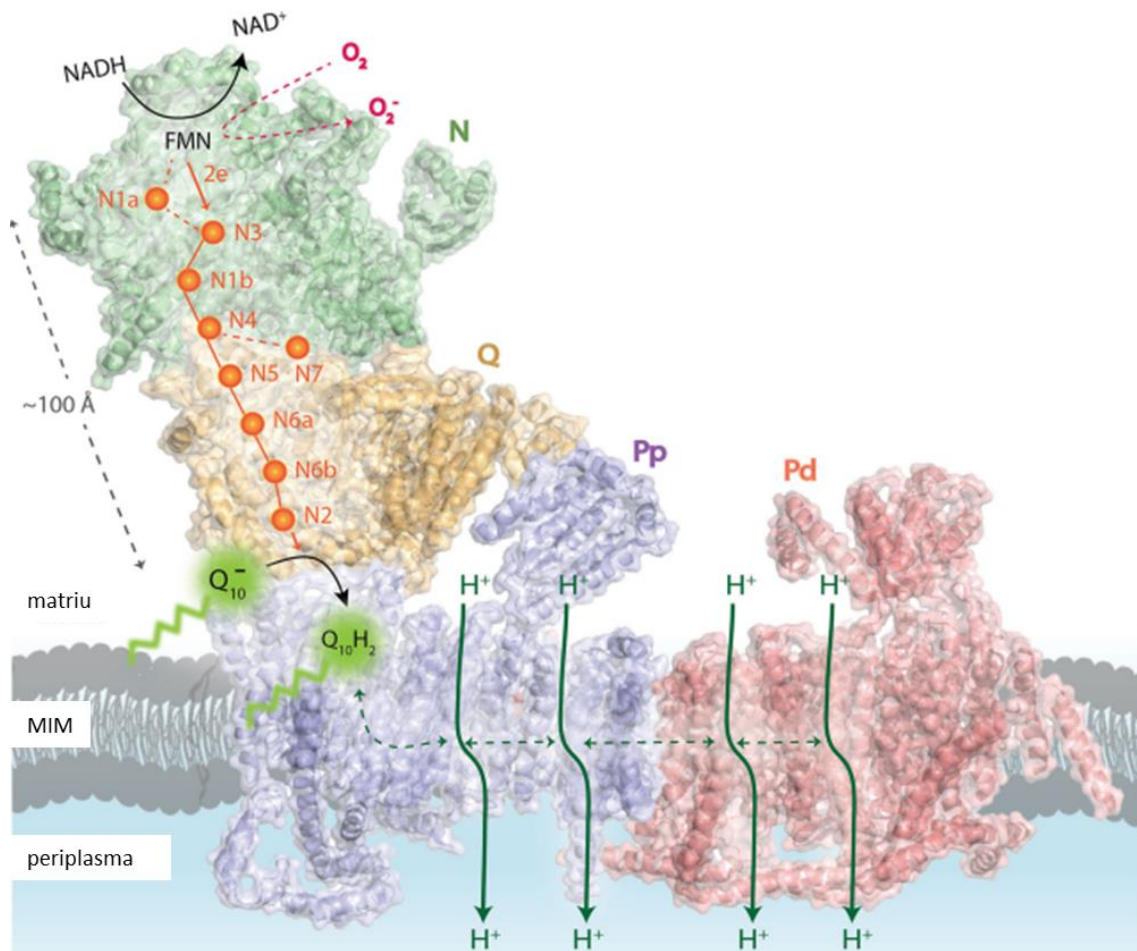


Figura 4. Representació esquemàtica de l'estructura i funció del complex I boví (PDB 4UQ8) segons Giachin G., et al. En el mòdul N (en verd) té lloc l'oxidació del NADH per part del grup FMN i la incorporació dels dos electrons generats a la cadena de nuclis Fe-S (esferes taronges). La transferència electrònica es produeix al llarg de set nuclis Fe-S fins al clúster N2, responsable de traslladar els electrons a l'ubiquinona (Q_{10}^-) del mòdul Q (en groc). La reducció de Q_{10}^- a $Q_{10}H_2$ induïx canvis conformacionals en les hèlix dels mòduls translocadors de protons P (P proximal en violeta i P distal en salmó). Com a resultat, un total de quatre protons són traslladats de la matriu mitocondrial al periplasma o espai intermembrana del mitocondri. El cofactor FMN reacciona també amb l'oxigen molecular i forma el radical lliure anió superòxid. MIM: membrana mitocondrial interna.

Múltiples estudis en cèl·lules i models de patologia animal han proporcionat informació sobre la biogènesi de la CRM i han ajudat a definir el mecanisme d'assemblatge així com les proteïnes involucrades en aquest procés. En termes generals, l'assemblatge del complex OXPHOS és un procés intricat altament regulat que requereix la incorporació coordinada de les proteïnes *core* o essencials, responsables de l'activitat catalítica, i l'addició de subunitats "supernumeràries" les quals exerceixen un paper crucial en l'assemblatge, la regulació i la estabilitat dels complexos. Es requereixen, a més, una multitud de factors intermediaris, essent principalment chaperones, que no formen part íntegra però que assisteixen durant el procés d'assemblatge i consolidació final, concretament, addicionant els components

estructurals i grups prostètics necessaris (Guerrero-Castillo et al., 2017; Signes et al., 2018). Per tant, la biogènesis estructural i la capacitat funcional del sistema OXPHOS requereix de l'acció coordinada de xaperones i altres factors d'assemblatge específics de complex.

El model actual que es proposa per a l'assemblatge del CI es fonamenta en l'addició ordenada de diferents mòduls, és a dir, formes d'organització intermèdies o de menor escala que s'integren progressivament fins a la consolidació final de l'estructura. En aquest sentit, el model proposa que el CI presenta una organització modular constituïda per un total de 6 subsistemes autònoms o mòduls (N, Q, ND1, ND2, ND4 i ND5) organitzats, al seu torn, amb l'ajuda de factors d'assemblatge específics (Guerrero-Castillo et al., 2017; Signes et al., 2018). Sorprenentment, els complexos de la CRM es troben interconnectats formant estructures de major ordre i complexitat (supra-moleculars) que reben el nom de super-complexes o respirasomes, les funcions dels quals es troben encara per definir (Signes et al., 2018).

1.4.1. Complex I com a font de producció de radicals lliures

Més enllà de la funció bioenergètica, el CI constitueix la major font de producció d'espècies reactives d'oxigen (*reactive oxygen species* o ROS), les quals són reconegudes com a molècules de senyalització determinants per a la funció mitocondrial i cel·lular (Kussmaul et al., 2006; Shadel et al., 2015). La formació de ROS es produeix per la transferència d'un únic electró a l'oxigen molecular, obtenint com a resultat el radical lliure aniónic que rep el nom de superòxid ($O_2^{\bullet-}$). Al seu torn, aquest compost pot ésser convertit al radical lliure peròxid d'hidrogen (H_2O_2) per acció de superòxids dismutases presents en el mitocondri i el citoplasma (Loschen et al., 1974).

El flux d'electrons en el mitocondri es produeix ordenadament a través de la cadena de transport d'electrons i finalitza amb la deposició sobre l'oxigen molecular per formar aigua en el complex IV. Tanmateix, els electrons poden reaccionar prematurament amb l'oxigen en determinats llocs de la CRM i donar lloc a l'aparició de radicals lliures superòxid/peròxid d'hidrogen. La producció de ROS depèn de gran quantitat de factors, entre els quals es troben la força protó-motriu, les raons de concentració $NADH/NAD^+$ i QH_2/Q així com la concentració local de O_2 . En qualsevol cas, el radical superòxid constitueix el subtipus més present i s'origina per transferència d'un electró procedent del FMN reduït a l'oxigen (Kussmaul et al., 2006; Murphy et al., 2009; Shadel et al., 2015). Els estudis realitzats amb el CI purificat, encara que limitats per a la interpolació dels resultats *in vivo*, proposen dos mecanismes per a la producció de ROS. En primer lloc, la generació de radical superòxid manté una relació proporcional amb l'increment de la raó $NADH/NAD^+$ i, consegüentment, amb l'aparició de formes FMN

completament reduïdes. Aquest tipus de regulació també dóna resposta a la formació de radicals lliures per dany i/o mutació en el CI; argumentant que una menor taxa en la respiració mitocondrial incrementa els nivells de NADH i, consegüentment, la formació de superòxid. De fet, l'oxidació dels cofactors NADH per l'expressió d'una NADH deshidrogenasa exògena redueix la producció de superòxid. El segon mecanisme que es planteja es produeix durant el transport revers d'electrons, el qual té lloc quan el subministrament d'electrons redueix el *pool*/CoQ, i en presència de prou força protònica, es pressiona als electrons a tornar de CoQH₂ cap al CI per reduir el NAD⁺ en el lloc d'unió a FMN (Murphy et al., 2009; Pryde et al., 2011).

A nivells intermedis, la producció de ROS constitueix mecanisme un de senyalització rellevant per a mantenir el potencial tumorigènic. Concretament, les espècies reactives d'oxigen actuen com a inhibidors de fosfatases de PTEN i d'activadors tant de quinases de la família Src i MAPK com dels factors de transcripció NRF2 i HIF1- α . Així doncs, es promou l'activació de programes transcripcionals relacionats amb la progressió tumoral (Bertrout et al., 2008).

La generació massiva de ROS en el mitocondri comporta l'aparició de dany oxidatiu a membranes, proteïnes i DNA mitocondrials, comproment així les nombroses funcions que exerceix el mitocondri. L'estrès oxidatiu afectaria a funcions mitocondrials bàsiques com les relacionades amb el metabolisme energètic (cicle de Krebs, β -oxidació, síntesis d'ATP i metabolisme d'aminoàcids) i aquelles relacionades amb la síntesis del grup hemo i l'assemblatge del grup FeS. Addicionalment, pot incrementar la permeabilitat de la membrana mitocondrial externa i fomentar la sortida de proteïnes presents en la membrana mitocondrial interna al citoplasma, entre les quals destaca el citocrom C pels efectes consegüents en l'activació de la maquinaria apoptòtica (Murphy et al., 2009; Pryde et al., 2011; Hirst et al., 2016).

1.4.2. Complex I i patologia

L'activitat del CI és essencial per al manteniment de la bioenergètica mitocondrial i el bon funcionament cel·lular. Genera aproximadament el 40% de la força motriu necessària per a la producció d'ATP i es troba implicat en processos relacionats amb la biosíntesi de macromolècules i el control redox. Les mutacions germinals en gens nuclears i mitocondrials que codifiquen per alguna de les subunitats del CI comporta l'aparició d'un ampli espectre de patologies metabòliques i neuromusculars (Fassone et al., 2012; Rodenburg et al., 2016).

Les malalties mitocondrials hereditàries per dèficit del CI representen el subtipus més freqüent. Alteracions tant en alguna de les subunitats estructurals com en els factors

responsables del seu assemblatge es consideren defectes primaris del CI i resulten suficients per donar lloc a disfunció. Amb efectes similars, les alteracions que es denominen secundàries són aquelles que repercuteixen de forma indirecta sobre la integritat del complex essent, per exemple, defectes en els gens involucrats en la traducció mitocondrial o la síntesis de CoQ. En quant a les alteracions primàries del CI, s'han identificat mutacions en un total de 26 gens estructurals, concretament, en 7 gens del mtDNA i en 21 de les subunitats de codificació nuclear; així com alteracions en un total de 9 factors d'assemblatge. Per tant, la deficiència del CI és extremadament heterogènia a nivell genètic i té associades patrons d'herència autosòmics, lligats al sexe i mitocondrials (Fassone et al., 2012; Rodenburg et al., 2016).

La presentació clínica de la deficiència hereditària del CI és altament variada i comprèn formes fatals com l'acidosis làctica infantil, l'aparició del denominat síndrome de Leigh i altres encefalopaties. Les manifestacions clíniques es presenten de forma primerenca i el 75% dels pacients evolucionen cap un fenotip fatal abans del 10 anys. El síndrome de Leigh es considera la condició patològica més comuna i s'origina per mutació en aproximadament 19 subunitats del CI (ND1-6, NDUFS1-8, NDUFV1, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10 i NDUFA12). L'aparició del síndrome de MELAS, un trastorn rar que cursa amb leucoencefalopatia, encefalomiopatia mitocondrial, acidosis làctica i episodis similars a accidents cerebrovasculars, es produeix, de forma similar, per deficiència del CI. Altres manifestacions clíniques cursen amb afectacions tissulars específiques com la cardiomiopatia hipertròfica i la neuropatia òptica hereditària de Leber. L'aparició del síndrome de MELAS i la neuropatia òptica de Leber són trastorns lligats a mutacions en gens mitocondrials. Per aquest motiu, les mutacions heteroplàsmiques en les subunitats ND sovint s'acompanyen d'altres manifestacions clíniques, exhibint síndromes mitocondrial solapats en la major part de casos. Un cop més, existeix una gran variabilitat en l'expressió clínica tant en la simptomatologia com en el transcurs natural de la patologia. De fet, les mutacions en NUBPL, un factor d'assemblatge dels clústers Fe-S, cursen amb un espectre totalment diferent en les imatges de ressonància magnètica (Fassone et al., 2012; Rodenburg et al., 2016)

Les mutacions somàtiques en alguna de les subunitats que integren el CI representen un factor contribuïdor de condicions patològiques diverses tals com les malalties neurodegeneratives, la diabetis i el càncer. Per exemple, les mutacions somàtiques en les subunitats ND4 i ND5 són presents en formes idiopàtiques de Parkinson (Parker et al., 2005) mentre que la presència d'afectacions genètiques en les subunitats ND1, ND6 i ND4L són presents en alguns tipus de tumors colorectals (Polyak et al., 1998). En aquesta línia, els efectes relacionats amb la producció d'energia no són els únics que es relacionen amb patologia; les funcions

independents de la respiració cel·lular, com són el control de la raó NAD⁺/NADH (equilibri redox) i el manteniment del potencial de membrana mitocondrial, resulten altres vies subjacents presents en malaltia. La producció de ROS també s'emmarca dins el mecanisme inherent del CI i resulta d'especial importància per explicar el dany oxidatiu que es genera en diferents contextos patològics com el Parkinson i altres malalties neurodegeneratives (Srinivas Bharath et al., 2017)

1.4.3. Modificacions post-traduccionals del complex I

Les modificacions post-traduccionals emergeixen como un mecanisme regulador de l'activitat del CI. Aquelles que deriven del metabolisme oxidatiu de la cèl·lula representen els canvis químics més prevalents, especialment, en condicions d'estrès oxidatiu. Aquests inclouen modificacions reversibles i irreversibles en residus de cisteïna, incorporació de grups nitro (nitració) en residus tirosina, carbonilacions, i oxidacions de l'aminoàcid triptòfan per espècies reactives d'oxigen i espècies reactives de nitrogen (Srinivas Bharath et al., 2017). Així doncs, les subunitats *core* i accessòries són susceptibles de dany oxidatiu i resulten en inhibició del CI, una característica associada a l'estrès oxidatiu i present en cervells de malalts amb Parkinson (Keeney et al., 2006).

Les fosforilacions actuen com a esdeveniments transitoris amb caràcter regulador i influeixen en la relació estructura-funció del CI, incidint per tant en la bioenergètica fisiològica o fisiopatològica de la cèl·lula. Les fosforilacions poden afectar l'orientació dels cofactors/clústers Fe-S, l'estructura de les subunitats i la seva interacció amb altres *partners*, la qual cosa pot repercutir negativament en la interfície dels dominis actius i interferir en les reaccions redox. Per exemple, la quinasa mitocondrial PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) fosforila la subunitat NDUFA10 en el residu Ser250 i garanteix la reducció de l'ubiquinona (Morais et al., 2014). En aquest sentit, les mutacions inactivadores en PINK1 provoquen disfunció mitocondrial i constitueixen una de les formes hereditàries de Parkinson (Valente et al., 2004). Per tant, un esdeveniment únic de fosforilació en una subunitat accessòria resulta suficient per regular l'activitat del CI i caracteritzar, en aquest cas, l'estrès oxidatiu que acompanya als malalts de Parkinson. Un altre exemple de regulació per fosforilació té lloc en NDUFS4 per acció de la *c-AMP-dependent protein kinase* o *protein kinase A* (PKA) mitocondrial, la qual estimula en dues vegades l'activitat del CI. Una mutació homozigòtica en NDUFS4, concretament una duplicació de 5 bp en el gen, comporta la destrucció del residu serina que és fosforilat per PKA i, amb això, l'aparició un síndrome neurològic fatal (Papa et al., 2002, Kotrasová et al., 2021). Altres subunitats del CI són fosforilades pels complexos ciclina

B1/CDK1, concretament, els components estructurals NDUFV1, NDUFV3, NDUFS2, NDUFB6 i NDUF12. Aquestes fosforilacions incrementen l'activitat de la respiració mitocondrial, el consum d'oxigen i la producció d'energia, requisits importants per proporcionar energia en les darreres fases del cicle cel·lular (Wang et al., 2014). A més, les tirosin quinases Src fosforilen a les subunitats NDUFV2 i NDUF10 amb un efecte positiu sobre l'activitat del CI. La inhibició de Src comporta una reducció de la cadena respiratòria mitocondrial i una reducció del contingut d'ATP. En resum, les modificacions post-traduccionals intervenen en l'assemblatge, funció i regulació del CI; i són presents en condicions fisiològiques i fisiopatològiques (Kotrasová et al., 2021).

Donada la importància de les modificacions post-traduccionals, un estudi bioinformàtic recent realitzà un anàlisi integral de les potencials fosforilacions presents en el CI juntament amb la seva implicació estructural i funcional. Els resultats indiquen que les subunitats que constitueixen el *core* i altres dominis actius són més susceptibles de fosforilació, és a dir, les subunitats que contenen els clústers Fe-S, el domini d'unió a NADH-FMN i el domini d'unió a ubiquinona presenten llocs de fosforilació en estreta proximitat amb les regions que uneixen als cofactors, amb les potencials implicacions funcionals que podrien tenir associades. Un experiment de fosfoproteòmica associat validà algunes de les troballes predites bioinformàticament i identificà nous residus fosforilats que comprometen potencialment l'activitat dels dominis actius. Tanmateix, el número de fosforilacions descrites bibliogràficament dista molt de les esmentades en l'estudi ja que, en el cas de NDUF3, només s'ha reportat una única fosforilació en el residu Ser59 *in vitro* (Gowthami et al., 2019).

1.5. Metabolisme del càncer

A mitjans del segle XX els bioquímics començaren a descriure el conjunt de reaccions en xarxa que comprenen el metabolisme cel·lular. Amb els avenços metodològics, s'han establert progressivament relacions entre les vies de senyalització intracel·lulars, el metabolisme i la patogènesis posant en el centre d'atenció novament el metabolisme, els mecanismes de control associats i el seu impacte en altres aspectes cel·lulars.

La tumorigènesi es troba subjecte a un fenomen de reprogramació metabòlica subjacent per, mutacions, directa i indirectament, en oncogens-gens supressors tumorals i la seva interrelació amb el microambient. La reprogramació metabòlica es defineix com el conjunt d'alteracions presents en les vies metabòliques de la cèl·lula tumoral que li permeten sobreviure en

condicions hostils i proliferar descontroladament. L'evolució de les eines de les quals disposa la biologia molecular ha permès estudiar en profunditat els mecanismes i conseqüències dels canvis metabòlics en varis estadis del desenvolupament tumoral. Això ha evidenciat que les alteracions metabòliques tumorals es presenten en totes les etapes del procés neoplàsic i contribueixen a l'aparició i manteniment del mateix. Tanmateix, alguns dels canvis metabòlics són també presents en les cèl·lules proliferants normals.

Otto Warburg evidencià que les cèl·lules neoplàsiques presenten, independentment de la presència d'oxigen, un augment en la captació i consum de glucosa per a la producció de lactat, fenomen conegut com a efecte Warburg o glucòlisis aeròbica (Warburg 1925). Tot i que hipotetitzà sobre la presència de defectes mitocondrials com a argument causa-efecte, la major part de cèl·lules tumorals segueixen un metabolisme glicolític en plena disposició de facultats mitocondrials.

Les alteracions genètiques presents en les cèl·lules tumorals són les responsables d'induir les alteracions metabòliques associades al efecte Warburg i donar suport a les demandes biosintètiques associades a la proliferació descontrolada. Recentment, un estudi organitzà les alteracions metabòliques que una cèl·lula tumoral adquireix durant el procés de desenvolupament tumoral en un total de sis trets distintius o *hallmarks*. Resumidament, 1) la cèl·lula tumoral adquireix la capacitat per disposar de major accés a les fonts nutricionals convencionals i 2) desenvolupa formes alternatives per a l'obtenció de substrats, estimulants així la entrada o afluència nutricional. D'altra banda, 3) remodela la manera en què s'empren aquests nutrients assignant-los, preferentment, a vies metabòliques que contribueixen a la generació de biomassa i al manteniment de les propietats tumorigèniques. A més, 5) presenta la capacitat d'exercir efectes sobre l'expressió gènica de la cèl·lula tumoral i 6) el de les cèl·lules circumdants en el microambient modificant el seu destí. Els mecanismes moleculars involucrats en aquestes propietats han estat estudiats detingudament durant els últims anys i s'han pogut dilucidar algun dels factors subjacents (Pavlova et al., 2016).

La internalització de nutrients en organismes pluricel·lulars és un procés que depèn de la presència de factors de creixement i l'adhesió a la matriu extracel·lular, és a dir, és un procés estrictament regulat per estímuls extracel·lulars (Rathmell et al., 2000; Grassian et al., 2011, Pavlova et al., 2016). Les cèl·lules tumorals sovint adquireixen mutacions que alteren funcionalment les vies de senyalització relacionades amb els receptors extracel·lulars i les proteïnes d'adhesió cel·lular, arribant inclús a dotar-les d'independència per aquests factors (Hanahan et al., 2000). Algunes d'aquestes es troben involucrades, al seu torn, en la captació i

conversió dels nutrients. Per exemple, les mutacions amb guany de funció en la via PI3K/Akt comporta la internalització constitutiva de nutrients a través de la expressió del transportador de glucosa GLUT1 i la seva translocació a la membrana plasmàtica (Pavlova et al., 2016). Focalitzant l'atenció en la glutamina, la captació d'aquest nutrient es troba regulat negativament per membres de la família del Rb. Les denominades cèl·lules triple KO, amb delecions en els membres de la família del Rb, incrementen la internalització i conversió de la glutamina via sobre-expressió del transportador ASCT2 i enzim convertidor GLS1, respectivament (Reynolds et al., 2014). Així doncs, membres participants en el control del cicle cel·lular incrementen també la captació de nutrients per afavorir la proliferació. Amb aquests mecanismes, la cèl·lula tumoral és capaç de proveir de nutrients necessaris per a la supervivència cel·lular en condicions microambientals desfavorables, és a dir, pot sostenir la proliferació cel·lular en condicions d'escassetat de nutrients i oxigen, agents inductors d'estrès i aturada de cicle per a qualsevol cèl·lula.

Tot i l'avidesa per la glucosa i la glutamina, els tumors presenten àrees hipòxiques i nutricionalment pobres degut a una vascularització ineficient. En aquest context, algunes cèl·lules tumorals adopten estratègies o formes alternatives per a l'adquisició de nutrients, entre les quals es troba la macro-pinocitosi i l'entosi. La primera involucra la incorporació de macromolècules d'índole proteica presents en la matriu extracel·lular, a través d'un procés en el que es vesiculitza part del líquid extracel·lular (Kerr et al., 2009). L'entosi, de forma similar, comprèn l'embolcallament i digestió de cèl·lules vives. A nivell molecular, les vies de senyalització relacionades amb factors de creixement són les que s'hi troben involucrades, essent KRas i Src (però no PI3K/Akt) els principals elements reguladors. La via de mTORC1 regula la utilització de les proteïnes obtingudes per aquestes formes especials d'endocitosi i evita que tinguin lloc en condicions d'abastiment d'aminoàcids; es reserven, únicament, com a formes extraordinàries d'obtenció de nutrients (Pavlova et al., 2016).

La proliferació cel·lular no involucra un increment en la captació de nutrients, exclusivament, sinó que requereix de canvis actius en la forma en què es metabolitzen aquests. Així doncs, el creixement i proliferació cel·lular requereix de la coordinació de processos metabòlics involucrats en la síntesis de macromolècules, és a dir, la divisió cel·lular té associada una major demanda biosintètica. En aquest sentit, la reprogramació metabòlica dota a les cèl·lules tumorals de la capacitat per suplir blocs estructurals anabòlics i generar tant la energia com el poder reductor necessaris per al seu assemblatge en macromolècules o altres estructures de major complexitat. D'aquesta manera, s'ofereix suport a altres *hallmarks* com la supervivència, la proliferació descontrolada, la invasió i la metàstasi. Tot i que les vies

metabòliques que utilitzen les cèl·lules normals i tumorals són típicament les mateixes, la diferència en el seu metabolisme radica en la taxa d'ús i la finalitat amb les que s'utilitzen (Pavlova et al., 2016).

Com s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules normals utilitzen la via glucolítica predominantment per a la obtenció de piruvat en un procés que dona lloc a dues molècules d'ATP per molècula de glucosa. Seguidament, aquest s'oxida completament dins el mitocondri per a generar equivalents reductors en forma de NADH i FADH_2 , els quals són necessaris per avivar la cadena de transport d'electrons i obtenir un rendiment energètic més eficient en la fosforilació oxidativa, amb aproximadament 36 molècules d'ATP. Per tal de donar suport a la proliferació, les cèl·lules tumorals presenten elevades taxes de la via glicolítica, contràriament, com a font de precursors anabòlics, és a dir, la via glicolítica és un proveïdor robust d'intermediaris estructurals que poden redirigir-se cap a la síntesi d'àcids nucleics, aminoàcids no essencials i àcids grassos. Les reaccions anabòliques requereixen, a més, la presència d'equivalents reductors en forma de NADPH ja que són reaccions reductores per naturalesa. La proporció energia:poder reductor pot veure's inclús desplaçada cap a situacions on la quantitat d'equivalents reductors excedeixi les necessàries en termes d'ATP. Així doncs, per la síntesis de palmitat i colesterol, components essencials per la membrana de la cèl·lula en formació, es necessiten 14 i 26 unitats de NADPH front a les 8 i 18 molècules d'ATP, respectivament. La síntesis de NADPH es genera per l'oxidació d'esquelets carbonats en vies distintes a aquelles que produeixen NADH. Per tant, es requereix poder reductor i precursors estructurals procedents de múltiples branques de la xarxa metabòlica per a la síntesis de macromolècules i la generació d'una nova cèl·lula (Lunt et al., 2011, Pavlova et al., 2016).

Les cèl·lules proliferants desacoblen la glicòlisis de la cadena respiratòria per poder satisfer la demanda biosintètica associada al procés de divisió, oferint un ampli espectre de precursors anabòlics. Concretament, el piruvat és el substrat inicial per a la biosíntesis d'alanina, aspartat i treonina mentre que el fosfoenolpiruvat resulta necessari per a la formació de tirosina, triptòfan i fenilalanina. D'altra banda, el 3-fosfoglicerat pot ésser dirigit cap a la síntesis de glicina, serina i nucleòtids purínics; on pot originar fins al 50% del NADPH intracel·lular. El primer metabòlit present en la glicòlisis, la glucosa-6-fosfat pot desviar-se vies de pentoses fosfat per a la biosíntesis de nucleòtids i poder reductor en forma de NADPH. D'altra banda, el cicle de Krebs presenta inherents intermediaris com el citrat, el succinil coenzim A i l'oxalacetat que poden ser emprats en vies biosintètiques per proporcionar lípids, aminoàcids i nucleòtids, respectivament (Pavlova et al., 2016).

Existeixen mecanismes específics que, simultàniament, dirigeixen els intermediaris glicolítics a vies anabòliques i garanteixen l'aportació de piruvat al cicle de Krebs. Amb aquest propòsit, les cèl·lules adopten una nova manera de regular l'última reacció glucolítica. En una reacció catalitzada per la piruvat quinasa (PK), el fosfoenolpiruvat transfereix un grup fosfat al ADP per formar ATP i piruvat, irreversiblement. PK presenta unes propietats cinètiques i reguladores diferents segons la variant que la cèl·lula expressi. La major part de teixits manifesten la variant muscular o PKM1, la qual s'organitza constitutivament com un tetràmer estable amb una elevada afinitat pel substrat i, consegüentment, desfosforila eficientment el fosfoenolpiruvat present a la cèl·lula. Paral·lelament, PKM2 és una isoforma embrionària reactivada en tumors per un mecanisme de *splicing* alternatiu, en el qual els exons 9 i 10 són escindits de forma mutualment exclouent. PKM2 pot oscil·lar entre una forma dimèrica i tetramèrica per un mecanisme de regulació al·lostèrica mediat per la fructosa-1,6-bisfosfat i, addicionalment, per diferents modificacions post-traduccionals. En tumors, PKM2 es troba majoritàriament en forma dimèrica on presenta baixa afinitat per PEP, de manera que crea un coll d'ampolla al final de la glicòlisis i permet proveir grans quantitats de precursors per a biosíntesis (Christofk et al., 2008; Israelsen et al., 2015)

Les vies metabòliques de la glicòlisis i el cicle de Krebs resulten altament flexibles i responen de maneres que beneficien el creixement i supervivència de les cèl·lules transformades. En un context competitiu d'evolució i selecció clonal dins el procés de desenvolupament tumoral, les cèl·lules amb vies metabòliques més adaptables superaran eventualment a aquelles amb un metabolisme més rígid i podran expandir-se clonalment. Aquesta plasticitat resulta especialment beneficiosa en el dinàmic microambient tumoral en el que es troben exposades les cèl·lules tumorals, on es produeixen canvis ràpids i constants en la disponibilitat de nutrients i oxigen inclús en zones relativament properes (Goetzman et al., 2018, Nakazawa et al., 2016, Cairns et al., 2017). Addicionalment, la supervivència en aquest microambient hostil acostuma a estar acompanyada de mutacions addicionals en gens supressors tumorals i/o vies relacionades amb l'apoptosis que fomenten, al seu torn, la supervivència i adquisició de noves mutacions favorables per l'evolució i adaptabilitat (Goetzman et al., 2018).

Un dels mecanismes presents en les cèl·lules tumoral que acompanyen a la reprogramació metabòlica és la producció i excreció de metabòlits amb capacitat moduladora sobre el perfil d'expressió gènica, és a dir, les xarxes metabòliques poden transmetre informació de l'estat metabòlic a múltiples enzims reguladors de l'expressió gènica (Pavlova et al., 2016; Goetzman et al., 2018). Aquests efectes els duen a terme metabòlits convencionals derivats de la respiració cel·lular o bé els denominats onco-metabòlits, quantitats aberrants de metabòlits

originats per mutacions en enzims mitocondrials. Per exemple, el producte derivat de la glicòlisi aeròbica, el lactat, és excretat en grans quantitats i exerceix múltiples efectes sobre la cèl·lula tumoral i el seu microambient. És capaç de promoure en els fibroblasts circumdants la síntesis i excreció de hialuronat, un glucosaminoglican present en la matriu extracel·lular que facilita la motilitat i propagació de les cèl·lules tumorals (Stern et al., 2002). El pH del medi extracel·lular es veu reduït i, en conseqüència, es veu estimulada l'activitat de proteases extracel·lulars amb un impacte positiu sobre la invasió (Kato et al., 2013). Focalitzant l'atenció en els onco-metabòlits, mutacions neomorfes en l'enzim del cicle de Krebs isocitrat deshidrogenasa (IDH) 1 o IDH2 provoquen, en substitució del producte α -cetoglutarat, l'aparició del enantiòmer D-R-2-hydroxyglutarate (D-R-2HG) a partir del mateix. Aquest onco-metabòlit és un potent regulador epigenètic que exhibeix una prominent híper-metilació en illes CpG i repercuteix negativament sobre la diferenciació cel·lular (Pavlova et al., 2016; Goetzman et al., 2018).

1.5.1. Complex I i càncer

Diversos estudis assenyalen una participació activa del CI en la tumorigènesi, recolzant la proliferació cel·lular descontrolada i la metàstasi. Clàssicament, aquest paper pro-tumorigènic s'atribueix a la funció principal del CI com a productor energètic, tenint efectes diferencials sobre el destí cel·lular d'acord el context mutacional i les demandes energètiques de la cèl·lula. Tanmateix, l'evidència actual suggereix que existeixen funcions no relacionades amb la producció d'ATP que recolzen la proliferació, per exemple, aquelles relacionades amb l'aprovisionament d'acceptors electrònics NAD^+ (Urrea et al., 2017).

El CI manté els nivells de NAD^+ adients per mantenir la proliferació i el seu dèficit limita la proliferació cel·lular. El mecanisme associat es relaciona amb la presència d'acceptors electrònics NAD^+ i l'activitat de la malat deshidrogenasa 2 (MDH2), la qual fa possible la producció mitocondrial d'aspartat en aquestes condicions. Aquest aminoàcid proteogènic és d'especial rellevància ja que pot derivar-se a vies anabòliques involucrades en la síntesis de purines i pirimidines (Sullivan et al., 2015). D'altra banda, l'acció d'inhibidors específics del CI com la rotenona o la fenformina repercuteix sobre la raó NAD^+/NADH i limita la síntesis d'aspartat. Sorprenentment, les cèl·lules amb defectes en elements de la cadena de transport d'electrons mantenen la proliferació a expenses de la presència d'altres nutrients com el piruvat, el qual estimula la producció d'aspartat en presència de l'aspartat aminotransferasa o GOT1 (*Glutamic-oxaloacetic transaminasa 1*) (Birsoy et al., 2015). Per tant, la respiració cel·lular sustenta la proliferació cel·lular jugant un paper clau en la síntesis d'aspartat.

El manteniment de la raó NAD^+/NADH per acció del CI resulta essencial per induir una resposta adaptativa a condicions de manca d'oxigen. El mecanisme associat involucra la presència $\text{HIF1-}\alpha$ (*hipoxia-inducible factor 1-alpha*), factor de transcripció que efectua una reprogramació del metabolisme cap a glicòlisi aeròbica mitjançant una resposta a múltiples nivells, entre ells, la sobre-expressió de gens glicolítics i la supressió de gens relacionats amb el TCA. El CI fomenta indirectament l'estabilització de $\text{HIF1-}\alpha$ a través del mecanisme de degradació associat. L'acumulació de NADH després d'inhibir el CI produeix canvis al·lostèrics en la α -cetoglutarat deshidrogenasa (α -KGDH), un enzim present en el TCA responsable de la producció final de succinat. Inhibint la seva activitat s'incrementa la raó α -KG/Succinat (Suc) i, com a conseqüència, s'activen les prolil-hidroxilases responsables de la degradació de $\text{HIF1-}\alpha$ i es prevé el creixement tumoral. Per tant, s'estableix una via de senyalització mitocondri-citosol que relaciona la funció mitocondrial i la progressió oncogènica a través del succinat i l'estabilitat de $\text{HIF1-}\alpha$ (Selak et al., 2005).

Altres estudis suggereixen que el CI té associada una activitat supressora tumoral. La disfunció del CI a causa de determinades mutacions en el mtDNA pot tenir conseqüències que afavoreixen el desenvolupament tumoral (Urrea et al., 2017). Per exemple, mutacions en *ND6* comporten disfunció del CI i sobre-producció de ROS, fenomen que dota de capacitat metastàtica a les cèl·lules tumorals i, específicament, reverteix després de l'aplicació d'antioxidants *scavengers* en models ratolins (Ishikawa et al., 2008). De la mateixa manera, cèl·lules canceroses amb mutacions en *ND4* i *ND6*, que cursen amb característiques fenotípiques moderades en quant a la davallada de la activitat del CI, promouen el creixement tumoral quan s'implanten en ratolins (Cruz-Bermúdez et al., 2015).

Estudis posteriors detallen que el tipus i grau de severitat en l'activitat del CI determina l'efecte final sobre el creixement tumoral. Mutacions homo-plàsmiques que cursen amb absència funcional del CI promouen la desestabilització de $\text{HIF1}\alpha$ per alteracions en la raó α -KG/Suc i en conseqüència, dificulten el creixement *in vivo*. D'altra banda, cèl·lules portadores de mutacions homo-plàsmiques amb afectació lleu fan possible el procés de fosforilació oxidativa i són capaces de mantenir taxes de proliferació equivalents a les cèl·lules convencionals (Iommarini et al., 2014). Per tant, una inhibició completa de l'activitat del CI per mutacions homo-plàsmiques severes en el mtDNA no genera ROS i limita l'adaptació a la hipòxia, efectes aparentment necessaris per donar lloc als efectes anti-tumorigènics.

Evidència bibliogràfica emergent indica que l'activitat CI té un impacte sobre el potencial metastàtic. La transducció estable de la NADH ubiquinona reductasa de llevat limita el

comportament metastàtic de cèl·lules tumorals mamàries *in vivo*. Contràriament, la regulació a la baixa de NDUFV1 estimula l'agressivitat d'aquestes, establint així una relació inversament proporcional entre agressivitat tumoral i activitat mitocondrial. El mecanisme subjacent involucra el control de l'equilibri redox NAD⁺/NADH per part del CI: la reducció en els nivells de NAD⁺ potencien l'agressivitat i progressió de les cèl·lules tumorals, i viceversa. Estudis mecanístics revelen que les metàstasis depenen de l'activitat de mTORC i l'autofàgia, les quals es troben regulades, al seu torn, per l'activitat del CI i la raó NAD⁺/NADH. Així doncs, els efectes anti-tumorals de l'expressió de ND1 reverteixen en presència de shRNA contra proteïnes involucrades en l'autofàgia (Santidrian et al., 2013). Estudis paral·lels indiquen que la capacitat invasiva de diverses línies cel·lulars de càncer de mama correlaciona negativament amb els nivells de NDUFA13, NDUFS3 i NDUF9 (Urrea et al., 2017).

La infra-expressió de les subunitats NDUFA13 i NDUFS3 en HeLa promouen la transició epiteli-mesènquima i, consegüentment, l'adquisició de propietats mesenquimals claus per a la progressió metastàtica (Urrea et al., 2017). El *knockdown* de NDUF9 en cèl·lules de mama altament metastàtiques genera alts nivells de ROS, pertorbacions en l'equilibri NAD⁺/NADH i una reducció del contingut mtDNA, fenòmens que s'acompanyen d'una major proliferació, migració i invasió. Com a mecanisme efector, l'estudi revela una major activació de la via Akt/mTOR/p70S6K, acompanyada de transició epiteli-mesènquima. S'observaren, com a tal, major expressió de marcadors mesenquimals (vimentina i fibronectina) i el seu regulador *upstream* SMAD3; així com la pèrdua del marcadors epitelial E-cadherina (Li L et al. 2015).

Malgrat els estudis anteriors, la bibliografia es contradictòria en els aspectes que vinculen el CI amb migració i invasió. Un article revela, tanmateix, que tant la sobrecàrrega com la disfunció parcial del mitocondri incrementen el potencial metastàtic per sobreproducció del radical superòxid. El mecanisme efector que promou les activitats migratòries, invasores, clonogèniques i metastàtiques de les cèl·lules tumorals inclou l'activació de Src i Pyk2 i reverteix amb l'aplicació de tractament antioxidant *scavenger* en models tumorals murins i humans (Porporato et al., 2014).

Tot i que aquesta tesis pretén estudiar els efectes de la desregulació del CI en càncer, val la pena mencionar un article recent que determina que la disfunció del CI en neurones dopaminèrgiques murines és responsable d'originar un fenotip parkinsonià (González-Rodríguez et al., 2021).

1.6. Reguladors del cicle cel·lular en el metabolisme

Les cèl·lules adapten el metabolisme d'acord als canvis fisiològics i les funcions cel·lulars. Com a norma general, la proliferació cel·lular i l'expansió clonal que són presents durant el desenvolupament o la regeneració tissular s'associen a una elevada demanda de fonts de carboni per tal de poder sintetitzar membranes, orgànuls i biomassa. En aquest sentit, les cèl·lules emprenen un metabolisme altament glicolític independentment de la presència d'oxigen per satisfer les demandes bioenergètiques de les cèl·lules proliferants. Aquest canvi metabòlic resulta un fenomen d'adaptació característic de les cèl·lules proliferants i multitud d'estudis que empren cèl·lules tumorals han identificat alguns dels mecanismes responsables (Fajas L 2013).

Múltiples estudis evidencien que els mecanismes responsables de determinades funcions cel·lulars inicien, simultàniament, una resposta metabòlica adaptativa. Dit d'una altra manera, existeixen vies de senyalització cel·lular que efectuen respostes metabòliques sota un mecanisme regulador comú. Concretament, els reguladors del cicle cel·lular, especialment l'eix *cdk4-pRB-E2F1*, són factors crucials que acoblen la proliferació i el metabolisme cel·lular. Aquestes proteïnes integren/sensen les senyals extracel·lulars i elaboren una resposta multidireccional coordinada per adaptar el metabolisme i sustentar la proliferació (Fajas et al., 2013).

Els membres de la família E2F regulen gens proliferatius i, més recentment, s'han involucrat en la regulació de gens del metabolisme. En condicions basals, E2F1 reprimeix l'expressió de gens clau en l'homeòstasi energètica i les funcions mitocondrials en el múscul esquelètic i teixit adipós marró. Els ratolins E2F1 KO exhibeixen un fenotip oxidatiu, amb un major nombre de mitocondris i un increment significatiu tant en el consum d'oxigen com en l'activitat d'enzims mitocondrials. L'electroporació d'E2F1 *in vivo* en ratolins E2F1 KO reduí l'activitat mitocondrial, revelant l'especificitat de les troballes. Entre las dianes analitzades per explicar els canvis de la funció mitocondrial es troben l'increment en l'expressió de gens que codifiquen per components de la cadena respiratòria mitocondrial, el cicle de Krebs, la regulació transcripcional (PGC-1 α , TFAM) i l'oxidació d'àcids grassos (Pdk4). El mecanisme que desencadena aquests canvis comprèn la interacció de Cdk4 i pRB. Sota circumstàncies de fred o dejú prolongat, els complexos dependents de Cdk4 fosforilen pRB i desencadenen l'alliberació del complex repressor pRB-E2F1 en el promotor d'aquests gens (Blanchet et al., 2011).

Els mecanismes responsables de la inhibició del cicle cel·lular regulen programes transcripcionals implicats en el metabolisme. Cooperativament, p130 i E2F4 reprimeixen l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme energètic i la biogènesis mitocondrial per induir l'estat de quiescència cel·lular, ja sigui en resposta a privació mitogènica, inhibició per contacte o inducció de p16. Curiosament, el factor de transcripció NRF1, responsable de l'expressió de gens involucrats en la funció mitocondrial, és un co-regulador de gens dependents d'E2F. Malgrat la unió a promotors sota condicions de transcripció gènica, NRF1 pot ser modulada per fosforilació i activar la transcripció (Cam et al., 2004).

Diferents estudis indiquen que E2F1 regula l'expressió d'altres gens implicats en el metabolisme de la glucosa, concretament, aquells relacionats amb la via glicolítica. Durant la transició G1/S, E2F1 promou l'expressió de la isoforma de tipus F de l'enzim denominat 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK/FBPasa), el qual és responsable de la síntesi de fructosa-2,6-bisfosfat, un potent estimulador de la glicòlisi (Darville et al., 1995). Un estudi posterior estudià els complexos presents en el promotor de PFK/FBPasa durant el cicle cel·lular: en cèl·lules quiescents, el complex p130-E2F4 constitueix la forma predominant present en el promotor de PFK/FBPasa mentre que, en cèl·lules estimulades a fase S, la composició del complex es veu modificada per la combinació p107-E2F1/4 (Fernández de Mattos et al., 2002). Paral·lelament, E2F1 estimula la via glicolítica a través de l'expressió de la piruvat deshidrogenasa quinasa (PDK). Tal i com el seu propi nom indica, és responsable de fosforilar l'enzim piruvat deshidrogenasa i, en conseqüència, inhibir l'entrada d'esquelets carbonats per a la seva oxidació mitocondrial (Hsieh et al., 2008). En tumors de pròstata, KDM4 s'associa amb E2F1 en els promotors gènics i coactiva eficientment la transcripció de gens metabòlics, entre els quals es troba PDK1 i PDK3. A través d'aquest mecanisme, les cèl·lules tumorals modulen el metabolisme des d'un metabolisme oxidatiu a un altre de tipus glicolític (Wang et al., 2016). Per tant, aquests factors regulen positivament els processos anabòlics i negativament les vies relacionades amb el catabolisme o oxidació.

Recentment, s'ha identificat que els complexos ciclines-cdk interactuen directament amb enzims glicolítics i modulen la seva activitat per fosforilació. Concretament, els hetero-dímers ciclinaD3-CDK6 inhibeixen l'activitat de PFK1 i PKM2, enzims que catalitzen reaccions irreversibles clau de la glicòlisi. Com a resultat, s'incrementa la fracció de PFK1 en la seva forma dimèrica (menys activa) i, d'igual manera, es prevé la formació de PKM2 en estat tetramètic (més actiu), alentint la glicòlisi. Conseqüentment, es re-direccionen els intermediaris glicolítics cap a vies de la serina i les pentoses fosfat amb efectes positius sobre la proliferació. Aquestes funcions explicarien el motiu pel qual la inhibició o deleció de CDK6

desencadena l'apoptosi de les cèl·lules de determinades leucèmies linfoblàstiques agudes derivades de cèl·lules T amb mutacions en RB i RBL1-RBL2 (Wang et al., 2017). Resumidament, els complexos ciclina-Cdk regulen directament el metabolisme durant la transició G1/S incrementant el flux glicolític per tal de proveir els precursors estructurals i l'energia necessària per coordinar el cicle cel·lular i el metabolisme (Huber et al., 2021).

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

2.1. Hipòtesi

Resultats previs del grup d'investigació on s'ha realitzat la tesi, obtinguts a partir d'un ChIP-on-chip i d'un microarray d'expressió en fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) WT i deficients en p27 (p27KO), mostraren canvis d'expressió en gens relacionats amb el metabolisme energètic. Les cèl·lules p27KO troben reduïda l'expressió de components de la cadena respiratòria mitocondrial (CRM), especialment de les subunitats del complex I (CI). A partir d'aquestes dades plantejem la següent hipòtesi de treball:

La proteïna p27 és un regulador de la respiració mitocondrial. Aquesta regulació es realitzaria principalment a través del control transcripcional de diferents components del complex I, però també d'altres complexos de la cadena respiratòria mitocondrial. Aquest control transcripcional es realitzaria a través del complex regulador p130/E2F4. També postulem que p27 regularia el metabolisme de la glucosa i, en conseqüència, la producció de lactat i piruvat, a través del control de la transcripció de diferents enzims glicolítics.

El fet documentat que la deficiència de p27 en molts tipus diferents de càncers està associat a un mal pronòstic ens fan proposar addicionalment una altra hipòtesi de treball:

La utilització de una combinació d'agents farmacològics que recuperin la funcionalitat de p27 en cèl·lules de càncer colorectal podria ser una eina terapèutica a utilitzar com a tractament contra aquest tipus de càncer.

2.2. Objectius

L'objectiu general d'aquesta tesi és validar aquestes hipòtesis de treball. Per tal de fer-ho, s'han establert els següents objectius:

1. Validar els resultats previs obtinguts en un *microarray* d'expressió realitzats en cèl·lules MEFs deficients en p27 vs. cèl·lules MEFs control. En aquest *microarray* s'observava que les cèl·lules p27KO tenien nivells més baixos de mRNA de diferents components del CI de la cadena respiratòria.
2. Analitzar si la pèrdua de p27 induïx també una disminució dels nivells de proteïna dels diferents components del CI.
3. Analitzar el paper de p130 en la regulació transcripcional de diferents subunitats del CI.

4. Analitzar el paper de p27 i p130 en la regulació transcripcional del genoma mitocondrial.
5. Analitzar el paper de p27, p130 i els complexos ciclina-Cdk en la regulació de la transcripció de gens implicats en el metabolisme de la glucosa.
6. Analitzar el paper de p27 en la producció de lactat i piruvat.
7. Realitzar assajos farmacològics emprant agents capaços d'estimular la funcionalitat de p27 com a tractament contra el càncer.

MATERIALS I

METODOLOGIA

3. MATERIALS I METODOLOGIA

3.1. Plasmidis

pVSV-G (Clontech): Vector que codifica per a una glicoproteïna G present en l'embolcall del virus de l'estomatitis vesicular (*vesicular stomatitis virus* o VSV). S'utilitza en la producció de vectors retrovirals pseudotipats perquè confereix major estabilitat a l'embolcall i incrementa el tropisme viral.

pCMVΔR8.91 (cedit pel Dr. Didier Trono): Vector que codifica per a gag, pol, rev i proteïnes accessòries/reguladores sota el control del promotor CMV. Aquests gens codifiquen components estructurals de les partícules lentivirals així com proteïnes implicades en la retrotranscripció i integració del genoma viral en la cèl·lula hoste.

MISSION® pLKO.1-puro (Sigma Aldrich): vector lentiviral que conté clonat la seqüència shRNA (*short hairpin RNA*) contra p27 (shp27) o cap gen conegut (shCtrl). La seva expressió es troba sota el control del promotor U6 humà dependent de RNA polimerasa III. Conté gens de resistència a puromicina i ampicil·lina per a la seva selecció en cultius mamífers i bacterians, respectivament.

pGL3-Promoter vector (Promega): vector que permet monitoritzar l'activitat transcripcional de factors *cis* o *trans* que regulen l'expressió gènica dins els assaigs luciferasa. La seva expressió es troba sota el control del promotor d'origen viral SV40, el qual activa constitutivament l'expressió del gen luciferasa.

3.2. Cultius cel·lulars

Models cel·lulars emprats durant el transcurs d'aquesta tesis:

MEFs WT: Línia cel·lular primària derivada de fibroblasts embrionaris de ratolí.

MEFs p27KO: Línia cel·lular primària derivada de fibroblasts embrionaris de ratolí *knock out* per a *Cdkn1b*.

MEFs p130KO: Línia cel·lular primària derivada de fibroblasts embrionaris de ratolí *knock out* per a *Rbl2*.

HEK293T: Línia cel·lular immortalitzada procedent de cèl·lules renals embrionàries humanes (*human embryonic kidney*)

C17.2: Línia cel·lular immortalitzada derivada de progenitors neurals multipotents de ratolí.

CaCo2: Línia cel·lular d'origen epitelial derivada del còlon d'un home adult amb un adenocarcinoma colorectal. En confluència expressen CRABP1 (*Cellular Retinoic Acid-Binding Protein I*) i CRABP2, marcadors de diferenciació enterocítica.

DLD1: Línia cel·lular derivada d'un adenocarcinoma colorectal.

HCT116: Línia cel·lular derivada del còlon d'un home adult amb un carcinoma colorectal. Presenta una mutació en el codó 13 del protooncogen RAS.

LIM1215: Línia de càncer colorectal derivada de metàstasis en oment.

LS174T: Línia cel·lular d'origen epitelial derivada d'una dona amb càncer colorectal en estadi B2 de Dukes, indicant que s'estén a la muscular pròpia i arriba a la serosa o a la grassa adjacent.

SW480: Línia cel·lular derivada del còlon d'un home adult amb un carcinoma colorectal. Presenta una mutació en el codó 12 del protooncogen RAS.

SW620: Línia cel·lular derivada d'un carcinoma colorectal en estadi C de Duke, indicant la presència de metàstasis ganglionars.

3.2.1. Condicions de cultiu

Les línies cel·lulars foren cultivades en medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biological Industries) suplementat amb sèrum boví fetal (FBS) (Biological Industries) al 10%, 2 mM L-glutamina (Merk), 1% aminoàcids no essencials (Biological Industries), 1 mM d'àcid pirúvic (Sigma) i antibiòtics (50 U/ml penicil·lina i 50 µg/ml estreptomicona), en condicions de temperatura i humitat òptimes (37°C; 5% CO₂).

La manipulació en sala de cultius cel·lulars es trobà subjecte a les directrius de funcionament i prevenció de risc biològics, amb tècniques de treball per al manteniment de l'asèpsia. En aquest sentit, s'abordaren els assaigs amb cultius cel·lulars sota campanes de flux laminar en condicions totalment estèrils. Rutinàriament, s'avaluà l'estat de confluència de les plaques de cultiu en actiu i s'inicià una presa de decisions amb els procediments adients pel subcultiu o la recollida de mostres.

3.2.2. Procediments habituals en sala de cultius

La transferència d'un grup reduït de cèl·lules a un nou contenidor proveït de medi fresc, el subcultiu cel·lular, suposà un procediment habitual en les sales de cultius cel·lulars. S'inicià amb l'aspiració del medi de cultiu per mitjà d'una pipeta de vidre i, tot seguit, amb la realització de dos rentats amb PBS (*Phosphate Buffered Saline*). S'afegí tripsina-EDTA1x (Gibco) en quantitats suficients per cobrir la placa, una peptidasa que hidrolitza els enllaços peptídics amb un màxim d'activitat a 37°C, durant un temps estàndard de 5 min per assegurar el deslligament de les cèl·lules. S'atura la tripsinització per inactivació enzimàtica amb medi de cultiu en relació 1:1 i es disgregaren les cèl·lules mitjançant pipeteig, assegurant la repartició equitativa en les noves plaques de cultiu. S'anotà, en qualsevol cas, el nombre de passes sobre la superfície de la placa de cultiu en expansió.

Per als assaigs d'immunoblot i anàlisis de l'expressió gènica, les cèl·lules es cultivaren a densitats equitatives en plaques de cultiu de 10 cm i foren recollides en condicions i temps concrets: cèl·lules en plaques no confluents (40-60% confluència), cèl·lules en placa confluent (90-100% confluència) i cèl·lules privades de sèrum en el cas d'experiments *time-course*. El procediment per a la recollida de material cel·lular fou similar al habitual per subcultivar les cèl·lules. Una vegada inactivada la tripsina, s'incorporaren les cèl·lules en tubs falcon i se centrifugaren a 2000 rpm durant 5 min mantenint una temperatura de 4°C. Es decantà el sobrenedant i es realitzaren dos rentats de PBS per tal d'eliminar restes de medi de cultiu i proteïna lliure. En aquest punt, s'afegí 1 mL de PBS i es repartí el material biològic a dos eppendorfs en relació 3:2 per als assaigs d'immunoblot i RT-qPCR, respectivament. Immediatament, les mostres foren centrifugades a 2000 rpm durant 5 min en fred, desproveïdes de la fracció no sedimentada (sobrenedant) i emmagatzemades a -80°C degudament retolades.

El protocol estàndard per a l'obtenció de lisats cel·lulars s'inicia després del procediment de recollida de material cel·lular. La lisi, procés pel qual es desestabilitza la membrana i s'allibera el material intracel·lular, es va dur a terme químicament amb detergents. Amb aquest objectiu, les cèl·lules foren tractades en tampó lisi (80mM Tris pH 8, 2% SDS) amb un còctel inhibidor de proteases o PIC (Roche) afegit *a priori*, en conjunció amb ortovanadat, PMSF i β -glicerol fosfat a una concentració final de 100 mM, 0,1 M i 1M, respectivament. Es van escalfar les mostres a 95°C durant 15 min en agitació i es van centrifugar 14.000 rpm durant 10 min a una temperatura de 4°C per tal de precipitar el material insoluble, DNA inclòs. Es recuperà el sobrenedant o fracció proteica i es procedí a determinar la concentració de proteïna present.

3.2.3. Sincronització dels cultius cel·lulars per privació sèrica

L'anàlisi del cicle cel·lular requereix de cultius cel·lulars relativament homogenis en diferents fases del cicle. Els fibroblasts embrionaris de ratolí representen un model biològic comunament emprat per estudiar els esdeveniments associats a la progressió del cicle cel·lular. Per dur a terme experiments durant el transcurs del cicle cel·lular es van sincronitzar les línies cel·lulars en G0 mitjançant privació de factors de creixement i inhibició per contacte. La re-estimulació del cicle per addició dels factors presents en el sèrum possibilita la obtenció de cèl·lules en G1 i fase S i, consegüentment, l'estudi dels esdeveniments intracel·lulars presents en aquestes fases així com els que tenen lloc durant la transició d'ambdues.

Cultivarem les cèl·lules en p150 mantenint l'estat proliferatiu fins a assolir la confluència (90-100%), punt en el que procedirem a la seva sincronització per privació sèrica durant un període de 72h. Després d'induir l'estat de quiescència cel·lular, es reincorporaren els factors tròfics per a oferir continuïtat al procés de divisió i obtenir poblacions relativament uniformes en aquestes fases inicials del cicle cel·lular. Així doncs, l'addició de FBS marcà l'inici del procés de recollida de les mostres a determinats temps: 0h, 12h i 24h després de l'entrada al cicle cel·lular.

3.2.4. Silenciament de l'expressió gènica: *knockdown* de p27

El silenciament gènic o *knockdown* fa referència al procediment experimental pel qual es redueix l'expressió gènica. La reducció de la proteïna diana s'aconsegueix per mitjà del tractament amb petits RNA llaç o shRNA (*small hairpin RNA*), una molècula de RNA artificial amb una estructura en forma de llaç que, per mitjà del sistema de RNA d'interferència (RNAi), reprimeix la traducció de forma dirigida. El principi molecular subjacent radica en què la cadena antisentit del shRNA s'associa al complex RISC (*RNA-induced silencing complex*) i dirigeix l'escissió del mRNA diana per complementarietat de bases. Per tant, el RNA interferent és un mecanisme regulador que condueix al silenciament post-transcripcional i es troba orquestrat per molècules de RNA de doble cadena que prevenen l'expressió de determinats gens.

En el nostre laboratori, l'expressió del shRNA es troba subjecte a l'administració de vectors plasmídics lentivirals pLKO.1 (Sigma Aldrich), els quals s'integren en el genoma de les cèl·lules diana per a una expressió transgènica estable. El protocol de transducció lentiviral involucra la utilització de cèl·lules HEK294T (Clontech) com a intermediàries per a la producció de les partícules lentivirals. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per una elevada eficiència de

transfecció en multitud de tècniques assolint, fins i tot, eficiències properes al 100% pel mètode de fosfat de calci. Seguint aquest procediment, es transfecten tres components per a la generació de les partícules víriques recombinants: el vector lentiviral pLKO.1-puro (que conté el shRNA), el vector d'empaquetament pCMVΔR8.91 (amb els gens lentivirals *gag*, *pol* i *rev*) i el vector pVSV-G per a la síntesis de l'embolcall del virus. Una vegada aïllades o purificades les partícules víriques, s'incorporen en els cultius cel·lular diana els quals se sotmeten a un tractament amb puromicina durant varis dies per a la selecció d'aquelles cèl·lules que incorporen correctament el vector recombinant shRNA.

Les instruccions per a la transfecció amb fosfat de calci en HEK293T i la transducció lentiviral en C17.2 es detallen a continuació:

- Transfectar 15 µg de pCMVΔR8.91, 5 µg de pVSVG i 10 µg de pLKO.1-puro (relació 3:1:2) en plaques de cultiu p100 HEK293T subconfluentes. Tenint en compte les conversions que ofereix el protocol CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Takara), es requereixen 87 µL de la solució de calci i 700 µL de HBS2x per a cada transfecció en p100,
- Incubar la solució de transfecció durant 10-15 min a temperatura ambient i afegir, gota a gota, al medi de les plaques de cultiu.
- Incubar les plaques de cultiu a 37°C durant 6-8h i canviar per medi fresc tot seguit. Iniciar el procés de transducció estable 48-72h després de la transfecció.
- Recollir les partícules víriques presents en el medi de cultiu passant-lo per un filtre Millex de 0,45 µm.
- Afegir el medi filtrat als cultius diana mantenint una proporció 1:1 amb el medi de cultiu fresc. Addicionar a una concentració final de 5 µg/mL el reactiu bromur d'hexadimetrina (Polybrene), un polímer catiònic que incrementa notòriament l'eficiència de la infecció lentiviral.
- Seleccionar les cèl·lules que incorporen els vectors pLKO.1 amb 2 µg/µl de puromicina (Sigma-Aldrich) 24h després de la infecció. Es realitzen un total de dos processos de selecció amb un tractament de 48h cadascun d'ells.

3.3. Extracció i quantificació d'àcids nucleics

3.3.1. Extracció de RNA

L'extracció de RNA es dugué a terme en campanes de flux laminar amb material estèril doblement autoclavat. Seguirem el protocol *High Pure RNA Isolation* per a cèl·lules en cultiu de la casa comercial Hoffmann-La Roche (Roche). Adaptarem les instruccions que ofereix amb el material intern del laboratori tal i com es mostra a continuació:

1. Suspendre les cèl·lules en 200 µL de PBS.
2. Afegir 400 µL del tampó de lisis i realitzar un vòrtex durant 15 s.
3. Transferir la mostra a una columna amb filtre (màxim 700 µL).
4. Centrifugar a 10.8000 rpm durant 15 s i descartar el material eluït en el tub col·lector.
5. Preparar per mostra 90 µL del buffer amb DNAsa i 10 µL DNAsa I en un mix, i pipetejar acuradament al reservori superior del filtre present en la columna. Incubar durant 15 min a temperatura ambient.
6. Afegir 500 µL tampó de rentat I, centrifugar durant 15 s a 10.800 rpm. Descartar el material eluït en el tub col·lector.
7. Afegir 500 µL tampó de rentat II i centrifugar durant 2 min a 13.400 rpm. Descartar el material eluït en el tub col·lector.
8. Centrifugar 1 min a 13.400 rpm per tal d'eliminar el tampó de rentat residual.
9. Afegir 30-50 µL d' H₂O estèril, acoblar un eppendorf i centrifugar durant 1 min a 10.800 rpm. El material eluït conté el RNA de interès, el qual pot ser tractat directament seguint el protocol de retroranscripció o emmagatzemat a -80°C.

3.3.2. Extracció de DNA

El kit *PureLink® Genomic DNA* permet una purificació eficient del DNA present en les cèl·lules mamíferes, incloent el DNA d'origen mitocondrial. El nostre laboratori utilitzà aquest procediment a la fi de poder dur a terme una quantificació relativa del número de còpies de mtDNA entre diferents condicions.

El sistema per a la purificació del DNA genòmic és similar al que s'utilitza per a la purificació de RNA. Després d'obtenir els lisats cel·lulars, es purifica el DNA per mitjà de centrifugacions seriadades en un procediment que utilitza columnes especialment dissenyades i membranes de sílice. Com qualsevol protocol de purificació de DNA, les mostres s'exposen a etanol i sals

caotrópiques per insolubilitzar el DNA, el qual és rentat d'impureses i eluït finalment en un tampó de baixa salinitat. Tanmateix, les proteïnes i els àcids ribonucleics són degradats, en aquest cas, per acció de Proteinasa K i RNAsa, respectivament. Les condicions de centrifugació, el volum dels reactius i el temps d'incubació per a cadascuna de les etapes se segueixen segons les indicacions que detalla el fabricant, però no es detallaran degut a la semblança amb el protocol d'extracció de RNA.

3.3.3. Extracció de DNA plasmídic

El material de partida per a l'extracció de DNA plasmídic fou cultius bacterians després de ser crescuts durant 14-18h en incubadors d'agitació orbital a 37°C. El volum de cèl·lules es determina en funció del material de DNA necessari, essent 5mL suficients per a als experiments de clonatge i comprovació de colònies bacterianes; i 250 mL els requerits per als assaigs de transducció en cèl·lules mamíferes.

L'extracció de DNA plasmídic a petita escala (1-3 mL de cultius bacterians) es dugué a terme adaptant el protocol Mini-Prep de Sambrook (Green et al., 2016). Aquest assaig limita la contaminació de proteïnes i el DNA genòmic assegurant una qualitat del plasmidi acceptable per als clonatges. El protocol consta de les següents accions:

- Centrifugar 1,5 mL de cultiu cel·lular en tubs eppendorf a 14000 rpm durant 30 segons. Aspirar el sobrenedant i repetir el procés fins obtenir el pèl·let de 3 mL de cultiu bacterià.
- Re-suspendre el pèl·let en 100 µL solució 1. Agitar per inversió unes 20 vegades.
- Afegir 100 µL de la solució 2. Agitar per inversió unes 20 vegades.
- Afegir 100 µL de la solució 3. Agitar per inversió unes 20 vegades.
- Centrifugar la mostra a 14000 rpm durant 10 min. Aspirar el sobrenedant.
- Addicionar 600 µL etanol absolut fred i 100 µL acetat sòdic 3M.
- Precipitar el DNA reservant les mostres a -80°C durant 30 min.
- Centrifugar la mostra a 13000 rpm durant 20 min a 4°C. Decantar el sobrenedant.
- Rentar la mostra dues vegades amb 1 mL d'etanol al 70% aplicant centrífugues de 5 min a 4°C en cadascun dels rentats.
- Decantar l'etanol i invertir l'eppendorf sobre paper de cel·lulosa per eliminar les traces d'etanol. Deixar assecar completament la quantitat romanent i suspendre el material en 30-50 µL d'aigua lliure de nucleases.

El kit per a l'extracció de DNA plasmídic per a bacteries suspeses en 250 mL fou el *Plasmid DNA Purification* de Macherey-Nagel. Resumidament, es lisa el pèl·let bacterià per alliberar el contingut plasmídic i el material obtingut es carrega completament en una columna amb un filtre de polipropilè especialment dissenyat. Per acció gravitacional, el contingut arriba a una resina d'intercanvi aniònic de sílice, la qual captura específicament el DNA plasmídic mitjançant interaccions iòniques entre els grups funcionals positivament carregats presents i els grups fosfat del nucleòtids. Les proteïnes, el RNA i altres contaminants són rentats de la columna i el DNA és eluït neutralitzant les càrregues positives de la resina amb una pujada del pH a condicions alcalines. Els volums i temps d'incubació per a cadascuna de les etapes s'escolliren acuradament segons les indicacions del fabricant que es proporcionen a continuació:

- Diluir un cultiu bacterià de 5 mL en un volum de 250 mL de medi LB amb l'antibiòtic adient per garantir la propagació del plasmidi. Incubar en un agitador orbital a 37°C durant 12-16h a 300 rpm aproximadament.
- Obtenir el pèl·let bacterià mitjançant una centrifugació de 5000 x g durant 15 min a 4°C. Descartar el sobrenedant completament per decantació.
- Suspendre el pèl·let en 8 mL de tampó RES + RNAsa A mitjançant pipeteig i/o vòrtex.
- Afegir 8 mL de tampó LYS invertint, acuradament, el tub un total de 5 vegades. Important no realitzar un vòrtex per tal de no alliberar el DNA cromosòmic a la suspensió. Incubar a temperatura ambient durant 5 min.
- Equilibrar la columna NucleoBond® Xtra addicionat 12 mL de tampó EQU sobre la vora del filtre concèntricament i permetre que la suspensió passi completament per la columna per acció gravitacional.
- Incorporar 8 mL de la solució NEU a la suspensió i, immediatament, homogeneïtzar el lisat acuradament invertint el tub fins que la mostra resti incolora, assegurant-se que no restin traces blavoses.
- Suspendre la solució homogèniament invertint el tub 3 vegades i aplicar el lisat a la columna NucleoBond® Xtra prèviament equilibrada. Permetre que la suspensió passi completament per la columna per acció gravitacional.
- Efectuar el primer rentat aplicant 5 mL del tampó EQU sobre la columna NucleoBond® Xtra. Després de buidar-se per acció gravitacional, descartar el filtre present en la columna.
- Efectuar el segon rentat amb 8 mL de la solució WASH. Permetre que la suspensió passi completament per la columna per acció gravitacional.

- Eluir el plàsmid de la columna NucleoBond® Xtra en un falcon fent passar 5 mL del tampó ELU.
- Afegir 3,5 mL d'isopropanol a temperatura ambient i deixar reposar durant 2 min després de realitzar un vòrtex vigorós.
- Retirar l'èmbol d'una xeringa i acoblar el NucleoBond® Finalizer. Afegir la barreja a la xeringa i pressionar amb l'èmbol suaument per fer-la sortir gota a gota.
- Desacoblar temporalment el NucleoBond® Finalizer de la xeringa per retirar l'èmbol i afegir 2 mL d'etanol al 70% després de reincorporar novament el NucleoBond® Finalizer. Pressionar l'èmbol i descartar el fluid.
- Assecar el NucleoBond® Finalizer fent passar aire vigorosament pressionant l'èmbol al voltant de 6 vegades, acoblant i desacoblant reiteradament el NucleoBond® Finalizer en cadascuna de les ocasions.
- Emprar una xeringa de 1mL i afegir 400 µL de Tris per eluir el DNA plasmídic del NucleoBond® Finalizer gota a gota. Recuperar el material extret i passar-lo novament pel NucleoBond® Finalizer, eluint en el mateix eppendorf. A la fi de poder concentrar el material d'interès, es fa passar aire per forçar la sortida de l'elut.
- Determinar la concentració per espectroscòpia UV i confirmar la integritat del plàsmid per electroforesis en gel d'agarosa, si procedeix.

3.3.4. Extracció de DNA en gels d'agarosa

La clonació molecular es tracta d'un procés llarg amb múltiples etapes entre les quals es troba l'extracció de DNA en gels d'agarosa. Com el seu nom indica, aquest procediment es troba dissenyat per permetre la purificació de fragments de DNA presents en gels d'agarosa que, en el context de clonació molecular per digestió-l·ligació, permet l'aïllament de l'insert o DNA a clonar després del procés de digestió amb enzims de restricció.

El nostre laboratori emprà el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up de Macherey-Nagel per purificar els productes derivats de la digestió del DNA. Breument, el protocol s'inicià amb l'extracció de les porcions de gel a recuperar visualitzant els fragments de DNA presents sota llum UV. Després d'aplicar calor per dissoldre l'agarosa, les mostres reberen tractament químic amb sals caotrópiques per facilitar l'adherència a membranes de sílice. Tot seguit, s'eliminaren les contaminacions inherents per mitjà de rentats i s'elueix el DNA sota condicions de baixa salinitat i pH lleugerament alcalí. El volum i temps d'incubació per a cadascuna de les solucions s'estableix d'acord a les instruccions que proporciona el fabricant.

3.3.5. Anàlisi espectrofotomètric: quantificació en Nanodrop

Les tècniques espectrofotomètriques permeten quantificar i avaluar la puresa d'àcids nucleics continguts en una mostra biològica. L'instrument *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific) determina la concentració d'àcids nucleics amb l'equació de Beer-Lambert i calcula les raons d'absorbància A260:A280 nm i A260:A230 nm per mesurar el grau de puresa dels mateixos. El fonament d'aquestes proporcions radica en què la longitud d'ona absorbida pels àcids nucleics és de 260 nm i estableix una relació matemàtica, en forma de raó, amb la presència de proteïnes i compostos químics residuals, els quals presenten un longitud d'ona d'absorció de 280 i 230 nm, respectivament. Generalment, un índex de puresa A260:A280 al voltant de 1,8 és acceptat com a "pur" referent a DNA i 2 referenciat a RNA, mentre que el valor de A260:280 ha d'oscil·lar entre 1,8-2,2 per a qualsevol tipus d'àcid nucleic.

Metodològicament, és un procediment senzill que involucra, exclusivament, el pipeteig directe de 1 µL de mostra o solució blanc sobre la superfície de mesura òptica o pedestal, prèviament agitada. Inicialment, es realitza una mesura del solvent en el que es troba suspesa la mostra (solució blanc). A continuació, es procedeix a obtenir l'espectre i els valors de concentració de les mostres, netejant el pedestal entre mesures per evitar la contaminació creuada.

3.4. Clonació de vectors

La clonació molecular del DNA és una pràctica habitual de la biologia molecular per a la producció massiva de DNA recombinant. Breument, el procediment convencional consisteix en assemblar fragments de DNA en un vector genètic (plasmidi) i amplificar exponencialment el nombre de còpies en un organisme receptor. Específicament, la clonació per mitjà de lligació i digestió amb enzims de restricció és una variant que permet traslladar fragments de DNA bicentenaris entre plasmidis. En aquest cas, el fonament radica en la utilització d'enzims de restricció, responsables de delimitar i alliberar el fragment d'interès (insert) per escissió; i una reacció de lligació mitjançant la lligasa de DNA T4 amb l'objectiu de combinar l'insert i el nou vector.

3.4.1. Transformació bacteriana

En el laboratori, la denominada transformació bacteriana contempla el procediment pel qual s'internalitza DNA exogen o forà en bacteris així com la selecció de la població genèticament modificada. La transformació bacteriana per xoc tèrmic en cèl·lules competents segueix el següent protocol:

- Es descongelen els bacteris competents en gel, en el nostre cas, E.Coli soca DH5α
- Addicionar 0,5-1 µg de DNA plasmídic en 100 µL de bacteris competents. Incubar 30 min en gel.
- Sotmetre la mostra a un xoc tèrmic de 42°C durant 45 seg i, immediatament, dipositar-la en gel durant 2 min.
- Afegir 1 mL LB sense antibiòtic i incubar 1h a 37°C en agitació.
- Centrifugar la mostra a 6000 rpm durant 1 min i eliminar 900 µL del sobrenedant.
- Suspendre les cèl·lules en el medi romanent i sembrar en plaques LB-agar amb l'antibiòtic pertinent. El gen de resistència que incorpora el plasmidi determinarà l'antibiòtic de selecció.
- Incubar la placa a 37°C durant tota la nit per a la formació de colònies bacterianes resistents. És convenient reservar una placa control amb bacteris competents no transformats per tal d'analitzar l'estabilitat de l'antibiòtic en placa i la formació inespecífica de colònies.

3.4.2. Digestió amb enzims de restricció i lligació del vector

La digestió de vectors plasmídics amb enzims de restricció permet alliberar l'insert del vector donant i generar, al mateix temps, llocs de restricció adequats en el vector diana per a la clonació d'aquest. En el nostre cas, es va clonar l'insert present en el vector comercial pUC19 en el vector de luciferasa pGL3-promoter.

La digestió dels vectors plasmídics es realitza mitjançant incubació en una estufa a la temperatura òptima per a l'activitat dels enzims de restricció, i tenint en compte el temps necessari en funció tant de la quantitat de DNA a digerir com de les unitats d'enzim afegides. En el cas de les digestions amb dos enzims de restricció es van consultar, addicionalment, les condicions de doble digestió recomanades per la casa comercial. Així doncs, es digereixen 4 µg de plasmidi amb 10 unitats d'enzim (10 U/µL) en un volum final de 20 µL, en el qual s'incorpora el tampó adequat a una concentració 1x, durant 2 hores a 37°C.

La lligasa de DNA T4 catalitza la formació d'una unió fosfodièster entre els extrems juxtaposats 5'-fosfat i 3'-hidroxil de fragments de DNA bicatenaris amb extrems roms o cohesius complementaris. La lligació del plasmidi recombinant requereix de la purificació prèvia de l'insert i el plasmidi diana digerit. En aquest punt, es realitzant múltiples reaccions de lligació

amb proporcions variades d'insert: vector en un rang de 1:1 i 6:1. Finalment, se segueixen les condicions de lligació que es defineixen el protocol *T4 DNA Ligase* (Takara). La reacció s'incuba a 16°C tota una nit.

3.5. Anàlisi de l'expressió gènica

3.5.1. Retrotranscripció

Després d'aïllar i quantificar el RNA de les mostres, procedirem a la retrotranscripció o transcripció inversa del mateix, reacció per la qual se sintetitza una cadena de DNA complementari (cDNA) a partir del RNA motlle. Es va fer servir el protocol *High Capacity RNA-to cDNA Kit* d'Applied Biosystems per dur a terme la retrotranscripció d'acord a les condicions i instruccions que a continuació es presenten:

1. Emprar un 1 µg de RNA per 20 µL de reacció en tubs eppendorf de 0,2 mL. Reservar les mostres i els components del kit en gel per preservar la integritat del material.
2. Calcular el volum dels components necessaris per preparar el nombre de reaccions desitjades. Es requereixen quantitats de 10 µL per al 2x RT Buffer Mix, 1 µL de 20X RT Enzyme Mix i fins a 9 µL de la mostra de RNA emprant H₂O estèril en quantitats suficients.
3. Incubar la reacció en un termociclador a 37°C durant 60 min. Detenir la reacció escalfant a 95°C durant 5 min. Mantenir la temperatura a 4°C fins la recollida de les mostres (per mantenir les mostres a llarg termini s'aconsella congelar entre -25°C i -15°C).

3.5.2. RealTime-qPCR o qPCR a temps real

La PCR quantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction* per les seves sigles en anglès) o PCR a temps real és una tècnica de biologia molecular emprada per a l'anàlisi de l'expressió gènica en un gran nombre de disciplines. El material biològic de partida correspon al cDNA obtingut prèviament segons els protocols d'extracció de RNA i retrotranscripció, motiu pel qual es parla en realitat de RT (transcripció inversa, del terme anglosaxó *reverse transcription*)-qPCR. Es tracta d'una variant de la reacció en cadena de la polimerasa que amplifica i quantifica, simultàniament i de forma absoluta, el producte d'amplificació d'ADN en cada cicle. Donat que monitoritza les reaccions durant la fase d'amplificació de la corba PCR, matemàticament, es pot determinar la quantitat inicial del gen diana.

Els fonaments biològics detallats de la qPCR no són d'especial rellevància en aquesta tesi donat que és una tècnica d'ús comú. Breument, el termociclador on té lloc la reacció en cadena de la polimerasa fa incidir sobre la mostra una longitud d'ona determinada i detecta la fluorescència emesa pel fluorocrom excitat en qüestió. Aprofita les propietats fisicoquímiques dels àcids nucleics amb l'objectiu de, en presència de la DNA polimerasa i els reactius necessaris, amplificar el material flanquejat per cebadors o *primers* dissenyats per l'experimentador. En un assaig de RT-PCR amb SYBR Green, la quantitat de producte PCR (amplicó) obtinguda és monitoritzada en cada cicle aprofitant les característiques inherents d'aquest fluorocrom per unir-se específicament a seqüències/fragments de DNA de doble cadena (dsDNA). La senyal fluorescent obtinguda és directament proporcional a la quantitat de molècules amplicó generades i es coneix com a valor C_q el cicle en el que la intensitat de fluorescència produïda es troba per damunt del *background (threshold)*, és a dir, el punt a partir del qual es comencen a sintetitzar les cadenes naixents i té lloc pròpiament l'amplificació del material genètic (Wittwer et al., 1997)

Per dur a terme la RT-qPCR, utilitzarem el kit *Express SYBR GreenER qPCR Supermix* (Invitrogen™) com a mètode de detecció (*reporter*), el qual inclou la Platinum® Taq DNA polimerasa, el colorant fluorescent SYBR® GreenER™, $MgCl_2$, l'uracil DNA glicosilasa làbil al calor (UDG), dNTPs (amb dUTP en lloc de dTTP) i varis estabilitzadors. Metodològicament, es prepara una mix amb diferents quantitats de Supermix 2x, cebadors (10 μM) i H_2O estèril segons el nombre de reaccions; i es pipeteja 9 μL per pou on, immediatament després, s'afegeix 1 μL de mostra. S'addiciona un control amb tots els components de la reacció excepte cDNA (*No-template control*; NTC) per avaluar la presència de primer-dímers o contaminants. La micro-placa de 96 pous (Agilent Biosystems) ja treballada es col·loca en el termociclador Mx3005P (Stratagene) amb una pel·lícula adhesiva òptica correctament adherida. A continuació, s'inicia la qPCR amb el següent programa:

Nom del programa	Cicles	Temperatura	Temps (hh:mm:ss)
Pre-incubació	1	95°C	00:05:00
Desnaturalització	40	95°C	00:00:15
Amplificació	40	60°C	00:01:00
Corba de dissociació	1	95°C-55°C	00:01:05
Refredament	1	4°C	Indefinit

El tipus d'anàlisi emprat per a la obtenció i interpretació dels resultats és el mètode de quantificació relatiu denominat $2^{-\Delta\Delta CT}$. Com a tal, s'assumeixen eficiències d'amplificació

similars entre els gens diana i el control endogen (*housekeeping gene*). Els resultats es presenten com a canvis en el número de vegades en què s'expressa el gen diana normalitzat amb el control endogen i de forma relativa al calibrador o control experimental (igual a 1 per definició). En aquesta línia, anàlisis de l'expressió gènica per mitjà de RT-qPCR van ser corregits pels nivells d'expressió de *GAPDH* o *Actina* i expressats com a unitats relatives respecte al control experimental.

El principal desavantatge d'emprar SYBR Green com a mètode de detecció és la potencial obtenció de falsos positius per la presència de primer-dímers o productes inespecífics amb estructura secundària. En aquest sentit, els anàlisis de temperatura de fusió (T_m de l'anglès *melting temperature*) o corbes de dissociació (*melting curves*) permeten identificar la presència de primer-dímers i estudiar l'especificitat de la reacció. El principi biològic subjacent a la generació d'aquest tipus de representacions gràfiques es basa en la dissociació de les estructures nucleotídiques de doble cadena a la denominada T_m , temperatura a la qual les dsDNA se separen i resten seqüències monocatenàries (ssDNA, *single-stranded DNA*). El termociclador enregistra els canvis de fluorescència durant la rampa de temperatura creixent i ofereix una visió esquemàtica de la dinàmica de dissociació amb una fàcil comprensió, simulant la temperatura de dissociació en virtut dels pics formats. És important indicar que la presència de dos pics en una mateixa corba de dissociació no resulta diagnòstic inequívoc d'inespecificitat. La transició dsDNA-ssDNA pot tenir lloc en dues etapes segons la composició de la seqüència, on les regions més estables (riques en G/C) i menys coexisteixen en una configuració intermèdia fins a la dissociació completa del fragment. Per tant, utilitzarem l'electroforesi en gel d'agarosa per analitzar la presència de bandes inespecífiques.

Els cebadors es dissenyaren amb l'ajuda del software en línia Primer3 Input, on es van adoptar una sèrie de mesures per garantir l'eficiència i especificitat de les reaccions PCR. Així doncs, es limita la longitud del producte de PCR a un nombre inferior a 200 bp per minimitzar el biaix d'eficiència en l'amplificació, s'estudiaren les possibilitats de formació de primers-dímers i estructures secundàries amb les puntuacions obtingudes en els indicadors de complementarietat, es mantingué el percentatge en GC prop del 50% per evitar el fenomen de *mismatch stabilization* i mantenir compatibles la T_m entre *primers*; i es cuidaren els trams amb nucleòtids repetitius. Paral·lelament, es van dur a terme alineaments de seqüència per mitjà de Primer-BLAST en busca de regions homòlogues amb l'objectiu d'evitar l'amplificació colateral de gens inespecífics.

3.6. Manipulació i anàlisi de proteïnes

Tampó de càrrega 4x	60 mM Tris-HCl pH 6'8, 10% glicerol, 2% SDS, 0'5 mg/ml DTT i 0'1 mg/ml blau de bromofenol
Tampó electròlit	10 mM Tris-HCl pH 8'3, 0'1% SDS, 76'8 mM glicina
Tampó de transferència	25 mM Tris-HCl pH 8'3, 192 mM glicina, 20% etanol i 0'02% SDS
TBS-Tween (TBS-T)	20 mM Tris-HCl pH 7'5, 150 Mm NaCl i 0'1% Tween 20

3.6.1. Quantificació de proteïnes pel mètode Lowry

La quantificació de proteïna en extractes cel·lulars es realitzà mitjançant una variant del mètode de Lowry. D'igual manera, es tracta d'un procediment analític de caràcter espectrofotomètric basat en una reacció colorimètrica, on el canvi de color a la mostra es produeix de forma directament proporcional a la concentració de proteïna (Lowry et al., 1951; Peterson et al., 1977).

El denominat DC (*Detergent Compatible*) *protein assay* (Bio Rad) en microplaca requereix una combinació de diversos reactius per desencadenar la reacció colorimètrica: reactiu A i reactiu S en proporcions 1000:20, respectivament; i l'addició de 200 µl de reactiu B. Per a l'obtenció dels valors de concentració proteica en les mostres, breument, es quantifica la variació colorimètrica per determinació de la absorbància a una longitud d'ona específica ($\lambda = 750 \text{ nm}$) i s'utilitza una recta patró amb dilucions seriades de sèroalbúmina bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma) per a la interpolació dels resultats.

La recta de calibratge es va construir amb 7 punts que contenien entre 0,5 i 10 µg de BSA per duplicat. Les mostres, l'estàndard i el blanc van ser tractats amb els reactius del kit en les mateixes quantitats i la lectura de la absorbància es va dur a terme 15 min després de desencadenar la reacció colorimètrica.

3.6.2. Western Blot

El denominat Western Blot (WB) o immunoblot és una tècnica analítica àmpliament utilitzada en l'àmbit de la biologia cel·lular i molecular per a detectar proteïnes específiques en una mostra mitjançant anticossos dirigits contra la proteïna d'interès. Aquesta metodologia es troba dividida en etapes ben diferenciades: la separació de les proteïnes per la seva mida (electroforesis), la transferència a un suport estable (electrotransferència) i la determinació de les mateixes mitjançant anticossos específics (immunodetecció).

3.6.2.1. Electroforesis unidimensional de proteïnes

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) és un mètode emprat per a l'anàlisi, purificació i caracterització de proteïnes en homogenats cel·lulars complexes (Laemmli et al., 1970). Permet separar les proteïnes presents en una mostra en funció de la massa molecular quan es troben en condicions desnaturalitzants, aprofitant la capacitat migratòria diferencial d'aquestes quan són sotmeses a la influència d'un camp elèctric.

El dodecilsulfat sòdic és un tensioactiu aniònic que provoca la pèrdua d'estructura nativa en les proteïnes (desnaturalització) i les confereix càrrega negativa uniforme, de manera que, la relació càrrega-massa és constant i les proteïnes poden ser separades, consegüentment, segons la seva longitud o mida, exclusivament. L'aplicació d'un camp elèctric possibilita la migració de proteïnes negativament carregades al pol positiu (ànode) amb una velocitat de migració o desplaçament inversament proporcional al pes molecular. Finalment, l'estimació del pes molecular es realitza comparant la mobilitat electroforètica de proteïnes de pes molecular desconegut amb el de proteïnes de referència.

Físicament, les proteïnes es troben immerses en una matriu porosa d'acrilamida, una combinació inert de polímers que suporta la migració proteica. De fet, l'electroforesi amb un pH discontinu aconsegueix una millor definició de bandes per l'acció combinada de dos fases diferents: el gel d'empaquetament o concentrador (pH 6,8), el qual promou l'empaquetament o alineació de les proteïnes; i el gel separador o de resolució (pH 8,8), involucrat directament en la separació dels components de la mostra. El poder de resolució ve determinat de forma directament proporcional amb la concentració d'acrilamida, és a dir, els gels separadors amb un percentatge elevat d'acrilamida resulten òptims per a la distinció de proteïnes petites, i viceversa.

Després de lissar i determinar la concentració de proteïna, es prepararen tubs de microcentrífuga amb 40 µg de proteïna total sota condicions reductores i desnaturalitzants. Mantenint un volum final de 40 µL, s'afegeix tampó de càrrega 4x (el qual incorpora DTT i SDS) i, seguidament, s'escalfen les mostres a 95°C durant 5 min per acabar de desestabilitzar completament l'estructura tridimensional de les proteïnes. Es carregà el marcador de pes molecular i les mostres en el sistema d'electroforesis degudament muntat, i s'inicia l'electroforesi a 35 mA durant aproximadament 60-90 min.

3.6.2.2. Electrotransferència

L' electrotransferència consisteix en transferir les proteïnes presents en el gel de poliacrilamida a un suport més adequat mantenint exacte el patró de migració electroforètica. Mitjançant un camp elèctric, les proteïnes migren i impacten sobre una membrana de nitrocel·lulosa (Bio-Rad), en aquest cas, on resten exposades i accessibles a la detecció per anticossos.

La transferència en medi humit és una de les opcions comunament emprades perquè possibilita el traspàs de proteïnes grans i eviten, alhora, els problemes derivats de l'asseccament de membrana que presenten altres mètodes més ràpids. Utilitza un muntatge en *sandwich*, on el gel i la membrana s'intercalen i fixen firmament entre esponges fines i paper Whatman, el qual se submergeix en un compartiment amb tampó de transferència on s'aplica el corrent elèctric. Les condicions d'electotransfèrència estàndard són 70V durant 90 min mantenint una temperatura de 4 °C, encara que es poden adequar depenent del rang de pes molecular de les proteïnes a immunodetectar. Així doncs, la transferència de proteïnes amb un pes molecular superior a 100 kDa precisen de transferències a baix voltatge durant tota la nit.

3.6.2.3. Immunodetecció

Les membranes de nitrocel·lulosa es van bloquejar amb llet en pols desgreixada al 5% durant 1 hora a temperatura ambient per tal de prevenir interaccions inespecífiques entre la membrana i l'anticòs emprat per a la detecció. Tot seguit, s'incuben amb anticossos primaris contra les proteïnes d'interès durant 1 hora. Després de rentar-les tres vegades amb PBS-Tween durant 10 min, les membranes es tracten amb anticossos secundaris anti-ratolí o anti-conill conjugats amb peroxidasa de rave dependent de la naturalesa de l'anticòs primari, entre 45-60 min. Després de tres rentats amb PBS-Tween durant 10 min, les membranes es tractaren amb un reactiu quimioluminiscent (*EZ-ECL, Chemiluminescence Detection Kit for horseradish peroxidase*, Biological Industries) i exposades a pel·lícules fotogràfiques (*Hyperfilm ECL*, Amserham) per a la visualització dels resultats.

3.7. Immunoprecipitació de cromatina

La immunoprecipitació de cromatina (ChIP) és una tècnica per estudis d'interaccions DNA-proteïna que combina el reconeixement i aïllament de proteïnes d'unió a la cromatina amb l'anàlisi de seqüències de DNA associades. S'empra principalment per identificar la composició i llocs d'unió de complexos proteics participants en la regulació de la expressió gènica amb

l'objectiu de poder definir, entre d'altres, els programes transcripcionals associats a un factor de transcripció. Tanmateix, la tècnica ChIP ofereix un ampli espectre de possibilitats d'estudi ja que permet analitzar les variants històniques així com la distribució i modificacions químiques de les mateixes al llarg del genoma o de forma locus específica.

En un experiment ChIP dirigit a proteïnes d'unió al DNA com histones o factors de transcripció, s'aconsegueix enriquir la mostra amb els fragments de DNA associats a la proteïna d'interès en un procés complex i durador. Breument, els fragments de cromatina són tractats de tal manera per conservar les interaccions específiques dels complexos DNA-proteïna. A continuació, s'extrau la cromatina i s'escindeix en fragments d'una longitud aproximada de 1000 pb per mitjà d'ultrasons (sonicació) o digestió enzimàtica. De manera específica, aquests fragments de cromatina s'immunoprecipiten emprant anticossos dirigits contra la proteïna d'interès. Després d'un procés exhaustiu de rentats, se separa el DNA i els components proteics associats (purificació de DNA). Per tant, el protocol ChIP es divideix convencionalment en 5 etapes: entrecreuament (*cross-linking*), sonicació, immunoprecipitació, reversió de l'entrecreuament (*decrosslinking*) i purificació del material genètic.

Amb l'objectiu de validar la unió de p27 a les regions definides en un ChIP-seq previ, acoblarem el DNA aïllat per ChIP amb la quantificació en paral·lel mitjançant qPCR (ChIP-qPCR). Es va utilitzar la línia cel·lular C17.2, model biològic d'origen murí derivat de neurones immortalitzades.

3.7.1. Fixació dels complexos DNA-proteïna (*cross-linking*)

Procedirem a fixar les interaccions DNA-proteïna de 6 plaques p150 de C17.2 confluents seguint el protocol que es detalla a continuació:

- Afegir la solució Cross-Link a les plaques de cultiu cel·lular en relació 1:10. Incubar en agitació suau durant 10 min a temperatura ambient.
- Afegir la solució Stop a les plaques de cultiu cel·lular en relació 1:10 tenint en compte els canvis volumètrics efectuats. Incubar en agitació suau durant 10 min a temperatura ambient.
- Rentar 2 vegades amb PBS estèril fred (Sigma) separant per decantació en el procés.
- Afegir 2 mL PBS estèril-PIC i suspendre les cèl·lules amb l'ajuda d'un raspador, en gel.
- Rentar 3 vegades per centrifugació, 3.000 rpm durant 5 min a 4°C, amb PBS estèril. Disgregar acuradament el sediment al finalitzar les centrifugacions i descartar el

sobrenedant en l'últim pas. El material cel·lular fixat pot ser emmagatzemat a -80°C en aquest punt, si procedeix.

3.7.2. Sonicació

- Suspendre el sediment en tampó ChIP de lisi d'acord al nombre de cèl·lules (100 µL per 1×10^6 cèl·lules). Incubar en agitació durant 30 min a 4°C.
- Rentar 3 vegades per centrifugació a 3.000 rpm durant 5 min a 4°C amb PBS estèril. Disgregar acuradament el sediment al finalitzar les centrifugacions i descartar el sobrenedant en l'últim pas.
- Incorporar PIC i SDS al 1% al tampó ChIP de sonicació. Addicionar 400 µL de solució per 1×10^6 cèl·lules lisades.
- Sonicar la mostra en Bioruptor® (Diagenode) indicant, en la unitat de control, cicles de 30 seg ON/ 30 seg OFF a elevada intensitat durant 10 min. El material fraccionat fixat pot ser emmagatzemat a -80°C durant un total de 3 mesos, si procedeix.
- Determinar la longitud dels fragments de cromatina mitjançant electroforesis en gel d'agarosa al 1%. Verificar la presència de fragments al voltant de 1000 pb.

3.7.3. Immunoprecipitació

Mesurarem la concentració de DNA amb l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) tal i com es detalla en l'apartat 3.3.5. A continuació:

- Incubar 250 µg de cromatina digerida amb 4 µg d'anticòs per cada reacció d'immunoprecipitació. Separar 25 µg de cromatina com a mostra *input* i una mostra addicional sense anticòs com a control del procés (*beads-only*).
- Incorporar 20 µL de partícules magnètiques Magna ChIP™ Protein A/G (Millipore). Incubar tota la nit en agitació a 4°C.
- Efectuar, en un agitador rotatori durant 1 min a 4°C, els rentats següents: 3 vegades amb tampó RIPA, 3 vegades amb tampó RIPA-NaCl (afegir 1M NaCl al tampó RIPA), 2 vegades amb tampó liti i 2 vegades amb tampó TE. En l'últim rentat passem les reaccions a eppendorfs amb taps de rosca.

3.7.4. Reversió de l'entrecreuament (decrosslinking) i purificació del DNA immunoprecipitat

Una vegada efectuat l'últim rentat del material immunoprecipitat, procedirem a seguir les instruccions adjuntes en el kit iPure (Diagenode) per a l'aïllament del DNA.

- Afegir 100 µL de la solució d'elució a cada condició fent un mix del tampó A i B. Tenir en compte que per a un volum de 120 µL es requereixen 115,4 µL de tampó A i tampó 4,6 µL de tampó B. En el cas de l'input, es recullen 10 µL i s'afegeixen 90 µL de la solució d'elució.
- Incubar la mostra i l'input durant 4 h (o bé tota una nit) en un termomixer programat a 65°C i 1000 rpm.
- Fer un spin del material i dipositar-ho en un *rack* magnètic. Passat 1 min, es transfereix el sobrenedant a un nou *ependorf* i es reserva en gel.
- Afegir 2 µL de *carrier* al input i cada IP. Fer un petit vòrtex i un spin seguidament.
- Afegir 100 µL d'isopropanol al input i cada mostra. Fer un petit vòrtex i un spin seguidament.
- Suspendre les partícules magnètiques del kit i transferir 15 µL al input i a les mostres.
- Incubar durant 1 h a temperatura ambient en un agitador rotatori (40 rpm).
- Fer un spin del material i dipositar-ho en un *rack* magnètic. Passat 1 min, es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 100 µL del tampó Wash I/*ependorf*. Suspendre les partícules magnètiques suaument amb pipeta i incubar 5 min a temperatura ambient en un agitador rotatori (40 rpm).
- Fer un spin del material i dipositar-ho en un *rack* magnètic. Passat 1 min, es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 100 µL del tampó Wash II/*ependorf*. Suspendre les partícules magnètiques suaument amb pipeta i incubar 5 min a temperatura ambient en un agitador rotatori (40 rpm).
- Fer un spin del material i dipositar-ho en un *rack* magnètic. Passat 1 min, es descarta el sobrenedant i s'afegeixen 25 µL del tampó C per *ependorf*. Suspendre les partícules magnètiques suaument amb pipeta i incubar 15 min a temperatura ambient en un agitador rotatori (40 rpm).
- Fer un spin del material i dipositar-ho en un *rack* magnètic. Passat 1 min, es transfereix el DNA eluït en un *ependorf* degudament retolat. El material pot ser processat per qPCR o ser emmagatzemat a -20°C o -80°C.

Tampó 5x	250 mM Hepes pH 8, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2.5mM EGTA
Solució Cross-Link	Buffer 5x, 1% formaldehid
Solució STOP	10 mM Tris pH 8, 1.5 M glicina
Tampó ChIP de lisi	10 mM Tris pH 8, 0.4% Tritó X-100, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM butirat sòdic, 20 mM β -glicerol fosfat, 0.1 mM Na_3VO_4
Tampó ChIP de sonicació	10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM butirat sòdic, 20 mM β -glicerol fosfat, 0.1 mM Na_3VO_4
Tampó RIPA	10 Mm Tris pH 8, 0.1 deoxicolat sòdic, 140 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 0.25 Mm EGTA, 10 mM butirat sòdic, 20 mM β -glicerol fosfat, 0.1 mM Na_3VO_4
Tampó Liti	10 mM Tris pH 8, 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% DOC, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM butirat sòdic, 0.1 mM Na_3VO_4
Tampó TE	10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA

3.8. Quantificació de l'activitat del complex I de la cadena respiratòria

Els assaigs funcionals del CI es dugueren a terme mitjançant el kit de determinació de l'activitat enzimàtica del CI amb tires reactives (Abcam). Similar a un assaig ELISA, combina l'immunoassaig i la detecció de l'antigen per mètodes colorimètrics acoblats. Així doncs, el kit es fonamenta en la captura del CI per mitjà d'anticossos i la posterior reacció redox que desencadena sobre el nitroblau de tetrazole (NBT), un compost químic oxidant que forma un precipitat blau-lilós quan es redueix.

Primerament, el CI és immunocapturat per anticossos monoclonals específics presents en la membrana de nitrocel·lulosa, la matriu que constitueix el cos central de la tira reactiva. A continuació, se submergeix en una solució que conté NADH (substrat natural de la reacció) i NBT com a acceptor d'electrons per desencadenar la reacció colorimètrica. El mecanisme catalític subjacent integra la oxidació del NADH per part del CI el qual, al seu torn, redueix el NBT per formar el precipitat acolorit.

El protocol es detalla a continuació:

- Recollir cèl·lules adherents segons l'apartat 3.2.2.
- Afegir 10 vegades el volum del pèl·let cel·lular amb tampó d'extracció. En cas d'excedir els 50 μL de volum, addicionar 500 μL de tampó d'extracció.
- Incubar en gel durant 20 min barrejant intermitentment.
- Centrifugar a 18000 x g durant 20 min a 4°C.
- Recollir el sobrenedant i quantificar la concentració de proteïna en la mostra. El rang de treball per als fibroblasts varia entre 1-30 μg .

- Diluir les mostres a un volum final de 25 µL amb el tampó d'extracció.
- Afegir 25 µL de mostra i 25 µL del tampó de bloqueig 2X a una microplaca.
- Incorporar acuradament una tira reactiva a la microplaca assegurant que arribi a la base de la mateixa.
- Permetre que la mostra penetri en la tira reactiva. El temps pot oscil·lar entre 15-45 min depenent de la viscositat de la mostra. En aquest punt, el CI queda retingut a una franja d'anticossos presents a aproximadament 7 mm de la part inferior de la tira reactiva.
- Addicionar 30 µL del tampó de rentat a pous independents de la mostra.
- Transferir la tira reactiva al pou amb tampó de rentat. Permetre que la solució penetri en la tira reactiva durant aproximadament 10 min.
- Afegir 300 µL del tampó d'activitat 1X a un pou buit de la microplaca per cada tira reactiva utilitzada.
- Retirar el coixinet absorbent present en la tira reactiva.
- Col·loca la tira reactiva al pou que conté el tampó d'activitat 1X. Permetre que la reacció tingui lloc durant 30-45 min. Exposar totes les mostres al mateix interval de temps ja que es tracta d'una reacció a punt final.
- Addicionar 300 µL d'aigua destil·lada a un pou buit de la microplaca per cada tira reactiva utilitzada.
- Transferir la tira reactiva al pou amb aigua destil·lada i deixar rentar durant 10 min.
- Retirar la tira reactiva i deixar-la assecar completament a temperatura ambient.
- Mesurar la intensitat de la senyal amb un lector de tires reactives o bé emprar sistemes d'imatge convencionals com per exemple un escàner.

3.9. Quantificació dels nivells de lactat i piruvat

Els nivells de lactat i piruvat en els cultius cel·lulars van ser determinats utilitzant els kit MAK064 o MAK071 (Abcam), respectivament. En aquests assaigs, la reacció enzimàtica de cada kit permet determinar la concentració del compost corresponent de forma precisa i específica. Concretament, la quantitat d'aquests metabòlits pot ser mesurada per espectrofotometria determinant l'absorbància a una λ = de 570 nm.

En primer lloc, les cèl·lules es van homogeneïtzar en 4 volums del tampó que proporciona cada kit i es van centrifugar durant 10 min a màxima velocitat per tal d'eliminar la fracció insoluble. En el cas de la determinació dels nivells de lactat extracel·lulars es va utilitzar directament

medi de cultiu. Tot seguit, es van concentrar les proteïnes de la mostra per ultrafiltració amb un punt de tall de 10 kDa alhora que s'elimina l'enzim lactat deshidrogenasa interferent. Es prepara la solució reactiva aplicant els volums descrits en el protocol, per duplicat, i es va procedir a la detecció colorimètrica de les mostres després de 30 min a temperatura ambient. En aquest moment, s'interpolen els valors de concentració obtinguts d'acord al model de regressió lineal descrit per la recta patró. Tenint en compte el volum de la reacció, el pes molecular i la concentració de proteïna es normalitzen les dades a la fi de poder comparar els nivells de lactat o piruvat entre mostres diferents.

3.10. Anàlisi del potencial de membrana mitocondrial

El marcatge d'òrgànuls cel·lulars específics i el seguiment de la seva distribució i funció resulta d'especial rellevància en el marc de les tècniques de microscòpia de fluorescència. El colorant MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) possibilita la detecció, monitorització i quantificació de la funció mitocondrial. De naturalesa lipòfila i catiònica, difon passivament a través de la membrana plasmàtica i queda retingut en la matriu de mitocòndries actives per la diferència de potencial transmembrana entre aquest compost i el potencial de membrana altament negatiu de les mitocòndries. Mitotracker® Red CMXRos presenta, específicament, una elevada sensibilitat als canvis de potencial de membrana en comparació amb altres tipus de fluorocroms mitocondrials, i resta associat al mitocondri després de ser fixat amb formaldehid, és a dir, una vegada el potencial de membrana s'ha perdut. Per tant, aquesta tinció pot ser acoblada amb immunofluorescència i, consegüentment, fer possible el marcatge d'altres components intracel·lulars de forma simultània.

D'acord a les recomanacions del protocol adjunt per a MitoTracker® Red CMXRos, el procediment inclou:

- Dissoldre el producte liofilitzat en dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma) a una concentració final de 1 mM, a partir de la qual es preparen les solucions de treball. Es reserva a una temperatura de -20°C fins a l'obtenció del material biològic necessari.
- Diluir la solució estoc a una concentració final entre 10-500 nM en un medi de cultiu lliure de sèrum per evitar l'exposició a oxidases potencialment presents.
- Fer créixer les cèl·lules a la confluència desitjada sobre cobreobjectes de 12 mm col·locats a la base de les plaques de cultiu p60. Afegir la solució amb Mitotracker® Red CMXRos i incubar durant 10 min. Reemplaçar per medi fresc sense fenol red i deixar en el incubador durant 1 hora.

- Recollir el cobreobjectes en plaques de 12 pous i rentar 2 vegades amb PBS. Aspirar el tampó en l'últim rentat.
- Fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 3,7% i PBS durant 15 min.
- Rentar 3 vegades amb PBS.
- Muntar el cobreobjectes sobre el portaobjectes amb 3 μ L de Mowiol. Deixar assecar a temperatura ambient ben protegit de la llum.

3.11. Quantificació del DNA mitocondrial: relació mtDNA/nDNA

Els protocols convencionals per a l'extracció de DNA genòmic permeten, al seu torn, l'aïllament del DNA d'origen mitocondrial. El kit PureLink® Genomic DNA permet una purificació eficient del DNA present en les cèl·lules mamíferes en quantitats suficients per poder dur a terme una quantificació relativa del nombre de còpies del mtDNA.

El contingut mitocondrial es determina per mitjà del quocient mtDNA/nDNA, servint-nos de cebadors dissenyats per a l'amplificació específica de fragments de DNA mitocondrials i nuclears particulars. Es va escollir Mt-rnr2 entre els gens del genoma mitocondrial murí que no són propensos a deleció i B2m per referenciar el DNA nuclear (Quiros et al., 2017). Així doncs, es dugué a terme una RT-qPCR per a l'amplificació dirigida d'ambdós gens en MEFs WT vs p130KO. Els resultats es normalitzaren amb els valors de C_t obtinguts per B2m i es relativitzaren respecte el control experimental, obtenint així dades que corresponen al nombre de molècules o còpies de mtDNA per molècules de nDNA.

3.12. Assaigs farmacològics

3.12.1. Corbes dosis-resposta: assaigs de citotoxicitat cel·lular

Les corbes dosis-resposta permeten avaluar l'efecte d'un fàrmac qualsevol independentment del seu mecanisme d'acció. La relació entre l'efecte i la dosis de fàrmac es representa tenint en compte la concentració de fàrmac en l'eix d'abscisses i la variable resposta o efecte en l'eix contigu i es defineix, la major part de vegades, per una equació matemàtica hiperbòlica. Com a qualsevol model matemàtic, les corbes dosis-resposta permeten predir l'efecte d'un fàrmac en qualsevol valor de concentració dins el rang de valors en el que s'hagi efectuat amb certa fiabilitat.

Diferents estudis indiquen que la sobreexpressió de p27 en tumors resulta suficient per induir l'aturada de cel·lular i la mort cel·lular (Toyoshima et al., 1994; Polyak et al., 1994;

Sheaff et al., 1997; Dijkers et al., 2000; Wu et al., 2006; Fujita et al., 2002; Chu et al., 2007; Deshmukh et al., 2022). En aquesta línia, el nostre laboratori va dissenyar una estratègia terapèutica basada en una combinació farmacològica múltiple per restituir els nivells nuclears de p27. Les corbes dosis-resposta representen la quimio-sensibilitat o citotoxicitat de 7 línies cel·lulars de càncer colorectal després de ser tractades amb antagonistes i/o inhibidors de vies de senyalització relacionades amb la pèrdua funcional de p27. Per dur-les a terme, es cultivaren 5000 cèl·lules per pou sota una bateria de dosis farmacològica creixent amb els valors de concentració 0, 0'001, 0'01, 0'1, 0'5, 0'75, 1, 10, 25 i 50 μ M, per triplicat. A les 48h, es va dur a terme un assaig de viabilitat cel·lular mitjançant WST-1 i es va determinar els efectes citotòxics en relació al valor control sense tractament, concretament, al valor que proporciona l'addició del solvent DMSO en aquestes cèl·lules en les mateixes quantitats.

Els paràmetres farmacodinàmics comunament emprats en les corbes dosis-resposta són la eficàcia i la potència, els quals fan referència a l'efecte màxim (límit de resposta) i la concentració necessària per assolir el 50% de l'efecte màxim, respectivament. En el cas d'assaigs farmacològics amb inhibidors i/o antagonistes, la potència s'avalua amb la denominada concentració inhibidora semimàxima o IC50, és a dir, la concentració a la qual s'aconsegueix el 50% de viabilitat/mortalitat cel·lular. La letalitat dels fàrmacs a dosis elevades és equivalent i és el motiu pel qual els resultats es normalitzaren per mitjà del mètode d'estandardització Min-Max. Aquest mètode d'estandarització permet traslladar les dades originals (absorbància) a un escala o interval de valors comprès entre 0 i 100 (percentatge de cèl·lules vives) mantenint la linearitat. A més, les representacions gràfiques milloren quan es contrasta l'efecte en base al logaritme de la concentració, a tal punt que les funcions en base logarítmica són l'estàndard gràfic per als assaigs farmacològics.

Definirem la IC50 de Dasatinib, Flavopiridol, SB225002, LY294002, Saracatinib en cèl·lules CaCo2, DLD1, HCT116, LIM1215, SW480 i SW620 sota condicions idèntiques per a permetre l'anàlisi comparatiu dels perfils farmacològics obtinguts. Posteriorment, es van seleccionar els agents més potents per dur a terme combinacions dos a dos i avaluar la presència de sinèrgia, fenomen pel qual la interacció conjunta de dos o més fàrmacs genera una citotoxicitat addicional a la suma dels efectes individualment.

3.12.2. Tractament dels cultius cel·lulars amb roscovitina

La roscovitina (seliciclib o CYC202) (Sigma Aldrich) és un inhibidor selectiu de les quinases dependents de ciclines CDK1, CDK2 i CDK5 amb IC50 de 0,65 μ M, 0,7 μ M i 0,16 μ M,

respectivament, en models *in vitro* lliure de cèl·lules. Es tracta d'un inhibidor competitiu reversible i, com a tal, impedeix la unió d'ATP al centre actiu de la quinasa.

Un estudi realitzat en cèl·lules mesangials mostra que la roscovitina redueix l'activitat de CDK2 en un 100% quan s'aplica a una concentració final de 20 μ M (Pippin et al., 1997). Per aquest motiu, vam incubar els cultius cel·lulars amb roscovitina a una concentració final de 20 μ M durant un total de 18 hores.

3.13. Bioinformàtica: anàlisis dels promotors gènics *in silico*

L'*Eukaryotic Promoter Database* (EPD) és un recurs *online* amb una col·lecció de promotors POL II validats experimentalment que es combina amb dades procedents d'experiments d'alt rendiment per, entre d'altres, analitzar la presència d'elements de resposta a factors de transcripció en aquestes regions.

Els factors de transcripció s'uneixen a seqüències específiques presents en el DNA per regular la transcripció gènica. Aquests dominis d'unió accepten petites variacions en la seva seqüència i és la raó per la qual les eines bioinformàtiques utilitzen una matriu de dades per a descriure la seqüència canònica o *consensus* d'un factor de transcripció. Així doncs, EPD alinea aquesta matriu de dades procedent de JASPAR la qual engloba els diferents dominis d'unió al DNA d'un factor de transcripció qualsevol, sobre la regió promotora del gen diana. D'aquesta manera, es crea un model predictiu o probabilístic dels potencials llocs d'unió putatius d'un factor de transcripció sobre la regió promotora d'un gen en el qual es pot modular, a més, la seva significació estadística. La interfície gràfica és altament intuïtiva i facilita molt l'anàlisi bioinformàtic per part de l'usuari.

De forma similar, l'eina bioinformàtica FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) permet escanejar la presència de motius d'unió a factors de transcripció amb múltiples opcions, ja siguin base de dades genòmiques o seqüències manualment introduïdes. Vam optar per utilitzar aquest recurs com a complement no exclouent dels resultats obtinguts en EPD, tot i que l'*output* que proporciona ofereix indicadors estadístics de p-valor i q-valor. Per una banda, ofereix informació de la probabilitat de què una seqüència aleatòria de la mateixa longitud que el motiu obtingui una puntuació de concordança similar (p-valor) i, d'altra, la probabilitat la taxa d'error de tipus I (falsos positius) quan es realitzen aquest tipus de comparacions múltiples.

3.14. Estadística

En primer lloc, s'obtingueren en cadascun dels grups d'estudi les mesures de dispersió i de tendència central habitualment emprades en estadística descriptiva. En tots els casos, els resultats finals es representaren amb la mitjana $\pm$ desviació estàndard del conjunt d'observacions. Aquest anàlisi descriptiu s'acompanyà de diagrames de caixa o *boxplot* per poder visualitzar intuïtivament la distribució i dispersió de les dades (resultats no es mostren).

A continuació, es dugueren a terme els tests estadístics pertinents a la fi de trobar diferències estadísticament significatives entre els grups d'estudi. La prova *T-Student* per a mostres independents permeté comparar les mitjanes de dos grups independents assumint una distribució normal i condicions d'homoscedasticitat en cadascun. Així doncs, es dugué a terme el *test de Shapiro-Wilk* i la prova de *Levene* per contrastar la normalitat i avaluar la igualtat de variàncies en el conjunt de dades. La prova *T-Student* per a mostres independents proporciona un estadístic *t* que estima la diferència entre les mitjanes per al conjunt de valors comparats, en el nostre cas, cèl·lules WT vs KO. Seguidament, el contrast d'hipòtesis bilateral concedeix un nivell crític o p-valor per confrontar la validesa de la hipòtesis nul·la, el qual denota significació estadística quan adquireix un valor inferior a 0,05. D'aquesta manera, rebutgem la hipòtesis nul·la d'igualtat de mitjanes i concloem que existeix una diferència significativa entre els dos grups en quant a la variable continua d'estudi.

L'anàlisi de la variància (ANOVA) fou emprat en experiments amb més de dos grups experimentals o nivells, com en el cas dels experiments sincrònics al llarg del cicle cel·lular. De la mateixa manera que la prova *T-Student*, les condicions necessàries per executar aquest anàlisi estadístic paramètric són la independència de les observacions, la distribució normal de cadascun dels grups i una variància constant entre aquests (encara que es bastant robust a la manca d'homoscedasticitat en dissenys equilibrats, on existeix el mateix nombre d'observacions per grup). Un resultat significatiu implica que almenys dos de les mitjanes comparades són significativament diferents entre sí, però sense especificar quines concretament. En aquest cas, es dugueren a terme contrastos *Post-Hoc* per comparacions de mitjana múltiples dos a dos per a tots els subgrups. Les comparacions múltiples es troben subjectes a un increment en l'error de tipus I, és a dir, a l'aparició de falsos positius; i s'aplica el *Test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey*.

La representació gràfica de les corbes dosis-resposta i el càlcul de la IC50 fou executat mitjançant Graphpad Prism (Graphpad Software Inc., CA). En primer lloc, es distribuïren els

valors de concentració farmacològica al llarg de l'eix d'abscisses en escala logarítmica i els corresponents valors d'absorbància es normalitzaren d'acord al mètode d'estandarització Mín-Max per obtenir el percentatge de viabilitat cel·lular. S'aplicà un model de regressió no lineal en el que s'ajustà la pendent a partir de les dades (el denominat *log[inhibidor] vs. normalized response – Variable slope*) i s'obtingué el valor d'IC50. Obtinguérem, addicionalment, el coeficient de determinació o R^2 , és a dir, el percentatge o proporció de la variació en la resposta observada (viabilitat cel·lular) que pot ser atribuïda al model matemàtic de regressió.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. Anàlisi del paper de p27 en l'expressió de les subunitats del CI

4.1.1. Validació del *microarray* d'expressió en MEFS quiescents

En el nostre laboratori d'investigació s'han obtingut durant els últims anys resultats que permeten ampliar els programes transcripcionals regulats per p27 a múltiples activitats i contextos biològics. Dades procedents d'un *microarray* d'expressió realitzat en MEFS p27^{WT} vs. p27^{-/-} (p27KO) quiescents revelen que p27 regula l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme cel·lular (Figura 5). Un total de 18 gens implicats en la cadena respiratòria mitocondrial es troben infra-expressats en MEFS p27KO respecte al WT. Aquests codifiquen per a subunitats constituents dels diferents complexos que formen la cadena de transport d'electrons i altres proteïnes implicades en el procés de fosforilació oxidativa. Sorprenentment, p27 estaria potencialment regulant l'expressió d'un total de 7 subunitats del complex I: *Ndufa1*, *Ndufa8*, *Ndufa9*, *Ndufb4*, *Ndufb9*, *Ndufs3* i *Ndufs6*. Aquest fet tindria un efecte rellevant sobre el metabolisme cel·lular i, fins i tot, en la reprogramació metabòlica subjacent al procés de divisió cel·lular.

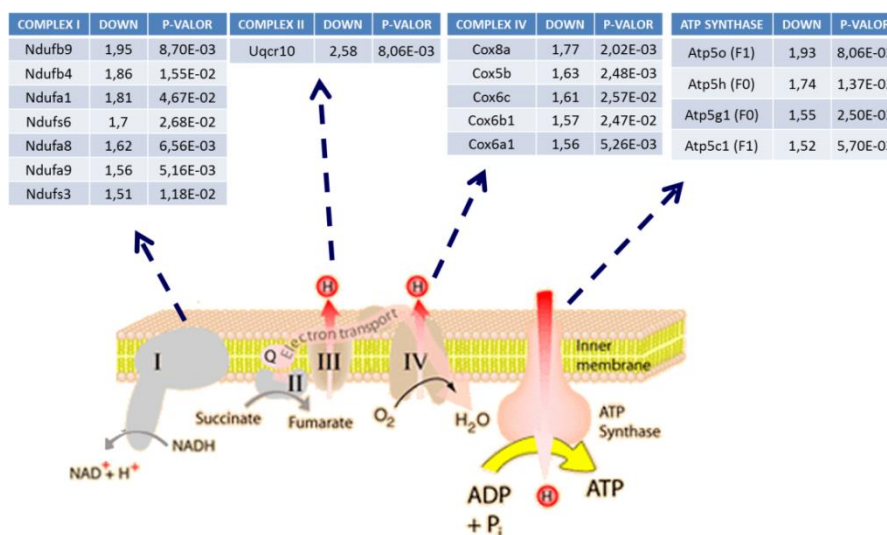


Figura 5. Gens pertanyents als complexos de la cadena respiratòria mitocondrial que es troben diferencialment expressats en MEFS p27KO quiescents segons resultats d'un "microarray" d'expressió previ. S'adjunta el número de vegades que es troben regulats a la baixa respecte al WT (DOWN) i la significació estadística associada (P-VALOR).

Hem volgut validar les troballes obtingudes en el *microarray* d'expressió analitzant els nivells de mRNA, mitjançant RT-qPCR, d'aquestes subunitats del CI regulades per p27. S'utilitzaren MEFS WT i p27KO com a model biològic i es dissenyaren *primers* específics per a l'amplificació

de *Ndufb9*, *Ndufb4*, *Ndufa1*, *Ndufs3* i *Ndufs6* després d'induir la sortida del cicle cel·lular. Metodològicament, es promogué l'estat de quiescència en les plaques de cultiu mitjançant inhibició per contacte i privació de factors de creixement durant un total de 72h. Es definí el control de sincronització cel·lular tenint en compte el patró d'expressió de components relacionats amb el control de l'entrada i progressió del cicle cel·lular.

Les corbes d'expressió de p27 i p21 durant el cicle cel·lular són antagòniques i els elevats nivells proteics de p27 resulten claus per definir l'estat de quiescència. És per això que l'estat en G₀ es comprovà utilitzant, com a marcadors, els nivells de p27 i p21 en relació a cèl·lules en creixement asincrònic. A la Figura 6, es poden observar els nivells proteics d'aquestes CKI en MEFs quiescents i proliferants: en MEFs WT es pot veure que els nivells de p27 incrementen dràsticament en estat de quiescència respecte les cèl·lules proliferants i els nivells de p21, pel contrari, es redueixen significativament. De forma similar, els MEFs p27KO quiescents exhibeixen una reducció en els nivells corresponents a p21 quan no es troben dins el programa de divisió.

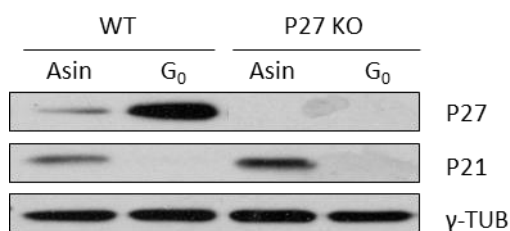


Figura 6. Sincronització dels cultius cel·lulars per privació sèrica i inhibició per contacte. Nivells de proteïnes relacionades amb el control de cicle cel·lular (p27 i p21) en MEFs asincròniques i quiescents WT i p27KO determinats mitjançant WB. S'utilitza γ-tubulina com a control de càrrega.

Els resultats de RT-qPCR indiquen que els MEFs p27KO quiescents presenten una disminució estadísticament significativa dels nivells de mRNA pertanyents a les subunitats *Ndufb9* i *Ndufs3*, amb valors de baixada de fins al 60% d'expressió relatius al WT. La resta de subunitats no mostraren canvis substancials en cèl·lules p27KO quiescents a excepció de *Ndufs6*. Els seus nivells d'expressió revelen una tendència inversa a l'observada i mostren 1,8 punts d'increment respecte al WT (Figura 7). En aquest punt, la línia d'investigació restringí els recursos i el material disponible a l'estudi de les subunitats *Ndufb9* i *Ndufs3* per tal d'oferir major consistència i productivitat al projecte d'investigació que, a partir d'un model biològic integrat, dona suport a la disfunció del CI per manca d'algun dels elements inherents. Dit d'una altra manera, la manca d'algunes de les subunitats del CI és suficient per irrompre la seva activitat òptima i promoure un estat de disfunció.

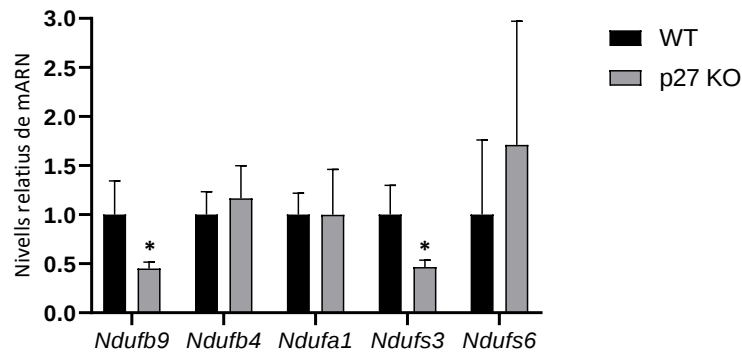


Figura 7. Nivells de mRNA determinats mitjançant RT-qPCR de *Ndufb9*, *Ndufb4*, *Ndufa1*, *Ndufs3* i *Ndufs6* en MEFs WT i p27KO en estat de quiescència. Es presenten les mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al WT i s'incorpora la desviació estàndard de 3 mostres independents (n=3).

4.1.2. p27 regula l'expressió de NDUF en quiescència

Els nivells de proteïna corresponen al producte final de l'expressió gènica i són fonamentals per definir la funció biològica. Així doncs, s'examinaren els nivells de NDUFB9 i NDUF3 en MEFs WT i p27KO quiescents per WB amb un total de 3 mostres biològiques independents per a cadascun del grups d'estudi. Es pretengué comprovar si les variacions que es produeixen en les subunitats del CI a nivell de mRNA tenen correspondència amb els nivells de proteïna.

Els resultats obtinguts per WB revelen una disminució dels nivells de proteïna corresponents a NDUFB9 i NDUF3 en MEFs p27KO respecte al control (Figura 8). Observem, doncs, una clara correspondència entre els nivells de mRNA i proteïna d'aquestes dues subunitats del CI. Això suggereix fortament la potencial implicació de p27 en la regulació de la expressió de NDUFs i, en conseqüència, amb el control del metabolisme oxidatiu.

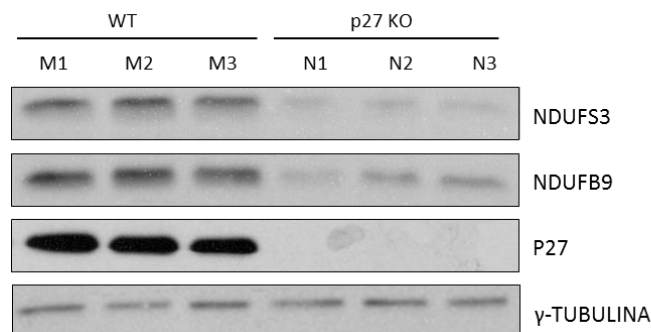


Figura 8. Implicació de p27 en el metabolisme oxidatiu en quiescència a través de la regulació de subunitats del CI. Determinació dels nivells de proteïna corresponents a NDUF3, NDUFB9 i p27 en MEFs WT i p27KO quiescents per WB. S'utilitzaren 3 mostres independents per a cadascun del grups d'estudi i γ-TUBULINA com a control de càrrega.

Amb l'objectiu de poder estudiar la relació entre els elements integrants de la resposta cel·lular analitzarem, en endavant, els nivells de proteïna i de mRNA per WB i RT-qPCR, respectivament. D'aquesta manera s'ofereix una visió més ampla i integrada de la mateixa alhora que no s'assumeixen les limitacions tècniques derivades d'utilitzar els nivells de transcrit com a predictors inequívocs de l'expressió proteica.

4.1.3. p27 regula l'expressió de *Ndufs* durant el cicle cel·lular

S'han realitzat estudis durant el transcurs del cicle cel·lular per analitzar el patró d'expressió de les subunitats del CI al llarg del mateix i examinar, paral·lelament, la dependència dels possibles canvis per p27. Partim del fet que els nivells proteics de p27 durant el cicle cel·lular presenten una corba d'expressió ben definida, caracteritzada per un decrement progressiu al llarg de la fase G1 amb un pic mínim durant la transició de la fase G1/S. Així doncs, s'utilitza aquesta davallada inherent dels nivells de p27 per estudiar el canvis d'expressió gènica subordinats, concretament, aquells relacionats amb els nivells de *Ndufs*. Amb aquest objectiu, hem analitzat els nivells de mRNA i proteïna de NDUF53 i NDUF9 a diferents temps del cicle cel·lular en MEFs WT mitjançant RT-qPCR i WB, respectivament. A més, hem dut a termes les mateixes determinacions en MEFs p27KO per poder analitzar l'especificitat dels resultats obtinguts. Dit d'una altra manera, la variabilitat en l'expressió de NDUFs podria ser atribuïble a factors independents i la incorporació de cèl·lules p27KO permet tenir en compte aquests efectes.

Metodològicament, després del protocol de sincronització cel·lular en G₀, es reincorporaren els factors de creixement a les cèl·lules quiescents per reprendre el procés de divisió cel·lular i, seguidament, es recolliren mostres a les 12h i 24h posteriors. S'avaluà la progressió del cicle cel·lular analitzant en aquests punts els nivells de les proteïnes p27 i PCNA, relacionades amb el control de la transició G1/S i la replicació del DNA, respectivament.

Les corbes d'expressió descrites per aquestes proteïnes es troben inversament relacionades al llarg de la progressió de G1 i els nivells de PCNA esdevenen màxims per evidenciar la seva implicació com a cofactor de la DNA polimerasa δ durant la fase de replicació genòmica. Tal com es pot observar a la Figura 9, els nivells de proteïna p27 disminueixen progressivament al llarg del cicle cel·lular en MEFs WT i, pel contrari, els nivells de PCNA incrementen notablement a les 24h, d'acord al patró d'expressió esperat. D'altra banda, en els cultius de cèl·lules p27KO es pot observar que, a les 0h, els nivells de PCNA són més alts que en els MEFs WT i que l'increment de PCNA durant el cicle cel·lular es més atenuat.

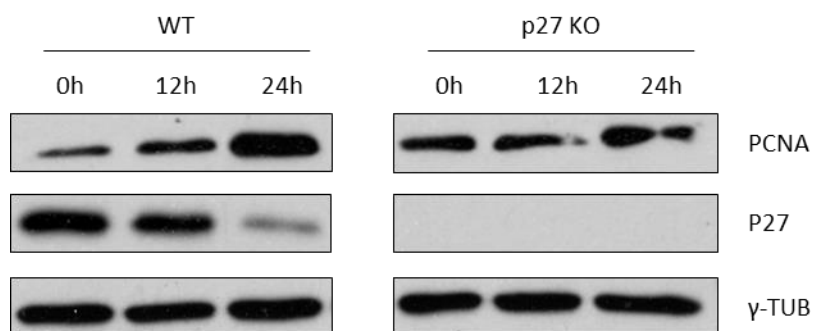


Figura 9. Sincronització de MEFs WT i p27KO en el cicle cel·lular amb determinació d'elements propis de la fase G1 i S mitjançant WB. Les cèl·lules foren privades de sèrum durant 72h i recollides a 0, 12 i 24h després de la seva sincronització i entrada en cicle cel·lular. Els nivells de les proteïnes P27 i PCNA foren determinats per WB als mateixos temps i s'utilitzà γ -TUBULINA com a control de càrrega.

A continuació, quantificarem en aquestes mostres els nivells de mRNA corresponents a *Ndufb9* i *Ndufs3*. Els resultats procedents de RT-qPCR revelen una disminució d'ambdues *Ndufs* a 12h i 24h en MEFs salvatges quan es compara amb el control experimental 0h. Els nivells de *Ndufs* decauen d'acord a l'evolució de p27 en el cicle cel·lular, especialment durant el transcurs de les primeres dotze hores. A més, els canvis de *Nduf* presents són dependents de p27 ja que la cinètica d'expressió d'aquestes en MEFs p27KO es manté pràcticament invariable i amb una magnitud inferior respecte les cèl·lules salvatges (Figura 10).

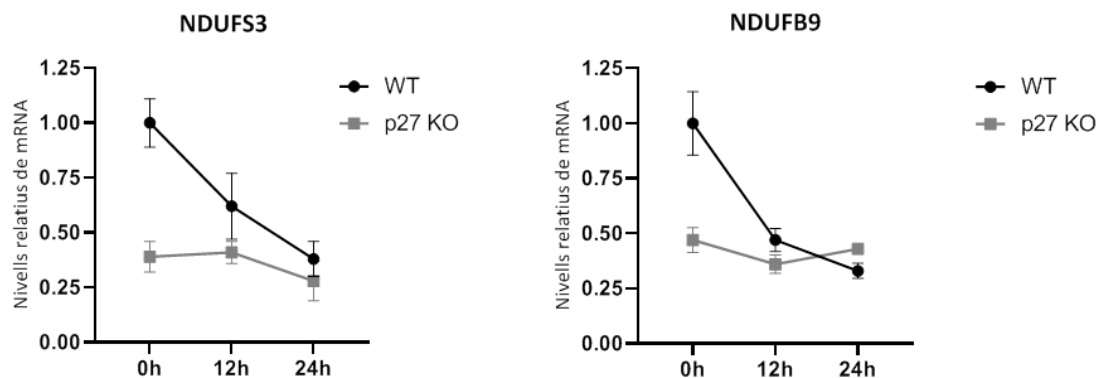


Figura 10. Nivells de mRNA de NDUFS3 i NDUFb9 durant el cicle cel·lular de MEFs WT i p27KO. Les cèl·lules foren privades de sèrum durant 72h i recollides a 0, 12 i 24h després de la seva sincronització i entrada en cicle cel·lular. Es presenten les mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al WT i s'incorpora la desviació estàndard de 2 mostres independents ($n=2$).

Hem estudiat també els nivells de NDUFS3 i NDUFb9 mitjançant WB després de 12 i 24 h d'iniciar la proliferació en MEFs WT i p27KO. A la Figura 11 es pot observar que les cèl·lules WT experimenten, en els punts de recollida obtinguts, una davallada d'ambdues NDUF a nivell de proteïna respecte 0h. De la mateixa manera que en el mRNA, la davallada de NDUFS3 i NDUFb9 que s'observa a les 12h en MEFs WT correlaciona amb la cinètica inherent de p27 al

llarg del cicle cel·lular. L'especificitat d'aquests resultats ve determinada per la invariabilitat que mostren els nivells de NDUF en MEFs p27KO.

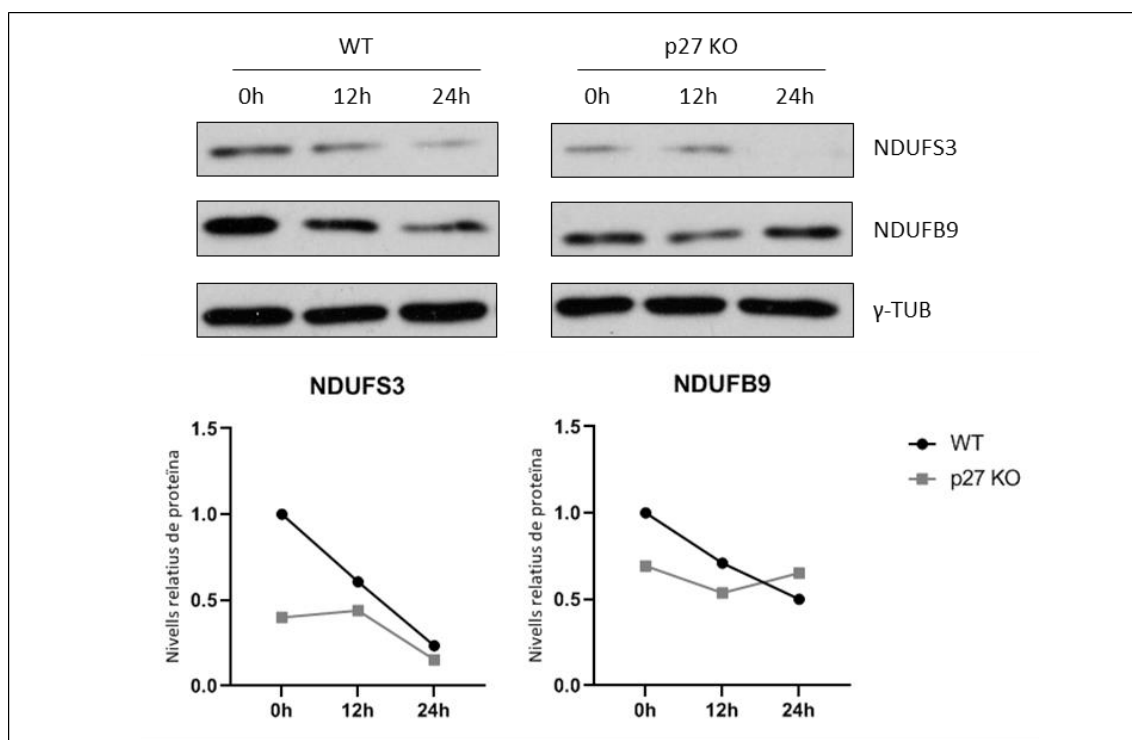


Figura 11. Nivells proteics de NDUF3, NDUF9 durant el cicle cel·lular de MEFs WT i p27KO. Les cèl·lules foren privades de sèrum durant 72h i recollides a 0, 12 i 24h després de la seva sincronització i entrada en el cicle cel·lular. Els nivells de proteïna foren determinats per WB als mateixos temps i es dué a terme una quantificació de bandes mitjançant Image J. S'utilitzà γ-TUBULINA com a control de càrrega pels assajos Western Blot i com a agent normalitzador per a les quantificacions computacionals.

4.1.4. p27 participa en l'expressió de *Ndufs* en cèl·lules asincròniques

Les plaques de cultiu cel·lular en creixement mantenen una població heterogènia quant a les proporcions relatives de cèl·lules en cadascuna de les fases en què es troba dividit el cicle cel·lular. Aquestes subpoblacions es troben en quantitats proporcionals a l'extensió temporal d'aquestes fases en el cicle vital de la cèl·lula. En aquest sentit, la població majoritària present en un cultiu cel·lular subconfluent de MEFs es localitza en G₁. És per això que els cultius cel·lulars asincrònics representen una aproximació ràpida i senzilla dels esdeveniments moleculars presents en fases inicials de cèl·lules que es divideixen activament. Aleshores, plantejarem la utilització de cèl·lules asincròniques com un complement dels resultats obtinguts en els experiments de sincronització cel·lular. Hem volgut, doncs, analitzar el paper de p27 en els nivells de *Ndufs* en cèl·lules que proliferen de manera asincrònica i, en conseqüència, es dugueren a terme RT-qPCR i WB per *Ndufs3* i *Ndufb9* en MEFs WT i p27 KO en aquestes condicions.

Tal com es pot observar a la Figura 12A, les cèl·lules p27KO exhibeixen quantitats inferiors del mRNA corresponent a *Ndufb9* i *Ndufs3* respecte les WT, amb una reducció de fins un 33% i 50%, respectivament. De manera similar, els nivells proteics de NDUFS3 i NDUFB9 a les cèl·lules p27KO són clarament inferiors als observats en les cèl·lules WT (Figura 12B).

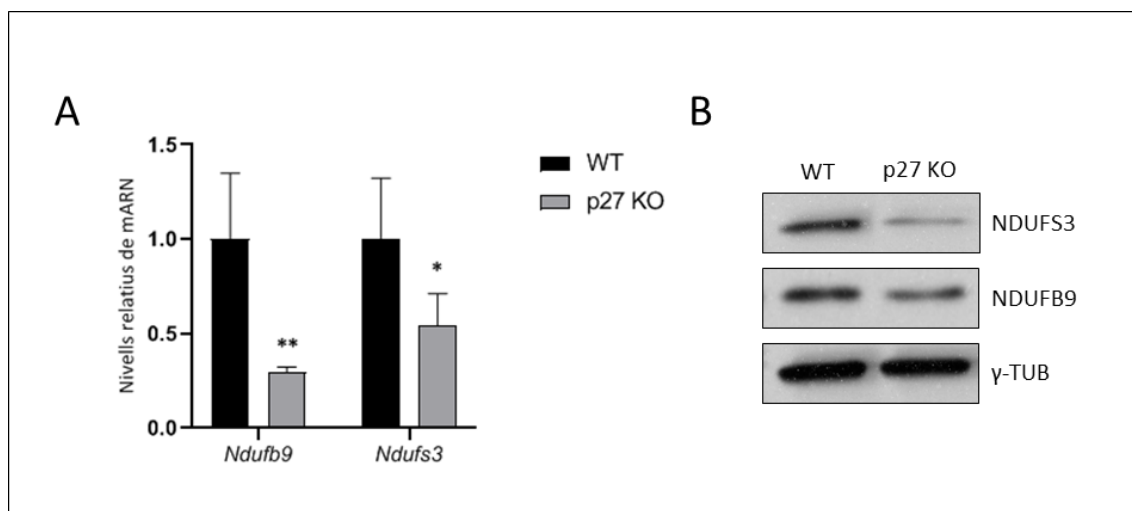


Figura 12. (A) Nivells relatius de mRNA pertanyents a *Ndufs3*, *Ndufb9* en cèl·lules WT vs p27KO asincròniques mitjançant RT-qPCR. Els resultats mostren mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al WT i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents ($n=3$). (B) Nivells relatius de proteïna pertanyents a NDUFS3, NDUFB9 i γ -TUBULINA en cèl·lules WT vs p27KO en condicions asincròniques mitjançant WB.

4.1.5. L'activitat del CI es troba regulada per p27

Tal i com s'ha presentat anteriorment, l'expressió d'algunes de les subunitats que constitueixen el CI de la CRM depèn de la funció de p27. Les nostres dades indiquen que els nivells de *Ndufb9* i *Ndufs3* es troben regulats, probablement, directa o indirectament per la funció de p27 com a regulador transcripcional. Per aquest motiu, estudiarem si la manca de les subunitats del CI presents en MEFs p27KO resulta suficient per reduir l'activitat del mateix quan es compara amb els WT.

Existeixen nombrosos abordatges per als estudis funcionals del CI. Optarem per un kit comercial d'abcam que ofereix un anàlisi quantitatiu ràpid i simple basat en tires reactives. Breument, el mètode combina la immunoprecipitació del CI en la tira reactiva amb un acceptor d'electrons anàleg per a detectar colorimètricament la reacció química subjacent. La intensitat del precipitat blau-lilós és proporcional a l'activitat del CI i es determina quantitativament per mitjà dels sistemes d'imatge habituals.

Els resultats revelen una disminució clara de l'activitat del CI en cèl·lules p27KO respecte les cèl·lules salvatges observant, a simple vista, la intensitat del precipitat blau-lilós. La quantificació de les tires per sistemes d'imatge convencionals determina una activitat inferior d'aproximadament el 25% en MEFs p27 absents en comparació amb els WT (Figura 13).

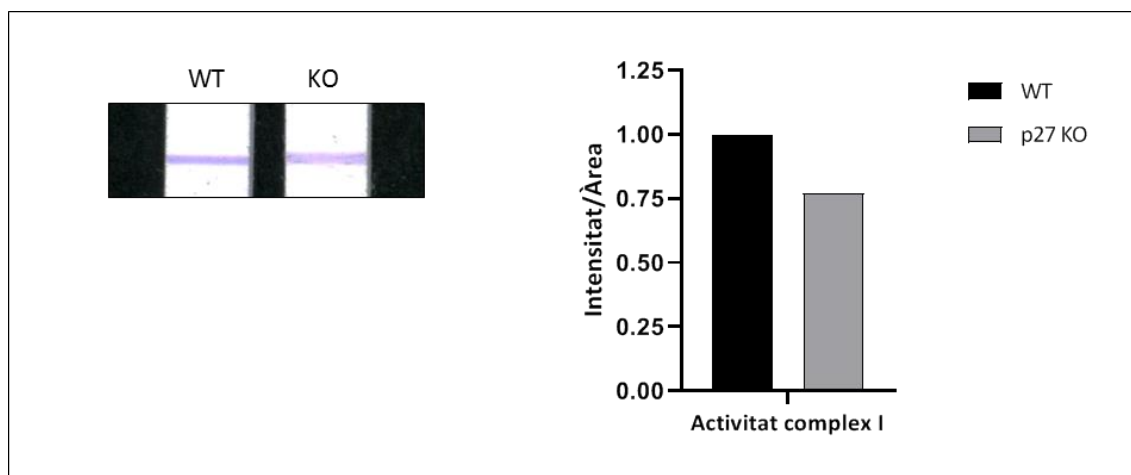


Figura 13. Quantificació de l'activitat del CI en MEFs WT i p27KO mitjançant el kit Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit. Les tires reactives foren escanejades i es determinà la intensitat de les bandes mitjançant ImageJ.

4.2. Anàlisi del paper de p130 en l'expressió de les subunitats del CI

4.2.1. p130 regula l'expressió de *Ndufs* en quiescència

L'activitat de p27 com a regulador transcripcional està funcionalment acoblada als programes transcripcionals dependents del complex p130/E2F4. Estudis anteriors en el grup d'investigació remarquen el paper de p130 com a component essencial per al reclutament de p27 en els promotors dels gens diana (Pippa R et al., 2012). Per tant, s'han plantejat abordatges experimentals emprant MEFs derivades de ratolins p130KO com a model d'estudi per a dilucidar els mecanismes moleculars subjacents a la regulació transcripcional de les subunitats del CI. Així doncs, hem utilitzat aquestes cèl·lules per analitzar el paper de p130/E2F4 en la regulació de la expressió dels gens *Ndufs3* i *Ndufb9*.

Amb l'objectiu de corroborar els resultats obtinguts fins ara en models biològics p27KO es determinaren els nivells de mRNA i proteïna de *Ndufs3* i *Ndufb9* en MEFs WT i p130KO quiescents mitjançant RT-qPCR i WB, respectivament.

Els resultats obtinguts revelen que, en cèl·lules quiescents, els nivells de mRNA pertanyents a *Ndufs3* i *Ndufb9* es troben disminuïts significativament en MEFs p130KO respecte al control (Figura 14).

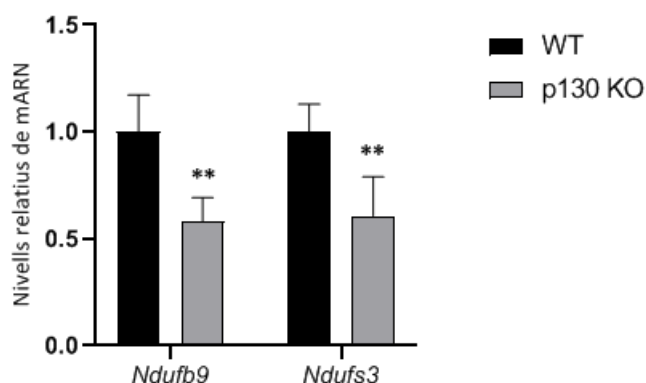


Figura 14. La proteïna p130 regula l'expressió de subunitats del complex I en quiescència. Expressió relativa dels nivells de mRNA corresponents a *Ndufs3* i *Ndufb9* en cèl·lules WT i p130KO quiescents detectats mitjançant RT-qPCR. S'utilitzaren un total de 3 rèpliques biològiques amb grups experimentals que integren fins a dues mostres independents en el cas de p130KO. Els resultats RT-qPCR mostren mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al WT i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents (n=3).

De manera similar, a la Figura 15 es pot observar que els nivells de proteïna de NDUF3 i NDUF9 també presenten una reducció significativa en les cèl·lules p130KO respecte les WT. S'empraren un total de dues mostres independents en el cas del grup p130KO per tal d'incrementar el poder estadístic associat i proporcionar, consegüentment, validesa i reproductibilitat als efectes que s'hi observen en estudis *in vitro* similars.

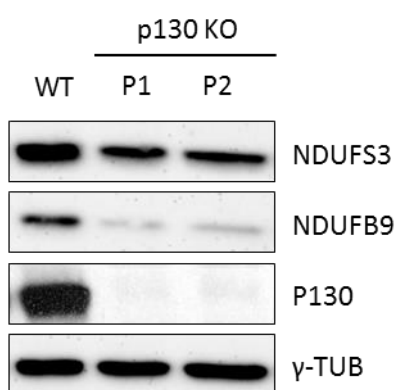


Figura 15. La proteïna p130 regula l'expressió de subunitats del complex I en quiescència. Nivells de proteïna corresponents a NDUF3 i NDUF9 en cèl·lules WT i p130KO quiescents detectats mitjançant WB. S'utilitzaren un total de 3 rèpliques biològiques amb grups experimentals que integren fins a dues mostres independents en el cas de p130KO, amb γ-TUBULINA com a control de càrrega i P130 per a la validació dels KO.

4.2.2. p130 regula l'expressió de Ndufs durant el cicle cel·lular

Hem realitzat estudis durant el transcurs del cicle cel·lular per analitzar el patró d'expressió de les subunitats del CI al llarg del mateix i examinar, paral·lelament, la dependència pel complex p130/E2F4. Així doncs, s'analitzaren els nivells proteics de NDUF53 i NDUFB9 en MEFs WT i p130KO després d'induir l'estat de quiescència i reinserir, seguidament, les cèl·lules al programa biològic de divisió. Amb aquest propòsit, es reincorporaren els factors de creixement per reprendre l'activació del cicle cel·lular i es recolliren mostres a les 12h i 24h per a cada una de les condicions d'estudi.

Novament, aquest tipus d'assaig es troba subjecte a una determinació prèvia dels nivells proteics corresponents a marcadors inherents a la progressió del cicle cel·lular. Així doncs, s'avaluà l'estat de sincronització cel·lular analitzant l'evolució temporal de les proteïnes p27 i PCNA de la mateixa manera que en experiments similars anteriors. Tal com es pot observar en la Figura 16, els nivells de PCNA incrementen progressivament al llarg de G1 alhora que els de p27 disminueixen, mantenint una correlació negativa que evidencia una progressió, a través del cicle cel·lular, equiparable entre MEFs WT i p130KO.

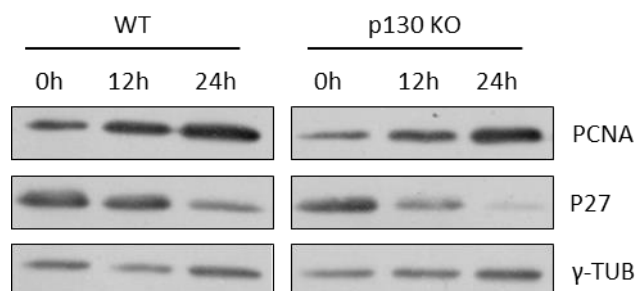


Figura 16. Nivells de proteïna corresponents a PCNA i p27 en MEFs WT i p130KO durant el cicle cel·lular. Les cèl·lules foren privades de sèrum durant 72h i recollides a 0, 12 i 24h després de la seva sincronització i entrada en el cicle cel·lular. Els nivells de proteïnes pròpies de la fase G1 i S (P27 i PCNA) foren determinats per WB als mateixos temps i s'utilitzà γ-TUBULINA com a control de càrrega.

Una vegada confirmada la sincronització de les cèl·lules, es van determinar els nivells de mRNA corresponents a *Ndufb9* i *Ndufs3* a 0, 12 i 24h mitjançant RT-qPCR. Tal com es pot observar a la Figura 17, els nivells de transcrit d'ambdues *Ndufs*, a temps 0 i 12h, són clarament inferiors a les cèl·lules p130KO respecte les cèl·lules WT. A temps mes avançats, es pot observar que a les cèl·lules WT i p130KO la quantitat de NDUFs roman més o menys constant.

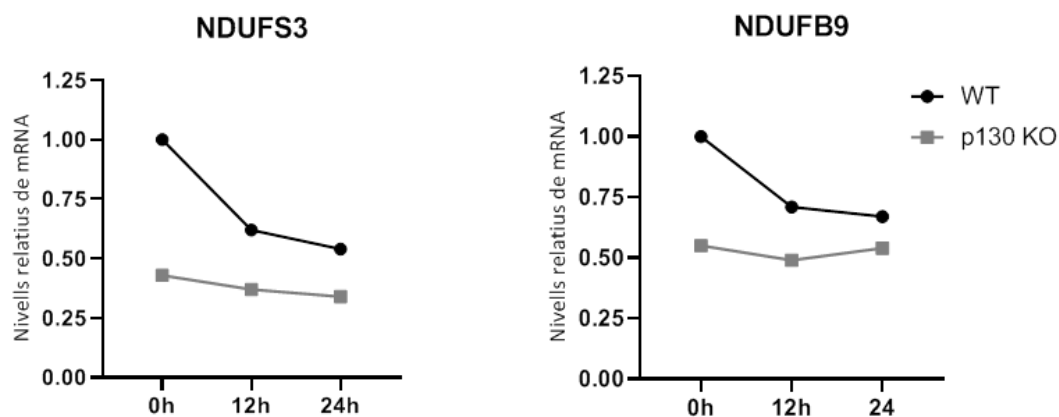


Figura 17. P130 regula l'expressió de subunitats del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial durant la progressió de la fase G1/S. Expressió relativa dels nivells de mRNA corresponents a *Ndufs3* i *Ndufb9* en cèl·lules WT i *p130KO* sincròniques detectades per mitjà de RT-qPCR. Les cèl·lules foren privades de sèrum durant 72h i recollides a 0, 12 i 24h després de la seva sincronització i entrada al cicle cel·lular.

L'anàlisi d'ambdues NDUF per WB revela que, a temps 0, les quantitats de proteïna presents en MEFs *p130KO* són notòriament inferiors a les que mostren les cèl·lules salvatges. La quantificació de les bandes per ImageJ mostra que els nivells d'ambdues subunitats en MEFs *p130KO* es troben reduïts a 12 i 24h respecte el control experimental. Tanmateix, pràcticament no s'observen diferències substancials en el pendent de la recta a partir de 12h, suggerint doncs certa insensibilitat de les NDUFs als fenòmens que es produeixen en aquest interval del cicle (Figura 18).

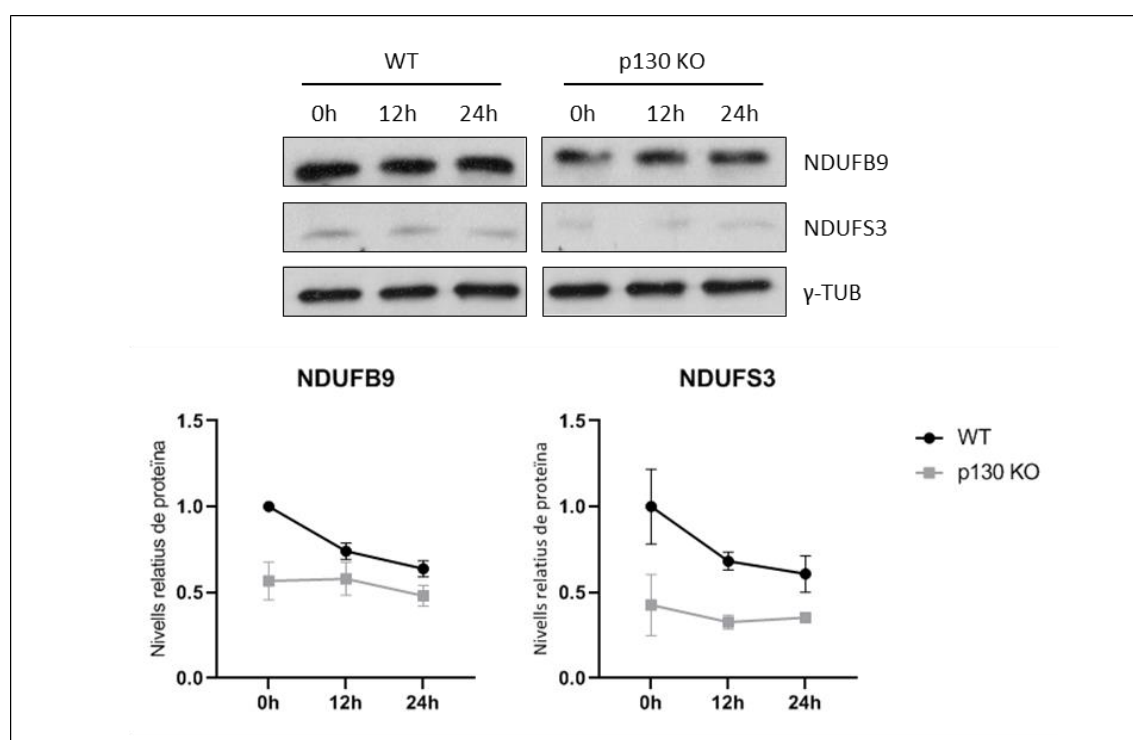


Figura 18. Nivells de proteïna NDUF3 i NDUF9 en MEFs WT i p130KO durant el cicle cel·lular. Les cèl·lules foren privades de sèrum durant 72h i recollides a 0, 12 i 24h després de la seva sincronització i entrada en cicle cel·lular. Els nivells de proteïnes foren determinats per WB als mateixos temps i s'utilitzà γ -TUBULINA com a control de càrrega. S'adjunta quantificació mitjana de les bandes per Image J d'un total de 3 mostres independents.

4.2.3. p130 participa en l'expressió de Ndufs en cèl·lules asincròniques

Hem determinat els nivells de Ndufs3 i Ndufb9 mitjançant experiments WB en MEFs WT vs p130 KO asincrònics. Els resultats són concordants amb els obtinguts prèviament en mostres biològiques amb ablació de p27. Així doncs, es pot observar que els nivells proteics de NDUF3 i NDUF9 són inferiors en cèl·lules mancades de p130 respecte el fenotip cel·lular salvatge (Figura 19).

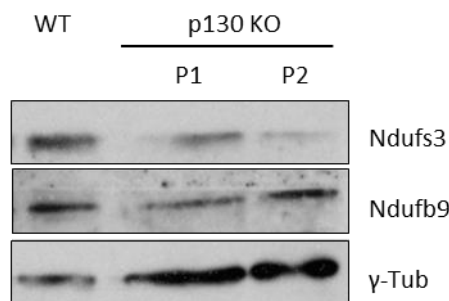


Figura 19. Nivells relatius de proteïna pertanyents a Ndufs3 i Ndufb9 en cèl·lules WT i p130KO asincròniques analitzats per WB. S'utilitzaren un total de 3 rèpliques biològiques amb grups experimentals constituïts per fins a dues mostres independents en el cas en p130 KO, amb γ -TUBULINA com a control de carga.

4.3. P27 y p130 regulen el metabolisme en altres models cel·lulars

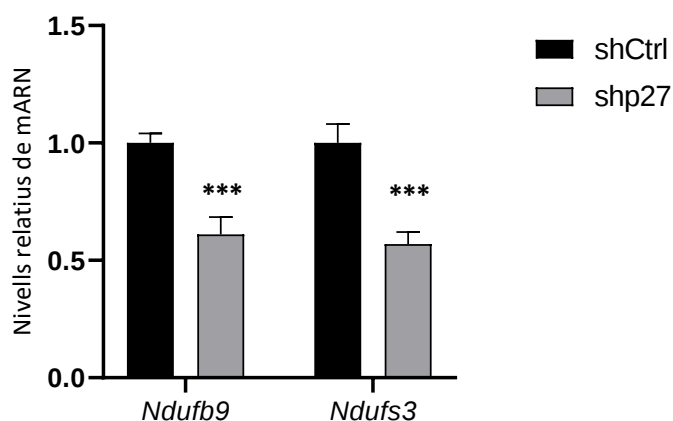
4.3.1. C17.2 com a model biològic murí

Els sistemes moleculars implicats en la regulació de processos biològics poden estar conservats entre diferents tipus cel·lulars. Els complexos ciclines-Cdk i la xarxa transcripcional Rb/E2F representen un exemple clar de mecanismes reguladors del cicle cel·lular altament conservats entre les cèl·lules eucariotes. S'evidencia cada cop més que aquests sistemes reguladors integren senyals del microambient extracel·lular i intracel·lular per oferir una resposta coordinada d'adaptació a diferents nivells. Així doncs, són molt nombroses les troballes que relacionen els elements centrals del cicle cel·lular amb múltiples aspectes del creixement i el metabolisme. En aquest sentit, vam voler estudiar si el mecanisme de control metabòlic associat a p27 es troba present en altres contextos biològics. Per aquest motiu, utilitzarem

arbitràriament una línia cel·lular de progenitors neurals multipotents d'origen murí (C17.2) i analitzarem si es recapitulaven les troballes descrites fins al moment.

Primerament, silenciarem l'expressió gènica de *CDKN1B* en cèl·lules C17.2 amb tecnologia RNA interferent. Amb aquest objectiu, introduïrem vectors plasmídics pLKO.1 amb shRNA específics contra p27 mitjançant transducció lentiviral i seleccionarem els inserts a través del gen de resistència a puromicina que incorporen. Tot seguit, estudiarem els canvis en els components del metabolisme quantificant l'expressió relativa de *Ndufb9* i *Ndufs3* per RT-qPCR i WB en comparació al control experimental.

Tal com es pot observar a la Figura 20, els valors d'expressió gènica obtinguts per RT-qPCR mostren una reducció dels nivells de mRNA d'ambdues *Ndufs* d'aproximadament un 40% en relació al control (shCtrl).



*Figura 20. Nivells de mRNA corresponents a *Ndufs3* i *Ndufb9* en C17.2 transduïdes amb vectors lentivirals shCtrl i shp27. Els resultats de RT-qPCR mostren mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al shCtrl i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents.*

Els anàlisis realitzats per WB mostren una disminució dels nivells proteics de NDUF3 i NDUF9 en cèl·lules tractades amb shp27 en comparació als nivells que revelen les cèl·lules manipulades amb el vector control (Figura 21). Per tant, els mecanismes que controlen l'expressió de gens pertanyents al CI es troben conservats i p27 participaria com a un dels elements de control.

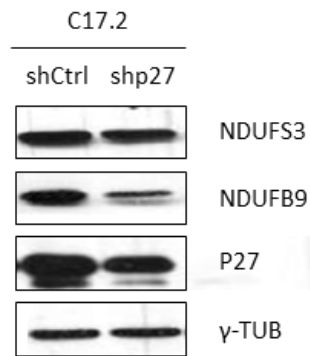


Figura 21. Nivells de les proteïnes NDUF3, NDUF9 i P27 detectats mitjançant WB en C17.2 transduïdes amb vectors lentivirals shCtrl i shp27. S'emptra γ -TUBULINA com a control de càrrega.

4.3.2. HCT116 com a model biològic humà

Focalitzant l'atenció en contextos fisiopatològics, la proliferació descontrolada és un fenomen inherent als processos neoplàsics i es troba subjecte a la desregulació dels sistemes de control del cicle cel·lular. Les alteracions metabòliques que hi acompanyen són essencials i ajuden a sostenir aquestes elevades taxes de proliferació. En nombroses ocasions, la desregulació dels elements reguladors del cicle cel·lular són responsables d'induir aquests canvis metabòlics i atorguen la plasticitat metabòlica que caracteritza les cèl·lules tumorals (Hannahan et al., 2011; Pavlova et al., 2016; Nakazawa et al., 2016)

És important recordar que els canvis fisiològics presents en cèl·lules tumorals són propis també de cèl·lules proliferants. El creixement de la cèl·lula requereix de la coordinació de processos metabòlics involucrats amb la síntesis de macromolècules. Així doncs, l'activitat del CI aminora alhora que es propicia l'aparició d'intermediaris glicolítics per afavorir les demandes biosintètiques associades a la proliferació. En aquest context, el nostre laboratori postulà que p27 podria estar involucrada en els canvis metabòlics associats a cèl·lules proliferants i/o tumorals. Concretament, les alteracions en els seus nivells podrien ser responsables, en part, de la reprogramació metabòlica subjacent al efecte Warburg o glicòlisi anaeròbica. Amb aquesta premissa, el projecte d'investigació incorporà cèl·lules tumorals en el calendari d'activitats i analitzà la presència dels mecanismes moleculars dependents de p27 que han estat esmentats anteriorment.

Arbitràriament se seleccionà la línia cel·lular de càncer colorectal HCT116 assumint el paper de p27 com a element fonamental en la maquinaria de divisió de qualsevol cèl·lula humana. A continuació, s'emptra la tecnologia CRISPR/Cas9 en aquestes cèl·lules com a eina d'edició genòmica dirigida per interrompre l'expressió gènica de p27 i analitzar el fenotip resultant.

Així doncs, es determinaren els nivells de proteïna corresponents a NDUF53 en les cèl·lules que incorporen el plasmidi CRISPR/Cas9 contra p27 (clons K) i es compararen amb els obtinguts en aquelles amb vector buit (clons C). Paral·lelament, es quantificà l'expressió gènica de NDUF9 en ambdues condicions seguint el mètode convencional dins el projecte d'investigació. Així doncs, vam analitzar els nivells de mRNA de Ndufb9 en les cèl·lules HCT116 amb ablació de *CDKN1B* vs control mitjançant RT-qPCR.

Tal i com es pot observar a la Figura 22, els nivells de NDUF9 a les cèl·lules sense p27 es troben disminuïts en gairebé un 50% en relació al control CRISPR.

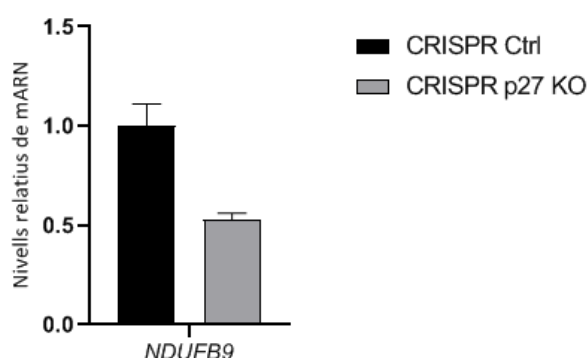


Figura 22. Expressió relativa dels nivells de mRNA corresponents a *Ndufb9* en clons HCT116 control i p27KO detectats mitjançant RT-qPCR. Els resultats, mostren mitjanes de *Ndufb9* expressades amb unitats arbitràries relatives al control i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents.

Quan es van analitzar els nivells de la proteïna NDUF53 en aquestes mostres, es va observar una reducció dels nivells proteics a les cèl·lules HCT116 tractades amb p27 CRISPR/Cas9 respecte el control (Figura 23). Per tant, les cèl·lules humanes conserven els mecanismes dependents de p27 descrits en ratolí que vinculen la progressió del cicle cel·lular i el metabolisme energètic.

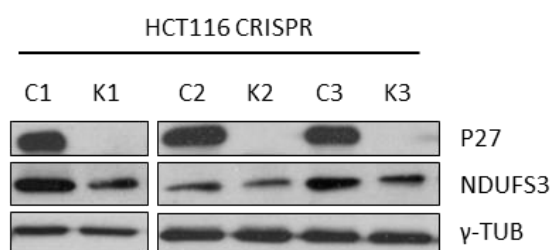


Figura 23. Expressió relativa dels nivells de proteïna NDUF53 i p27 en clons HCT116 control (clons C) i p27KO (clons K) detectats mitjançant WB. L'expressió de γ-TUBULINA s'utilitza com a control de càrrega. C: clons control; K: clons deficients en p27.

4.4. p27 s'uneix a la regió promotora de *Ndufs3*

La immunoprecipitació de cromatina (ChIP) és una tècnica per estudis d'interaccions DNA-proteïna que combina el reconeixement i aïllament de proteïnes d'unió a la cromatina amb l'anàlisi de seqüències de DNA associades. S'empra principalment per identificar la composició i els llocs d'unió de complexos proteics participants en la regulació de la expressió gènica amb l'objectiu de poder definir, entre d'altres, els programes transcripcionals associats a un factor de transcripció. Tanmateix, la tècnica ChIP ofereix un ampli espectre de possibilitats d'estudi ja que permet analitzar les variants histona així com la distribució i modificacions químiques de les mateixes en el genoma o de forma locus específica.

Dades procedents de ChIP-seq preliminars revelaren diversos llocs d'unió de p27 a la cromatina, els quals s'assignaren bioinformàticament com a potencials focus de regulació transcripcional respecte l'inici de transcripció (TSS) del gen més pròxim, independentment de la seva localització *upstream*, *inside* o *downstream*. Els resultats permeteren identificar dominis d'unió de p27 propers al gen *Ndufs3*, un dels quals es troba localitzat a 424 bp de distància respecte el TSS. Aquest lloc constitueix probablement un element regulador actiu en la transcripció d'aquest gen ja que es troba immediatament adjacent al promotor gènic.

Vam realitzar experiments ChIP/RT-qPCR en C17.2, per validar la unió de p27 a aquestes regions. Els resultats revelen un enriquiment significatiu de la regió promotora pel gen *Ndufs3* quan els complexos proteics associats al DNA són immunoprecipitats emprant anticossos contra p27 respecte un control sense anticòs (Figura 24). Els resultats revelen, per tant, que p27 endògena s'associa significativament a la regió promotora del *Ndufs3*.

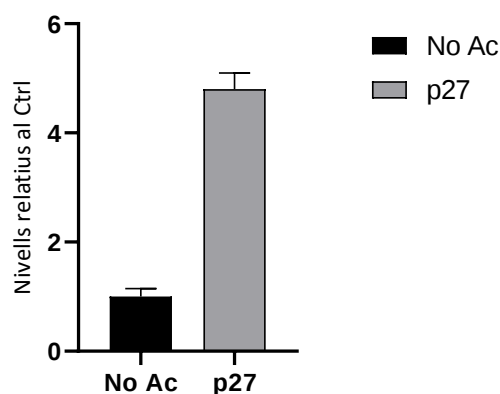


Figura 24. Enriquiment de cromatina obtingut mitjançant ChIP/RT-qPCR de la regió promotora de *Ndufs3* en cèl·lules C17.2. S'utilitzaren anticossos específics contra p27 aptes per ChIP i es dugué a terme un control sense anticòs.

Amb l'objectiu de dilucidar els mecanismes moleculars subjacents que intervenen en l'expressió d'algunes de les subunitats del complex I, es procedeix a clonar aquesta regió potencialment reguladora de Ndufs3 en vectors luciferasa pGL3. Així mateix, s'estudiarà si la seqüència d'unió de p27 descrita actua com a zona de regulació transcripcional per mitjà d'assajos luciferasa.

4.5. p27 i p130 intervenen en la replicació del genoma mitocondrial

4.5.1. p27 regula l'expressió de TFAM en cèl·lules quiescents

Les subunitats que constitueixen el CI de la cadena respiratòria mitocondrial presenten orígens de codificació nuclear i mitocondrial. L'assemblatge i consolidació final corresponent precisa d'una estreta i complexa comunicació en la inducció de gens entre ambdues estructures subcel·lulars. Per aquest motiu, la regulació transcripcional del gens que codifiquen pels components del CI exhibeix un mecanisme de control comú, essent presents elements biològics claus que actuen com a nexa en la comunicació nucli-mitocondri.

La proteïna TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) és un factor de transcripció mitocondrial clau en la replicació i transcripció del genoma present en el mitocondri. Constitueix l'element final en la cascada de senyalització molecular que intervé en l'expressió dels gens mitocondrials i esdevé essencial per a una resposta metabòlica integral. Amb l'objectiu d'estudiar el paper de p27 en la resposta metabòlica d'origen mitocondrial, s'analitza el paper de p27 en la regulació de l'expressió de TFAM en MEFs WT i p27KO quiescents mitjançant WB.

Els resultats obtinguts per WB indiquen que els nivells proteics de TFAM es mostren relativament inferiors en cèl·lules p27KO quiescents respecte al WT en un total de dues mostres biològiques independents (Figura 25).

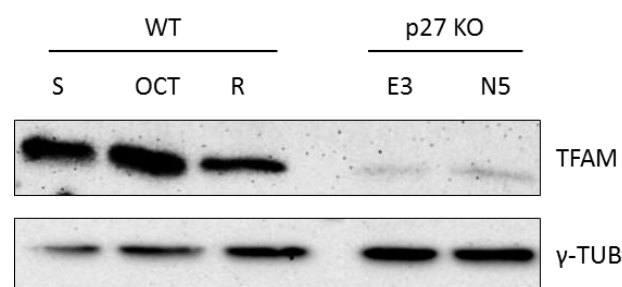


Figura 25. Nivells de proteïna pertanyents a TFAM en MEFs WT i p27 KO quiescents, amb γ -TUBULINA com a control de càrrega. S'utilitzaren un total de 3 rèpliques biològiques amb les mostres independents indicades en cadascun del grups d'estudi.

4.5.2. p130 regula l'expressió de TFAM en cèl·lules quiescents

Com s'ha esmentat en anteriors ocasions, durant els últims anys el nostre laboratori es troba analitzant els programes transcripcionals dependents de p27 en contextos biològics i fisiopatològics diferents. Sustentem un model de regulació transcripcional íntimament relacionat amb l'activitat de p130, per la qual cosa investigarem si les proteïnes implicades en l'expressió de gens mitocondrials també són dependents de p130. Amb aquest objectiu, s'analitzà el paper de p130 en la regulació de l'expressió de TFAM en MEFs WT i p130 KO quiescents emprant tècniques de RT-qPCR i WB.

Tal com es pot observar a la Figura 26, els resultats dels anàlisis amb RT-qPCR revelen una clara baixada dels transcrits de TFAM, al voltant d'un 80%, a les cèl·lules p130KO respecte al WT.

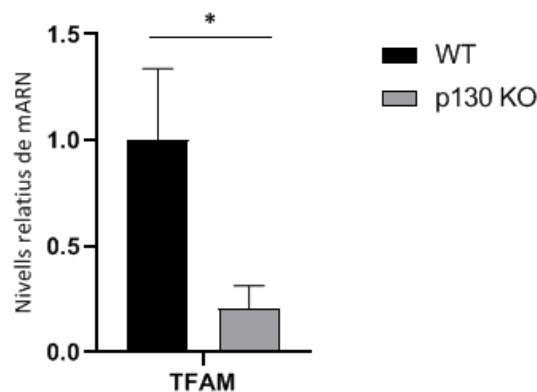


Figura 26. Nivells de mRNA corresponents a TFAM en MEFs WT i p130 KO detectats mitjançant RT-qPCR. S'utilitzaren un total de 3 rèpliques biològiques amb grups experimentals constituïts per fins a dues mostres independents en el cas de p130KO. Els resultats mostren mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al WT i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents.

De manera similar, la magnitud relativa dels nivells proteics de TFAM és inferior en MEFs mancades de p130 en comparació al fenotip cel·lular salvatge (Figura 27).

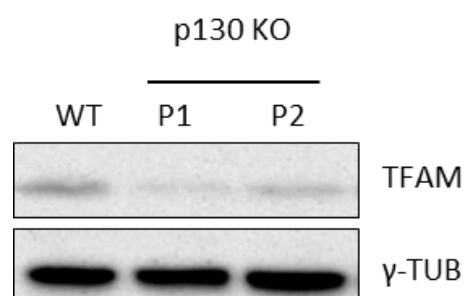


Figura 27. Nivells proteics de TFAM en MEFs WT i p130KO detectats mitjançant WB, amb γ -TUBULINA com a control de càrrega. S'utilitzaren un total de 3 rèpliques biològiques ($n=3$) amb grups experimentals constituïts per fins a dues mostres independents en el cas de p130KO.

4.5.3. p27 regula el nombre de còpies del mtDNA

Com s'ha fet referència en apartats anteriors, TFAM constitueix una proteïna essencial per la transcripció i replicació del genoma mitocondrial, és a dir, actua com a regulador clau en el nombre de còpies del DNA present en el mitocondri (Ekstrand MI, et al., 2014). Així doncs, es compararen el nombre de còpies del mtDNA determinant la ratio mtDNA/nDNA en MEFs WT i p130KO per mitjà de RT-qPCR, incorporant cebadors dirigits a l'amplificació específica dels genomes mitocondrial i nuclear. Per dur-lo a terme, se segueixen les instruccions dels protocols convencionals d'extracció de DNA i es dissenyaren cebadors per *Mt-rnr2* i *B2m*, gens del DNA mitocondrial i nuclear, respectivament.

El número de còpies del mtDNA en MEFs p130KO exhibeix un número relativament inferior al present en cèl·lules salvatges. En termes numèrics, el genoma mitocondrial adquirí una representació del 40% en comparació al detectat en cèl·lules control (Figura 28). Per tant, disposem d'indis primerencs de la implicació de p27 en el procés de biogènesis mitocondrial o síntesis mitocondrial de novo.

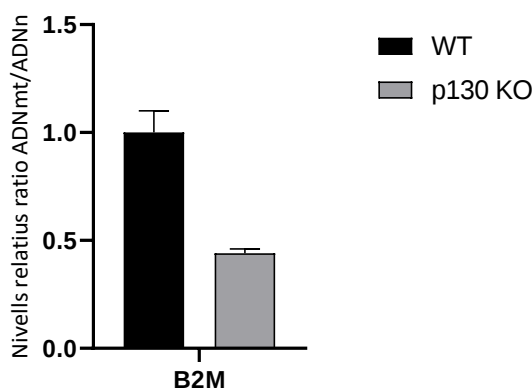


Figura 28. Quantificació del número de còpies del mtDNA en MEFs WT vs p130KO determinant el quocient mtDNA/nDNA per mitjà de RT-qPCR. S'utilitzaren cebadors per *Mt-rnr2* i *B2m* els quals amplificaren específicament el genoma mitocondrial i nuclear, respectivament. Els resultats RT-qPCR mostren mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al control.

4.6. Implicació de p27 en el metabolisme de la glucosa

4.6.1. p27 regula l'expressió de gens associats al metabolisme glucolític

Altres dades derivades del *microarray* d'expressió apunten que p27 podria estar implicada en el metabolisme de la glucosa. Els MEFs p27KO potencien l'expressió de *Pfk-p* i *Slc16a3*, gens relacionats amb la glicòlisis i l'exportació de lactat, respectivament (Figura 29). Així doncs, la davallada dels nivells de p27 al llarg del cicle cel·lular podria oferir resposta als canvis metabòlics que tenen lloc durant la seva progressió. En aquest sentit, les cèl·lules proliferants requereixen de substrats anabòlics i poder reductor per satisfer les demandes biosintètiques associades al procés de divisió. Concretament, precisen d'un metabolisme capaç de proveir àcids nucleics de forma robusta en el moment de propiciar la fase de replicació genòmica. Amb aquest propòsit, les cèl·lules incrementen la taxa glucolítica amb l'objectiu de desviar els seus substrats cap a vies de caràcter anabòlic com la via de les pentoses fosfat, proveïdora de nucleòtids i equivalents reductors. En conjunt, el nostre laboratori postula que la davallada dels nivells de p27 al llarg del cicle cel·lular podria constituir un mecanisme pel qual l'oxidació completa de la glucosa queda compromesa i es veuria afavorit un metabolisme més implicat en la divisió de la cèl·lula. Les cèl·lules proliferants limitarien, probablement, l'entrada de piruvat al mitocondri i promourien la seva conversió a lactat per sostenir cicles glucolítics continuats.

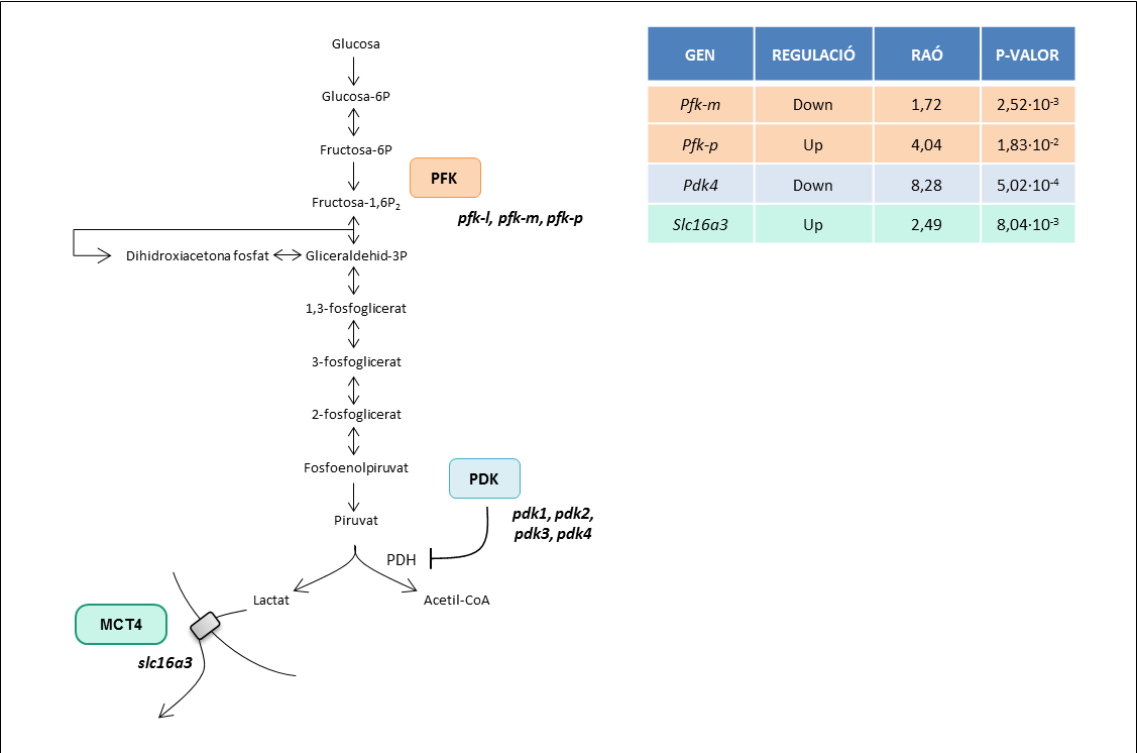


Figura 29. Gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa que es troben diferencialment expressats en MEFs p27KO quiescents segons resultats d'un "microarray" d'expressió previ. S'adjunta el tipus de relació (REGULACIÓ), el número de vegades que es troben regulats respecte al WT (RAÓ) i la significació estadística associada (P-VALOR).

Tal i com s'ha comentat en apartats anteriors, el programes transcripcionals dependents de p27 es troben íntimament relacionats amb aquells en què els membres de la família E2F són participants (Pippa et al; 2012). En aquesta línia, múltiples gens implicats en el catabolisme de la glucosa han estat identificats com a gens diana d' E2F (Blanchet et al., 2011). Amb l'objectiu d'estudiar el paper de p27 en l'oxidació de la glucosa, analitzàrem possibles gens dianes de p27 i E2F potencialment implicats en la glicòlisis (*pfk-l*, *pfk-m*, *pfk-p*, *pkm1*, *pkm2*), el metabolisme del piruvat (*pdk1*, *pdk2*, *pdk3*, *pdk4*) i el transport de lactat (*slc16a3*) en MEFs proliferants WT vs p27KO.

Els resultats obtinguts per RT-qPCR mostren un increment significatiu en l'expressió de *pfk-l*, *pfk-p*, *pdk1*, i *slc16a3* en cèl·lules p27KO respecte al control. L'expressió dels gens *pdk4* i *pkm2*, sorprenentment, depèn també de la presència de p27. D'altra banda, els nivells proteics de PDK1 i PKM en aquestes cèl·lules es troben, en consonància, en major presència respecte el fenotip salvatge, suggerint així que p27 podria estar implicada en la glicòlisis aeròbica per mitjà de la seva funció com a regulador transcripcional (Figura 30).

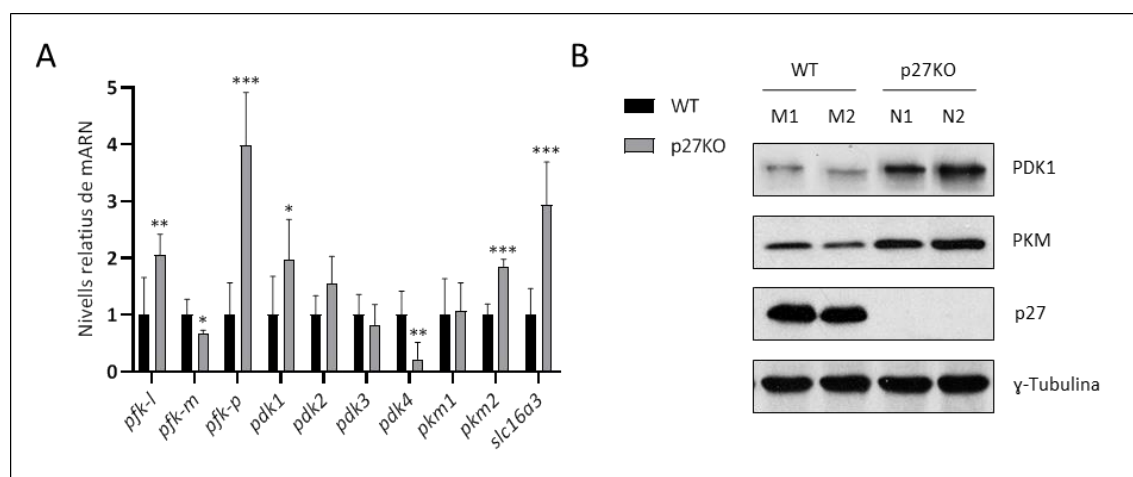


Figura 30. (A) Nivells relatius de mRNA pertanyents a gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa en cèl·lules WT i p27KO asincròniques mitjançant RT-qPCR. Els anàlisis d'expressió mostren mitjanes expressades amb unitats arbitràries relatives al WT i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents (n=3). (B) Nivells relatius de proteïna pertanyents a NDUF53, NDUF9 i γ-TUBULINA en cèl·lules WT vs p27KO asincròniques mitjançant WB.

4.6.2. Els nivells de p27 al llarg del cicle cel·lular correlacionen negativament amb l'expressió de gens glicolítics

Amb l'objectiu d'estudiar la relació entre p27 i el metabolisme de la glucosa, analitzàrem l'expressió de gens glicolítics a diferents moments del cicle cel·lular aprofitant la davallada inherent dels nivells de p27. La progressió del cicle cel·lular fou analitzada per mitjà dels nivells proteics de marcadors inherents de la transició G₁-S, essent p27 i PCNA proteïnes clau per a la progressió de G₁ i la fase S, respectivament. Així doncs, determinarem els nivells relatius de p27 i PCNA a 0h (quiescència), 12h transició (G₁/S) i 24h en MEFs mitjançant WB. La relació inversa dels seus nivells posa de manifest el bon estat de sincronització dels cultius cel·lulars (Figura 31A).

Paral·lelament, es quantificaren els nivells d'expressió de gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa (*pfk-l*, *pfk-p*, *pdk1*, *pkm2*, *slc16a3*) duent a terme RT-qPCR en cadascun dels temps recol·lectats. Els resultats revelen una pujada important en els nivells de mRNA de tots els gens analitzats a 12h coincidint amb el declivi dràstic de p27 (Figura 31B). Addicional i concordantment, els nivells de proteïna de PDK1 i PKM es troben incrementats a 12h tal i com s'observa en els WB corresponents. Aquests resultats són compatibles amb el model de regulació depenent de cicle que es proposa, en el qual p27 jugar un paper en el metabolisme a través de la regulació transcripcional de gens clau.

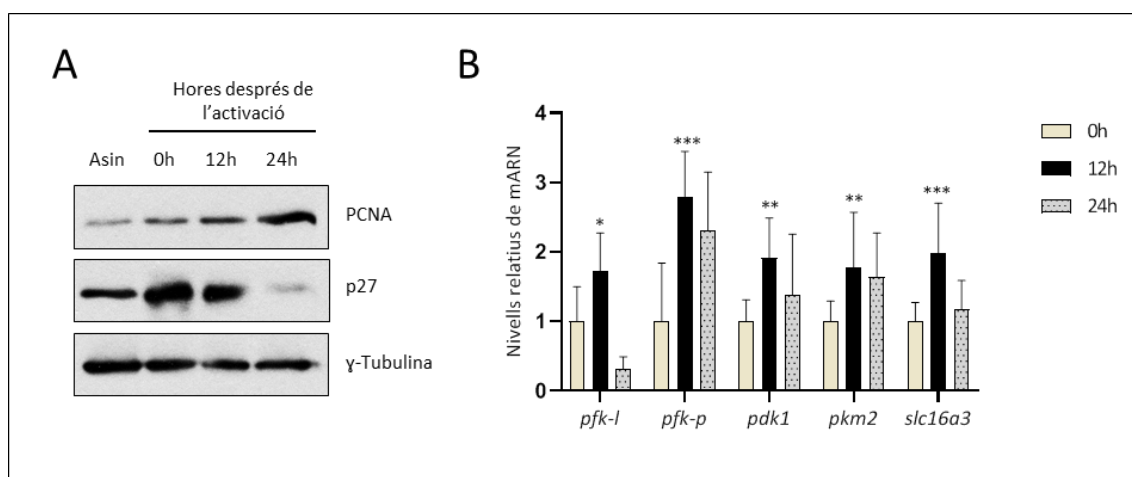


Figura 31. (A) Western Blot de PCNA i p27 en MEFs proliferants asincròniques (Asin) i a 0h, 12h i 24h després del protocol de sincronització cel·lular. S'emprà tubulina com a control de càrrega. (B) Nivells relatius de mRNA corresponents a gens del metabolisme de la glucosa durant la progressió del cicle cel·lular. Els resultats de RT-qPCR són normalitzats a actina i s'expressen relativitzats a cèl·lules quiescents (0h). Els valors mitjans obtinguts incorporen la desviació estàndard d'un total de 6 mostres independents per a cada punt (n=6).

4.6.3. p27 s'associa a motius E2F en el promotor de *pfk-p*

El model de regulació transcripcional validat en el nostre laboratori integra la presència de p130/E2F en els promotors regulats per p27 (Pippa et al., 2012). Així doncs, efectuarem un anàlisi *in silico* per identificar elements de resposta a E2F en els promotors de gens implicats en el metabolisme de la glucosa. Per dur-lo a terme, alinearem bioinformàticament matrius amb múltiples seqüència *consensus* per a la unió de E2F1 i E2F4 en la regió reguladora mitjançant recursos bioinformàtics *online* (Figura 32). Aquest anàlisi computacional revela la presència de dominis d'unió E2F en les promotors dels gens *pfk-l*, *pfk-p*, *pdck1*, *pkm2* i *slc6a13*, els quals constitueixen regions d'interès per als assaigs ChIP.

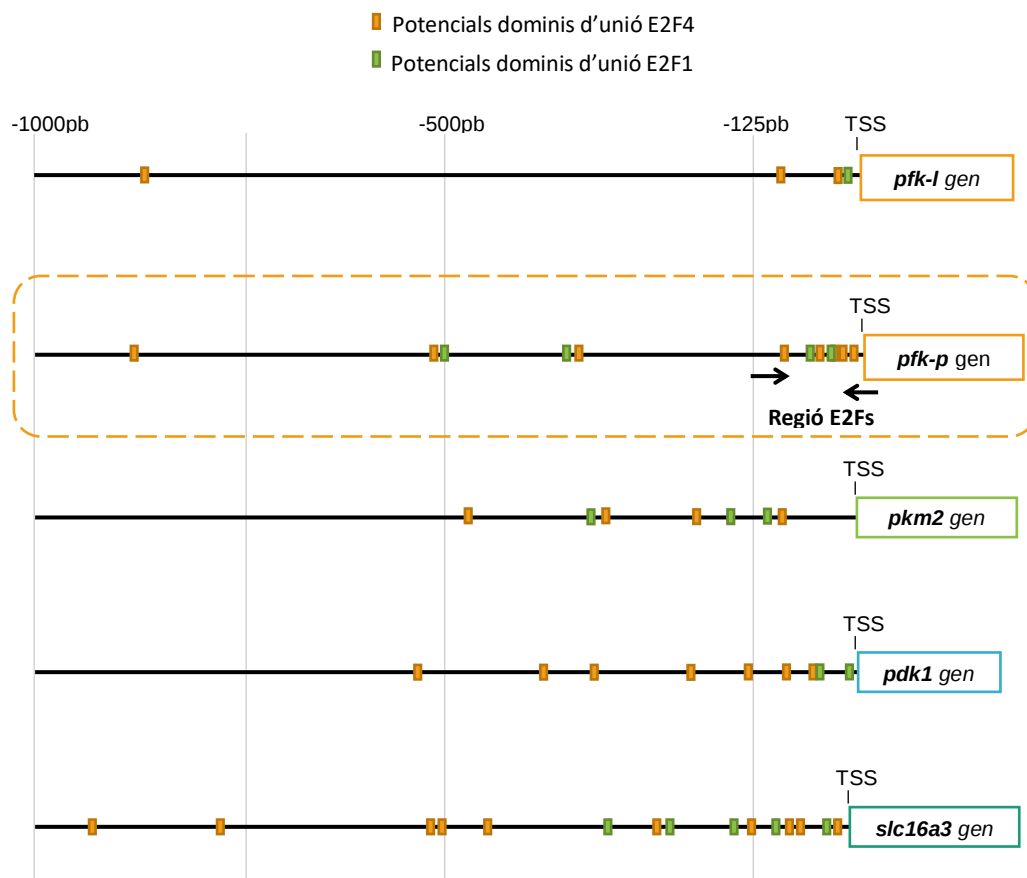


Figura 32. Representació esquemàtica dels dominis d'unió a factors de transcripció E2F1 i E2F4 en la regió promotora de gens implicats en la glicòlisis i el transport de lactat. Els motius d'unió predits foren determinats mitjançant anàlisis computacional amb les eines bioinformàtiques EPD, FIMO, PROMO i JASPAR establint un *p*-valor < 0,001.

La concorreguda presència de llocs d'unió E2F1 i E2F4 prop del lloc d'inici de la transcripció fou el motiu pel qual focalitzarem l'atenció en estudiar el complex transcripcional involucrat en l'expressió de *pfk-p*. En aquesta línia, dissenyarem cebadors dirigits a flanquejar la regió que s'estén des del lloc d'inici de la transcripció fins aproximadament 150 bp de longitud mentre que, paral·lelament, iniciarem immunoprecipitacions de cromatina en MEFs per analitzar la

presència de p27 en aquesta regió. Una vegada enriquides les regions de cromatina associades a p27, detectarem l'associació específica de p27 amb la regió d'interès mitjançant RT-qPCR. Els resultats ChIP revelen que p27 s'associa significativament a aquesta regió rica en dominis d'unió a E2F, probablement, com a regulador transcripcional en col·laboració amb complexos p130/E2F (Figura 33).

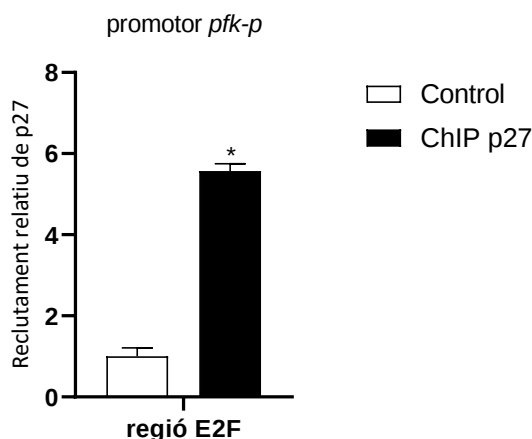


Figura 33. Anàlisi ChIP amb anticossos anti-p27 per aïllar els dominis d'unió de p27 a la cromatina. Les mostres ChIP foren analitzades mitjançant RT-qPCR amb cebadors específics per detectar el promotor de *pfk-p* amb elements de resposta a E2F. Els resultats ChIP revelen mitjanes relativitzades al control experimental (sense anticòs) i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

4.6.4. Els complexos ciclines-cdk i p130 participen en l'expressió de gens glucolítics

Volguérem avaluar si l'expressió de gens glicolítics per p27 té lloc a través dels complexos p130/E2F. Sabem que E2F4 i E2F5 requereixen la presència de p130 per associar-se a les regions promotores i reprimir la transcripció. A més, la davallada de p130 en aquestes zones reguladores possibilita l'entrada de factors positius de la transcripció (Pippa et al., 2012). Per tant, analitzàrem l'expressió dels gens *pfk-l*, *pfk-p*, *pdk1*, *pkm2* i *slc13a6* en MEFs p130KO vs WT. Els resultats revelen un increment significatiu dels nivells de mRNA de tots els gens en absència de p130 (Figura 34). D'aquesta manera, p130 i, probablement E2F4, participen en la regulació transcripcional de diversos components del metabolisme de la glucosa.

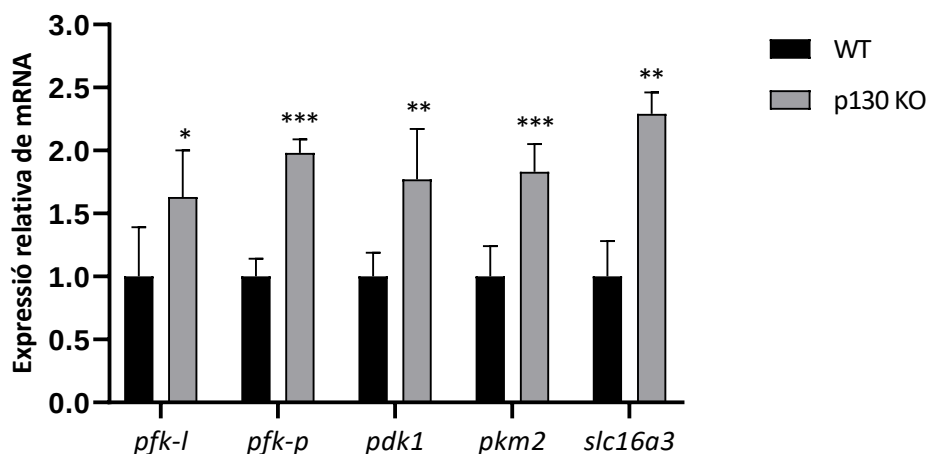


Figura 34. Nivells de mRNA corresponents a gens del metabolisme de la glucosa en MEFs WT i p130KO. Els resultats es normalitzen a l'expressió d'actina i es mostren relativitzats al WT en un total de 4 mostres independents per a cada grup.

L'absència de p27 es troba estretament relacionada amb l'activació dels complexos ciclines-cdk i la fosforilació de p130 per aquestes. Testarem l'efecte de la roscovitina, un inhibidor de ciclines-cdk d'ampli espectre, sobre l'expressió de gens glicolítics en MEFs proliferants. El tractament amb aquesta droga redueix significativament els nivells de mRNA de *pfk-l*, *pfk-p*, *pdk1*, *pkm2* i *slc13a6*, suggerint, doncs, la dependència transcripcional d'aquests gens pels components del cicle cel·lular (Figura 35).

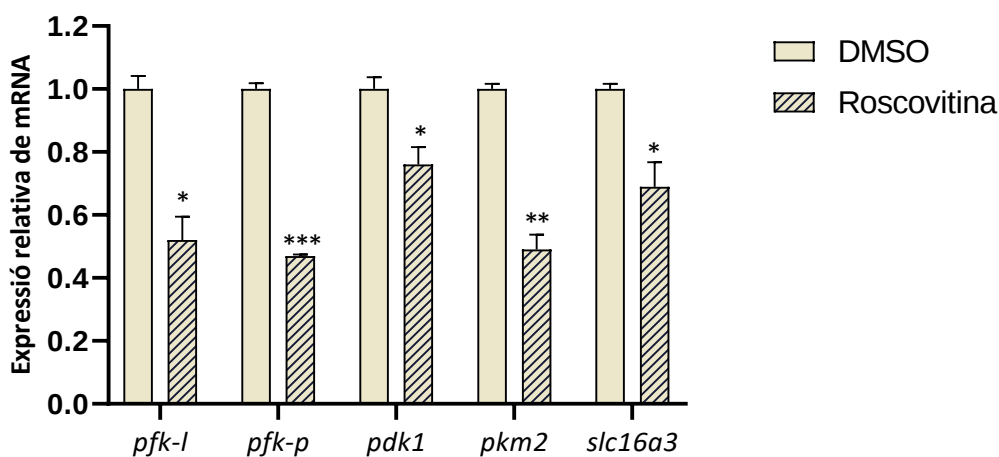


Figura 35. Expressió relativa de *pfk-l*, *pfk-p*, *pdk1*, *pkm2* i *slc16a3* en MEFs WT tractades amb roscovitina (20 μ M) durant 16 h. Els resultats es normalitzen als nivells de mRNA corresponents a actina i es relativitzen respecte les cèl·lules WT no tractades (DMSO) en un total de tres mostres independents per a cada grup.

4.6.5. La producció de lactat i piruvat depèn de p27

Nivells reduïts de p27 promouen l'expressió d'enzims limitants en la via glicolítica i, és per aquest motiu que, decidírem estudiar la implicació de p27 en la glucòlisis a nivell funcional. Així doncs, determinàrem la concentració de metabòlits inherents i analitzàrem si la seva producció depèn de p27. Per dur-lo a terme, quantificàrem els nivells intracel·lulars de piruvat i lactat en MEFs WT i p27KO mitjançant els kits comercials de Sigma Aldrich MAK071 i MAK064, respectivament (Figura 36). Com s'esperava, les cèl·lules p27KO cursen amb nivells majors de lactat en comparació amb les cèl·lules WT. En contraposició i de forma concordant, els nivells de piruvat es troben reduïts en MEFs p27KO vs WT, suggerint un desviament continu cap a lactat per poder reodixar el NADH i mantindre així cicles glicolítics continuats.

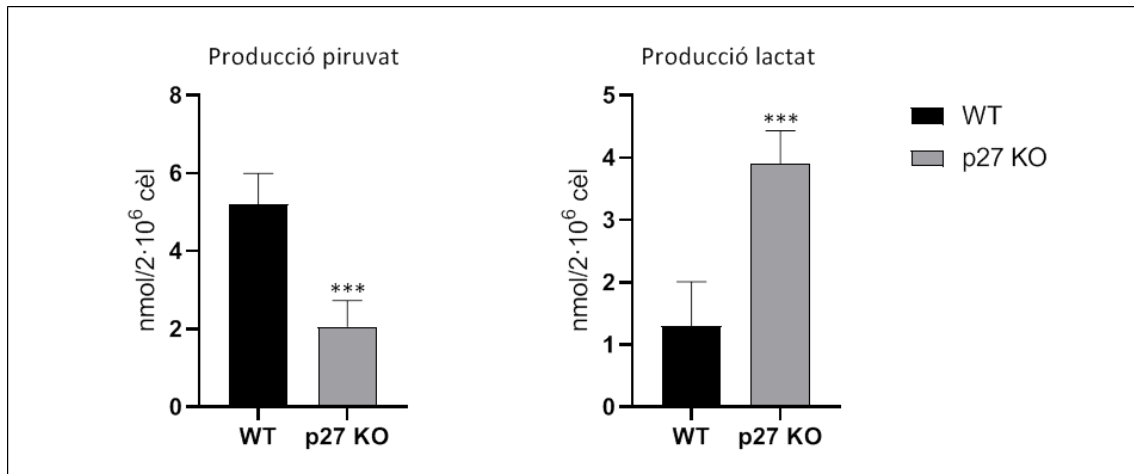


Figura 36. Nivells de piruvat i lactat en MEFs WT i p27 KO asincròniques. Es dugueren a terme assaigs enzimàtics independents per cadascun dels metabòlits i es determinà la concentració d'aquests mitjançant espectrofotometria. Els resultats mostren els valors de concentració corregits pel número de cèl·lules i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents.

Posteriorment, mesuràrem els nivells d'aquests metabòlits durant el cicle cel·lular de MEFs WT. Els resultats revelen que, a les 12h, els nivells de piruvat cauen significativament respecte els presents en estat de quiescència cel·lular. Al seu torn, la producció de lactat i els nivells intracel·lulars d'aquest metabòlit es troben incrementats notablement després d'activar la proliferació (Figura 37). Les variacions en la concentració de piruvat i lactat a les 12h correlacionen amb la davallada de p27 en aquest moment del cicle. Així doncs, p27 participa en la conversió de piruvat a lactat, és a dir, deriva la via glicolítica cap a la generació de lactat.

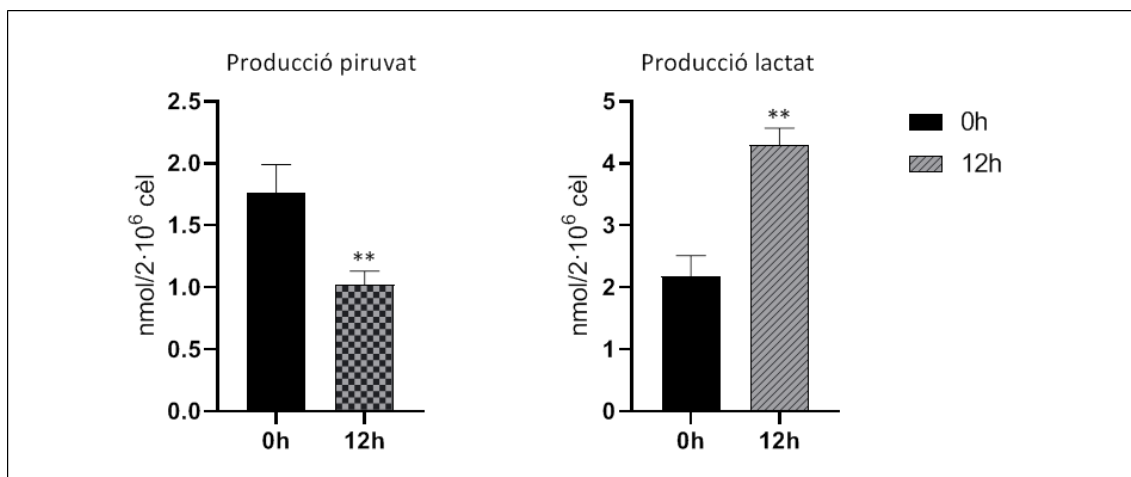


Figura 37. Nivells de piruvat i lactat en MEFs WT a 0 i 12h de la reincorporació al cicle cel·lular. Es dugueren a terme assaigs enzimàtics independents per cadascun dels metabòlits i es determinà la concentració d'aquests mitjançant espectrofotometria. Els resultats mostren els valors de concentració corregits pel número de cèl·lules i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents ($n=3$).

Per sostenir contínuament la glicòlisis és necessari reciclar i mantenir una font suficient de NAD^+ com a acceptor d'electrons. El NAD^+ és un coenzim necessari per a una reacció enzimàtica inherent a la glicòlisis, catalitzada per la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa. La conversió de piruvat a lactat permet oxidar contínuament el NADH que s'hi genera en aquesta reacció i prevenir l'efecte al·lostèric negatiu que exerceix enzims clau de la via. En nombroses ocasions, la producció massiva d'aquest metabòlit ve acompanyada per la seva excreció al medi extracel·lular. Així doncs, decidírem complementar els estudis metabòlics al llarg del cicle cel·lular amb la quantificació de la concentració extracel·lular de lactat (Figura 38).

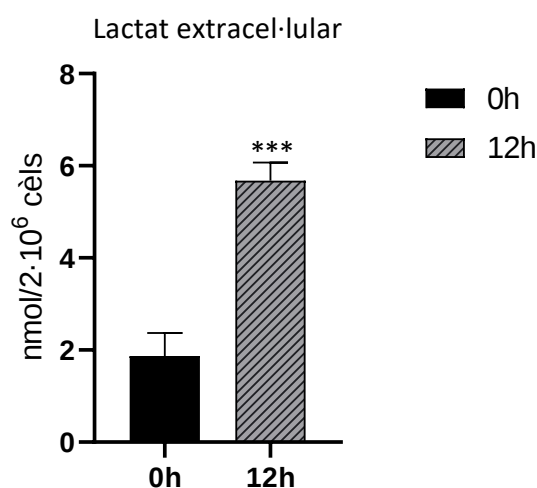


Figura 38. Nivells de lactat extracel·lular en MEFs WT a 0 i 12h de la reincorporació al cicle cel·lular. Es dué a terme un assaig enzimàtic i es determinà la concentració de lactat mitjançant espectrofotometria. Els resultats mostren els valors de concentració corregits pel número de cèl·lules i incorporen la desviació estàndard de 3 mostres independents ($n=3$).

4.7. El dèficit de p27 dóna lloc a estrès oxidatiu.

Determinar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) i la producció de ROS proporciona informació important sobre la funció mitocondrial. El $\Delta\Psi_m$ es considera un indicador important de l'activitat mitocondrial ja que és responsable de la producció d'ATP en l'última etapa de la CRM i, a més, es troba íntimament lligat amb la producció de ROS. La fuga o pèrdua d'electrons de la membrana mitocondrial interna pot comprometre la magnitud del potencial de membrana mitocondrial, essent la fuga proporcional i exponencialment dependent del potencial de membrana (Brand et al., 1994). En aquest sentit, un elevat $\Delta\Psi_m$ es relaciona una elevada producció de ROS per part de la cadena respiratòria mitocondrial (Korshunov et al., 1997).

La implicació de p27 en l'activitat del CI permetré formular la hipòtesis de relacionar aquesta proteïna amb el potencial de membrana mitocondrial i la producció de ROS. Abordarem aquest aspecte aplicant en els cultius cel·lulars el reactiu MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen), un colorant que s'acumula en les mitocòndries actives en resposta al potencial de membrana mitocondrial.

Els resultats derivats de la tinció MitoTracker® Red CMXRos mostra un marcatge perinuclear característic que correspon a la distribució intracel·lular de les mitocòndries (Figura 39). La intensitat de a senyal es veu incrementada en MEFs *knockdown* de p27 respecte les cèl·lules salvatges.

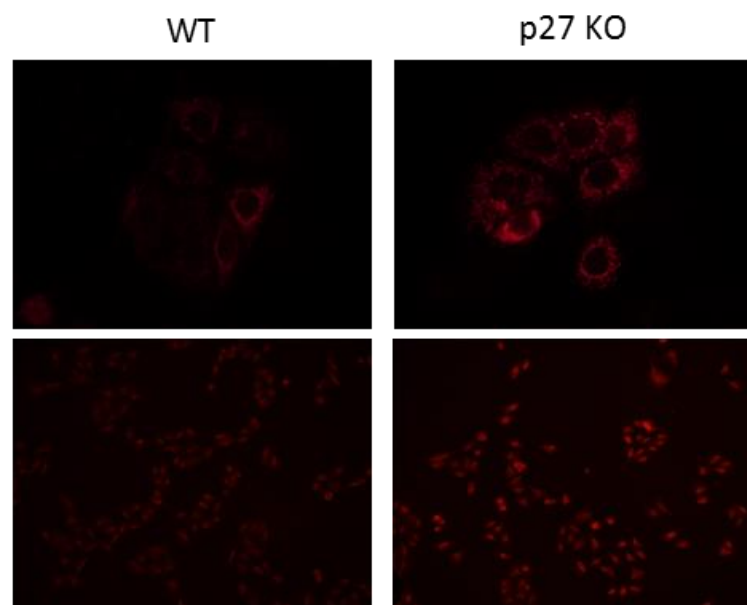


Figura 39. MEFs WT i p27 KO tenyides amb MitoTracker® Red CMXRos a una concentració de 25 nM.

4.8. Assaigs farmacològics

4.8.1. Corbes dosis-resposta en línies de càncer colorectal

Els principals mecanismes tumorals per a la reducció del contingut proteic de p27 es basen en l'estimulació de les vies proteolítiques comunament associades. La inactivació i deslocalització nuclear de p27 constitueixen mecanismes addicionals de desregulació que també promouen l'oncogènesi. Per altra banda, múltiples estudis indiquen que la sobreexpressió de p27 en cèl·lules canceroses indueix l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi (Toyoshima et al., 1994; Polyak et al., 1994a; Sheaff et al., 1997; Dijkers et al., 2000; Wu et al., 2006; Fujita et al., 2002; Chu et al., 2007; Deshmukh et al. 2022). Amb aquestes dades, el nostre laboratori plantejà la recuperació funcional de p27 en el nucli com a estratègia terapèutica contra el càncer.

La tàctica terapèutica es basà en l'administració combinada de compostos farmacològics el mecanisme d'acció dels quals radica en inhibir les principals vies associades a la pèrdua funcional de p27: degradació, deslocalització i inactivació per fosforilació (Figura 40). Es portaren a terme assajos farmacològics dosis-resposta en un panel de 7 línies de càncer colorectal amb els antagonistes i inhibidors que s'exposen en la Taula 1.

Compost	Referència	Mecanisme d'acció	Casa comercial
Dasatinib		Inhibidor selectiu de Src	Sigma Aldrich
Flavopiridol	S1230	Inhibidor de CDKs d'ampli espectre	Sigma Aldrich
LY294002		Inhibidor de PI3K	Sigma Aldrich
Saracatinib	S1021	Inhibidor de la família de quinasas Src	Sigma Aldrich
SB225002		Antagonista de CXCR2	Sigma Aldrich
Bortezomib		Inhibidor del proteasoma	Sigma Aldrich

Taula 1. Llista de compostos administrats in vitro línies cel·lulars de càncer colorectal amb els detalls comercials i el mecanisme d'acció pels quals es definiren en primera instància.

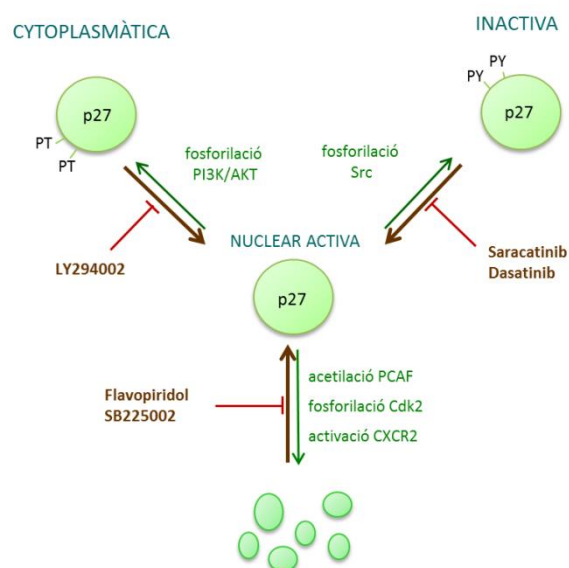


Figura 40. Estratègia terapèutica per a la recuperació funcional de p27 en el nucli. Esquema de les principals proteïnes i vies moleculars implicades en la inactivació, deslocalització i degradació de p27 en càncer. S'adjunten fàrmacs antagonistes i/o inhibidors de cadascuna de les vies emprats en assaigs dosis-resposta amb línies de càncer colorectal.

En primer lloc es determinà la concentració inhibidora semimàxima o IC50 de Dasatinib, Flavopiridol, SB225002, LY294002, Saracatinib en CaCo2, DLD1, HCT116, LIM1215, SW480 i SW620 sota condicions idèntiques per a permetre l'anàlisi comparatiu dels perfils farmacològics obtinguts. Així doncs, es cultivaren 5000 cèl·lules per pou sota una bateria de dosis farmacològica creixent (0,01-50 μ M) i es dugué a terme un assaig de viabilitat/proliferació cel·lular a les 48h mitjançant WST-1. Els resultats obtinguts es normalitzaren per mitjà del mètode d'estandardització Min-Max en relació al valor control sense tractament, concretament, al valor que proporciona l'addició del solvent DMSO en aquestes cèl·lules en les mateixes quantitats. Tot seguit, es representà gràficament el percentatge de viabilitat cel·lular respecte la concentració de fàrmac/s en base logarítmica amb la finalitat d'obtenir corbes sigmoïdes de fàcil interpretació.

Els valors experimentals obtinguts correlacionen negativament en un model matemàtic de regressió no lineal. La morfologia decreixent de les corbes dosis-resposta al llarg del eix de concentració posa de manifest el caràcter citotòxic dels compostos i constitueix una de les propietats característiques dels assaigs de viabilitat cel·lular cursats amb fàrmacs antagonistes i inhibidors. Els compostos presenten una eficàcia màxima similar per dosificació equivalent (els resultats no es mostren) i és el motiu pel qual es procedí a la normalització Min-Max.

L'inhibidor selectiu de Src, Dasatinib, constitueix un dels fàrmacs més potents dins l'espectre farmacològic testat. Els valors d'IC50 obtinguts són inferiors a 5 μ M per a la major part de

línies de càncer col·lorectal, essent CaCo2, DLD1 i LIM1215 les úniques que requereixen concentracions superiors a 15 µM per obtenir el mateix efecte. Sorprenentment, l'inhibidor de múltiples membres de la família de quinases Src presenta valors d'IC₅₀ comparativament superiors en totes les línies cel·lulars.

Flavopiridol, inhibidor de CDKs d'ampli espectre, resulta l'agent antiproliferatiu d'efectivitat més important. El percentatge de supervivència cel·lular assoleix el 50% a concentracions inferiors a 3 µM en les línies tumorals CaCo2, HCT116, LIM1215, SW480 i SW620. D'igual manera, l'antagonista de CXCR2 (SB225002) presenta un efecte antitumoral rellevant ja que inhibeix la proliferació de gran part de línies cel·lulars a concentracions farmacològiques de magnitud similar.

La via PI3K és una de les vies mediadores en la degradació de p27 i juga un paper important en la carcinogènesis. L'administració de LY294002 en el panel de línies cel·lulars inhibeix reprimeix aquesta via de senyalització i inhibeix la divisió de les cèl·lules. Tanmateix, els valors d'IC₅₀ d'aquesta droga reflecteixen una potència inferior en relació a compostos anteriors perquè es requereixen entre 25-75 µM per exhibir els efectes citotòxics.

Per tant, els resultats dels assaigs de citotoxicitat indiquen que els fàrmacs més potents corresponen a Dasatinib, SB225002 i flavopiridol, els valors IC₅₀ dels quals aconseguixen valors inferiors a 5 µM en la major part de línies cel·lulars estudiades. D'entre aquestes, HCT116 presenta una sensibilitat superior a l'exposició farmacològica independentment del mecanisme d'acció subjacent dirigit a la recuperació funcional de p27 (Figura 41).

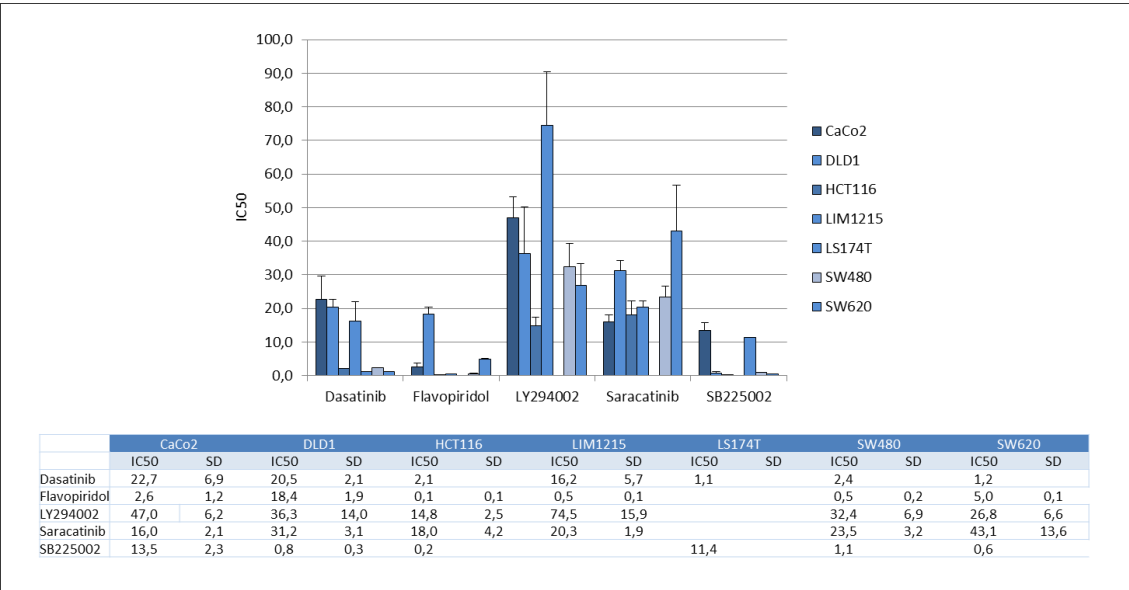


Figura 41. Determinació de la IC50 de Dasatinib, Flavopiridol, LY294002, Saracatinib, SB225002 en un panel de 7 línies cel·lulars de càncer colorectal: CaCo2, DLD1, HCT116, LIM1215, LS174T, SW480 i SW620. Es quantifica el percentatge de viabilitat cel·lular front una bateria de dosis creixent amb 0, 0'01, 0'1, 0'5, 0'75, 1, 10, 25, 50 µM de concentració a les 48h per WST-1. La taula subjacent contempla els valors mitjans de IC50 i la desviació estàndard d'un total de 3 mostres independents.

Una vegada determinats els fàrmacs amb major potència, es testà la combinació farmacològica Dasatinib-SB225002 i s'analitzà la potencial sinergia en un nombre de línies de càncer colorectal més reduït: HCT116, LS174T, SW480 i SW620 (Figura 42). Les combinacions amb Flavopiridol foren descartades dels estudis de viabilitat *in vitro* ja que, en diversos assajos clínics, s'han atribuït nocius relacionats amb l'aparició de fenòmens tromboembòlics durant el tractament de neoplàsies hematològiques. A més, s'han identificat efectes pliotròpics de l'acció del flavopiridol com a conseqüència de la seva acció sobre pp60 Src, PKC i Erk-1, motiu addicional pel qual se exclou dels experiments de viabilitat posteriors.

En termes generals, l'inhibidor selectiu de Src assoleix valors de IC50 al voltant de 1-2,5 µM per a les línies seleccionades. L'administració de SB225002 dóna lloc a una variabilitat en la resposta més estreta ja que el rang de valors de IC50 queda comprès entre els 0,2-1,3 µM, amb un efecte debilitat i excepcional en LS174T. La presència d'ambdós fàrmacs disminueix significativament la IC50 de manera tal que aquests compostos mostren una acció conjunta de major intensitat en comparació als seus efectes aïlladament, assolint un ordre de magnitud inferior a 1 µM independentment de la línia cel·lular emprada. Conseqüentment, les corbes sigmoïdes combinades revelen un desplaçament lateral a l'esquerre respecte la cinètica farmacològica individual. Per tant, l'administració conjunta de Dasatinib i SB225002 té associats un potent efecte biològic ja que minora notòriament la concentració farmacològica que resulta en una disminució del 50% en la viabilitat cel·lular *in vitro*.

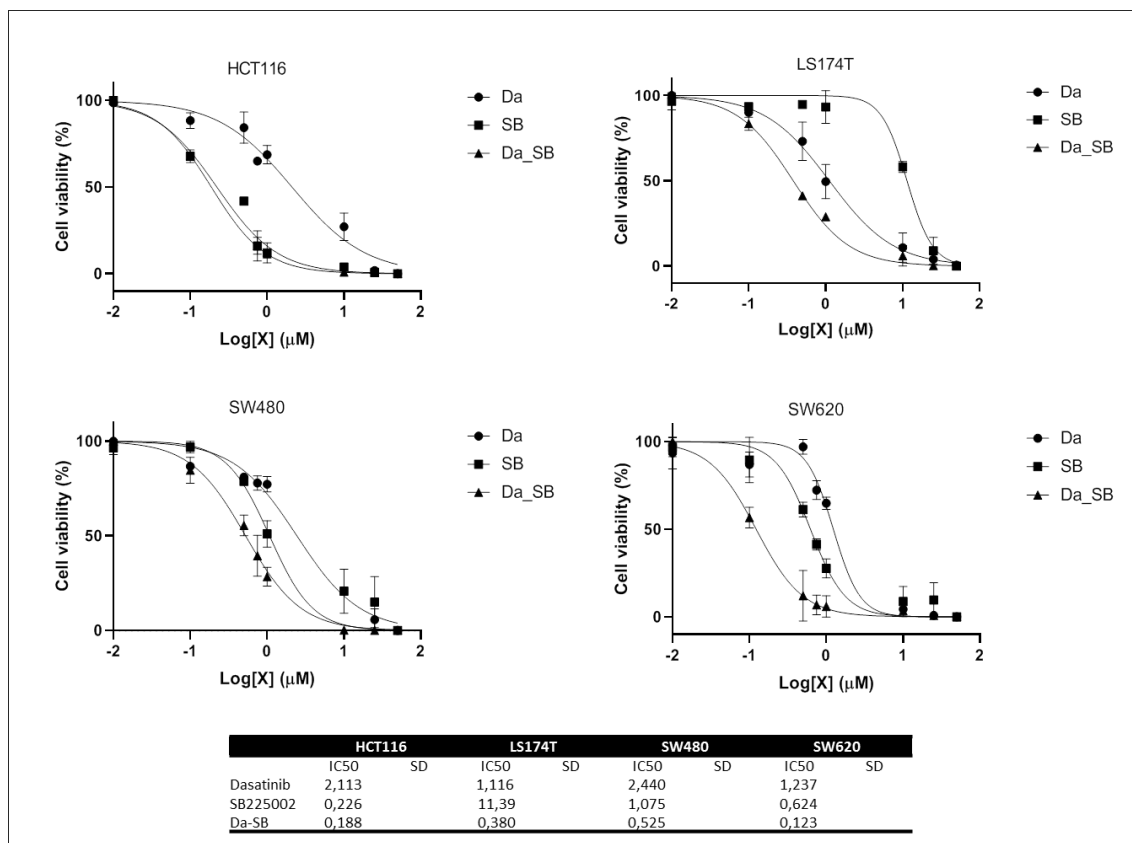


Figura 42. Corbes dosis-resposta de Dasatinib, SB225002 i combinades en les línies de càncer colorectal HCT116, LS174T, SW480 i SW620. Es quantificà el percentatge de viabilitat cel·lular front una bateria farmacològica de dosificació creixent amb 0, 0'01, 0'1, 0'5, 0'75, 1, 10, 25, 50 μM de concentració a les 48h per WST-1. Els resultats contempnen els valors mitjans de IC50 i la desviació estàndard d'un total de 3 mostres independents.

ANNEX

I. Clonació de la regió promotora de Ndufs3 en vector de luciferasa pGL3

Amb l'objectiu de dilucidar els mecanismes moleculars directes implicats en la transcripció de Ndufs3, procedírem a clonar la regió potencialment reguladora en plasmidis aptes per assaigs luciferasa. A data d'avui, hem pogut dur a terme la incorporació del DNA recombinant en vectors de clonació pGL3-promoter mitjançant lligació i digestió amb enzims de restricció.

S'analitzaren múltiples colònies bacterianes amb diferents proporcions d'insert:vector per incrementar les probabilitats de lligació. En el gel d'agarosa de comprovació es visualitzen les bandes corresponents als fragments de DNA recombinant alliberats després del procés de digestió enzimàtica (Figura 43). La migració electroforètica evidencia els 272 pb de longitud de la regió d'interès i la seva integració en els vectors luciferasa.

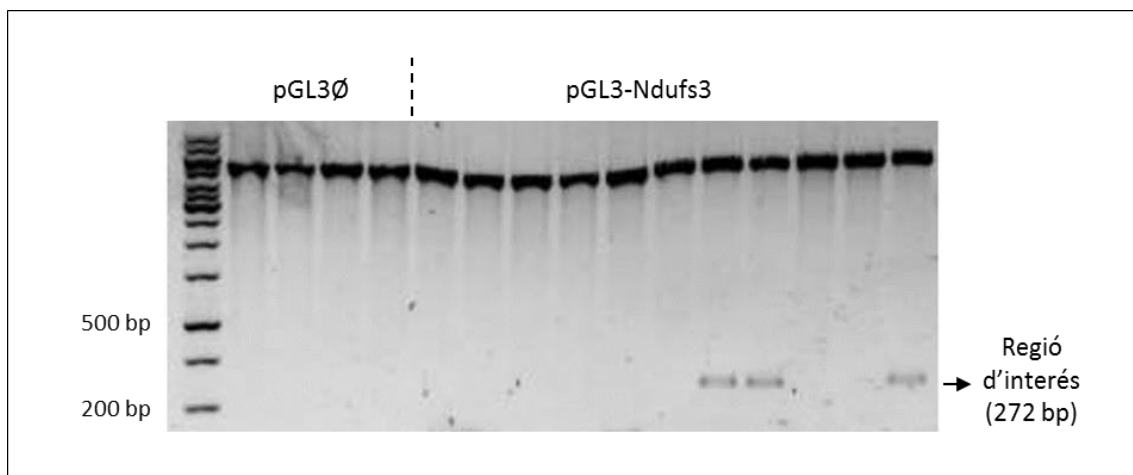


Figura 43. Clonació molecular mitjançant lligació i digestió amb enzims de restricció. Gel d'agarosa al 1% de colònies bacterianes que incorporen pGL3-promoter Ø i pGL3-promoter clonat (pGL3-Ndufs3) amb diferents proporcions d'insert:vector.

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

El projecte experimental pretén proporcionar major coneixement científic sobre les activitats biològiques intracel·lulars que regulen la reprogramació metabòlica de les cèl·lules proliferants per dissenyar, posteriorment, aproximacions experimentals que analitzin la rellevància funcionals dels resultats obtinguts. Els beneficis immediats derivats d'aquesta tesis permeten dilucidar alguns dels mecanismes moleculars regulats per p27 que es troben involucrats en la proliferació cel·lular i l'efecte Warburg.

Resultats precedents d'un *microarray* d'expressió en MEFs WT vs p27KO quiescents posen de manifest la relació biològica existent entre els elements reguladors del cicle cel·lular i el metabolisme energètic. Un total de 18 gens relacionats amb el metabolisme oxidatiu es troben infra-expressats en MEFs p27KO respecte al WT, amb un rang comprès entre 1,5 i 1,95 vegades (Figura 5). Aquests codifiquen per a subunitats de cadascun dels complexos implicats en el procés de fosforilació oxidativa, amb especial representació per components estructurals que formen el primer multímer. Concretament, p27 estaria potencialment regulant l'expressió d'un total de 7 subunitats del CI: *Ndufa1*, *Ndufa8*, *Ndufa9*, *Ndufb4*, *Ndufb9*, *Ndufs3* i *Ndufs6*. Aquestes troballes permeten formular la idea d'implicar p27 com a regulador clau en la resposta metabòlica adaptativa necessària per a la proliferació cel·lular, és a dir, en la reprogramació metabòlica subjacent al procés de divisió cel·lular. p27 controlaria la progressió del cicle cel·lular a través del seu paper com a modulador de l'activitat dels complexos ciclina-dk i com a regulador transcripcional de gens metabòlics clau, dirigint compassadament els canvis metabòlics necessaris per satisfer les demandes metabòliques associades a la proliferació cel·lular.

Els resultats obtinguts per RT-qPCR en MEF WT vs p27KO quiescents validen les dades obtingudes en el *microarray* d'expressió, tot i que no completament. Només els nivells de transcrit corresponents a *Ndufb9* i *Ndufs3* es troben reduïts, significativament, en comparació al control experimental (Figura 7). Així doncs, la línia d'investigació restringí els recursos i el material disponible a l'estudi de les subunitats *Ndufb9* i *Ndufs3* per tal d'oferir major consistència i productivitat al projecte d'investigació. Simultàniament, no assumírem les limitacions associades a la utilització dels nivells de transcrit com a predictors inequívocs de l'expressió proteica i, consegüentment, incorporàrem assaigs WB per a la determinació dels nivells de proteïna que, de forma esperada, exhibiren resultats concordants (Figura 8). Específicament, els resultats dels assaigs WB indiquen que nivells de les subunitats *Ndufs3* i *Ndufb9* es troben reduïts en MEFs p27KO quiescents respecte el control.

A partir d'un model biològic integrat, aquest projecte d'investigació dóna suport a la disfunció del CI per manca d'alguns dels elements inherents. En aquest sentit, la reducció dels nivells proteics de Ndufs3 i Ndufb9 haurien de ser suficients per minorar l'activitat del CI. De fet, les malalties mitocondrials amb mutacions germinals en alguna de les subunitats del CI cursen amb dèficits en la seva activitat (Rodenburg et al., 2016). A més, un estudi amb cèl·lules KO per a les 31 subunitats accessòries demostra que la manca d'alguna subunitat afecta a l'estabilitat d'altres components residents en el mateix mòdul, i impacta directament sobre l'activitat del CI (Stroud et al., 2016).

Un experiment relativament senzill podria estudiar l'efecte de p27 sobre la integritat estructural del CI. La tècnica BN-PAGE (Blue Native-PAGE) ofereix la possibilitat de determinar la massa nativa i l'estat oligomèric dels complexos mitocondrials, entre d'altres aplicacions (Wittig et al., 2006). Aquest mètode utilitza detergents no iònics, com la digitonina, per tal de preservar les interaccions supramoleculares; i Comassie Blue per a permetre la migració electroforètica de les proteïnes. Amb un control WT com a referència, es podria comparar el patró de migració del CI i analitzar la presència de bandes amb diferents recorreguts migratoris.

Els experiments de sincronització cel·lular representen un bon model per estudiar els canvis moleculars associats a la progressió del cicle cel·lular. La sincronització cel·lular per privació sèrica i inhibició per contacte permet estudiar les característiques moleculars vinculades a la quiescència i, alhora, analitzar els canvis moleculars associats a la progressió del cicle una vegada les cèl·lules són reinserides al programa de divisió. L'avantatge d'aquest tipus d'assaigs respecte mètodes alternatius és, precisament, l'absència d'una manipulació experimental que requereixi de constructes foranis o es trobi subjecte a exposició farmacològica. Es prescindeix, doncs, de les limitacions que plantegen aquests abordatges, entre els quals destaquen, sobretot, els efectes *off-target* o inespecífics.

La quiescència cel·lular ve definida per l'increment dels nivells de p27 en cultius amb una elevada densitat cel·lular (Polyak et al., 1994a). En cèl·lules confluents, p27 s'integra com a mecanisme efector de E-cadherina i N-cadherina i és responsable de la sortida del cicle cel·lular en aquestes condicions (Chassot et al., 2008; St Croix et al., 1998; Levenberg et al., 1999). Un estudi recent apunta que les senyals mitogèniques i de densitat cel·lular conflueixen en la relació estequiomètrica entre p27 i ciclina D1, la qual resulta decisiva per desencadenar la fosforilació de pRb i controlar la progressió del cicle cel·lular (Fan et al., 2021). Per aquest motiu, el control experimental per als assaigs de sincronització cel·lular radica en l'expressió

diferencial de p27 respecte les cèl·lules en estat asincrònic (Figura 6). Tal i com revelen els resultats WB, els MEFs WT presenten un increment important dels nivells de p27 en relació als cultius cel·lulars asincrònics.

Les cèl·lules amb manca d'algun dels elements relacionats amb el control del cicle cel·lular podria comprometre, *a priori*, la validesa dels resultats obtinguts en els experiments de sincronització cel·lular. L'absència de p27 podria minvar la resposta a les senyals antiproliferatives de tal manera que les cèl·lules podrien restar-hi insensibles i, consegüentment, veure's abolida la sortida del cicle cel·lular. Per aquest motiu, la utilització de cèl·lules p27KO en aquests assaigs es troba sotmesa a un control de sincronització addicional per tal de verificar que el seu cicle cel·lular evoluciona de forma compassada amb els de MEFs WT. Per a la fase G₀, es verificà la disminució de p21 en MEFs WT i p27KO respecte l'estat asincrònic (Figura 6). Alternativament, per analitzar el bon estat de sincronització cel·lular en els diferents grups es podria incloure la determinació d'algunes respostes efectores de Cdk4/6 i/o Cdk2 com, per exemple, la fosforilació de pRb o la histona H1 mitjançant WB. La quantificació del contingut de DNA per citometria de flux o els assaigs BrdU podrien ser un altre manera d'identificar el nombre de cèl·lules que es troben activament proliferant.

Durant el cicle cel·lular es produeix una davallada progressiva dels nivells de p27 i, en conseqüència, es poden analitzar els canvis d'expressió gènica dependents. La incorporació de fibroblasts derivats de ratolins p27KO permet analitzar l'especificitat dels resultats obtinguts i, d'aquesta manera, es pot estudiar la dependència dels programes transcripcionals del cicle cel·lular per p27. En el nostre cas, avaluarem el grau de variabilitat de *Ndufs* per p27 al llarg de la transició de la fase G₁/S. Per dur-lo a terme, quantificarem els nivells de mRNA i proteïna de *Ndufs3* i *Ndufb9* a 12h i 24h de la reinserció de les cèl·lules al cicle cel·lular mitjançant RT-qPCR (Figura 10) i WB (Figura 11), respectivament. Els resultats dels nostres experiments indiquen que p27 es troba involucrada en la regulació transcripcional de les subunitats *Ndufb9* i *Ndufs3*, especialment, durant les primeres 12 hores dins el programa de divisió cel·lular. Els nivells de mRNA i proteïna d'aquestes subunitats decauen d'acord a l'evolució de p27 durant el cicle cel·lular, exhibint doncs, cert grau de correlació. L'especificitat d'aquests resultats ve determinada per la invariabilitat que mostren els nivells de *Ndufb9* i *Ndufs3* en MEFs p27KO en tot l'experiment. Paral·lelament, s'utilitzaren MEFs asincròniques com a complement dels experiments de sincronització cel·lular basant-nos en la premissa que les poblacions cel·lulars en fase G₁ són majoritàries en aquestes condicions. Els resultats amb MEFs WT vs p27KO asincròniques exhibeixen, de forma similar, valors concordants i l'expressió de les subunitats estructurals del CI es troben minvades en cèl·lules p27KO a nivell de RNA i proteïna (Figura 12).

Probablement, p27 s'integra com a una proteïna clau per coordinar i adaptar la resposta metabòlica a la fase de replicació genòmica.

Donat que p27 regula l'expressió de subunitats que conformen el CI de la CRM, es desenvoluparen assaigs funcionals per quantificar l'activitat del mateix en MEFs WT i p27KO. El kit de tires reactives que s'utilitzà amb aquest propòsit mostrà que l'activitat del CI és inferior en cèl·lules sense p27 en comparació amb el control (Figura 13). Tot i les limitacions derivades de la utilització de tires reactives per anàlisis quantitius, com és per exemple, la manca de normalització per quantitat de proteïna endògena, podem inferir que p27 regula l'activitat del CI a través de la seva funció com a regulador transcripcional. Els resultats del *microarray* d'expressió suggereixen que p27 té un paper més ampli en la funció de la CRM, regulant l'expressió de constituents d'altres complexes del procés de fosforilació oxidativa. Aquests efectes haurien d'abordar-se per mitjà de mètodes que puguin determinar, per exemple, la taxa de consum d'oxigen extracel·lular.

Múltiples articles impliquen els clàssics reguladors del cicle cel·lular, concretament els membres de la família pRB i E2F, en la resposta metabòlica adaptativa que permet sustentar el procés de divisió cel·lular. El complex p130-E2F4 es tracta d'un mecanisme evolutiu altament conservat per reprimir l'expressió de gens relacionats amb la progressió del cicle cel·lular (Litovchick et al., 2007). Tanmateix, resultats d'experiments genòmics d'alt rendiment demostren que p130 i E2F4 regulen també l'expressió de gens implicats en el metabolisme energètic (Cam et al., 2004). Curiosament, el nostre laboratori demostrà que la presència de p27 és necessària per al reclutament de p130/E2F4 en els promotors dels gens diana, la regulació dels quals té lloc per un mecanisme dependent de l'activitat dels complexes ciclina-cdk (Pippa et al., 2012; Orlando et al., 2015). Per aquest motiu, la inclusió de MEFs p130KO en el projecte d'investigació permeté estudiar la dependència funcional de p130 pels programes transcripcionals associats a p27.

Els MEFs p130KO se sotmeteren, de la mateixa manera, a assaigs de sincronització cel·lular per privació sèrica i inhibició per contacte. Els resultats mostren que l'expressió de Ndufb9 i Ndufs3 es troba reduïda en MEFs p130KO quiescents respecte als fibroblasts salvatges, tant a nivell de mRNA com de proteïna (Figura 14 i 15). Per tant, p130 s'annexa també com una proteïna potencialment clau per definir la funció mitocondrial en quiescència.

En aquest moment, es decidí estudiar l'evolució dels nivells de Ndufs3 i Ndufb9 al llarg del cicle cel·lular en MEFs WT i p130 KO. S'analitzarà l'expressió de p27 i PCNA a 0, 12 i 24h després de la reinserció dels fibroblasts al programa de divisió com a control de sincronització. Es

comprovà, mitjançant WB, que els nivells proteics d'aquests reguladors del cicle es troben inversament relacionats al llarg de la fase G1 (Figura 16). Tal i com s'esperava i d'acord a la seva funció, els nivells de p27 minoren per a què els complexos ciclines-cdk desencadenin la hiperfosforilació de pRb i l'activació de programes transcripcionals que promouen l'avenç a fase S. Contràriament, l'expressió de PCNA, un element de resposta induït per E2F1 durant la transició G1/S esdevé màxima a 24h durant la fase de replicació genòmica evidenciant el seu paper com a cofactor de la DNA polimerasa delta (Bravo et al., 1987). Focalitzant l'atenció en les subunitats estructurals del CI, els nivells de Ndufb9 i Ndufs3 en MEFs p130KO decauen notablement en el transcurs de les primeres dotze hores respecte el control experimental (Figura 17 i 18). A més, no s'observen diferències substancials en la pendent de la recta en cap moment, suggerint que els canvis són dependents de p130. Els resultats en condicions asincròniques exhibeixen valors concordants; l'expressió de les subunitats estructurals del CI és inferior en cèl·lules p130KO en comparació amb els fibroblasts salvatges (Figura 19). Per tant, p130 es reconeix també com una proteïna que permet coordinar i adaptar la resposta mitocondrial durant la progressió del cicle cel·lular.

Els resultats obtinguts en els experiments de sincronització suggereixen que p27 i p130 regulen l'expressió de Ndufs al llarg del cicle cel·lular. Ambdues proteïnes poden estar, d'acord al model de regulació transcripcional descrit pel Dr. Bachs, col·laborant en l'expressió d'algunes de les subunitats estructurals que conformen el CI. De fet, resultats procedents d'un ChIP-seq previ identificaren un lloc d'unió de p27 a la cromatina a 424 bp de distància respecte el TSS del gen *Ndufs3*. Així doncs, es dugueren a terme assaigs d'immunoprecipitació de cromatina per tal de dilucidar el mecanisme molecular subjacent a la regulació transcripcional de *Ndufs3*. En aquest context, la variant ChIP-RTqPCR, una tècnica combinada que acobla l'aïllament de les regions de cromatina associades a p27 amb la detecció dirigida de les mateixes per RT-qPCR, representa una de les estratègies metodològiques habituals que s'utilitzen per caracteritzar i/o validar el complex proteic present en un locus específic. Per tant, podem identificar la presència de determinats factors de transcripció i coreguladors transcripcionals presents en un amplicó d'interès. En el nostre cas, immunoprecipitàrem els fragments de DNA associats a p27 i, a continuació, amplificàrem la regió descrita preliminarment per tal d'analitzar l'ocupació de p27 en aquesta regió. Els resultats ChIP-RTqPCR revelaren que p27 s'associa significativament a la regió descrita per ChIP-seq quan es compara la quantitat de DNA enriquit respecte un control experimental sense anticòs (Figura 24). Per tant, els resultats ChIP-RTqPCR validaren la unió de p27 sobre aquesta regió d'interès propera a *Ndufs3*, amb les connotacions de caràcter funcional que això pot comportar. Malgrat la importància de la

detecció de p130 en aquesta regió, resta pendent l'execució de ChIP-RTqPCR amb anticossos contra p130 aptes per tal de contrastar el model de regulació que es proposa.

Amb l'objectiu de dilucidar els mecanismes moleculars implicats directament en la transcripció de *Ndufs3*, procedirem a clonar la regió potencialment reguladora en plasmidis aptes per assaigs luciferasa (Figura 43). Aquest tipus d'assaig permet estudiar la regulació gènica a nivell transcripcional emprant l'enzim luciferasa com a proteïna reportera. La síntesis de l'indicador luciferasa permet analitzar el paper activador o repressor d'una proteïna qualsevol sobre l'expressió d'un gen diana, establint una connexió funcional entre la presència d'una proteïna i la quantitat de producte gènic produït. La base biològica radica en la reacció química catalitzada per la luciferasa la qual, en presència del seu substrat luciferina, ofereix com a resultat l'emissió de llum com a subproducte. La bioluminescència que es genera manté una relació directament proporcional amb l'efecte de la proteïna sobre l'expressió del gen diana, i pot ser monitoritzada amb els equips fotomètrics adequats. Donat que no precisa d'una excitació prèvia per a desencadenar la reacció bioluminiscent, la senyal de fons es troba reduïda i, consegüentment, l'assaig té associada una sensibilitat elevada. Com el propi nom de la tècnica indica, el constructe per dur a terme aquest procediment conté la regió reguladora d'interès fusionada amb la seqüència codificant de l'enzim luciferasa. A data d'avui, hem pogut dur a terme la incorporació del DNA recombinant en vectors luciferasa pGL3-promoter mitjançant lligació i digestió amb enzims de restricció. Resta encara dur a terme assaigs luciferasa en MEFs WT, p27KO i p130KO per analitzar si aquests reguladors del cicle actuen sobre la transcripció de *Ndufs3*. En aquest cas cas, involucraríem a p27 com a coregulador del metabolisme energètic.

Els sistemes implicats en la regulació de processos biològics poden estar conservats entre diferents tipus cel·lulars. Els complexos ciclines-Cdk i la xarxa transcripcional Rb/E2F representen un clar exemple de mecanismes altament preservats entre les cèl·lules eucariotes. L'evidència científica indica que aquests sistemes reguladors integren senyals del microambient extracel·lular i intracel·lulars per oferir una resposta coordinada d'adaptació en múltiples direccions. Concretament, són varies les troballes que relacionen els elements centrals del cicle cel·lular amb aspectes del metabolisme. Els membres de la família E2F regulen l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme glicolític (*Pdk1*, *Pdk4*) i la funció mitocondrial (*Nduf1c*, *Cox5a* i *Atp5g1*) en múscul esquelètic i teixit adipós blanc (Blanchet et al., 2011). A més, un estudi analitzà els programes transcripcionals dependents de p130-E2F4 en resposta a diversos estímuls d'aturada del cicle cel·lular. Acoblant immunoprecipitacions de cromatina de p130 i E2F4 amb un *microarray* de 13.000 promotors gènics s'identificà un

conjunt de gens en què p130 i E2F4 es troben colocalitzant. Alguns d'aquests gens es troben implicats amb la funció mitocondrial com són, per exemple, algunes subunitats del CIV (Cox8) i transportadors de la membrana mitocondrial interna (TIMM8 i TIMM23). La major part de les dianes identificades no es restringeixen a tipus cel·lulars específics (Cam et al., 2004). Per tant, decidírem estudiar si el mecanisme de control metabòlic associat a p27 es troba present també en altres contextos biològics. Per aquest motiu, utilitzàrem, arbitràriament, una línia cel·lular de progenitors neurals multipotents d'origen murí (C17.2) i analitzàrem si es recapitulaven algunes de les troballes descrites fins al moment.

S'utilitzaren altres abordatges per estudiar la relació entre p27 i el CI en la línia cel·lular C17.2. En aquest cas, se silencià l'expressió gènica de *CDKN1B* amb tecnologia RNA interferent. Per dur-lo a terme, s'introduïren vectors plasmídics pLKO.1 amb un shRNA específic contra p27 mitjançant transducció lentiviral. Tot seguit, estudiàrem els canvis en els components del CI quantificant l'expressió relativa de *Ndufb9* i *Ndufs3* per RT-qPCR i WB en comparació al control experimental. Com s'esperava, els nivells de transcrit i proteïna es troben significativament reduïts en C17.2 p27 deficients respecte aquelles que incorporen el shCtrl (Figura 20 i 21). Els resultats suggereixen, doncs, que els mecanismes que controlen l'expressió gènica de les subunitats del CI poden estar conservats entre tipus cel·lulars diferents. Dins aquest sistema, p27 podria participar com un dels elements de control.

La desregulació dels sistemes que governen el cicle cel·lular es troba inherent a diversos contextos fisiopatològics, especialment, la tumorigènesi. Les alteracions metabòliques subordinades són essencials per promoure i sostenir la proliferació aberrant que els defineix. Curiosament, la desregulació dels elements del cicle cel·lular són responsables d'induir part dels canvis metabòlics que s'observen en les cèl·lules tumorals (Pavlova et al., 2016). Així doncs, la deleció dels membres de la família del Rb involucra la sobreexpressió de proteïnes relacionades amb la internalització (ASCT2 o SLC1A5) i conversió de la glutamina (GLS1) a través de membres E2F (Reynolds et al., 2014). La internalització de nutrients és, doncs, un procés regulat negativament per la família pRb; i la seva mutació podria definir, en part, l'avidesa de les cèl·lules tumorals per la glutamina. Paral·lelament, estudis proteòmics apunten que la pèrdua de pRb es relaciona amb un fenotip marcat per un menor contingut i activitat mitocondrials. L'ablació de pRb genera, doncs, un perfil proteòmic caracteritzat per una disminució de les proteïnes que formen la CRM (Ndufb8-CI, Uqcrl2-CIII, Cox4-CIV i Atp5a-CV) tant en cèl·lules humanes com de ratolí (Nicolay et al., 2015). Comparat amb altres estudis, sembla ser que els efectes de la pèrdua de *Rb* són diferents a nivell transcripcional i proteòmic segons indiquen els autors d'aquest article. En qualsevol cas, volguérem analitzar la relació de

p27 i el CI en un context fisiopatològic humà, concretament. Amb aquest propòsit, se seleccionà la línia cel·lular de càncer colorectal HCT116 i analitzàrem si es recapitulaven novament les troballes descrites fins al moment.

S'aprofità un altre abordatge per estudiar la relació entre p27 i CI en HCT116. En aquest cas, s'empraren cèl·lules que havien estat sotmeses al procés d'edició gènica per CRISPR/Cas9 amb l'objectiu d'interrompre l'expressió gènica de *CDKN1B*. Les dades relacionades amb l'obtenció dels clons CRISPR no es poden detallar en aquesta tesi degut a que l'autoria pertany a altres membres del laboratori. En qualsevol cas, se seleccionaren un total de 3 clons per a cadascun dels grups i s'analitzaren els nivells de *Ndufb9* i *Ndufs3* per RT-qPCR i WB, respectivament. Els resultats mostren que els nivells de transcrit pertanyents a *Ndub9* es troben reduïts respecte el control CRISPR (Figura 22). D'igual manera, la quantitat relativa de proteïna corresponent a *Ndufs3* és inferior en cèl·lules HCT116 p27KO en comparació al control (Figura 23). Plantejaments erronis en el calendari d'activitats i la pèrdua accidental d'aquests clons per causes desconegudes impossibilitaren completar els anàlisis proposats. Per aquest motiu, no es poden proporcionar dades vinculades als nivells de mRNA i proteïna de *Ndufs3* i *Ndufb9*, respectivament.

Les subunitats que constitueixen la cadena respiratòria mitocondrial presenten orígens de codificació nuclear i mitocondrial. La regulació transcripcional del seus gens exhibeix un mecanisme de control comú que actua com a nexa en la comunicació nucli-mitocondri. Dins la cascada de senyalització per induir la resposta transcripcional en el mitocondri, el factor de transcripció TFAM és l'últim responsable (Gureev et al., 2019). Concretament, intervé en la replicació i transcripció del genoma mitocondrial per mitjà de, per una banda, el reclutament de la RNA polimerasa mitocondrial POLRMT en els promotors i, d'altra, el seu posicionament al lloc d'inici de la transcripció (Hillen et al., 2017). Amb l'objectiu d'estudiar el paper de p27 i p130 en la resposta metabòlica d'origen mitocondrial, s'analitzà el paper d'aquestes proteïnes en l'expressió de TFAM utilitzant MEFs WT, p27KO i p130KO quiescents. Els resultats mostren que p27 i p130 regulen l'expressió de TFAM en quiescència: els nivells de TFAM es troben reduïts en MEFs p27KO (Figura 25) i MEFs p130KO a nivell de RNA (Figura 26) i proteïna (Figura 27), tot i que es troba pendent encara l'anàlisi per RT-qPCR en MEFs p27KO. Per a la replicació del genoma mitocondrial es requereix d'un RNA *primer* i, per tant, l'inici de la transcripció constitueix un esdeveniment clau no solament per a l'expressió dels gens mitocondrials, sinó també per a la formació de noves mitocòndries. En aquesta línia, aprofitarem per estudiar el fenomen de biogènesis mitocondrial mitjançant la raó mtDNA/nDNA. Els resultats revelen, de moment, que p130 participa activament en el control

del número de còpies de mtDNA (Figura 28). Arribat a aquest punt, s'hauria d'estudiar la via de senyalització que governa la funció i la síntesis mitocondrial de *ново*, la qual coordina la transcripció de gens presents en el genoma nuclear i mitocondrial per mantenir una funció mitocondrial íntegra. Així doncs, s'analitzarien els nivells d'expressió de l'eix PGC-1 α /PGC-1 β , NRF-1, NRF-2 i TFAM en MEFs p27KO i p130KO. En cas de no trobar-se canvis substancials es recorrerà a estudiar la distribució subcel·lular de PGC-1 α amb la finalitat d'analitzar la presència de possibles mecanismes d'inactivació per deslocalització.

Altres dades derivades del *microarray* d'expressió suggereixen que p27 podria estar implicada en el metabolisme de la glucosa. Respecte les cèl·lules salvatges, els MEFs p27KO veuen incrementada l'expressió de *Pfk-p* i *Slc16a3* (o *Mct4*), gens relacionats amb la glicòlisis i l'exportació de lactat, respectivament (Figura 29). Més específicament, l'isoforma p de la fosfofructoquinasa (Pfk-p) és una de les subunitats que constitueix la Pfk1, el principal enzim regulador de la glicòlisis. Dependent del tipus cel·lular existeix en forma d'homo- o heterotetràmer amb les isoformes Pfk-m o Pfk-p, la combinació de les quals defineix les propietats cinètiques i reguladores de l'enzim. La seva activitat es troba altament regulada per una sèrie de reguladors positius (citràt, ATP, fosfoenolpiruvat, i [H⁺]) i negatius (Fru-2,6-P₂, AMP, Fru-1,6-P₂, Glu-1,6-P₂, NH₄⁺ i P_i), els quals coordinen la seva resposta en relació al estatus energètic intracel·lular. És d'aquesta manera que es controla l'ingrés i flux de la glucosa a la via glicolítica. Generalment, l'activitat de PFK1 incrementa en resposta a les senyals proliferatives i es característic de l'increment glicolític present en cèl·lules proliferants i tumorals. Concretament, les principals isoformes tumorals corresponen a Pfk-p i Pfk-l, l'inducció de les quals depèn d'Akt, EGFR i Ras, Src, respectivament. Al seu torn, ambdues isoformes es glicosilen en resposta a condicions d'hipòxia, on es redueix l'activitat de PFK1 i, consegüentment, es redireccionen els esquelets carbonats per generar nucleòtids i NADPH a través de la via de les pentoses fosfat (Bartrons et al., 2018). Pel que fa *Slc16a3*, el gen codifica per un transportador monocarboxilat responsable del transport passiu de lactat i altres substrats a través de la membrana plasmàtica. La seva sobreexpressió es característic típicament de la tumorigènesi i permet l'adaptació de les cèl·lules tumorals a la hipòxia. Es troba induït en condicions de manca d'oxigen per unió directa del factor de transcripció HIF1 α als elements de resposta a hipòxia (HRE) presents en el promotor; i és responsable de l'aflux de lactat en les condicions glicolítiques que s'hi deriven. La baixa afinitat de *Slc16a3* pel piruvat assegura la seva conversió a lactat abans de la seva translocació i permet, d'aquesta manera, la regeneració de NAD⁺ per nous cicles glicolítics (Payen et al., 2020).

A partir de les troballes descrites en el microarray d'expressió, estudiarem el paper de p27 en el catabolisme de la glucosa analitzant els nivells de mRNA corresponents a *Pfk-p*, *Slc16a3* i *Pdk4* en MEFs WT vs p27KO proliferants. Tal i com s'ha comentat en apartats anteriors, el programes transcripcionals dependents de p27 es troben íntimament relacionats amb aquells en què els membres de la família E2F són participants (Pippa R et al., 2012). Per aquest motiu, s'incorporaren altres dianes metabòliques descrites com a efectores de la resposta E2F (Blanchet et al., 2011; Nicolay et al., 2015; Cantal et al., 2004). Analitzarem, doncs, una bateria de gens potencialment regulats per p27 i E2f implicats en la glicòlisis (*pfk-l*, *pfk-m*, *pfk-p*, *pkm1*, *pkm2*), el metabolisme del piruvat (*pdh1*, *pdh2*, *pdh3*, *pdh4*) i el transport de lactat (*slc16a3*) en MEFs proliferants WT i p27KO (Figura 30). Els resultats obtinguts mostren un increment significatiu en l'expressió de *pfk-l*, *pfk-p*, *pdh1*, *pkm2* i *slc16a3* en cèl·lules p27KO respecte al control. Hem pogut comprovar que els nivells proteics de PDK1 i PKM en aquestes cèl·lules es troben, en consonància, en major presència respecte el fenotip salvatge. Per tant, p27 podria estar implicada en la via glicolítica per mitjà de la seva funció com a regulador transcripcional i oferir suport als requeriments metabòlics durant el cicle cel·lular. En contextos fisiopatològics, p27 podria ser responsable, en part, del *switch* metabòlic a glicòlisis aeròbica que caracteritza les cèl·lules tumorals, tot i que es precisen d'experiments addicionals en models biològics adequats per tal d'estudiar detingudament aquest aspecte.

A la fi de poder definir la relació entre p27 i l'expressió d'aquests gens glicolítics al llarg del cicle cel·lular, es recolliren MEFs WT a 0, 12 i 24h després de sincronitzar-los segons els mètodes anteriorment descrits (Figura 31). El control de sincronització posà de manifest un cicle cel·lular uniforme/regularitzat entre les poblacions cel·lulars dins el cultiu. Així doncs, es quantificà l'expressió de cadascun d'ells mitjançant RT-qPCR i es relativitzaren respecte el control 0h. Els resultats revelen una pujada significativa dels nivells a les 12h, exhibint certa correlació amb la davallada de p27 en aquest punt. Aquestes dades suggereixen que els gens del metabolisme glicolític tenen un patró d'expressió relacionat amb la progressió del cicle cel·lular i, probablement, dependent de factors reguladors del cicle.

El model de regulació transcripcional validat en el nostre laboratori integra la presència de p130/E2F en els promotors regulats per p27 (Pippa et al., 2012; Orlando et al., 2015). Per aquest motiu, efectuarem un anàlisi *in silico* per identificar elements de resposta a E2f1 i E2f4 en el promotor dels gens vinculats al metabolisme de la glucosa. Aquest anàlisi computacional revelà la presència de dominis d'unió E2f en la regió reguladora de *Pfk-l*, *Pfk-p*, *Pdh1*, *Pkm2* i *Slc6a13* (Figura 32). La concorreguda presència de dominis d'unió E2F1 i E2F4 prop del lloc d'inici de la transcripció fou el motiu pel qual focalitzarem l'atenció en estudiar el complex

transcripcional involucrat en l'expressió de *Pfk-p*. Amb aquestes dades es dissenyaren primers específics per a poder caracteritzar, mitjançant ChIP-RTqPCR, el complex proteic que ocupa el seu promotor (Figura 33). A data d'avui, s'ha validat la presència de p27 en aquesta regió i els factors de transcripció associats es troben encara per esclarir. Resta pendent, per tant, l'adquisició d'anticossos p130, E2F1 i E2F4 aptes per ChIP per poder demostrar que p27 i p130 són reclutats conjuntament en el promotor de *Pfk-p*.

Per poder estudiar si l'expressió de gens glicolítics té lloc a través dels complexos p130/E2f, analitzarem la correspondència dels resultats obtinguts amb models cel·lulars p130KO. Els resultats obtinguts revelen que els nivells d'expressió de *pfk-l*, *pfk-p*, *pdk1*, *pkm2* o *slc16a3* es mostren, d'igual manera, incrementats en MEFs p130KO respecte els fibroblasts salvatges (Figura 34). A més, l'expressió d'aquests gens en MEFs WT es troba minvada en presència de roscovitina, un inhibidor competitiu dels complexos ciclina-cdk d'ampli espectre (Figura 35). L'expressió d'aquests gens es troba subjecte, doncs, a l'activitat dels complexos ciclina-cdk, denotant així certa dependència per components del cicle cel·lular. Sabem que la fosforilació dels membres de la família del Rb pels complexos ciclina-cdk és essencial per desencadenar la sortida d'aquests complexos repressors dels gens diana i, d'aquesta manera, fer possible la transcripció de proteïnes implicades en la progressió del cicle cel·lular. Probablement, la roscovitina estigui preveent la fosforilació desestabilitzadora sobre p130.

Com s'ha comentat anteriorment, nivells reduïts de p27 promouen l'expressió de Pfk1, Pkm i Pdk1, enzims que catalitzen, directa o indirectament, etapes limitants del metabolisme glicolític. Pfk1 es troba implicada en la catàlisi d'una de les reaccions irreversibles de la glucòlisi, la fosforilació de fru-6-P a fru-1,6-P₂, i constitueix el principal regulador de la via. Pkm catalitza també una reacció irreversible en la etapa final de la via glicolítica, concretament, la formació de piruvat a partir de fosfoenolpiruvat. D'altra banda, Pdk1 introdueix un fosfat inorgànic a la piruvat deshidrogenasa i inhibeix la reacció irreversible que converteix el piruvat a acetil-CoA, limitant així el seu accés al cicle de Krebs i la CRM. Donada la importància d'aquests enzims en el metabolisme de la gluocsa, es decidí estudiar la implicació funcional de p27 en la glicòlisi quantificant els nivells intracel·lulars de piruvat i lactat en MEFs WT i p27KO (Figura 36). Els resultats mostren que aquestes darreres presenten nivells de lactat més elevats respecte les cèl·lules salvatges. En contraposició i de forma concordant, els nivells de piruvat es troben reduïts en MEFs p27KO respecte el WT, suggerint la desviació de piruvat cap a la producció de lactat. Curiosament, les variacions en els nivells de piruvat i lactat es produeixen, especialment, a les 12h de reinseir les cèl·lules quiescents salvatges al programa de divisió cel·lular (Figura 37). La quantificació dels nivells de lactat extracel·lular en aquestes condicions

permeté identificar l'aflux o translocació d'aquest metabòlit a l'exterior de la cèl·lula (Figura 38). Aquest perfil metabòlic es característic de les cèl·lules proliferants, en les quals es redirigeix el piruvat cap a la producció de lactat per reciclar i mantenir una font suficient de NAD⁺ com a acceptor d'electrons i, d'aquesta manera, poder mantenir cicles glicolítics continuats alhora que s'eludeixen els efectes al·lostèrics negatius que el NADH exerceix sobre enzims clau.

En resum, els resultats d'aquesta tesis suggereixen que p27 podria adaptar i coordinar el metabolisme controlant múltiples aspectes del mateix. La davallada de p27 durant el transcurs del cicle cel·lular s'acompanya d'un increment de la taxa glucolítica per sobreexpressió dels principals enzims reguladors (*pfk*, *pkm*, *pdk*). Simultàniament, p27 garanteix la continuïtat d'aquesta via mitjançant la conversió de piruvat a lactat i l'eflux d'aquest últim. Els experiments amb MEFs p130KO i els assaigs amb roscovitina suggereixen que p130 podria estar col·laborant en la regulació transcripcional d'aquests gens de forma dependent dels complexos ciclina-cdk, tot i que resten dur a terme immunoprecipitacions de cromatina amb anticossos anti-p130 que revelin certa colocalització amb les regions d'unió de p27 que hem descrit. D'altra banda, p27 limita, per infra-expressió de les subunitats estructurals del CI, l'entrada d'equivalents reductors al mitocondri i l'obtenció eficient d'energia a la CRM. Els assaigs amb MEFs p130KO indiquen que el número de còpies del mtDNA podria trobar-se sota el control de proteïnes amb paper rellevant en el cicle cel·lular, tot i que no disposem indicis de la implicació de p27 en aquest procés (Figura 44).

En conjunt, el nostre laboratori indica que p27, a més de controlar la progressió del cicle cel·lular, participa en el control del metabolisme energètic. La davallada dels seus nivells al llarg del cicle cel·lular podria constituir un mecanisme pel qual l'oxidació completa de la glucosa queda compromesa i es veuria afavorit un metabolisme més implicat en la divisió de la cèl·lula. Les cèl·lules proliferants requereixen de substrats anabòlics i poder reductor per satisfer les demandes biosintètiques associades al procés de divisió i, concretament, precisen d'un metabolisme capaç de proveir àcids nucleics de forma robusta. A través de la sobreexpressió de *pkm2*, *pfk-p* i *pdk1*, p27 probablement estigui redirigint els intermediaris glucolítics cap a vies anabòliques, com la via de les pentoses fosfat, per satisfer la demanda de nucleòtids i poder reductor inherent a la fase S. En aquesta línia, p27 s'integraria com una proteïna reguladora del metabolisme que desencadenaria una resposta efectora a múltiples nivells: l'aminoració del CI de la CRM i la sobreexpressió d'enzims relacionats amb el metabolisme de la glucosa, principalment. Tot i tenir certes evidències, resta contrastar que els canvis metabòlics es produeixen en associació amb el complex p130-E2f.

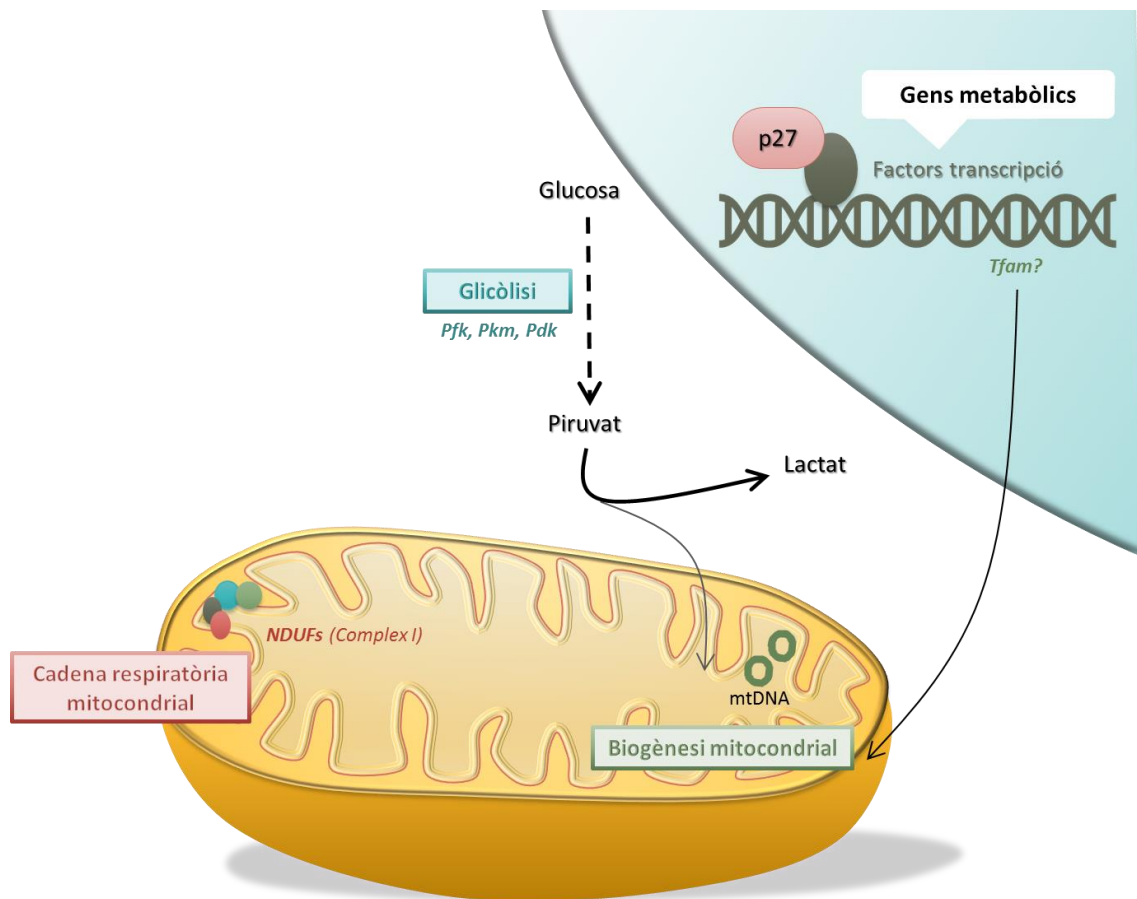


Figura 44. Aspectes metabòlics potencialment regulats per p27. La proteïna p27 es troba implicada en el control transcripcional de proteïnes de la cadena respiratòria mitocondrial, especialment, de les subunitats que constitueixen el complex I (NDUFs). El paper sobre la funció mitocondrial s'esté, probablement, al control de coactivadors transcripcionals de la família PGC-1 o bé a través de l'expressió del regulador mitocondrial downstream TFAM, el qual intervé en la replicació del mtDNA i la transcripció de subunitats de la CRM d'origen mitocondrial. Altres gens que es troben regulats per p27 inclouen enzims relacionats amb el metabolisme oxidatiu de la glucosa (Pfk, Pkm i Pdk). Els factors de transcripció potencialment implicats són dependents de p130/E2F tot i que es requereixen d'experiments addicionals per contrastar definitivament aquesta conjectura. En un cicle cel·lular convencional, la davallada de p27 durant G1 limitaria l'obtenció d'energia a través de la CRM mentre fomentaria l'obtenció d'intermediaris glicolítics i poder reductor per a la síntesis de biomolècules mitjançant el mecanisme que es descriu.

Nombrosos estudis apunten que la recuperació funcional de p27 en el nucli promou l'aturada del cicle cel·lular i la mort cel·lular (Toyoshima et al., 1994; Polyak et al., 1994a; Sheaff et al., 1997; Dijkers et al., 2000; Wu et al., 2006; Fujita et al., 2002; Chu et al., 2007; Deshmukh et al., 2022). Els assaigs farmacològics de quimiosensibilitat permeten avaluar, precisament, la citotoxicitat dels inhibidors i antagonistes testats. En el nostre cas, se seleccionaren una bateria de compostos contra les vies d'inactivació, deslocalització i degradació de p27 per tal d'estimular la seva activitat antitumoral. Es reprimiren, doncs, l'activació de Src (Dasatinib,

Saracatinib), els complexos ciclins-cdk (flavopiridol) i la via de senyalització PI3K/Akt (LY294002) com a mecanisme preventiu de la inactivació, degradació i deslocalització de p27, respectivament (Figura 40). A més, s'introduí SB225002, un inhibidor del receptor de CXCL5 (CXCR2) que, segons resultats preliminars del nostre laboratori, es troba involucrat en la degradació de p27. Els resultats semblen ser prometedors ja que la IC50 dels compostos estudiats són inferiors a 1 μ M (Figura 41), especialment, l'estratègia farmacològica múltiple basada en l'acció combinada de Dasatinib i SB225002, amb valors que ronden unitats nanomolars (Figura 42). Estem pendents, tanmateix, d'avaluar la combinació de flavopiridol-SB225002 en varies línies de càncer colorectal.

Sabem que la selectivitat farmacològica es relaciona directament amb el mecanisme d'acció del compost el qual té associat, al seu torn, un efecte secundari o colateral derivat de la interacció del fàrmac amb dianes farmacològiques addicionals. Per aquest motiu, es requereixen de més experiments per verificar la recuperació funcional de p27, i que la mort cel·lular descrita en els nostres experiments deriva dels efectes farmacològics sobre els mecanismes cel·lulars relacionats a aquest fenomen. Amb aquest propòsit, s'haurien d'incloure, com a mínim, un WB que verifiqui la pujada dels nivells intracel·lulars de p27 i, paral·lelament, un assaig farmacològic en cèl·lules tumorals p27KO per analitzar l'especificitat dels resultats obtinguts. En qualsevol cas, l'eficàcia de la teràpia que es proposa en aquesta tesi és suficient per iniciar estudis destinats a identificar el mecanisme responsable de la mort de les cèl·lules tumorals colorectals.

La teràpia combinada que es proposa pretén sensibilitzar les cèl·lules que no responen als tractaments antitumorals convencionals per activació de mecanismes que involucren la pèrdua funcional de p27. En càncer de colòn, per exemple, l'adquisició de resistència a palbociclib (inhibidor selectiu de CDK4/6) es relaciona amb Src i la fosforilació de p27 en residus tirosina. Petites dosis d'inhibidors Src resensibilitzen les cèl·lules a palbociclib i, en aquesta línia, es podria utilitzar aquesta troballa per estaficar els pacients que podrien beneficiar-se d'un tractament combinat (Rampioni Vinciguerra GL et al., 2021). En càncer de mama, els inhibidors de CDK4/6 Palbociclib, Abemaciclib i Ribociclib es combinen amb fàrmacs antagonistes del receptor d'estrògen (Letrozole) o amb compostos dirigits contra la síntesis d'estrògens (Fulvestrant) i s'utilitzen com a tractament de primera línia en metàstasis de tumors sensibles a hormones (ER/PR+) i pacients Her2-. La ciclina D és un element *downstream* en les vies de senyalització dels receptors d'estrògen i Her2 i la seva inhibició resulta d'especial interès com a opció terapèutica en tumors mamaris sensibles a hormones. Tanmateix, l'activació de Cdk2 per mecanismes epigenètics és responsable de la resistència a la teràpia amb inhibidors de CDK4.

Aquest esdeveniment compensatori incrementa l'activitat de Cdk2 i desencadena l'entrada a fase S per mitjà de la fosforilació a RB. Es precisa doncs, d'una estratègia combinada que inhibeixi la quinasa protumorigènica (cdk4) i la quinasa implicada en l'adquisició de resistència (cdk2) (Blain 2018).

La proteïna p27 actua com a inhibidor o activador dels complexos ciclina D-cdk4 segons dues conformacions alternatives que depenen de l'estatus de fosforilació en Y88 o Y89. La fosforilació en Y88 per la denominada *breast tumor related kinase* (Brk) promou un canvi conformacional que comporta l'apertura de p27 i l'activació dels complexos ciclina-cdk associats, amb efectes que promouen la degradació subsegüent de p27 per un mecanisme dependent de la fosforilació de Cdk2. La utilització d'una variant *splicing* de Brk amb el domini SH3 (ALT) prevé/bloqueja la fosforilació de Y88 i inactiva tant cdk4 com cdk2, arrestant les cèl·lules en G1 de forma més duradora que la observada amb inhibidors de cdk4 (Patel et al., 2018). De fet, quan es combina ALT amb Palbociclib, les cèl·lules es tornen senescent i són incapaces de reingressar al cicle cel·lular després de retirar el tractament, a diferència del tractament amb Palbociclib exclusivament. En models ratolins xenotransplantats amb cèl·lules tumorals mamàries, el tractament amb ALT i Palbociclib comporta la regressió del tumor mentre que el tractament exclusiu amb l'inhibidor de CDK4/6 aminora la cinètica del creixement tumoral (Blain 2018). De fet, un article recent recolza la utilització de pY88 com a biomarcador de la resposta terapèutica a inhibidors de CDK4/6 en tumors mamaris (Gottesman et al., 2019). Aquesta tesis recolza la importància de la desregulació funcional de p27 en la tumorigènesi i planteja la combinació dels compostos Dasatinib i SB2205002 com a opció terapèutica, tot i que resta pendent diversos experiments per recolzar fortament aquesta opció.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. La manca de p27 en MEFs comporta la desregulació de proteïnes implicades en el metabolisme energètic.
2. L'activitat del complex I de la cadena respiratòria mitocondrial es veu reduïda per manca d'algunes de les subunitats que el constitueixen.
3. Els MEFs p130KO exhibeixen, de forma similar als MEFs p27 KO, una menor expressió de les subunitats Ndufs3 i Ndub9.
4. L'expressió de les subunitats Ndufs3 i Ndub9 durant el transcurs del cicle cel·lular és dependent de p27 i p130.
5. Un domini d'unió de p27 a la cromatina se situa molt prop del lloc d'inici de la transcripció del gen *Ndufs3*, amb potencials implicacions en la seva regulació transcripcional.
6. La proteïna p27 es troba implicada en la replicació del genoma mitocondrial través de TFAM. Probablement coordini l'expressió de subunitats d'origen mitocondrial per aquest mecanisme.
7. La manca de p27 promou un metabolisme glicolític a través de l'expressió de *Pfk-p*, *Pkm2*, *Pdk1* i *Slc16a3*, caracteritzat per la redirecció de piruvat a lactat.
8. La proteïna p27 s'integra com una proteïna clau en la resposta metabòlica adaptativa que es troba subjacent a la progressió del cicle cel·lular.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Alberts, B. Molecular Biology of the Cell. 2014

Alrezk R, Hannah-Shmouni F, Stratakis CA. MEN4 and CDKN1B mutations: the latest of the MEN syndromes. *Endocr Relat Cancer*. 2017; 24(10): T195-T208.

Alvarez-Fernández M, Malumbres M. Preparing a cell for nuclear envelope breakdown: Spatio-temporal control of phosphorylation during mitotic entry. *Bioessays*. 2014 Aug; 36(8):757-65.

Babu MM. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct 15; 44(5): 1185-1200.

Bachs O, Gallastegui E, Orlando S, Bigas A, Morante-Redolat JM, Serratos J, Fariñas I, Aligué R, Pujol MJ. Role of p27Kip1 as a transcriptional regulator. *Oncotarget*. 2018 May 25;9(40):26259-26278.

Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Vecchione A, Spessotto P, Morrione A, Canzonieri V, Colombatti A. p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2005 Jan; 7(1): 51-63.

Bartrons R, Simon-Molas H, Rodríguez-García A, et al. Fructose 2,6-Bisphosphate in Cancer Cell Metabolism. *Front Oncol*. 2018; 8: 331.

Bencivenga D, Caldarelli I, Stampone E, Mancini FP, Balestrieri ML, Della Ragione F, Borriello A. p27Kip1 and human cancers: A reappraisal of a still enigmatic protein. *Cancer Lett*. 2017 Sep 10; 403: 354-365.

Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Aug; 14(8): 518-28.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Dec; 8(12): 967-75.

Besson A, Assoian RK, Roberts JM. Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):948-55.

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 2008 Feb;14(2):159-69.

Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*. 2004 Apr 15; 18(8): 862-76.

Besson A, Hwang HC, Cicero S, et al. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev*. 2007; 21(14): 1731-1746.

Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*. 2015 Jul 30; 162(3): 540-51.

Blain SW. Targeting p27 tyrosine phosphorylation as a modality to inhibit CDK4 and CDK2 and cause cell cycle arrest in breast cancer cells. *Oncoscience*. 2018 Jun 25; 5(5-6): 144-145.

Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, Aguilar V, Clapé C, Chavey C, Fritz V, Casas F, Apparailly F, Auwerx J, Fajas L. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 14; 13(9): 1146-52.

Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*. 1977 Aug;11(4):719-27.

Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF, Porter RK. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Aug 30; 1187(2): 132-9.

Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*. 1987 Apr 2-8; 326(6112): 515-7.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 1995 Oct 12; 377(6549): 552-7.

Cairns RA, Mak TW. Fire and water: Tumor cell adaptation to metabolic conditions. *Exp Cell Res*. 2017 Jul 15; 356(2): 204-208.

Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, Kluger Y, Dynlacht BD. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell*. 2004 Nov 5; 16(3): 399-411.

Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*. 1999 Aug; 1(4): 193-9.

Chandramohan V, Jeay S, Pianetti S, Sonenshein GE. Reciprocal control of Forkhead box O 3a and c-Myc via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway coordinately regulates p27Kip1 levels. *J Immunol*. 2004 May 1; 172(9): 5522-7.

Chassot AA, Lossaint G, Turchi L, Meneguzzi G, Fisher D, Ponzio G, Dulic V. Confluence-induced cell cycle exit involves pre-mitotic CDK inhibition by p27(Kip1) and cyclin D1 downregulation. *Cell Cycle*. 2008 Jul 1; 7(13): 2038-46.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008 Mar 13;452(7184):230-3.

Chu I, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S, Sun P, Tan CK, Hengst L, Slingerland J. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell*. 2007 Jan 26; 128(2): 281-94.

Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Apr; 8(4): 253-67.

Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*. 1996 May 10; 272(5263): 877-80.

Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, Resch A, Lupetti R, Beniston RG, Melchior F, Hengst L, Slingerland JM. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell*. 2003 Jan; 14(1): 201-13.

Cruz-Bermúdez A, Vallejo CG, Vicente-Blanco RJ, Gallardo ME, Fernández-Moreno MÁ, Quintanilla M, Garesse R. Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. *Oncotarget*. 2015 May 30; 6(15): 13628-43.

Darville MI, Antoine IV, Mertens-Strijthagen JR, Dupriez VJ, Rousseau GG. An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis. *Oncogene*. 1995 Oct 19; 11(8): 1509-17..

de Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, Schelen AM, Antonissen C, van Leeuwen D, Löwenberg B, Touw IP. STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene*. 2000 Jul 6; 19(29): 3290-8.

Deshmukh D, Xu J, Yang X, Shimelis H, Fang S, Qiu Y. Regulation of p27 (Kip1) by Ubiquitin E3 Ligase RNF6. *Pharmaceutics*. 2022 Apr 6; 14(4): 802.

Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(24):9138-48.

Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Mar; 6(3): 197-208.

Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson CM, Larsson NG. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*. 2004 May 1;13(9):935-44.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19; 75(4): 817-25.

Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*. 1993 May 7; 73(3): 487-97.

Fabris L, Berton S, Pellizzari I, Segatto I, D'Andrea S, Armenia J, Bomben R, Schiappacassi M, Gattei V, Philips MR, Vecchione A, Belletti B, Baldassarre G. p27kip1 controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 10; 112(45): 13916-21.

Fajas L. Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Front Oncol*. 2013 Jan 24;3:4.

Fan Y, Meyer T. Molecular control of cell density-mediated exit to quiescence. *Cell Rep*. 2021 Jul 27; 36(4): 109436.

Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet*. 2012 Sep; 49(9): 578-90.

Fernández de Mattos S, Lam EW, Tauler A. An E2F-binding site mediates the activation of the proliferative isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J*. 2002 Nov 15; 368(Pt 1): 283-91.

Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*. 1998 Nov 12; 396(6707): 177-80.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*. 1996 May 31; 85(5): 733-44.

Fujita N, Sato S, Katayama K, Tsuruo T. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem*. 2002 Aug 9; 277(32): 28706-13.

Furstenthal L, Swanson C, Kaiser BK, Eldridge AG, Jackson PK. Triggering ubiquitination of a CDK inhibitor at origins of DNA replication. *Nat Cell Biol*. 2001 Aug; 3(8): 715-22.

Giachin G, Bouverot R, Acajjaoui S, Pantalone S, Soler-López M. Dynamics of Human Mitochondrial Complex I Assembly: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci*. 2016 Aug 22; 3: 43.

Godin JD, Thomas N, Laguesse S, Malinetskaya L, Close P, Malaise O, Purnelle A, Raineteau O, Campbell K, Fero M, Moonen G, Malgrange B, Chariot A, Metin C, Besson A, Nguyen L. p27(Kip1) is a microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization during neuron migration. *Dev Cell*. 2012 Oct 16; 23(4): 729-44.

Goetzman ES, Prochownik EV. The Role for Myc in Coordinating Glycolysis, Oxidative Phosphorylation, Glutaminolysis, and Fatty Acid Metabolism in Normal and Neoplastic Tissues. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Apr 12; 9: 129.

González-Rodríguez P, Zampese E, Stout KA, Guzman JN, Ilijic E, Yang B, Tkatch T, Stavarache MA, Wokosin DL, Gao L, Kaplitt MG, López-Barneo J, Schumacker PT, Surmeier DJ. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature*. 2021 Nov; 599(7886): 650-656.

Göpfert U, Kullmann M, Hengst L. Cell cycle-dependent translation of p27 involves a responsive element in its 5'-UTR that overlaps with a uORF. *Hum Mol Genet*. 2003 Jul 15; 12(14): 1767-79.

Gottesman SRS, Somma J, Tshiperson V, Dresner L, Govindarajulu U, Patel P, Blain SW. Tyrosine Phosphorylation of p27Kip1 Correlates with Palbociclib Responsiveness in Breast Cancer Tumor Cells Grown in Explant Culture. *Mol Cancer Res*. 2019 Mar; 17(3): 669-675.

Gowthami N, Sunitha B, Kumar M, Keshava Prasad TS, Gayathri N, Padmanabhan B, Srinivas Bharath MM. Mapping the protein phosphorylation sites in human mitochondrial complex I

(NADH: Ubiquinone oxidoreductase): A bioinformatics study with implications for brain aging and neurodegeneration. *J Chem Neuroanat.* 2019 Jan; 95: 13-28.

Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, Paul JD, Hbaliu A, Goode RG, Sandusky GE, Vessella RL, Neubauer BL. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* 2000 Aug 11; 275(32): 24500-5.

Grassian AR, Coloff JL, Brugge JS. Extracellular matrix regulation of metabolism and implications for tumorigenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011; 76:313-24

Green MR, Sambrook J. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Oct 3; 2016(10).

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005 Nov 18; 123(4): 631-40.

Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell.* 2007 Jan 26; 128(2): 269-80.

Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 1994 Dec 15; 8(24): 2939-52.

Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, Wessels HJ, Arnold S, Brandt U, Nijtmans L. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab.* 2017 Jan 10; 25(1):128-139.

Gui P, Labrousse A, Van Goethem E, Besson A, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. Rho/ROCK pathway inhibition by the CDK inhibitor p27(kip1) participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration. *J Cell Sci.* 2014 Sep 15; 127(Pt 18): 4009-23

Gureev AP, Shaforostova EA, Popov VN. Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways. *Front Genet.* 2019 May 14; 10: 435.

Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 2016 Jun 2; 85: 133-60.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998 Jan 23; 279(5350): 509-14.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7; 100(1): 57-70.

Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 1994 Sep 15; 371(6494): 257-61.

Hao B, Zheng N, Schulman BA, Wu G, Miller JJ, Pagano M, Pavletich NP. Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell.* 2005 Oct 7; 20(1): 9-19.

Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S, Nakayama K. Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28; 276(52): 48937-43.

Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 1996 Mar 29; 271(5257): 1861-4.

Hillen HS, Morozov YI, Sarfallah A, Temiakov D, Cramer P. Structural Basis of Mitochondrial Transcription Initiation. *Cell*. 2017 Nov 16;171(5):1072-1081.

Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. 1995 May; 15(5): 2672-81.

Hirst J, Roessler MM. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul;1857(7):872-83.

Hnit SS, Xie C, Yao M, Holst J, Bensoussan A, De Souza P, Li Z, Dong Q. p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Nov; 68 :9-14.

Hsieh MCF, Das D, Sambandam N, Zhang MQ, Nahlé Z. Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J Biol Chem*. 2008 Oct 10; 283(41): 27410-27417.

Huang YC, Chen JY, Hung WC. Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3. *Oncogene*. 2004 Jun 17; 23(28): 4856-61.

Huber K, Mestres-Arenas A, Fajas L, Leal-Esteban LC. The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism. *FEBS J*. 2021 Jun; 288(12): 3813-3833.

Hunte C, Zickermann V, Brandt U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science*. 2010 Jul 23; 329(5990): 448-51.

Inoue T, Kamiyama J, Sakai T. Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5; 274(45): 32309-17.

Iommarini L, Kurelac I, Capristo M, Calvaruso MA, Giorgio V, Bergamini C, Ghelli A, Nanni P, De Giovanni C, Carelli V, Fato R, Lollini PL, Rugolo M, Gasparre G, Porcelli AM. Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum Mol Genet*. 2014 Mar 15; 23(6): 1453-66.

Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem*. 2002 Apr 26; 277(17): 14355-8.

Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*. 2008 May 2; 320(5876): 661-4.

- Israelsen WJ, Vander Heiden MG. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Jul; 43: 43-51.
- Jäkel H, Peschel I, Kunze C, Weinl C, Hengst L. Regulation of p27 (Kip1) by mitogen-induced tyrosine phosphorylation. *Cell Cycle.* 2012 May 15; 11(10): 1910-7.
- James MK, Ray A, Leznova D, Blain SW. Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Mol Cell Biol.* 2008 Jan; 28(1):498-510.
- Jeannot P, Nowosad A, Perchey RT, Callot C, Bennana E, Katsube T, Mayeux P, Guillonneau F, Manenti S, Besson A. p27Kip1 promotes invadopodia turnover and invasion through the regulation of the PAK1/Cortactin pathway. *Elife.* 2017 Mar 13; 6:e22207.
- Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec;6(12):1229-35.
- Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK. Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11; 102(41): 14659-64.
- Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 1993 Mar; 7(3): 331-42.
- Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* 2013 Sep 3;13(1):89.
- Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci.* 2006 May 10; 26(19): 5256-64.
- Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 2009 Apr; 10(4): 364-71.
- King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell.* 1994 Nov 18;79(4):563-71.
- Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell.* 1996 May 31; 85(5):721-32.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1971; 68: 820–823.
- Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Fianza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science.* 1992 Sep 18; 257(5077): 1689-94.

Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massagué J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science*. 1993 Apr 23; 260(5107): 536-9.

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997 Oct 13; 416(1): 15-8.

Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmüller U, Nakajima K, Hirano T, Horn F, Behrmann I. Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene*. 1999 Jun 24; 18(25): 3742-53.

Kotake Y, Nakayama K, Ishida N, Nakayama KI. Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J Biol Chem*. 2005 Jan 14; 280(2): 1095-102.

Kotoshiba S, Kamura T, Hara T, Ishida N, Nakayama KI. Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *J Biol Chem*. 2005 May 6; 280(18): 17694-700.

Kotrasová V, Keresztesová B, Ondrovičová G, Bauer JA, Havalová H, Pevala V, Kutejová E, Kunová N. Mitochondrial Kinases and the Role of Mitochondrial Protein Phosphorylation in Health and Disease. *Life (Basel)*. 2021 Jan 23; 11(2): 82.

Kullmann M, Göpfert U, Siewe B, Hengst L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev*. 2002 Dec 1; 16(23): 3087-99.

Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 16; 103(20): 7607-12.

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. 1997 Apr 1; 11(7): 847-62.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15; 227(5259):680-5.

Larrea MD, Liang J, Da Silva T, Hong F, Shao SH, Han K, Dumont D, Slingerland JM. Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4. *Mol Cell Biol*. 2008 Oct; 28(20): 6462-72.

le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, Maira G, Mercatelli N, Ciafrè SA, Farace MG, Agami R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*. 2007 Aug 8; 26(15): 3699-708.

Lees JA, Saito M, Vidal M, Valentine M, Look T, Harlow E, Dyson N, Helin K. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1993 Dec; 13(12): 7813-25.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. 2005

Levenberg S, Yarden A, Kam Z, Geiger B. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*. 1999 Jan 28; 18(4): 869-76.

Lew DJ, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Dec;8(6):795-804.

Li LD, Sun HF, Liu XX, Gao SP, Jiang HL, Hu X, Jin W. Down-Regulation of NDUF9 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation, Metastasis by Mediating Mitochondrial Metabolism. *PLoS One*. 2015 Dec 7;10(12):e0144441

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*. 2002 Oct; 8(10): 1153-60.

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar; 41(3):211-218.

Litovchick L, Sadasivam S, Florens L, Zhu X, Swanson SK, Velmurugan S, Chen R, Washburn MP, Liu XS, DeCaprio JA. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell*. 2007 May 25; 26(4): 539-51.

Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996 Jan 15;10(2):142-53.

Lodish, H. *Molecular Cell Biology*. 2016

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*. 1974 May 15; 42(1): 68-72.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov; 193(1): 265-75.

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27: 441-64.

Luo Y, Hurwitz J, Massagué J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*. 1995 May 11;375(6527):159-61.

MacGrath SM, Koleske AJ. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 7):1621-1626.

Mai N, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res*. 2017 Jan; 367(1): 5-20.

Malek NP, Sundberg H, McGrew S, Nakayama K, Kyriakides TR, Roberts JM. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*. 2001 Sep 20; 413(6853): 323-7.

Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005 Nov; 30(11): 630-41.

Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014; 15(6):122.

McAllister SS, Becker-Hapak M, Pintucci G, Pagano M, Dowdy SF. Novel p27(kip1) C-terminal scatter domain mediates Rac-dependent cell migration independent of cell cycle arrest functions. *Mol Cell Biol.* 2003 Jan; 23(1): 216-28.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature.* 2000 Apr 13; 404(6779): 782-7.

Metallo CM, Vander Heiden MG. Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology. *Mol Cell.* 2013 Feb 7; 49(3): 388-98.

Millard SS, Vidal A, Markus M, Koff A. A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug; 20(16): 5947-59.

Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14; 272(11): 7093-8.

Milne TA, Dou Y, Martin ME, Brock HW, Roeder RG, Hess JL. MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005b Oct 11; 102(41): 14765-70.

Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepp RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, Meyerson M, Hess JL. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005a Jan 18; 102(3): 749-54.

Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jun; 1817(6): 851-62.

Miskimins WK, Wang G, Hawkinson M, Miskimins R. Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. *Mol Cell Biol.* 2001 Aug; 21(15): 4960-7.

MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961 Jul 8; 191: 144-8.

Moeller SJ, Head ED, Sheaff RJ. p27Kip1 inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(11): 3735-3752.

Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev.* 1999 May 1;13(9):1181-9.

Morais VA, Haddad D, Craessaerts K, De Bock PJ, Swerts J, Vilain S, Aerts L, Overbergh L, Grünewald A, Seibler P, Klein C, Gevaert K, Verstreken P, De Strooper B. PINK1 loss-of-function

mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science*. 2014 Apr 11; 344(6180): 203-7.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997; 13: 261-91.

Morosétti R, Kawamata N, Gombart AF, Miller CW, Hatta Y, Hiramata T, Said JW, Tomonaga M, Koeffler HP. Alterations of the p27KIP1 gene in non-Hodgkin's lymphomas and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 1995 Sep 1; 86(5): 1924-30.

Moshfegh Y, Bravo-Cordero JJ, Miskolci V, Condeelis J, Hodgson L. A Trio-Rac1-Pak1 signalling axis drives invadopodia disassembly. *Nat Cell Biol*. 2014 Jun; 16(6): 574-86.

Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jun 23;12(7):413-26.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1; 417(1): 1-13.

Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med*. 1998 Dec; 4(12): 1449-52.

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 1996 May 31; 85(5):707-20.

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell*. 2004 May; 6(5): 661-72.

Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 May; 6(5): 369-81.

Nakazawa MS, Keith B, Simon MC. Oxygen availability and metabolic adaptations. *Nat Rev Cancer*. 2016 Sep 23; 16(10): 663-73.

Nallamshetty S, Crook M, Boehm M, Yoshimoto T, Olive M, Nabel EG. The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with MCM7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett*. 2005 Dec 5; 579(29): 6529-36.

Nicolay BN, Danielian PS, Kottakis F, Lapek JD Jr, Sanidas I, Miles WO, Dehnad M, Tschöp K, Gierut JJ, Manning AL, Morris R, Haigis K, Bardeesy N, Lees JA, Haas W, Dyson NJ. Proteomic analysis of pRb loss highlights a signature of decreased mitochondrial oxidative phosphorylation. *Genes Dev*. 2015 Sep 1; 29(17): 1875-89.

Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*. 1992; 61: 441-70.

Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*. 1994 Dec 8; 372(6506): 570-3.

Orlando S, Gallastegui E, Besson A, Abril G, Aligué R, Pujol MJ, Bachs O. p27Kip1 and p21Cip1 collaborate in the regulation of transcription by recruiting cyclin-Cdk complexes on the promoters of target genes. *Nucleic Acids Res*. 2015 Aug 18; 43(14): 6860-73.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 1995 Aug 4; 269(5224): 682-5.

Papa S, Scacco S, Sardanelli AM, Petruzzella V, Vergari R, Signorile A, Technikova-Dobrova Z. Complex I and the cAMP cascade in human physiopathology. *Biosci Rep*. 2002 Feb; 22(1): 3-16.

Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*. 1995 Feb 17; 267(5200): 1024-7.

Parker WD Jr, Parks JK. Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jan 21; 326(3): 667-9.

Patel P, Tshiperson V, Gottesman SRS, Somma J, Blain SW. Dual Inhibition of CDK4 and CDK2 via Targeting p27 Tyrosine Phosphorylation Induces a Potent and Durable Response in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res*. 2018 Mar; 16(3): 361-377.

Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jan 12; 23(1): 27-47.

Payen VL, Mina E, Van Hée VF, Porporato PE, Sonveaux P. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab*. 2020 Mar; 33: 48-66.

Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Graw J, Atkinson MJ. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 17; 103(42): 15558-63.

Pérez-Luna M, Aguasca M, Perearnau A, Serratos J, Martínez-Balbas M, Jesús Pujol M, Bachs O. PCAF regulates the stability of the transcriptional regulator and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1. *Nucleic Acids Res*. 2012 Aug; 40(14): 6520-33.

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977 Dec; 83(2): 346-56.

Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10; 264(1): 148-68.

Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10; 264(1): 148-68.

Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Rowley JD, et al. Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res.* 1995 Mar 15; 55(6): 1206-10.

Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):264-9.

Pippa R, Espinosa L, Gundem G, García-Escudero R, Dominguez A, Orlando S, Gallastegui E, Saiz C, Besson A, Pujol MJ, López-Bigas N, Paramio JM, Bigas A, Bachs O. p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene.* 2012 Sep 20; 31(38): 4207-20.

Pippin JW, Qu Q, Meijer L, Shankland SJ. Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15; 100(10): 2512-20.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994a Jan; 8(1): 9-22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 1994b Jul 15; 78(1): 59-66.

Ponce-Castañeda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J, et al. p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res.* 1995 Mar 15; 55(6): 1211-4.

Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, Dhup S, Tardy M, Vazeille T, Bouzin C, Feron O, Michiels C, Gallez B, Sonveaux P. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep.* 2014 Aug 7;8(3):754-66.

Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem.* 2011 May 20; 286(20): 18056-65.

Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017 Mar 2;7(1):47-54.

Rampioni Vinciguerra GL, Dall'Acqua A, Segatto I, Mattevi MC, Russo F, Favero A, Cirombella R, Mungo G, Viotto D, Karimbayli J, Pesce M, Vecchione A, Belletti B, Baldassarre G. p27kip1 expression and phosphorylation dictate Palbociclib sensitivity in KRAS-mutated colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2021 Oct 15; 12(10): 951.

Rath SL, Senapati S. Mechanism of p27 Unfolding for CDK2 Reactivation. *Sci Rep.* 2016 May 23;6:26450.

Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell*. 2000 Sep; 6(3): 683-92.

Reynisdóttir I, Massagué J. The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev*. 1997 Feb 15; 11(4): 492-503.

Reynisdóttir I, Polyak K, Iavarone A, Massagué J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev*. 1995 Aug 1; 9(15): 1831-45.

Reynolds MR, Lane AN, Robertson B, Kemp S, Liu Y, Hill BG, Dean DC, Clem BF. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene*. 2014 Jan 30; 33(5):556-66.

Rodenburg RJ. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul; 1857(7): 938-45.

Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*. 1996 Jul 25; 382(6589): 325-31.

Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*. 2003 Aug; 5(8): 711-9.

Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, Seo BB, LeBoeuf SE, Gay LJ, Yagi T, Felding-Habermann B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2013 Mar; 123(3): 1068-81.

Sekimoto T, Fukumoto M, Yoneda Y. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J*. 2004 May 5; 23(9): 1934-42.

Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005 Jan; 7(1): 77-85.

SenGupta S, Parent CA, Bear JE. The principles of directed cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Aug; 22(8): 529-547.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16; 366(6456): 704-7.

Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*. 2015 Oct 22; 163(3): 560-9.

Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*. 1997 Jun 1; 11(11): 1464-78.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15; 13(12): 1501-12.

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med.* 2002 Oct; 8(10): 1145-52.

Signes A, Fernandez-Vizarra E. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays Biochem.* 2018 Jul 20; 62(3):255-270.

Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 2000 Apr; 183(1): 10-7.

Slingerland JM, Hengst L, Pan CH, Alexander D, Stampfer MR, Reed SI. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 1994 Jun; 14(6): 3683-94.

Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, Kawamata N, Miller CW, Koeffler HP. p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res.* 1996 May 15; 56(10): 2400-4.

Srinivas Bharath MM. Post-Translational Oxidative Modifications of Mitochondrial Complex I (NADH: Ubiquinone Oxidoreductase): Implications for Pathogenesis and Therapeutics in Human Diseases. *J Alzheimers Dis.* 2017; 60(s1): S69-S86.

St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Flørenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS. E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol.* 1998 Jul 27; 142(2): 557-71.

Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res.* 2002 May 15; 276(1): 24-31.

Stroud DA, Surgenor EE, Formosa LE, Reljic B, Frazier AE, Dibley MG, Osellame LD, Stait T, Beilharz TH, Thorburn DR, Salim A, Ryan MT. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature.* 2016 Oct 6; 538(7623): 123-126.

Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E, Vander Heiden MG. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell.* 2015 Jul 30; 162(3): 552-63.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 1994 Jul 15; 78(1): 67-74.

Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature.* 2006 May 25; 441(7092): 523-7.

Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol.* 1999 Jun 17; 9(12): 661-4.

Tsytlonok M, Sanabria H, Wang Y, Felekyan S, Hemmen K, Phillips AH, Yun MK, Waddell MB, Park CG, Vaithiyalingam S, Iconaru L, White SW, Tompa P, Seidel CAM, Kriwacki R. Dynamic

anticipation by Cdk2/Cyclin A-bound p27 mediates signal integration in cell cycle regulation. *Nat Commun.* 2019 Apr 11; 10(1):1676.

Urrea FA, Muñoz F, Lovy A, Cárdenas C. The Mitochondrial Complex(ity) of Cancer. *Front Oncol.* 2017 Jun 8; 7: 118.

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 2004 May 21; 304(5674): 1158-60.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May 22; 324(5930): 1029-33.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med.* 2002 Oct; 8(10): 1136-44.

Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature.* 2014 Nov 6; 515(7525): 80-84.

Vlach J, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* 1997 Sep 1;16(17):5334-44.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 1994 Jun 16; 369(6481): 574-8.

Wang C, Hou X, Mohapatra S, Ma Y, Cress WD, Pledger WJ, Chen J. Activation of p27Kip1 Expression by E2F1. A negative feedback mechanism. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1; 280(13): 12339-43.

Wang H, Nicolay BN, Chick JM, Gao X, Geng Y, Ren H, Gao H, Yang G, Williams JA, Suski JM, Keibler MA, Sicinska E, Gerdemann U, Haining WN, Roberts TM, Polyak K, Gygi SP, Dyson NJ, Sicinski P. The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature.* 2017 Jun 15; 546(7658): 426-430.

Wang LY, Hung CL, Chen YR, Yang JC, Wang J, Campbell M, Izumiya Y, Chen HW, Wang WC, Ann DK, Kung HJ. KDM4A Coactivates E2F1 to Regulate the PDK-Dependent Metabolic Switch between Mitochondrial Oxidation and Glycolysis. *Cell Rep.* 2016 Sep 13; 16(11): 3016-3027.

Wang Y, Wang Y, Xiang J, Ji F, Deng Y, Tang C, Yang S, Xi Q, Liu R, Di W. Knockdown of CRM1 inhibits the nuclear export of p27(Kip1) phosphorylated at serine 10 and plays a role in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2014 Feb 1; 343(1): 6-13.

Wang Z, Fan M, Candas D, Zhang TQ, Qin L, Eldridge A, Wachsmann-Hogiu S, Ahmed KM, Chromy BA, Nantajit D, Duru N, He F, Chen M, Finkel T, Weinstein LS, Li JJ. Cyclin B1/Cdk1

coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. *Dev Cell*. 2014 Apr 28; 29(2): 217-32.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123 (3191): 309-14.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5; 81(3): 323-30.

Wittig I, Braun HP, Schägger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc*. 2006; 1(1): 418-28.

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8.

Wu FY, Wang SE, Sanders ME, Shin I, Rojo F, Baselga J, Arteaga CL. Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer Res*. 2006 Feb 15; 66(4): 2162-72.

Yang W, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S, Romieu-Mourez R, Freedman LP, Sonenshein GE. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*. 2001 Mar 29;20(14):1688-702.

Yung Y, Walker JL, Roberts JM, Assoian RK. A Skp2 autoinduction loop and restriction point control. *J Cell Biol*. 2007 Aug 27; 178(5): 741-7.

Zhao D, Besser AH, Wander SA, Sun J, Zhou W, Wang B, Ince T, Durante MA, Guo W, Mills G, Theodorescu D, Slingerland J. Cytoplasmic p27 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis via STAT3-mediated Twist1 upregulation. *Oncogene*. 2015 Oct; 34(43): 5447-59.:

Zhu J, Vinothkumar KR, Hirst J. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*. 2016 Aug 18; 536(7616): 354-358.