

Regulació de la localització intracel·lular de p21^{Cip1}

Neus Abella Martí

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

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

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

TESI DOCTORAL

**REGULACIÓ DE LA LOCALITZACIÓ
INTRACEL·LULAR DE p21^{Cip1}**

NEUS ABELLA MARTÍ



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Barcelona, Maig 2009

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències
Programa de Doctorat en Biologia i Patologia Cel·lular
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Bienni 2002-2004

REGULACIÓ DE LA LOCALITZACIÓ INTRACEL·LULAR DE p21^{Cip1}

Memòria presentada per
Neus Abella Martí

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Doctora Neus Agell Jané al Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Als meus pares

A l'Anna

*I hate to say I love you,
because it means that I will be with you forever
or will sadly... say goodbye.*

*And I love to say I hate you,
because it means that I will live my life happily without you
or will sadly... live a lie.*

Ben Harper "Ground On Down"

Agraïments

Sembla que ja ha arribat el gran moment, el moment d'anar a la impremta i avançar... un pas més en la finalització d'aquesta tesi. Però abans falta un dels apartats més importants i imprescindibles, donar les gràcies a tots els que m'heu acompanyat en aquest camí. Són moltes coses viscudes, molts anys i molta gent amb qui els he compartit i cadascú de vosaltres m'heu ajudat a arribar fins aquí.

En primer lloc vull donar-te les gràcies a tu Neus, per la oportunitat que hem vas donar, ja fa uns quants anys, de poder fer la tesi en el teu grup. He après molt al teu costat, dia a dia. Gràcies per ensenyar-me a lluitar fins a aconseguir els objectius proposats, encara que de vegades les coses siguin difícils. Ha estat una sort tenir-te com a directora de tesi. Gràcies per ser tan propera i ajudar-me en tants moments. Ets un exemple a seguir i et tindrè sempre present!

També vull agrair als jefes: Oriol, Carles, Rosa i Xus. Per totes les discussions científiques, per ajudar-me sempre que ho he necessitat i pel vostre entusiasme en tot allò que feu. Gràcies per fomentar un bon ambient en el laboratori amb les populars calçotades, pernilades, paelles... Sens dubte, el millor laboratori per a fer una tesi!

A les secres, Núria i Carme, gràcies per ajudar amb tota la paperassa, sobretot en aquesta recta final i per estar sempre de tan bon humor!

Gràcies Eulàlia, pel teu gran treball i per cuidar-te tant de tot i de tots nosaltres. Gràcies per les teves paraules amables i per tenir sempre un moment per ajudar-me.

Als jefecillos, gràcies per estar sempre disponibles ja sigui per a parlar de ciència, per a fer un cafè o explicar un acudit. A l'Albert, per tots els teus consells i per oferir-me un cap d'any a Moianès quan més ho necessitava, gràcies. A la Marta, perquè la teva capacitat de combinar treball i bon humor sempre m'ha fascinat; gràcies per ser tan propera i estar sempre disposada a escoltar. Gràcies per la teva paciència quan tot just començava a descobrir el món de l'apoptosi, he après molt al teu costat! Al Siscu, perquè amb tu passen molt més ràpides les hores al quartet dels microscopis! Gràcies, per ensenyar-me que la ciència també pot ser divertida. Gràcies, perquè sempre has tingut un moment per a mi quan te l'he demanat. Ets una peça clau entre tots nosaltres perquè encomanes la teva alegria i el teu bon humor a tots els que tens al costat!

I a la meva jefecilla preferida, la Montse, una gran amiga dins i fora del laboratori, gràcies per adoptar-me com a germana i ajudar-me tant des del primer dia que vaig entrar en el laboratori, gràcies pels teus savis consells científics i per apreciar-me i cuidar-me sempre! Se que hi ets pel que faci falta i tu ja saps que jo també hi soc! El teu suport en aquesta última etapa ha estat molt important per a mi. Ja ho saps, ets una de les millors persones que m'he trobat mai!

Josep Maria, Eva i Teresita, amb vosaltres he compartit menys moments, però han estat suficients com per adonar-me que la vostra amabilitat i alegria. Eva, estic contenta que hagi tornat entre nosaltres!

A les nenes del confocal, la meva segona casa aquests últims anys: Maria, Anna Lladó i Anna Bosch. No puc fer separacions perquè les tres m'heu ajudat moltíssim durant tota aquesta tesi. Gràcies per la vostra dedicació, a qualsevol hora i en qualsevol moment (eh, Maria?). Gràcies a les tres per ser tan optimistes i alegres i

animar-me quan jo veia les coses de color gris! Heu estat un gran suport en aquesta recta final! Ja ho sabeu, jo de gran vull ser com vosaltres!! Je, je!

A tots els que formaven part del grup de Biologia Cel·lular quan jo vaig arribar: Núria, Iñaki, Manolo, Raquel, Lúdia, Jorge, Elson i Maribel. Gràcies per acollir-me i ensenyar-me tot el que us preguntava quan vaig entrar al laboratori.

Milions de gràcies al grup de la bahia Neus: Al Príam, per tots els consells que m'has donat. A l'Aina, ja ho vas dir que em deixaves un tema en plena ebullició! Gràcies per obrir-me el camí que ha servit en aquesta tesi. Al Roger, gràcies per ser el meu germà gran i amic. Per les parets que hem escalat i les muntanyes que hem pujat (la veritat es que em pensava que al Cadí em moria congelada) Espero que ara que tindre una mica mes de temps tornem a reprendre les nostres aventures! A la Cristina, per ser la germana gran del grup quan jo vaig entrar. Per la teva paciència quan et preguntava les coses mil vegades, perquè com tu dius, som molt diferents però ens assemblem! I aquesta semblança ens ha portat a compartir experiències i consells. Gràcies! A la Vero, com et trobo a faltar! Hem compartit molts moments i moltes històries durant aquesta tesi i gràcies a la nostra complicitat vam aconseguir superar totes les dificultats!! Gràcies per transmetre'm la teva força i la teva passió per la ciència! Els encantadora! "*Sun is shining over the rainbow*". Ai Blanca, que t'he de dir que no t'hagi dit a aquestes alçades. Has estat una peça clau en aquesta tesi. Moltes gràcies per tot el teu suport i la teva ajuda. Has estat sempre al meu costat per ajudar-me i escoltar-me en el que sigui! M'encanta la passió que poses en tot allò que fas! Ets una gran científica i ja ho saps! Lluita pels teus somnis perquè pots arribar molt lluny! Noe, gràcies per la teva dolçor, per compartir les teves pors i sobretot els teus somriures. Perquè encara tenim molt de temps per fer tes i infusions i posar-nos al dia de les nostres aventures per l'Himalaya. *Namaste!* Sandra, quina energia! Molts ànims en aquesta nova etapa que ara comences, estic segura que tu i l'Agus sereu uns gran pares! Gràcies també als peques del grup: l'Alba i el Carles, molta sort en la vostra tesi, disfruteu molt d'aquest moment i del lloc on heu triat per fer-lo, que val molt la pena. Alba, encara tenim uns quants bailoteos pendants!!

Gràcies a la Sònia Brun, per implicar-te tant des del primer moment i donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat. Gràcies Sònia pel teu bon humor, per tots els ànims que m'has donat i per deixar-te la pell tots aquests últims mesos, ets la millor companya de la p21 que podria haver tingut. Gràcies!

Gràcies les nenes Pombe. Sandra, Moltes gràcies pels teus ànims! Tens una constància i una força increïbles i ets una gran persona. Vam començar jutes i tu ja fa temps que vas començar una nova etapa, espero que et vagi molt be! Gràcies Eva, per ser tan dolça i agradable. És una sort treballar a prop teu! Espero que puguem compartir alguna altra escapada musical. Et desitjo molta sort en la nova etapa que tot just comences. Gràcies també a l'Alba G i Natàlia, quin riure per NYC! Encara no entenc com vam deixar escapar al Danke i ens vam quedar amb la màfia russa!!!! M'encanta el vostre bon humor i les vostres ganes de fer "juerga"!! Espero recuperar el temps perdut d'aquests últims mesos! Alba G, gràcies per compartir amb mi els teus descobriments musicals!! I a la més recent, Marta, molta sort i disfruta amb els pombitos. Gràcies Alba F, per la teva naturalitat i per la teva noblesa. M'ha agradat molt compartir aquesta etapa amb tu!

Als Oriols: Marta, gràcies per les nostres confessions al Rosco, les nits a Cornellà i acollir-me a Moianès quan més ho necessitava. Sonia, gràcies per la teva energia i la teva força, gràcies perquè sempre t'has preocupat per mi. Per cert, trobo a faltar les teves històries des de que vas marxar! Gràcies al Dr. Lu, per les bones converses d'aquell estiu i per fer-me de metge de capçalera cada cop que em feia mal alguna cosa. Paky, gràcies per haver-te obert a mi, tu també ets molt maca, i

les teves paraules d'ànim m'han ajudat en molts moments! No et rendeixis mai perquè tu vals molt! Sigues valenta i ja veuràs com t'acabaràs menjant el món i aconseguint tot allò que et proposis! Ignasi, gràcies per les bromes, acudits, per fer la punyeta i per les nostres converses al metro que al dia següent ja no recordem. Gràcies per ensenyar-me que si veig la vida amb un "filtre", és d'un altre color. Miriam, gràcies per ajudar-me fa tant de temps en tots aquells FACS, aleshores em va sorprendre el teu optimisme, que encara ara em sorprèn. Ja saps que m'has fet viure un moment molt especial. Aprofita aquesta nova oportunitat i disfruta de la tesi. Patri, te haces querer des del primer dia. Gracias por mostrarte tal y como eres, por tu fuerza y tu valentia frente a la vida. Raffy, es una pena que no hayamos coincidido más momentos, espero que algún día me enseñes alguna de esas recetas italianas tan ricas! Anna, gracias por tus bromas, siempre me haces pasar un buen rato! Maria, gràcies per estar sempre de tan bon humor!

Als de "l'altre laboratori": Sílvia, Cheles i Cecília, sembla mentida que vam entrar juntes i ara cadascuna està en un moment diferent! Gràcies per les primeres experiències compartides en aquest laboratori. Laia, ja t'ho he dit en altres ocasions, però la companyia i els ànims que m'has donat en aquesta ultima etapa m'han ajudat moltíssim a tirar endavant. Gràcies per estar a l'altre costat dels mails i de les trucades desesperades! Ens devem tants cafès que acabarem taquicàrdiques!!! Però tranquil·la, que ara comença una nova etapa on podrem compartir moltes més coses! Elena, gracias por tu sinceridad y por saber escuchar siempre que te lo he pedido. Maite, gràcies per transmetre'm tranquil·litat. Espero que ens continuem trobant en eventos festivaleros!! Sandra, la teva mirada em transmet força i serenitat. Gràcies per la teva amabilitat. M'encantaria que poguéssim fer juntes alguna d'aquestes excursions que de tant en tant ens expliquem! Molts ànims que ja estàs a punt d'entrar en la recta final!! Maria Molinos, gràcies pel teu carinyo i la teva atenció. I als nous, Meritxell, Albert i Adam, molta sort en aquesta etapa!

Jaumet, tu de quin grup ets? El meu primer company de poyata! Gràcies per aportar sempre el teu bon humor i la teva bona música (bé, excepte la terremoto!) i com no, el teu punt de bogeria entre tants científics sueltos!

Als que han passat pel laboratori: Carles Rentero, Jan Class i Raquel Fucho, per connectar amb mi tan ràpidament des del primer dia. Raquel, *"All of me why don't take all of me!"*, ja saps que em vas fer un dels millors regals d'aniversari, moltes gràcies.

I finalment vull agrair a dos persones molt especials que he trobat fent aquesta tesi, les meves dues científiques preferides!!! Sense vosaltres res hauria estat igual! Gràcies per confiar en mi i ajudar-me a confiar en mi mateixa, gracies per tots els moments que hem compartit juntes i que no oblidaré mai. Jemina, gràcies per encomanar-me les teves ganes de ballar i de fer coses, i per les nostres vacances mafiosilles per Itàlia!!! Mireia, estrelleta, gracies per animar-me a seguir els meus somnis i a ser tot un exemple de força, energia i vitalitat, que també m'encomanes!! Crec que podria fer una llista molt més llarga, però tot i així no trobaria totes les paraules per agrair-vos tots aquests anys i tots els que encara ens queden. Us estimo molt!

Als de histo, gràcies per les històries al quartet de dinar. Al JuanMa, al Jesús, al JR i la Empar per preguntar-me sempre com m'anaven les coses i al Dani del Toro per treure'm de mes d'un "apuro". Gràcies Dani, perquè sempre tens un moment per ajudar-me!

Gracias a Miguel y Maite, por vuestro apoyo científico y vuestra gran sabiduría en el mundo del núcleo y del nucleolo. Y sobretodo por quererla compartir conmigo.

Gracias a todos los del laboratorio por acogerme durante mi estancia en Santander. Rocío, mil gracias por hacerme sentir como en casa!

I would like to thank Jan Christiansen, my first boss who gave me my first project. You have always been an inspiration for me! I learned a lot about the lab and life working with you! You are one of the best people I have ever met! Thanks also to Lena and all the people from the lab who always helped me and made me feel like home!

Gràcies a tots els de Bio pels biodinars, biosopars, biopastissos, biofestes, bioalçotades, biotot... i tots els moments compartits des de de que vam dir: "Jo de gran vull ser biòleg". En especial a la Esti perquè tens un gran cor i omplés de passió tot allò que fas i et proposes. A la Núria per la teva alegria contagiosa i la teva innocència. A l'Olga, mil gràcies per TOT! Ets una peça clau en la meua vida. Crec que no tinc paraules suficients per agrair-te tots els moments que em passat juntes! A la Gemma per les teves bogeries i per les ganes de fer el pallasso que m'encomanes. A la Mireia Bartons per la teva dolçor i la teva innocència que m'encanta! Tenim que recuperar les nostres sortides a la muntanya!!! A l'Enric per aprendre tant l'un de l'altre. Al Miquel per ser un gran amic a BCN o des de NYC, és igual on visquis perquè se que sempre hi ets quan ho necessito, gràcies! A l'Albert, el Pau, la Maria, la Fina i el Mario per tots els bons bio-moments!

I a les nenes de Bordeus 33, l'Anna i l'Antònia. Juntes vam començar dues aventures paral·leles que poc a poc ja hem anat acabant. Hem compartit una etapa de la nostra vida irreplicable i inoblidable! Moltes gràcies per tot el que hem viscut juntes i tot el que encara viurem! També vull donar les gràcies a tots els altres que han passat pel nostre piset: al Salvatore per la teva amabilitat, la Laura perquè també has portat bons moments a Bordeus 33, a l'Amparo per ser una genial inquilina de los jueves i a la Hannah-Dexter (mandonguilles i autobusus!!!) per la alegria i la complicitat de esos meses que compartimos!

Als de sempre: Anna Domenech, Mireia Navarro, Erni, Gemma, Marta Martinez, Betlem, Sílvia, Roser, Àfrica i Noelia; i als que he trobat per camí: Ivan, Álvaro, Jacob, Miriam, Marta, Ainara i Anna Morera... pels moments inoblidables (podria fer una llarga llista de cada un de vosaltres) que hem viscut junts!

A la Maite per estimar-me com una més de la família des del primer moment, al Ramón per la seva curiositat científica que m'ha fet replantejar i reflexionar sobre totes les coses encara més i a l'Andreu per ensenyar-me a mirar la vida des d'un altre costat i fer-me veure que a vegades no em tinc que escalfar tant el cap, que tot es mes senzill.

Gràcies a la meua família; als grans (iaia, tietes i tiets) pels vostres savis consells, als no tan grans (cosines i marits) per estar sempre al meu costat, a les mitjanes per confiar-me els seus secrets i a les peques per arrencar-me milers de somriures. A tots per estimar-me tal com sóc, per ajudar-me a creure més en mi mateixa i fer-me sempre costat. Gràcies en especial a la Iaia Rosa, perquè sempre m'has cuidat i estimat moltíssim! I jo també! Quan et veig somriure, sóc la persona més feliç del món!!! Special thanks to Ian, my Guinness friend!! Thanks for our beer talks and for taking care of me always. We will have to celebrate this!!!

També vull donar les gràcies a les persones més importants de la meua vida. Gràcies als meus pares per estimar-me tal i com sóc i ensenyar-me grans valors, per confiar en mi i animar-me en tot moment. Mama, gràcies per tot el que fas per mi, només tu saps cuidar-me tan bé! Gràcies per la teva tendresa i la teva bondat. Ets la millor! Papa, gràcies per encomanar-me la teva passió per les muntanyes que ens ha fet arribar molt lluny i viure moments impressionants, per animar-me a seguir endavant tot i els obstacles, perquè encara que no t'ho sembli saps com

ajudar-me a tirar endavant. La vostra ajuda en aquesta ultima etapa, ha fet que hagi pogut disfrutar realment de l'escriptura de la tesi i que no em tingués que preocupar per res més. Moltes gràcies! Us estimo molt!

Anna, la meva germaneta preferida!!! Quanta sort tinc de tenir una germana com tu!! Gràcies per cuidar-me i per ser a prop meu tot i la distància, ja saps que en molts moments et trobo a faltar! Moltes gràcies pels ànims telefònics i a través de la webcam. Ara que seré una mica més lliure, espero poder-te visitar molt més sovint! T'estimo!

Germán, ja ho saps que ets la millor cosa que m'ha portat aquesta tesi!! Qui m'ho havia de dir que amb aquelles primeres mirades entre falcons, eppendorf i vasos de precipitats ara compartiríem un projecte de vida junts. Gràcies per ensenyar-me tantes coses i per ajudar-me a creure més en mi mateixa, per tots els moments inoblidables que hem viscut i els que ens esperen. Al teu costat tot és una mica més fàcil! Aquesta tesi també va dedicada a tu i a tot el teu esforç durant aquests últims mesos per fer-me costat de manera incansable.

Finalment, també vull agrair a tots aquells amb qui he pujat muntanyes, ja des de molt petita; he après molt, de les muntanyes i de tots els que m'heu acompanyat durant el camí, perquè cada cim és un petit objectiu i molts cops sembla difícil poder arribar a dalt, però quan hi arribo i contemplo les increïbles vistes, me n'adono que l'esforç realitzat durant la pujada ha valgut la pena!



Neus

Barcelona, Maig del 2009

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. El cicle cel·lular.....	3
1.1 Aspectes generals.....	3
1.2 El control del cicle cel·lular: complexos Cdk-ciclina.....	5
1.3 Substrats de les Cdk.....	9
1.4 Regulació dels complexos Cdk-ciclina.....	12
1.5 Els <i>checkpoints</i> de dany al DNA.....	18
1.6 Cicle cel·lular i càncer.....	22
2. La proteïna p21^{Cip1}.....	23
2.1 Estructura de p21 ^{Cip1}	24
2.2 Proteïnes d'unió a p21 ^{Cip1}	27
2.3 Funcions de p21 ^{Cip1}	30
2.4 Regulació dels nivells de p21 ^{Cip1} : transcripció i degradació.....	47
2.5 Modificacions post-traduccionals de p21 ^{Cip1} : la fosforilació.....	52
2.6 p21 ^{Cip1} <i>knockouts</i> i càncer.....	56
3. La regulació de proteïnes per Ca²⁺, CaM i PKC.....	58
3.1 Calci i calmodulina.....	58
3.2 Proteïnes d'unió a CaM.....	60
3.3 Processos regulats per CaM.....	61
3.4 Proteïna cinasa C.....	63
3.5 Regulació de proteïnes per CaM i PKC.....	65
3.6 p21 ^{Cip1} , CaM i PKC.....	66
4. El nuclèol.....	68
4.1 El nuclèol: fàbrica de ribosomes.....	68
4.2 Noves funcions del nuclèol.....	73
4.3 Nuclèol i malalties humanes.....	78
OBJECTIUS.....	79
MATERIALS I MÈTODES.....	83
1. Plàsmids.....	85
2. Cultius Cel·lulars.....	87
2.1 Models cel·lulars i manteniment de cèl·lules en cultiu.....	87
2.2 La sembra de les cèl·lules.....	88
2.3 Congelació i descongelació de cèl·lules.....	88
2.4 Transfecció de les cèl·lules.....	89
2.5 Tractaments cel·lulars.....	89

3. Cultius Bacterians.....	90
3.1 Soques i medis de cultiu.....	90
3.2 Transformació bacteriana.....	90
3.3 Obtenció i purificació de DNA.....	91
3.4 Expressió i purificació de proteïnes de fusió.....	91
4. Electroforesi, transferència i immunodetecció.....	94
4.1 Obtenció de lisats cel·lulars.....	94
4.2 Fraccionaments cel·lulars.....	94
- Fraccionament de nuclis.....	94
- Fraccionament de nuclèols.....	95
4.3 Valoració de la concentració de proteïna.....	97
4.4 Electroforesi en una dimensió.....	97
4.5 Electroforesi en dues dimensions.....	97
4.6 Tinció de gels.....	99
4.7 <i>Western blot</i> : electrotransferència i immunodetecció	100
5. Microscòpia de fluorescència.....	102
5.1 Immunocitoquímica.....	102
5.2 Tincions de DNA, RNA i actina.....	104
5.3 Microscòpia de fluorescència.....	104
5.4 Microscòpia confocal.....	105
5.5 Experiments de fotoextinció: FLIP i FRAP.....	106
6. Microscòpia electrònica.....	109
6.1 Microscòpia electrònica convencional.....	109
6.2 <i>Immunogold</i>	110
7. Tècniques “in vitro”.....	111
7.1 Assaigs d'unió de CaM-Sefarosa a proteïna purificada.....	111
7.2 Assaig d'unió de pèptids-Sefarosa a CaM pruíficada.....	111
7.3 BIAcore.....	112
8. Tècniques “in vivo”.....	113
8.1 Assaig de viabilitat: MTS.....	113
8.2 Assaig de formació de clons.....	113
8.3 Detecció de cèl·lules en fase S (BrdU).....	114
8.4 Determinació de les fases del cicle cel·lular per citometria de flux....	115
8.5 Viabilitat cel·lular.....	116
8.6 Activitat transcripcional del nuclèol (<i>Run-on transcription assay</i>).....	116

RESULTATS.....	117
I. Estudi de la funcionalitat de la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC..	123
I.1 Estudi de la localització cel·lular dels residus pseudofosforilats.....	123
I.2 La fosforilació <i>in vivo</i> del residu serina 153 de p21 ^{Cip1} està regulada per CaM i PKC.....	129
I.3 La fosforilació per PKC de p21 ^{Cip1} en el residu Ser153 indueix la localització citoplasmàtica de p21 ^{Cip1}	132
I.4 La pseudofosforilació del residu Ser153 de p21 ^{Cip1} inhibeix la unió entre p21 ^{Cip1} i CaM.....	133
I.5 La unió de la CaM a la p21 ^{Cip1} no és essencial per a la translocació nuclear de p21 ^{Cip1}	134
I.6 Estudi de la funcionalitat de la p21 ^{Cip1} fosforilada en la Ser153.....	135
I.7 Estudi de la funcionalitat de la p21 ^{Cip1} citoplasmàtica: paper en l'apoptosi	138
II. Estudi de la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol.....	147
II.1 El tractament amb 0,15 µg/ml Adr provoca una parada del cicle cel·lular en G ₂ /M i una baixa mort cel·lular.....	147
II.2 El dany al DNA indueix la localització de p21 ^{Cip1} al nuclèol.....	150
II.3 GFP-p21 també es localitza als nuclèols en resposta al dany al DNA.....	153
II.4 Estudi en detall de la estructura nucleolar formada per p21 ^{Cip1}	155
II.5 Anàlisi dels dominis de p21 ^{Cip1} importants per a la localització de p21 ^{Cip1} al nuclèol.....	159
II.6 La localització de p21 ^{Cip1} al nuclèol és el resultat d'un equilibri dinàmic entre el nuclèol i el nucleoplasma.....	161
II.7 El dany al DNA provoca la desorganització del nuclèol.....	164
II.8 p21 ^{Cip1} es localitza en un compartiment nucleolar que no conté UBF ni fibril·larina.....	165
II.9 Estudi de la desorganització del nuclèol i de la localització de p21 ^{Cip1} mitjançant microscòpia electrònica.....	166
II.10 Altres estímuls com la llum UV també indueixen la desorganització del nuclèol i la presència de p21 ^{Cip1} en el INoB.....	168
II.11 p21 ^{Cip1} es localitza en un compartiment nucleolar que no conté RNA ni DNA.....	170
II.12 Els nuclèols positius per a p21 ^{Cip1} no són transcripcionalment actius.....	171
II.13 Els INoBs induïts per Adr també contenen proteïnes del <i>checkpoint</i> del dany al DNA i proteïnes reguladores del cicle cel·lular.....	173
II.14 La formació dels INoBs i la localització en el nuclèol de les proteïnes del <i>checkpoint</i> de dany al DNA i reguladores del cicle cel·lular després del dany al DNA és dependent de p21 ^{Cip1}	180
II.15 SUMO-1 i p21 ^{Cip1} colocalitzen en el mateix compartiment nucleolar després del tractament amb Adr.....	184

II.16 L'acumulació de p21 ^{Cip1} en el nuclèol correlaciona amb una disminució del seu transport entre el nucli i el citoplasma.....	187
II.17 El nuclèol de les cèl·lules control està en contacte directe amb l'embolcall nuclear i és un lloc de pas per a p21 ^{Cip1}	191
II.18 La inhibició de l'export de ribosomes indueix l'acumulació nucleolar de p21 ^{Cip1}	194
II.19 Altres proteïnes que participen en diferents vies de modificació post-traduccional de proteïnes també es localitzen en els nuclèols després del dany al DNA.....	197
III. Annexos.....	201
III.1 Annex 1: Vídeos de la formació i la recuperació del INoB.....	201
III.2 Annex 2: Vídeos dels experiments de fotoextinció: FLIP i FRAP.....	203
III.3 Annex 3: Immunocitoquímiques de proteïnes localitzades en el INoB en resposta al tractament amb Adr.....	205
DISCUSSIÓ.....	207
1. Regulació de la localització nucli-citoplasma de p21 ^{Cip1} per la fosforilació per PKC en Ser153.....	209
2. Anàlisi de la funcionalitat de p21 ^{Cip1} fosforilada en el residu Ser153.....	214
3. Paper de la p21 ^{Cip1} en l'apoptosi.....	215
4. Localització nucleolar de p21 ^{Cip1} en resposta al dany al DNA.....	218
5. INoB i modificació post-traduccional de proteïnes.....	225
6. Canvis en el transport nucli-citoplasma de p21 ^{Cip1} induït per dany al DNA.....	227
7. En resum.....	229
CONCLUSIONS.....	231
BIBLIOGRAFIA.....	235

INTRODUCCIÓ

1. EL CICLE CEL·LULAR

1.1 Aspectes generals

La divisió d'una cèl·lula eucariota consisteix en un conjunt de processos ordenats, coordinats i seqüencials que donaran lloc a dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. Durant el cicle cel·lular, les cèl·lules augmenten el seu tamany, dupliquen el seu material genètic i finalment reparteixen el seu contingut citoplasmàtic i nuclear entre les dues cèl·lules filles.

Les primeres descripcions del cicle cel·lular indicaven que estava format per dues etapes morfològicament diferenciades: la mitosi, moment en el qual tenia lloc la divisió nuclear; i la interfase, considerada com el període de temps necessari que havia de transcorre entre dues mitosi. Actualment es considera que la interfase està formada per tres etapes diferenciades: G_1 , S i G_2 (revisat en (Norbury and Nurse, 1992)).

Així doncs, el cicle cel·lular està format per quatre fases. És en la fase G_1 quan la cèl·lula rep i interpreta els diferents estímuls proliferatius, incrementa la seva massa cel·lular i sintetitza tota la maquinària necessària per a la síntesi del DNA. Seguidament, té lloc la fase S durant la qual es replica el DNA i s'obtenen dues còpies de material genètic. Posteriorment comença la fase G_2 , moment en el qual es comprova que la duplicació del DNA ha tingut lloc correctament i la cèl·lula es prepara per a entrar en fase de mitosi (M). És en la fase M on té lloc la segregació i divisió dels cromosomes replicats i el repartiment del contingut cel·lular (citoquinesi) entre les dues cèl·lules filles (Figura 1).

Cal destacar que la major part de les cèl·lules no proliferen de manera continuada, sinó que la capacitat de proliferar es perd en cèl·lules ja diferenciades que formen part d'un teixit, aquestes cèl·lules es troben en estat de quiescència o G_0 . Només quan les cèl·lules es troben en fase G_1 i abans de començar a replicar el seu DNA poden entrar en estat de quiescència. En presència de senyals mitogènics o d'estímuls específics, les cèl·lules en G_0 podran entrar novament en fase G_1 (revisat (Vermeulen *et al.*, 2003)).

Durant el cicle cel·lular, la cèl·lula rep i integra senyals extracel·lulars. A més, la cèl·lula s'ha d'assegurar que la divisió només tindrà lloc si existeixen les senyals adequades i l'entorn és també l'adequat. És en la fase G_1 durant la qual la cèl·lula és

INTRODUCCIÓ

sensible als senyals de l'exterior i decideix si avança cap una altra divisió cel·lular o si entra en estat de quiescència (revisat en (Sherr, 1994)). El terme “punt de restricció” (R), situat al final de la fase G₁, es defineix com a punt de no retorn; per tant, un cop sobrepassat el punt de restricció la cèl·lula està compromesa a completar el cicle cel·lular independentment dels senyals extracel·lulars (Pardee, 1974).

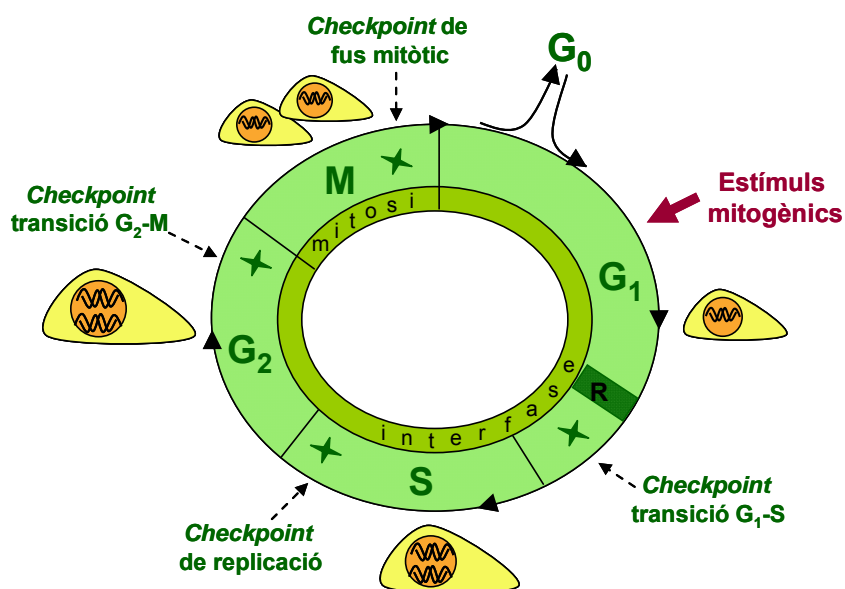


Figura 1: Representació de les diferents fases del cicle cel·lular. Fase G₁ (Gap1), fase S (Síntesi), fase G₂ (Gap2), fase M i fase G₀. També s'indica el punt de restricció (R) i la localització dels diferents checkpoints (★) dins del cicle cel·lular.

Existeixen altres controls addicionals o sistemes de vigilància cel·lulars, anomenats *checkpoints*. Els *checkpoints* asseguren la correcta progressió a través del cicle cel·lular, ja que s'encarreguen de verificar constantment l'estat de la cèl·lula per tal de detectar possibles errors comesos en alguna de les fases del cicle (Hartwell and Weinert, 1989). Els *checkpoints* són els encarregats d'aturar el cicle i evitar que la cèl·lula entri a la següent fase cel·lular si no s'ha completat amb èxit la fase prèvia. Actualment es coneixen diferents *checkpoints* entre els quals destaquem els *checkpoints* de dany al DNA (situats en diferents moments del cicle cel·lular) i el *checkpoint* de formació del fus mitòtic (localitzat a la fase M).

Davant la presència de dany al DNA, s'activarà el *checkpoint* de dany al DNA corresponent, depenent de la fase en que es trobi la cèl·lula, que engendrarà diferents vies de senyalització per tal d'aturar el cicle cel·lular. Un cop activades, aquestes vies de senyalització donaran el temps necessari a la maquinària de reparació del DNA per a reparar el dany abans de continuar amb la progressió del cicle. La proteïna principal d'aquesta tesi, la p21^{Cip1}, forma part de la resposta desencadenada per tal d'aturar el

cicle cel·lular enfront al dany DNA com veurem amb més detall en apartats posteriors d'aquesta introducció. Els *checkpoints* de dany al DNA es situen en diferents moments del cicle cel·lular: transició G₁-S, on el *checkpoint* comprova que el DNA es trobi en perfectes condicions abans de ser replicat; transició G₂-M, on es verifica que la replicació s'ha produït correctament i que no hi ha alteracions o dany en el DNA; i també durant la fase S, anomenat també *checkpoint* de replicació, on el *checkpoint* s'encarrega d'aturar la replicació i l'elongació de les cadenes de DNA. D'altra banda, el *checkpoint* de formació del fus mitòtic detecta qualsevol anomalia en l'alineament dels cromosomes al fus mitòtic i s'encarrega d'aturar el cicle abans de l'anafase, prevenint així una mala segregació de les cromàtides germanes en les cèl·lules filles (revisat en (Vermeulen *et al.*, 2003)).

Tal hi com hem explicat, el cicle cel·lular juga un paper decisiu dins el context cel·lular ja que és l'encarregat de controlar la proliferació i el creixement cel·lular i de prendre decisions sobre si és necessari enviar una cèl·lula danyada cap a la mort cel·lular programada (apoptosi). Tot això fa que la correcta regulació del cicle cel·lular sigui d'extrema importància ja que alteracions en aquest poden tenir conseqüències dràstiques per a la cèl·lula. Actualment, els estudis de la regulació del cicle cel·lular i les seves possibles alteracions són de gran importància per a entendre malalties com el càncer (revisat a (Sherr, 1996;Pavletich, 1999)).

1.2 El control del cicle cel·lular: complexos Cdk-Ciclina

Tal i com hem vist a l'apartat anterior, la correcta transició entre les fases del cicle cel·lular és de vital importància per a la cèl·lula i és per aquest motiu que la seva regulació esdevé molt important.

Estudis inicials en mutants de llevats i en oòcits de *Xenopus* van permetre identificar, respectivament, la presència de gens encarregats de regular la progressió del cicle cel·lular (Nurse, 1975), així com determinar l'existència de factors encarregats d'induir l'entrada en una fase determinada del cicle (Gautier *et al.*, 1988;Lohka *et al.*, 1988). Més endavant, es va poder observar que el sistema de control del cicle cel·lular és similar en tots els organismes eucariotes. Estudis posteriors van corroborar que la transició entre les diferents fases del cicle cel·lular era un procés altament ordenat i regulat gràcies a la presència d'una família de serina-treonina cinases anomenades cinases dependents de ciclina o Cdk, que s'activen en moments concrets i específics del cicle cel·lular (revisat en (Morgan, 1997;Vermeulen *et al.*, 2003)).

INTRODUCCIÓ

Les Cdks funcionen com a processadors d'informació capaces d'integrar els senyals extracel·lulars i intracel·lulars, i asseguren una acurada coordinació del cycle cel·lular fent front als canvis de l'entorn o a possibles errades que es produeixin. L'activitat d'aquestes Cdks és essencial per a la correcta regulació del cycle cel·lular. La desregulació d'aquesta maquinària pot provocar un creixement cel·lular descontrolat i originar el desenvolupament de processos tumorals (revisat en (Sherr, 1994;Morgan, 1997)).

Les Cdks no actuen soles, ja que la seva capacitat de coordinar les diferents fases del cycle cel·lular és completament depenent de la seva associació a una subunitat reguladora anomenada ciclina. Així doncs, la progressió del cycle cel·lular està regulada per uns complexos heterodimèrics, formats per una subunitat catalítica anomenada Cdk i una subunitat reguladora anomenada ciclina, la qual és l'encarregada d'unir-se a la Cdk per tal de formar el complex actiu. (revisat en (Morgan, 1997))

Els nivells proteics de la subunitat catalítica de les Cdks es mantenen constants durant el cycle cel·lular, a diferència de les seves subunitats reguladores, les ciclines. Els nivells de les ciclines augmenten i disminueixen al llarg del cycle cel·lular i d'aquesta manera s'aconsegueix l'activació de forma periòdica de les diferents Cdks (Evans *et al.*, 1983;Pines, 1991). Cada Cdk pot associar-se amb diferents ciclines, i és la ciclina associada la que determina quines proteïnes seran fosforilades pel complex actiu (revisat en (Vermeulen *et al.*, 2003)).

En llevat només es coneix una Cdk (Cdc28 en *Saccharomyces cerevisiae* o Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe*) que s'activa a l'unir-se a diferents ciclines específiques que són induïdes en resposta a diferents estímuls segons la fase del cycle cel·lular (Nurse, 1975). En humans i en models de ratolí, s'han identificat onze gens que codifiquen per a les Cdks (Cdk1-Cdk11) i nou gens que codifiquen per a proteïnes "Cdk-like", totes elles formen part d'una família de Cdks que inclou unes vint proteïnes (revisat en (Malumbres, 2005;Malumbres and Barbacid, 2005)). Només cinc Cdks estan actives durant el cycle cel·lular: a la fase G₁ (Cdk4, Cdk6 i Cdk2), a la fase S (Cdk2) i a les fases G₂ i M (Cdk1) com es pot observar en l'esquema de la figura 2. El paper de Cdk3 en la regulació del cycle cel·lular no està clar ja que aquest gen no s'expressa en molts tipus cel·lulars i està inactiu en el genoma de ratolí (revisat en (Morgan, 1997;Vermeulen *et al.*, 2003;Malumbres, 2005))

La Cdk7 actua en combinació amb la ciclina H, formant el complex anomenat CAK (*Cdk-activating kinase*) (Fisher and Morgan, 1994). Com veurem posteriorment, aquest complex juga un paper important en l'activació dels complexos Cdk-ciclina que regulen el cicle cel·lular. A les altres Cdk descrites encara no se'ls hi ha atribuït cap paper en la progressió del cicle cel·lular tot i que sí que intervenen en processos de regulació de la transcripció i diferenciació, entre d'altres (revisat en (Malumbres, 2005)).

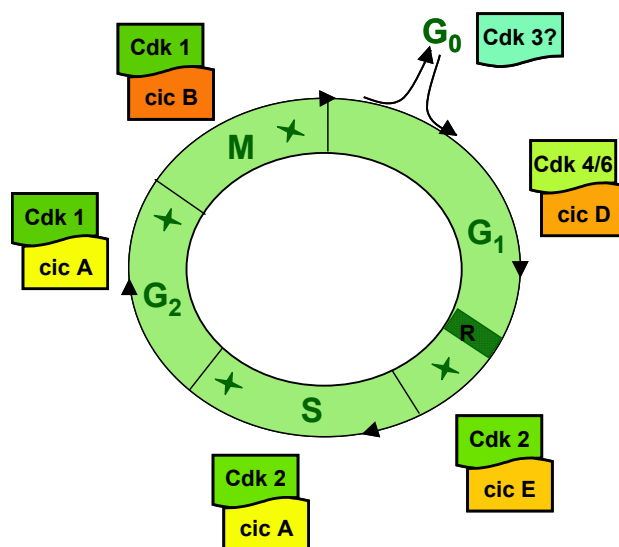


Figura 2: Distribució dels complexos Cdk-ciclina durant les diferents fases del cicle cel·lular.

Amb l'anàlisi del genoma humà, s'han identificat 29 gens que codifiquen pels 150 aminoàcids de la regió anomenada "*cyclin-box*". La regió "*cyclin-box*" de les ciclins és la regió responsable de la unió a les Cdks (revisat en (Vermeulen *et al.*, 2003; Malumbres and Barbacid, 2005)). Igual que en el cas de les Cdks, no totes les ciclins identificades tenen un paper en la regulació del cicle cel·lular. Com s'indica en la figura 2, diferents ciclins són necessàries per a la progressió a través de les diferents fases del cicle cel·lular; en cada una de les fases, la ciclina corresponent formarà un complex actiu associant-se a la seva subunitat catalítica o Cdk.

La ciclina D (de la qual existeixen 3 tipus: ciclina D1, D2 i D3) s'uneix a Cdk4 i Cdk6. Els complexos Cdk4/6-ciclinaD són essencials per a la entrada en G₁ (Sherr, 1994) com veurem amb més detall posteriorment. A diferència de les altres ciclins, la ciclina D no s'expressa de forma periòdica, sinó que la seva síntesi depèn de l'estimulació per part dels factors de creixement (Assoian and Zhu, 1997). La ciclina E

INTRODUCCIÓ

també juga un paper important en la fase G_1 ja que s'associa a Cdk2 i s'encarrega de regular la progressió G_1 -S (Ohtsubo *et al.*, 1995). La ciclina A s'uneix a Cdk2 i forma el complex necessari per a la fase S (Girard *et al.*, 1991; Walker and Maller, 1991). Cap al final de la fase G_2 i principi de la fase M, la ciclina A canvia de parella i s'uneix a la Cdk1, aquest nou complex promou la entrada en fase M. Posteriorment, la mitosi serà regulada pel complex Cdk1-ciclina B (King *et al.*, 1994; Arellano and Moreno, 1997).

Fins fa poc es creia que l'activitat d'aquests complexos Cdk-ciclina específics de cada fase del cicle cel·lular era essencial per a la regulació del cicle. Sorprenentment, estudis recents en ratolins *knockout* per alguna d'aquestes proteïnes reguladores del cicle, han demostrat que els membres d'aquestes famílies presenten cert nivell de redundància que els hi permet cert grau de compensació davant la falta d'algun complex Cdk-ciclina en particular. Això fa pensar que alguns d'aquests complexos no són imprescindibles per al cicle cel·lular tal i com es creia anteriorment. Per exemple, la pèrdua de Cdk2, Cdk3, Cdk4 o de Cdk6 és compatible amb l'embriogènesi en ratolins, de fet, l'absència d'aquestes cinases de manera individual només afecta a alguns tipus cel·lulars específics. Una possible explicació d'aquests fenotips, seria la gran homologia estructural i funcional que existeix entre algunes de les diferents Cdks, com per exemple entre Cdk4 i Cdk6, que permetria una possible compensació de la funció entre elles quan manca una. D'una banda, el doble *knockout* Cdk2-Cdk6 no presenta cap efecte sinèrgic per la pèrdua de dues Cdks ja que els ratolins són viables amb un fenotip igual al dels mutants simples. D'altra banda els ratolins doble *knockout* Cdk4-cdk6 presenten un fenotip més sever ja que moren a les darreres fases del desenvolupament embrionari. Aquests resultats mostren un cop més la compensació parcial entre aquestes Cdks, ja que com acabem de veure els ratolins *knockout* poden sobreviure en absència d'una de les Cdks d'interfase o fins i tot, de dues. Resultats similars s'han obtingut amb l'ablació d'algunes de les subunitats activadores de les Cdks, com per exemple les ciclines tipus D i E. En canvi, ratolins deficientes en Cdk1 presenten un fenotip totalment diferent ja que són letals des dels primers estadis del desenvolupament embrionari. Aquest tipus d'estudi en models animals està donant molta informació del possible paper de cadascuna de les Cdks en les cèl·lules de mamífers i obre un camp d'estudi molt important per a poder dissenyar futures teràpies efectives contra el càncer (revisat en (Sherr and Roberts, 2004; Malumbres, 2005; Sanchez and Dynlacht, 2005; Malumbres and Barbacid, 2005).

Recentment, Santamaría i col·laboradors van observar com ratolins sense cap Cdk d'interfase (Cdk2, Cdk3, Cdk4 i Cdk6) no presentaven problemes d'organogènesi ni desenvolupament fins a les etapes de la meitat de la gestació. Aquests resultats

indiquen que la Cdk1 és l'única Cdk essencial per al cicle cel·lular i que en absència de les Cdks d'interfase, la Cdk1 és capaç d'unir-se a totes les ciclins i executar els esdeveniments necessaris per a la correcta divisió cel·lular i progressió del cicle (Santamaria *et al.*, 2007).

1.3 Substrats de les Cdks

Quan les Cdks són actives fosforilen els seus substrats i com a conseqüència es produeixen canvis fisiològicament rellevants per a la progressió del cicle cel·lular. Les fosforilacions per part de les Cdks tenen un paper important en la regulació de la transcripció, ja sigui reprimint-la o activant-la, i se sap que aquests dos tipus de control sobre la transcripció són imprescindibles per a la correcta progressió a través de totes les fases del cicle cel·lular (revisat en (Vermeulen *et al.*, 2003; Sanchez and Dynlacht, 2005)).

El principal substrat de les Cdks durant la fase G₁, i més rellevant per a de la progressió del cicle cel·lular, és el producte del gen del retinoblastoma (pRb), un gen que pertany a la família de les proteïnes *pocket* (pRb, p107 i p130) (Weinberg, 1995). pRb és el principal substrat dels complexos Cdk4-ciclina D i Cdk6-ciclina D, encara que totes les Cdks actives durant el cicle cel·lular (Cdk1, 2, 3, 4 i 6) també poden fosforilar pRb i inhibir la seva funció com a repressor transcripcional (Sherr, 2000; Ren and Rollins, 2004). pRb actua com a repressor de la transcripció unint-se i modulant l'activitat de: factors de transcripció com els membres de la família E2F; de les histones deacetilases (HDAC) i dels complexos remodeladors de la cromatina (revisat en (Cobrinik, 2005)).

Durant l'entrada en G₁, la proteïna pRb és fosforilada pels complexos Cdk4-ciclina D i/o Cdk6-ciclina D i aquesta fosforilació de pRb provoca la disrupció del complex format amb la HDAC i l'alliberament dels factors de transcripció E2F-1 i DP-1 (Figura 3). Un cop alliberats, els factors de transcripció E2F-1 i DP-1 regularan positivament la transcripció de gens els quals donaran com a producte proteïnes necessàries per a la progressió del cicle, per a la entrada en fase S i per a la síntesi del DNA, com per exemple la ciclina E, ciclina A i la Cdc25 (Buchkovich *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1993; Brehm *et al.*, 1998).

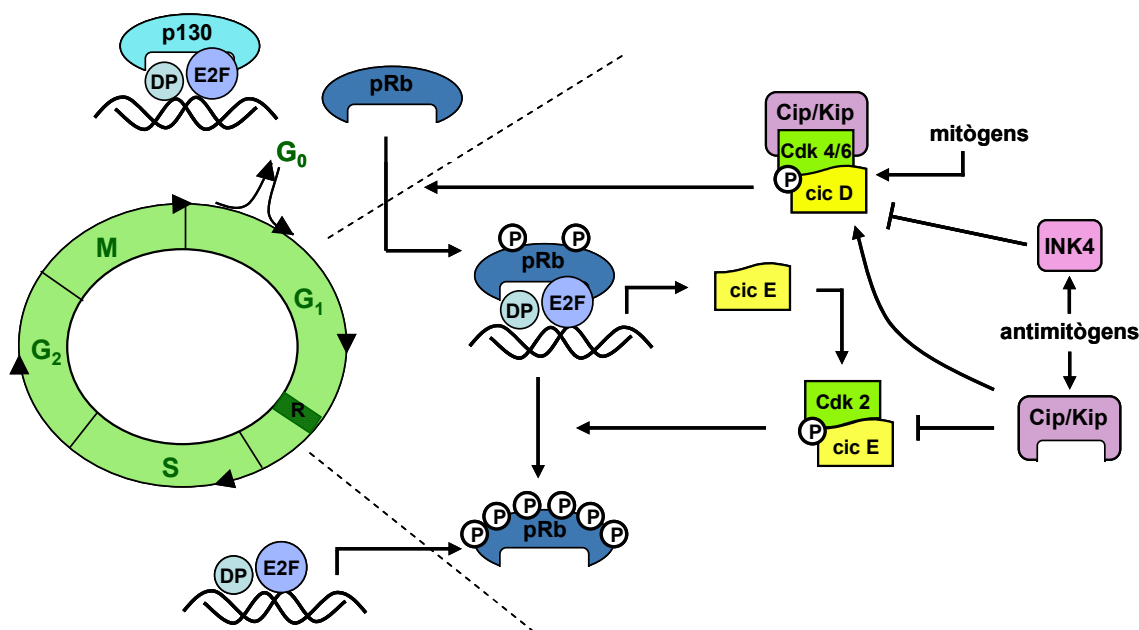


Figura 3: Regulació de la fase G₁ i de la transició G₁/S. En cèl·lules quiescents, els factors de transcripció E2F i DP estan units a la proteïna *pocket* p130 que els manté inactius. En canvi, a la fase G₁ predominen els complexos pRb-E2F-DP. En resposta als estímuls mitogènics, es comença a sintetitzar ciclina D i es formen els complexos Cdk4/6-ciclina D actius que fosforilen pRb. pRb fosforilat parcialment es manté unit a E2F-DP i aquest complex actiu s'encarrega de hiperfosforilar a pRb que s'allibera de E2F-DP i permet l'expressió de gens necessaris per a la transició G₁/S (adaptat de (Malumbres and Barbacid, 2001)). En resposta a senyals antimitogènics les proteïnes INK4 i Cip/Kip poden inhibir els complexos Cdk-ciclina, com veurem en l'apartat 1.4.

pRb es manté en estat d'hiperfosforilació durant la resta del cicle cel·lular i és el complex Cdk2-ciclina E l'encarregat de mantenir aquest estat d'hiperfosforilació. L'estat d'hiperfosforilació de pRb fa irreversible la seva inactivació i és a partir d'aquest moment quan les cèl·lules poden continuar el cicle independentment dels estímuls mitogènics i superar el punt de restricció (R) (revisat en (Harbour and Dean, 2000) (Malumbres and Barbacid, 2005)). Es creu que la Cdk3 podria estimular la fosforilació de pRb i promoure la transició G₀-G₁ en algunes cèl·lules de tumors humans (Ren and Rollins, 2004). En les fases posteriors del cicle cel·lular, les Cdks que formen complexos amb ciclina A i ciclina B, s'encarreguen de mantenir a pRb en un estat d'hiperfosforilació fins que les cèl·lules surten de la mitosi. Després de la mitosi pRb retorna a un estat d'hipofosforilació i queda preparat per a la següent entrada en fase G₁ (Ludlow *et al.*, 1993).

El complex Cdk2-ciclina E no només fosforila pRb, sinó que la seva activitat també és essencial per a iniciar la replicació del DNA. Per exemple, aquest complex ajuda a l'activació dels orígens de replicació al fosforilar a Cdc6. Cdk2-ciclina E també fosforila la histona H1 i aquesta fosforilació pot ser important en la condensació dels

cromosomes necessària per a la replicació del DNA. La histona H1 també es substrat del complex Cdk1-ciclina B (revisat en (Vermeulen *et al.*, 2003;Malumbres and Barbacid, 2005)).

Durant la transició G₁/S i a la fase S el complex Cdk2-ciclina E i Cdk2-ciclina A actius, fosforilen el seu propi inhibidor, p27^{Kip1}, induint així la degradació dependent de proteasoma d'aquest inhibidor (Montagnoli *et al.*, 1999). Un cop les cèl·lules ja han entrat en fase S, el complex Cdk2-ciclina E ha de ser silenciats per evitar la re-replicació del DNA, això és possible gràcies a la ràpida degradació dependent d'ubiquitina de la ciclina E via proteasoma (revisat en (Malumbres and Barbacid, 2005)).

La ciclina A comença a acumular-se durant la fase S i comença a formar complexos amb la Cdk2 que ja no està associada a ciclina E. Aquest nou complex Cdk2-ciclina A fosforila un gran nombre de proteïnes necessàries per a completar i sortir de la fase S, com per exemple alguns factors de transcripció (E2F1 i B-Myb), proteïnes implicades en la replicació del DNA (Cdc6 i MCMs), proteïnes implicades en la reparació del DNA (BRCA1) i algunes de les proteïnes dels *checkpoints* del cicle cel·lular (p53, p21^{Cip1} i mdm2) entre d'altres (revisat en (Sherr and Roberts, 1999;Malumbres and Barbacid, 2005)). Cap al final de la fase S, la ciclina A s'associa també amb la Cdk1. S'ha vist que els complexos Cdk2-ciclina A i Cdk1-ciclina A comparteixen la major part de substrats com per exemple les proteïnes involucrades en la replicació del DNA (MCMs) i proteïnes reguladores de la progressió del cicle cel·lular (pRb, p53, BARD1 i BRCA2) (revisat en (Malumbres and Barbacid, 2005)).

La ciclina B, tot i ser regulada també per pRb no comença a fer-se evident fins a la fase G₂. És en aquest moment quan la ciclina A comença a ser degradada i la Cdk1 lliure forma complexos amb la ciclina B, sent el complex Cdk1-ciclina B el majoritari en la transició G₂-M i en la progressió durant la mitosi. Aquest complex està involucrat en la majoria dels processos estructurals que tindran lloc durant la mitosi com per exemple la condensació dels cromosomes o el trencament de la lamina nuclear. Finalment cal la inactivació de Cdk1-ciclina B per a poder sortir de la mitosi. La inactivació del complex és possible gràcies a la degradació de la ciclina B via ubiquitina regulada per la via del APC (*Anaphase promoting complex*) (revisat a (Sanchez and Dynlacht, 2005;Malumbres and Barbacid, 2005)).

És interessant remarcar que la llista de substrats dels diferents complexos Cdk-ciclina és molt més extensa del que acabem de veure i hi apareixen substrats de naturalesa molt diversa (revisat en (Sanchez and Dynlacht, 2005;Malumbres and

Barbacid, 2005). Per exemple, un component de la maquinària de transcripció de la RNA polimerasa I, el factor de transcripció nucleolar UBF, també és substrat dels complexos Cdk-ciclina de la fase G₁. Així doncs, la fosforilació d'UBF comporta la seva activació que és necessària per a la seva interacció amb la RNA polimerasa I i la conseqüent activació de la transcripció dels DNAs ribosomals (rDNAs) (Voit *et al.*, 1999; Voit and Grummt, 2001).

1.4 Regulació dels complexos Cdk-ciclina

Per tal que el cycle cel·lular pugui progressar correctament, cal un control precís dels nivells d'activitat de les Cdk. És per això que l'activitat de les Cdk està altament regulada per diversos mecanismes com la fosforilació i la unió a proteïnes activadores o a proteïnes inhibidores. A més, cal destacar la importància de la localització intracel·lular de totes les proteïnes reguladores del cycle cel·lular, ja que la correcta localització dins el context cel·lular és bàsica per a la progressió del cycle. Recentment, en el nostre laboratori s'ha descrit un nou mecanisme de regulació de l'activitat dels complexos Cdk-ciclina, concretament l'acetilació per P/CAF de la ciclina A regula la seva degradació i per tant regula la formació de complexos Cdk-ciclina A actius (Mateo *et al.*, 2009). A continuació descriurem els principals mecanismes de regulació dels complexos Cdk-ciclina al llarg del cycle cel·lular:

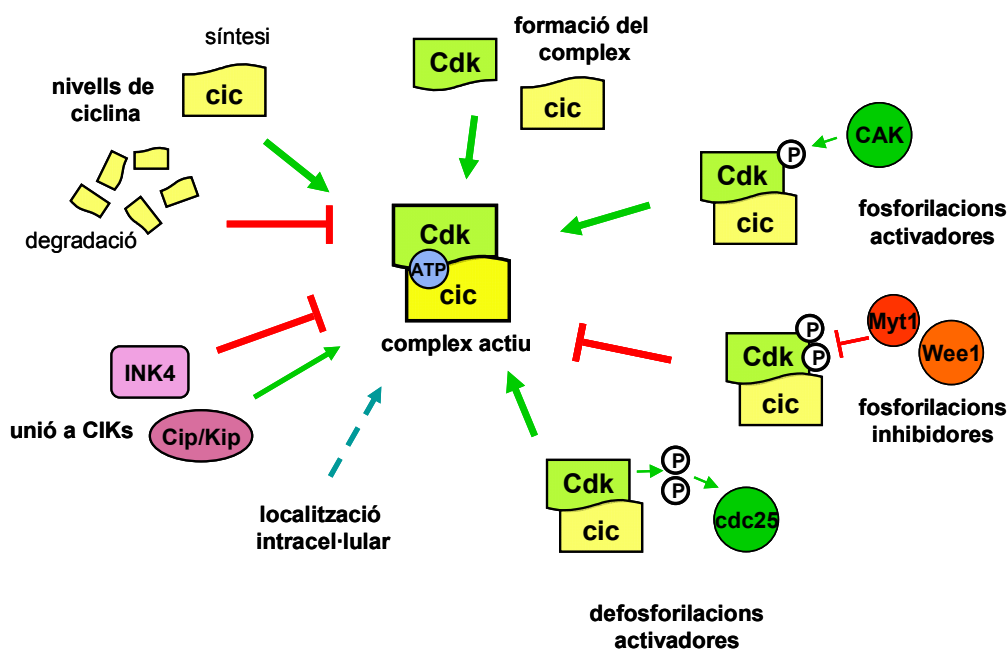


Figura 4: Mecanismes de regulació de l'activitat dels complexos Cdk-ciclina.

Unió a la ciclina:

En el moment de ser sintetitzada, una unitat aïllada de Cdk no té activitat cinasa. Com ja hem comentat anteriorment, l'activació de les Cdks requereix, en primer lloc, la unió de la subunitat reguladora, la ciclina. Gràcies a la reconstrucció de l'estructura tridimensional cristal·litzada del monòmer de Cdk2 (De Bondt *et al.*, 1993) i del complex humà Cdk2-ciclina A (Jeffrey *et al.*, 1995), s'han pogut estudiar els canvis conformacionals que pateix la subunitat de Cdk al unir-se amb la ciclina i que provoquen conseqüentment l'activació de la Cdk (revisat en (Morgan, 1997)):

- en el monòmer de Cdk el *loop* flexible de la Cdk (*T-loop*) bloqueja el lloc d'unió del substrat. La unió a la ciclina desplaça el *T-loop* deixant el lloc d'unió del substrat accessible.
- la unió de la ciclina exposa el residu treonina 160 de la Cdk, situat en el *T-loop*, que queda accessible a la fosforilació per CAK, necessària per a l'activació de la Cdk.
- en el complex Cdk-ciclina, l'hèlix PSTAIRE de la Cdk s'uneix amb les hèlix del domini *cyclin box* de la ciclina, fet que provoca un desplaçament de PSTAIRE i permet la correcta orientació de les cadenes involucrades en la unió de l'ATP.
- els residus implicats en la unió de l'ATP no es troben correctament posicionats en el monòmer de Cdk. Gràcies a la ciclina es provoca una reorientació en la zona d'unió de l'ATP i el correcte posicionament dels grups fosfat necessari per a reacció de fosforilació.

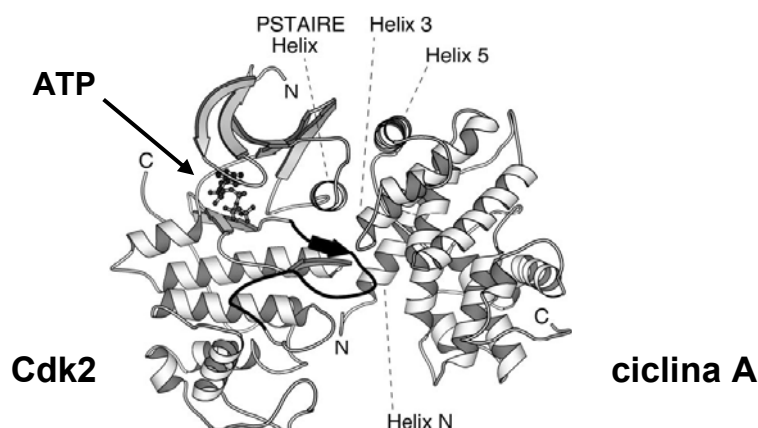


Figura 5: Estructura cristal·litzada del complex Cdk2-ciclinaA-ATP humà. Cdk2 correspon a la proteïna de l'esquerra i el seu domini T-loop està ressaltat en negre. La ciclina A està situada a la dreta del complex. Per a la unió de la Cdk2 i la ciclina A es necessita la interacció entre l'hèlix PSTAIRE de la Cdk2 i les hèlix 3 i 5 de la ciclina A. En la representació també s'indica la localització de l'ATP.

Nivells de ciclina:

Cal destacar la importància de la regulació dels nivells de ciclina al llarg del temps, ja que es un punt clau per a l'activació de les Cdks. La cèl·lula inverteix un gran esforç en regular els nivells de ciclina a nivell de transcripció i de degradació. (Morgan, 1997).

Els nivells de RNA missatger (RNAm) i els nivells proteics de les ciclines varien de forma paral·lela al llarg del cycle cel·lular, fet que remarca la importància de la regulació de la transcripció de les ciclines durant el cycle. S'ha descrit que la síntesi de la ciclina D s'indueix per factors de creixement i estímuls mitogènics, mentre que la síntesi de les ciclines E i A depèn de l'activació de la seva transcripció per part de la família de factors de transcripció E2F. A la vegada aquests factors de transcripció s'activen pels complexos Cdk-ciclina de les fases G_1 i G_1/S afavorint una ràpida transició cap a la fase S, com hem vist amb més detall a l'apartat de substrats de les Cdks. Posteriorment s'incrementen els nivells del complex Cdk2-ciclina A que inhibiran a E2F. En els eucariotes superiors els mecanismes de regulació de la transcripció de les ciclines mitòtiques són menys coneguts (revisat a (Morgan, 1997)).

Per tal d'aconseguir nivells variables al llarg del cycle, les ciclines contenen seqüències d'aminoàcids necessàries per a la seva proteòlisis depenent d'ubiquitina que permetran la degradació via proteasoma de la ciclina específica al final de cada fase del cycle cel·lular. Les ciclines A i B contenen una seqüència anomenada "*destruction box*", mentre que les ciclines D i E contenen una seqüència PEST (domini ric en residus de prolina (P), àcid glutàmic (E), serina (S) i treonina (T)). Són aquestes seqüències les essencials per a la proteòlisi de les ciclines, tot i que alguna de les ciclines també necessiten de fosforilacions per a degradar-se (revisat a (Vermeulen *et al.*, 2003)).

Per a la destrucció de ciclines mitòtiques es requereix la participació del complex proteic anomenat ciclosoma o APC (*Anaphase Promoting Complex*). Aquest complex actua com un enzim E3 ubiquitin·ligasa, transferint molècules d'ubiquitina a diferents substrats mitòtics, incloses les ciclines i a altres substrats inhibidors de l'anafase. No es coneix massa sobre la regulació del complex APC, se sap que és activat per Cdk1 i es manté actiu durant el inici de G_1 fins que apareixen les ciclines d'aquesta fase ((King *et al.*, 1996) i revisat a (Morgan, 1997)).

Fosforilacions activadores i inhibidores del complex Cdk-ciclina:

L'altre pas imprescindible per a l'activació de la Cdk és la fosforilació del complex Cdk-ciclina. L'activitat de la Cdk també està regulada per la fosforilació de residus treonina i tirosina conservats situats en el *T-loop*. Per a l'activació completa de la Cdk1 es necessita la fosforilació de la treonina T161, en el cas de Cdk4 cal la fosforilació de la T172, i en Cdk2 la T160. Aquestes fosforilacions estan catalitzades pel complex CAK (*Cdk-Activating-Kinase*, format pel complex Cdk7-ciclinaH-Mat1) i induïxen canvis conformacionals a la pròpia Cdk que afavoreixen la seva unió amb la ciclina i faciliten la interacció amb el substrat ((Jeffrey *et al.*, 1995) i revisat a (Vermeulen *et al.*, 2003)).

Però la CAK no és la única cinasa que fosforila les Cdk. Les cinases Wee1 i Myt1 fosforilen la Cdk1 a la tirosina Y15 i/o a la treonina T14 inactivant-la. És necessària la defosforilació d'aquests residus per part de la família de fosfatases Cdc25 i aconseguir així l'activació completa de Cdk1 i la consegüent progressió al llarg del cicle cel·lular (Lew and Kornbluth, 1996). Si en el mateix complex existeixen fosforilacions activadores (CAK) i inhibidores (Wee1 i Myt1) al mateix temps, el resultat final serà la molècula de Cdk inactiva, serà imprescindible que actui la Cdc25 i elimini les fosforilacions inhibidores per a poder tenir el complex actiu.

Unió a proteïnes inhibidores:

L'activitat de les Cdk també està regulada mitjançant l'associació a les proteïnes inhibidores de les Cdk, anomenades CKIs (*Cdk kinase inhibitors*). Aquests inhibidors s'uneixen al monòmer de Cdk o al complex Cdk-ciclina tot inhibint la seva activitat, d'aquesta manera les CKIs aconseguïxen frenar el cicle cel·lular en resposta a senyals intracel·lulars i/o extracel·lulars. S'han descrit dues famílies de proteïnes inhibidores de CDK: la família INK4 i la família Cip/Kip (Sherr and Roberts, 1995; Harper and Elledge, 1996).

La família INK4 (*Inhibitors of Cdk4*) consta de quatre membres: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d} que inhibeixen específicament les Cdk de la fase G₁, Cdk4 i Cdk6. Els membres de la família INK4, formen complexos estables amb el monòmer de Cdk abans que s'uneixi a la subunitat ciclina, d'aquesta manera impedeixen que les Cdk de la fase G₁ (Cdk4 i Cdk6) puguin unir-se a la ciclina D per a formar complexos actius (Carnero and Hannon, 1998).

En l'estructura cristal·litzada de p16^{INK4a} unida a Cdk6 (Russo *et al.*, 1998; Brotherton *et al.*, 1998) podem observar com no existeix solapament entre el lloc

INTRODUCCIÓ

d'unió de p16^{INK4a} i el lloc d'unió de la ciclina a la subunitat de Cdk. La unió de p16^{INK4a} bloqueja indirectament la unió de la ciclina ja que causa distorsions en la molècula de Cdk que redueixen l'afinitat de la Cdk tant per a la ciclina com per a l'ATP (revisat en (Pavletich, 1999)).

Les senyals que indueixen l'expressió dels membres de la família INK4 encara són poc coneguts. El primer membre descrit d'aquesta família: p16^{INK4a}, s'acumula progressivament amb l'edat cel·lular fet que indica que la seva expressió està induïda per la senescència. Se sap que l'expressió de p15^{INK4b} està induïda pel factor d'inhibició del creixement TGF- β i contribueix a aturar el cicle en fase G₁. D'altra banda, p18^{INK4c} i p19^{INK4d} s'expressen principalment durant el desenvolupament embrionari i es relaciona les seves funcions amb la diferenciació cel·lular (revisat a (Sherr and Roberts, 1999)).

La família Cip/Kip (*Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*) inclou: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}. Aquests inhibidors actuen sobre els complexos Cdk-ciclina (Polyak *et al.*, 1994b; Harper *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995). Els tres membres d'aquesta família s'uneixen a gran varietat de complexos Cdk-ciclina a través del seu domini amino terminal, molt conservat en els tres inhibidors. Són potents inhibidors dels complexos Cdk-ciclina de la fase G₁ i G₁/S, sobretot de Cdk2-ciclina E i Cdk2-ciclina A, tot i que també inhibeixen en menor nivell els complexos Cdk1-ciclina B (Hengst and Reed, 1998).

Així doncs, diferents estudis demostren que la unió als complexos Cdk2 i Cdk1 bloqueja la seva activitat cinasa, en canvi, la funcionalitat de la unió dels inhibidors de la família Cip/Kip al complexos Cdk4-ciclina D o Cdk6-ciclina D no està del tot clara. Estudis primerencs indicaven que la unió de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} era essencial per a la formació d'aquests complexos induint la seva translocació cap al nucli, la seva acumulació, estabilització i, per tant, la seva activació (Sherr and Roberts, 1999; Cheng *et al.*, 1999b) tot i que en estudis posteriors no està del tot confirmat ja que s'ha vist que l'activació d'aquests complexos és possible en absència de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} (Sugimoto *et al.*, 2002; Bagui *et al.*, 2003). Tot i així, aquest últim treball citat, suggereix que la unió de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} és necessària per a l'estabilització dels complexos Cdk4-ciclina D (Bagui *et al.*, 2003). A més, en un estudi recent, James i col·laboradors observen com el paper inhibidor de p27^{Kip1} unida als complexos Cdk4-ciclina D depèn de l'estat de fosforilació de la pròpia p27^{Kip1} en dos residus tirosina (Y88 i Y90) situats en el domini d'unió a Cdk. Segons aquest estudi, si les tirosines estan fosforilades, p27^{Kip1} no pot actuar com a inhibidor tot i estar unida als complexos Cdk4-ciclina D

(James *et al.*, 2008). Aquest paper dual dels inhibidors de la família Cip/Kip sobre els complexos Cdk-ciclina està àmpliament documentat i l'explicarem amb més detall en apartats posteriors d'aquesta introducció.

La proteïna p21^{Cip1}, va ser el primer inhibidor descobert de la família Cip/Kip. Va ser descrit a l'any 1993 per diferents estudis simultàniament (Xiong *et al.*, 1993; El-Deiry *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993a; Noda *et al.*, 1994; Dulic *et al.*, 1994). A més d'inhibir els complexos Cdk-ciclina, la proteïna p21^{Cip1} també inhibeix la síntesi de DNA ja que es capaç d'unir-se i inhibir el PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Waga *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1995). A nivell transcripcional, p21^{Cip1} està regulada de manera dependent de p53 i forma part de la resposta davant de dany al DNA, sent la responsable d'aturar el cicle cel·lular en fase G₁ o G₂. Tot i així, existeixen altres mecanismes independents de p53 encarregats de regular els nivells proteics de p21^{Cip1}, com veurem més endavant (El-Deiry *et al.*, 1993; Gartel and Tyner, 1999). A continuació, en l'apartat 2 de la introducció, descriurem amb més detall la proteïna p21^{Cip1} ja que aquesta tesi es centra en el seu estudi.

p27^{Kip1}, va ser el segon membre descrit de la família Cip/Kip (Toyoshima and Hunter, 1994; Polyak *et al.*, 1994a; Polyak *et al.*, 1994b). La proteïna p27^{Kip1} va ser identificada inicialment com a inhibidor dels complexos Cdk-ciclina en resposta a senyals antimitogènics, com la inducció de TGF-β o la inhibició per contacte, mantenint així els complexos Cdk2-ciclina E inactius. p27^{Kip1} és, per tant, una de les principals dianes de regulació en front a factors externs de les quals disposa la cèl·lula.

p27^{Kip1} presenta una elevada homologia (44%) amb la regió amino terminal de p21^{Cip1}. Es coneix l'estructura cristal·logràfica del complex Cdk2-ciclina A-p27^{Kip1} (Russo *et al.*, 1996) que aporta valuosa informació de com p27^{Kip1} i els altres membres de la família Cip/Kip inhibeixen els complexos Cdk-ciclina. Una regió de l'estructura de p27^{Kip1} mimetitza l'ATP, fet que ajuda a p27^{Kip1} a introduir-se dins del centre catalític i bloquejar al mateix temps el lloc d'unió de l'ATP. A més, la unió de p27^{Kip1} provoca canvis en la forma del centre catalític i nous replegaments al complex, induint la formació d'una nova estructura (revisat a (Pavletich, 1999)).

Els nivells de p27^{Kip1} són elevats en cèl·lules quiescents i disminueixen en resposta a estímuls mitogènics; es mantenen baixos durant la fase G₁ i S i augmenten posteriorment quan els mitògens són retirats. La regulació precisa dels nivells de p27^{Kip1} és gràcies a la perfecta regulació de la seva degradació, que és necessària per a la transició G₀/G₁. La degradació de p27^{Kip1} es produeix com a conseqüència de la

fosforilació del residu T187 per part dels complexos Cdk-ciclina, i un cop p27^{Kip1} està fosforilada es reconeguda per la proteïna SKP2 (Carrano *et al.*, 1999) que jugarà un paper important en l'ubiquïtinització i proteòlisi de p27^{Kip1}.

Treballs posteriors indiquen que p27^{Kip1}, igual que la resta de membres de la família Cip/Kip, no actua només com a regulador del cicle cel·lular, sinó que també exerceix altres funcions dins de la cèl·lula (revisat a (Besson *et al.*, 2008)). A més, es tracta d'un gen supressor de tumors molt vinculat a diversos càncers humans.

Finalment, la proteïna p57^{Kip2}, ha estat l'últim membre descrit de d'aquesta família d'inhibidors. S'ha vist que p57^{Kip2} realitza un paper important en la regulació del cicle cel·lular durant el desenvolupament embrionari i a diferència dels altres membres de la família Cip/Kip, p57^{Kip2} té un patró d'expressió depenent de teixit tant en l'embrió com en l'adult (Lee *et al.*, 1995; Matsuoka *et al.*, 1995). La regió amino terminal inclou el domini inhibidor de les Cdks, i és una regió molt conservada amb els altres membres de la família Cip/Kip. S'ha comprovat que p57^{Kip2} pot inhibir els complexos Cdk4-ciclina D, Cdk6-ciclina D, Cdk2-ciclina E, Cdk3-ciclina E i Cdk2-ciclina A *in vitro*. La disminució dels nivells d'expressió de p57^{Kip2}, s'ha relacionat amb la tumorigènesi, fet que s'ha pogut comprovar en ratolins *knockout* per a aquest gen. Aquest inhibidor està també molt relacionat amb el tumor de Wilm i amb la síndrome de Beckwith-Wiedemann, entre d'altres, ja que aquests tipus de tumors humans presenten deleccions o reordenacions del gen de p57^{Kip2}. Així doncs, existeixen diferents evidències del paper de p57^{Kip2} com a supressor de tumors, mentre que de moment no s'ha trobat cap paper de p57^{Kip2} com a oncogen (revisat en (Besson *et al.*, 2008)). D'altra banda, p57^{Kip2} està també implicada en processos d'apoptosi i diferenciació en diferents teixits. De manera similar a p21^{Cip1}, s'ha descrit que p57^{Kip2} inhibeix directament la replicació del DNA *in vitro* i la entrada en fase S *in vivo*, mitjançant la unió i inhibició de PCNA (Watanabe *et al.*, 1998).

1.5 Els checkpoints de dany al DNA

En front al dany al DNA, les cèl·lules responen principalment amb dos mecanismes. En primer lloc les cèl·lules aturen el cicle cel·lular gràcies als mecanismes de vigilància anomenats *checkpoints*; però si el dany és persistent, l'única alternativa serà enviar les cèl·lules a la mort cel·lular programada o apoptosi. Els mecanismes de *checkpoint* comproven constantment l'estat en el que es troba la cèl·lula. Si aquests mecanismes fallen tindria conseqüències perjudicials per a la

cèl·lula i per a l'organisme, ja que no seria possible corregir els errors els quals s'acumularien en forma d'alteracions genètiques que podrien ser transmeses a les cèl·lules filles o podrien predisposar a la cèl·lula a patir processos tumorals. Tot seguit descriurem alguns conceptes de les principals cascades de senyalització dels checkpoints de la transició G_1/S i G_2/M .

Checkpoint de G_1/S :

Quan les cèl·lules de mamífer reben dany en el DNA durant la fase G_1 del cicle cel·lular s'activa el checkpoint corresponent encarregat de bloquejar l'entrada de les cèl·lules en fase S per tal d'evitar la replicació del DNA amb lesions no reparades.

ATM i ATR són cinases claus en la resposta al dany al DNA i activen una cascada de senyalització capaç d'induir la parada en G_1 per tal de donar temps a que es pugui reparar el dany acumulat. ATM i ATR poden fosforilar directament a p53 en resposta al dany al DNA i a més, també fosforilen a Chk1 i Chk2 (dues proteïnes transductores del senyal iniciat per ATM i ATR) que també fosforilen a p53 (Siliciano *et al.*, 1997; Agarwal *et al.*, 1998; Bartek and Lukas, 2003).

En cèl·lules ciclants, els nivells proteics de p53 són baixos però en resposta al dany al DNA s'indueix una estabilització de la p53 de manera que augmenten els nivells de p53 i també la seva activitat (Levine, 1997). Nivells de p53 elevats dins la cèl·lula estimularan la transcripció de diferents gens entre els quals destaquem a *p21* i a *mdm2* (revisat a (Agarwal *et al.*, 1998)). La inducció de $p21^{Cip1}$ resulta en una aturada del cicle cel·lular en G_1 , gràcies a la inhibició de les Cdks, principalment les Cdks de G_1 , per part de $p21^{Cip1}$ i d'aquesta manera la cèl·lula evita la replicació del DNA danyat (revisat en (Ko and Prives, 1996)). La inducció de Mdm2 és una mica més complexa, ja que Mdm2 és el principal regulador negatiu de p53. Mdm2 s'uneix i inhibeix l'activitat transcripcional de p53 i a més, indueix la degradació via proteasoma de p53 facilitant la seva ubiquitinització, de manera que s'estableix una relació molt estreta entre aquestes dues proteïnes (Oren, 1999). D'una banda, la fosforilació de p53 impedeix la unió amb Mdm2, i d'altra banda, en resposta a alguns tipus de dany cel·lular, com per exemple la radiació ionitzant, ATM i ATR poden fosforilar també a Mdm2 disminuint la capacitat d'unió entre p53 i Mdm2, afavorint una acumulació de p53 (Maya *et al.*, 2001).

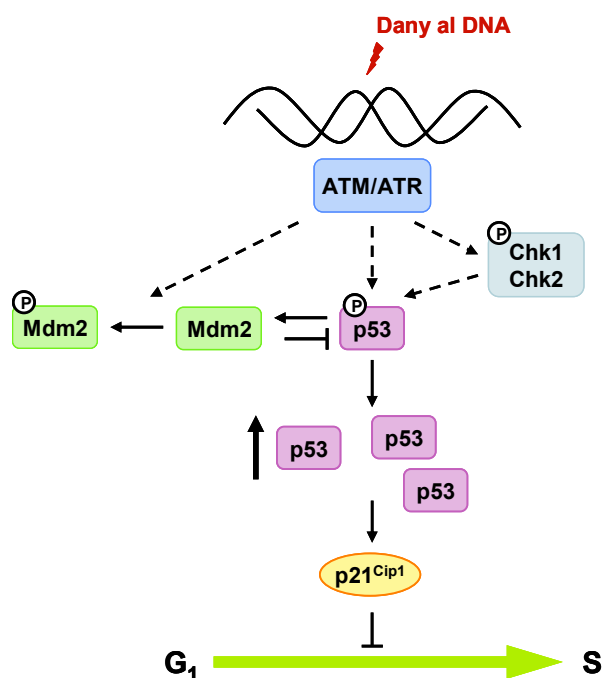


Figura 6: Esquema simplificat de la via principal d'activació en presència de dany al DNA en fase G₁ del cycle cel·lular. En resposta al dany al DNA, ATR i ATM fosforilen a p53. Amb la fosforilació de p53 i amb l'ajuda d'altres mecanismes, s'aconsegueix augmentar els nivells proteics de p53 dins la cèl·lula els quals estimularan la transcripció de diversos gens com per exemple el gen que codifica per a p21^{Cip1}.

Si el dany cel·lular és molt elevat i persistent, p53 també és capaç d'induir mort cel·lular i ho fa activant la transcripció d'altres gens com per exemple: *Bax*, *Fas*, *Apaf-1*, *NOXA* (Oda *et al.*, 2000), *PUMA* (Nakano and Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001) i gens de la via de senyalització d'estrès oxidatiu, que tenen un paper molt important en la cascada de senyalització de l'apoptosi (revisat a (Vermeulen *et al.*, 2003)).

Checkpoint de G₂/M:

Si el dany al DNA té lloc durant la fase S o G₂, les cèl·lules són capaces d'iniciar una aturada del cycle cel·lular en presència o absència de p53. El mecanisme principal sobre el qual actuen els mecanismes de *checkpoint* per evitar l'entrada en mitosi és el manteniment en estat no actiu de la Cdk1 o bé el segrest dels components del complex Cdk1-ciclina B fora del nucli. Aquests mecanismes són portats a terme per les cinases Chk1 i Chk2 les quals s'activen per ATM i ATR en resposta al dany en el DNA. Chk1 i Chk2 són les encarregades de fosforilar a la família de fosfatases Cdc25. Quan Cdc25 està fosforilada, s'inhibeix la seva activitat, no podrà actuar eliminant les fosforilacions inhibidores de Cdk1, i per tant, no podrà activar a Cdk1 i les cèl·lules no podran entrar en mitosi. A més, la fosforilació de Cdc25 promou la unió amb les proteïnes 14-3-3 que la segrestaran fora del nucli, d'aquesta manera s'evita novament

la activació dels complexos Cdk1-ciclina B nuclears i l'entrada en mitosi (Sanchez *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003).

El paper que juga p53 en el *checkpoint* de G₂/S és secundari. Com a resposta al dany en el DNA augmenten els nivells de p53, de la mateixa manera que en el *checkpoint* G₁/S. D'una banda p53 estimularà la transcripció de mdm2 i de p21^{Cip1}, la qual inhibirà el complex Cdk1-ciclina B, tot i que amb menys afinitat que les Cdk's d'interfase. D'altra banda estimularà la transcripció de 14-3-3 σ que s'unirà a ciclina B i a Cdc25 fosforilada i les segrestarà fora del nucli. A més, p53 també indueix a Gadd45 que afavoreix la dissociació de complex Cdk1-ciclina B (Hermeking *et al.*, 1997; Taylor and Stark, 2001; Vermeulen *et al.*, 2003).

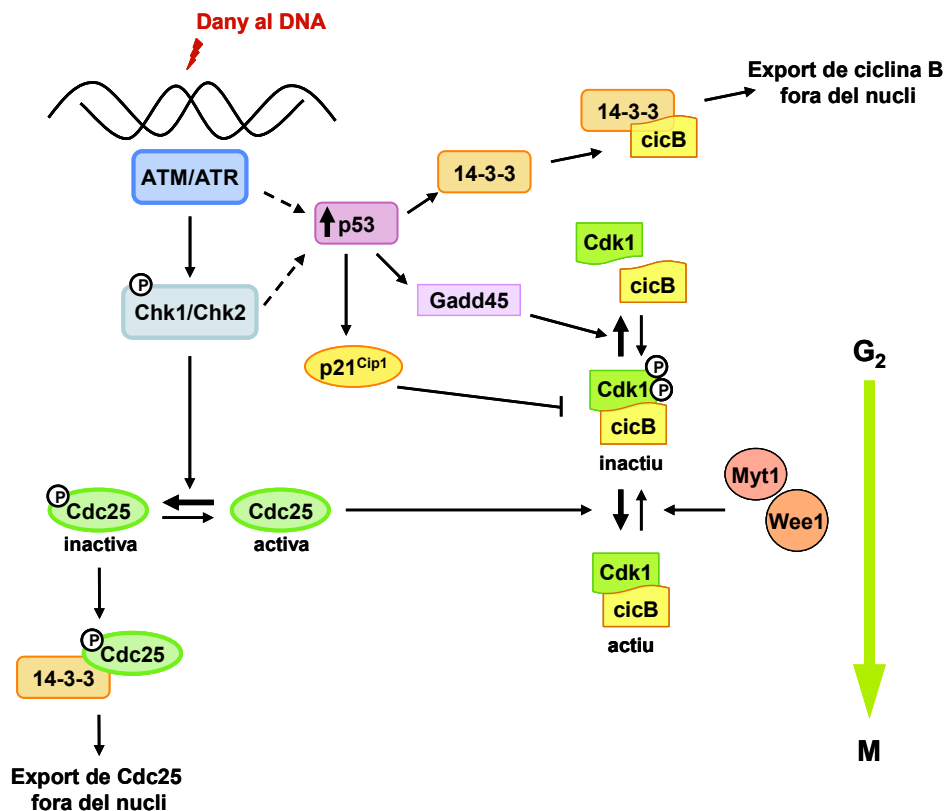


Figura 7: Esquema de les vies cel·lulars activades pel *checkpoint* de G₂/M. Davant del dany al DNA en fase G₂, s'activen diferents mecanismes per a evitar l'activació del complex Cdk1-ciclina B i impedir l'entrada en mitosi. El principal mecanisme d'activació del *checkpoint* de G₂/M és la fosforilació inhibidora de Cdc25.

1.6 Cicle cel·lular i càncer

En malalties com el càncer, apareixen alteracions en el control de la divisió cel·lular que es tradueixen, principalment, amb un augment de la proliferació cel·lular. Les mutacions genètiques causants d'aquestes alteracions poden aparèixer en dues classes de gens: proto-oncogens i els gens supressors de tumors. Els proto-oncogens o oncogens estan relacionats amb les vies que estimulen la proliferació cel·lular i, per tant, mutacions en aquests gens podran promoure el creixement tumoral. D'altra banda, mutacions en els gens supressors de tumors com per exemple *pRb* i *p53*, provoquen alteracions en proteïnes que en condicions normals serien capaces d'inhibir la progressió del cicle cel·lular, i que un cop alterades, no poden frenar la divisió cel·lular.

En el càncer s'han observat mutacions en diferents gens que codifiquen per a les proteïnes cinasa Cdk, les ciclines, enzims activadors de Cdks, CKI, substrats dels Cdks i proteïnes dels *checkpoints* (revisat en (Sherr, 1996;McDonald, III and el Deiry, 2000;Vermeulen *et al.*, 2003)). En resum, les alteracions més freqüents en càncers humans són la pèrdua de pRb, la pèrdua de funció de p16^{INK4a} o mutacions en el gen de *p53*; en canvi, la pèrdua de la funció de les proteïnes de la família Cip/Kip són poc freqüents en els càncers humans (revisat en (Sherr, 1996;Vermeulen *et al.*, 2003)).

Mutacions en les proteïnes del *checkpoint* són freqüents en tots els tipus de càncer. El gen *p53* és el gen més freqüentment mutat en els càncers humans i la regulació de p21^{Cip1} com a resposta al dany al DNA es perd quan p53 està inactiva. En general, els tumors que no tenen alterada la proteïna p53 tenen millor pronòstic i responen millor a les teràpies que els tumors que tenen mutacions en el gen *p53* donat el paper dual de p53 en induir aturada del cicle cel·lular o induir apoptosi. D'altra banda, la sobreexpressió de mdm2 també es freqüent en alguns tipus de tumors ja que provoca uns efectes similars als de les mutacions en p53 i per tant permet que les cèl·lules s'escapin del control mediat per p53 (revisat en (Vermeulen *et al.*, 2003)).

2. LA PROTEÏNA p21^{Cip1}

La proteïna p21^{Cip1}, va ser el primer inhibidor dels complexos Cdk-ciclina identificat. La identificació de p21^{Cip1} es va dur a terme de forma independent per diversos estudis amb aproximacions diferents:

- Per tal d'identificar possibles reguladors de Cdk2 es va realitzar un estudi de dos híbrids (*two-hybrid*) a partir del qual es va aïllar el gen humà *CIP1* que codificava per a una proteïna de 21 kDa capaç d'immunoprecipitar amb la ciclina A, ciclina D1, ciclina E i Cdk2 (Harper *et al.*, 1993b). Harper i col·laboradors anomenen p21^{Cip1}, a aquest nova proteïna capaç d'unir-se i inhibir l'activitat de diferents complexos Cdk-ciclina.

- Un altre grup, va identificar un gen anomenat *WAF1*, l'expressió del qual estava induïda de manera directa per p53 i que podia ajudar a p53 en el seu paper com a supressor de tumors. Descriuen que el gen *WAF1* es troba localitzat en el cromosoma 6p21.2 i el promotor d'aquest gen conté un lloc d'unió a p53. Observen que la seqüència, estructura i activació de *WAF1* per p53 està conservada entre rosegadors i humans i denominen a aquesta nova proteïna p21^{Waf1} (El-Deiry *et al.*, 1993).

- L'estudi de fibroblasts humans en senescència va permetre l'aïllament de cDNAs que codifiquessin per a inhibidors de la síntesi de DNA. Noda i col·laboradors identifiquen un d'aquests cDNAs, *sdi1*, localitzat en el braç p del cromosoma 6, l'expressió del qual estava induïda durant la senescència. Aquest grup anomena a aquesta proteïna p21^{sdi1} i suggereix un paper important per a p21^{sdi1} en el manteniment de la senescència (Noda *et al.*, 1994).

- En l'estudi dels mecanismes de regulació de Cdk2, Gu i col·laboradors, identifiquen un nou mecanisme de regulació de l'activitat de Cdk2 en cèl·lules de mamífer. Observen que en fibroblasts humans, els complexos Cdk2-ciclina es troben fortament associats a una proteïna de 20 KDa, que ells anomenen CAP20, i que aquesta associació *in vivo* de CAP20 inhibeix l'activitat cinasa de Cdk2 (Gu *et al.*, 1993).

- L'any 1993, estudis en fibroblasts humans no transformats, van permetre l'aïllament d'uns complexos quaternaris formats per una cinasa, una Cdk, el PCNA i

una subunitat de pes molecular de 21 kDa no caracteritzada. El mateix grup va observar com la proteïna de 21 kDa, p21, era capaç d'inhibir l'activitat dels complexos Cdk-ciclina i com la sobreexpressió de p21^{Cip1} inhibia la proliferació en cèl·lules de mamífer. Aquest grup proposa, per primer cop, a la proteïna p21^{Cip1} com a un inhibidor universal de les Cdks (Xiong *et al.*, 1993).

- L'estudi de fibroblasts tractats amb radiacions gamma portat a terme l'any 1994 per Dulic i col·laboradors, mostra com en resposta a aquest tipus d'irradiació, els fibroblasts aturen el cicle cel·lular en fase G₁, abans d'entrar en fase S. Tot seguit, observen com aquesta parada del cicle cel·lular es correlaciona amb una manca d'activitat dels complexos Cdk-ciclina formats per Cdk2 i que té lloc de manera dependent de p53. Aquest grup proposa un model funcional on la proteïna p21^{Cip1/Waf1}, descrita anteriorment, és la responsable d'aquesta aturada del cicle en fase G₁ com a resposta a les radiacions ionitzants en fibroblasts (Dulic *et al.*, 1994).

- Jiang i col·laboradors observen que el gen associat a la diferenciació de melanòcits, *mda-6*, és idèntic al gen *Waf1/Cip1* induït per p53, ja que codifica per a una proteïna de 21 kDa capaç de reprimir l'activitat de les Cdks i d'inhibir el creixement cel·lular. En el mateix estudi demostren com *mda-6* (*Waf1/Cip1*) és un gen que té un paper important en la diferenciació de cèl·lules promielocítiques de leucèmia i que aquest paper és independent de p53 (Jiang *et al.*, 1994).

Tots aquests diferents estudis realitzats pràcticament al mateix temps, van aportar molta informació sobre p21, la qual va rebre noms diferents com hem pogut observar; a partir d'aquest moment citarem a aquesta proteïna únicament com a p21^{Cip1}.

2.1 Estructura de p21^{Cip1}

Tal i com hem comentat anteriorment, p21^{Cip1} pertany a la família de proteïnes Cip/Kip, inhibidores dels complexos Cdk-ciclina. Els tres membres d'aquesta família presenten un elevat grau d'homologia en la seva seqüència, sobretot en l'extrem amino terminal. Com es mostra en la figura 8, és en l'extrem amino terminal, on aquestes proteïnes tenen el domini d'unió a Cdks i a ciclins (Nakanishi *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1996).

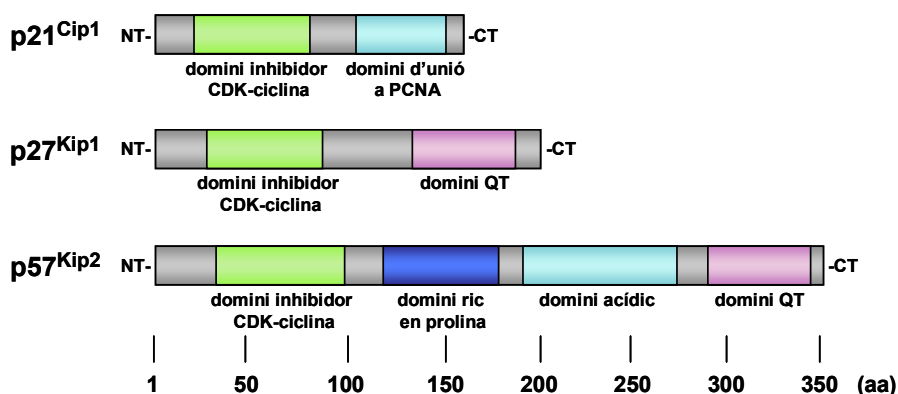


Figura 8: Esquema dels dominis estructurals de la família Cip/Kip. Els tres membres de la família Cip/Kip, presenten una elevada homologia en l'extrem amino terminal (NT), on es troba situat el domini d'unió i inhibidor dels complexos Cdk-ciclina. En l'extrem carboxi terminal (CT) de la p21^{Cip1} es troba localitzada la regió d'unió al PCNA. Tant p27^{Kip1} com p57^{Kip2}, comparteixen regions semblants en el seu extrem CT anomenades dominis QT els quals encara no es coneix la funció. A més, p57^{Kip2} conté en la meitat de la seva molècula, una regió rica en prolina i un domini àcidic, aquestes regions úniques de p57^{Kip2} podrien indicar funcions de p57^{Kip2} que no compartiria amb p21^{Cip1} ni amb p27^{Kip1}. (adaptat de (Nakayama and Nakayama, 1998)).

En un principi, es creia que l'extrem carboxi terminal era el tret que diferenciava els membres d'aquesta família i el responsable de les diferents funcions *in vivo* de cada un d'ells. En el cas de p21^{Cip1} es va veure que aquesta regió li permetia unir-se i inhibir el PCNA (Waga *et al.*, 1994; Flores-Rozas *et al.*, 1994); en canvi, la funcionalitat de la regió carboxi terminal no era coneguda per a p27^{Kip1} ni per p57^{Kip2}. Posteriorment s'ha vist que p57^{Kip2} també conté, en la regió carboxi terminal, un domini d'unió a PCNA i que, de manera similar a p21^{Cip1}, la unió a PCNA resulta en una inhibició de la replicació del DNA *in vitro* i de l'entrada en fase S *in vivo* (Watanabe *et al.*, 1998). Recentment s'han trobat un gran nombre de proteïnes associades als diferents membres de la família Cip/Kip, i totes aquestes noves associacions amplien les funcions on hi poden jugar un paper p21^{Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}. Més tard en centrarem en l'ampli ventall de proteïnes d'unió a p21^{Cip1}.

El gen humà *CDKN1A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) es troba localitzat en el cromosoma 6p21.2. i genera un transcrit de 2.1 kb, que codifica per a 164 aminoàcids i que corresponen a la proteïna p21^{Cip1}. El gen *CDKN1A* conté tres exons de 58, 450 i 1600 pb (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993b).

La seqüència de la proteïna p21^{Cip1} humana comparteix un 70% d'homologia amb la p21^{Cip1} de ratolí i hi destaquen dues regions molt conservades. La primera d'aquestes regions altament conservades, es troba situada entre els aminoàcids 21-60 (95% d'homologia), és una regió rica en cisteïna i que pot formar dits de zenc. La

INTRODUCCIÓ

segona regió és situa entre els aminoàcids 130-164 (89% d'homologia) i és creu que aquesta regió conté una seqüència de localització nuclear (Gartel *et al.*, 1996b).

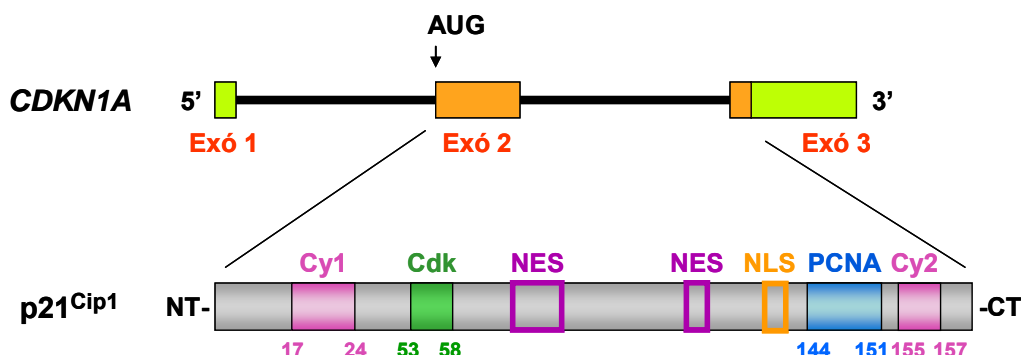


Figura 9: Estructura de gen humà *CDKN1A* i de la proteïna *p21^{Cip1}*. En l'esquema s'indiquen els següents dominis de *p21^{Cip1}*: Cy1 i Cy2, dominis d'unió de les ciclines; Cdk, lloc d'unió de les Cdk; domini d'unió del PCNA; senyal de localització nuclear (NLS) aa 140-142; senyals d'export nuclear (NES) putatives aa 66-83 i 102-119.

Així doncs, és l'extrem amino terminal el que està més conservat entre els diferents membres de la família Cip/Kip, i és en aquest extrem on es situen els dominis d'unió a les diferents Cdk i ciclines. En la proteïna *p21^{Cip1}*, el domini d'unió a les ciclines es troba entre els aminoàcids A₁₇CRRLF₂₄. Aquest domini es coneix com a lloc d'unió a ciclina Cy1 (Chen *et al.*, 1996b), i conté el motiu aminoacídic RXL, que també està present en altres proteïnes que interaccionen amb les ciclines com per exemple *p27^{Kip1}*, *p57^{Kip2}*, proteïnes de la família de pRb, el factor de transcripció E2F-1 o la fosfatasa Cdc25 (Adams *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 1997).

El lloc d'unió de *p21^{Cip1}* a la Cdk, situat entre els aminoàcids 53-58 bloqueja la unió de l'ATP a la Cdk (Goubin and Ducommun, 1995; Chen *et al.*, 1996a; Chen *et al.*, 1996b) i impedeix, per tant, l'activitat catalítica de la Cdk, com ja hem explicat en l'apartat dels mecanismes de regulació dels complexos Cdk-ciclina (Russo *et al.*, 1996; Pavletich, 1999). Per tal d'assolir una inhibició òptima de l'activitat del complex Cdk/ciclina es requereix tant la interacció amb la Cdk com amb la ciclina corresponent (Fotadar *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996b).

A més, en l'extrem carboxi terminal de *p21^{Cip1}* és on es troba el domini d'unió a PCNA, comprès entre els aminoàcids 144-151 (Waga *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1995; Warbrick *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b). L'any 1996, Gulbis i col·laboradors, van cristal·litzar el PCNA humà acomplexat amb un pèptid de la regió carboxi terminal de

p21^{Cip1} i van demostrar així, que la interacció entre aquestes dues proteïnes tenia lloc en diferents punts i amb una relació estequiomètrica de 1:1 (Gulbis *et al.*, 1996).

p21^{Cip1} presenta també un segon lloc d'unió a les ciclines, tot i que més feble que Cy1, i que es troba proper a l'extrem carboxi terminal de la proteïna. Aquest lloc d'unió anomenat Cy2 també conté el motiu RXL i es troba situat entre els aminoàcids R₁₅₅RL₁₅₇. Aquest segon lloc d'unió a ciclines no es troba en p27^{Kip1} ni en p57^{Kip2} (Chen *et al.*, 1996b). La importància de Cy2 encara és incerta, però el fet que es trobi a prop del lloc d'unió amb el PCNA, insinua un possible paper de PCNA en la regulació de l'activitat de p21^{Cip1} sobre els complexos Cdk-ciclina.

Finalment, cal destacar que l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, presenta una senyal de localització nuclear (NLS) localitzada entre els aminoàcids R₁₄₀KR₁₄₂, que permet l'entrada de la proteïna cap al nucli de manera regulada. Mutacions en la senyal NLS, provoquen la retenció de p21^{Cip1} en el citoplasma, on la capacitat d'aturar el cicle cel·lular es veu reduïda dràsticament (Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2002).

Mitjançant bases de dades, Henderson i col·laboradors, identifiquen una putativa seqüència d'export nuclear (NES) per a p21^{Cip1} que segueix el patró Lx₍₁₋₃₎Lx₍₂₋₃₎LxL localitzada entre els aminoàcids 66-83, tot i que indiquen que és una senyal d'export molt feble (Henderson and Eleftheriou, 2000). Més recentment s'ha identificat un altra NES putativa per a p21^{Cip1} que segueix el mateix patró que l'anterior i es troba entre els aminoàcids 102-119 (Hwang *et al.*, 2007). Es postula que les dues senyals febles NES es complementarien en una senyal totalment funcional ja que s'ha observat com la disrupció de les dues seqüències NES putatives provoca un bloqueig en la sortida de p21^{Cip1} cap al citoplasma en resposta a estrès oxidatiu i evita la seva degradació. Per tan, totes dues NES són necessàries per a la correcta translocació i degradació de p21^{Cip1} (Hwang *et al.*, 2007).

2.2 Proteïnes d'unió a p21^{Cip1}

A més d'interaccionar amb Cdks, ciclines i PCNA, la proteïna p21^{Cip1} s'ha vist implicada en moltes altres interaccions específiques amb una gran varietat de proteïnes. Algunes d'aquestes interaccions proteïna-p21^{Cip1} continuen tenint un paper en la regulació del cicle cel·lular, mentre que altres interaccions suggereixen la implicació de p21^{Cip1} en noves funcions fins ara desconegudes per a aquesta proteïna (revisat en (Dotto, 2000;Besson *et al.*, 2008)). En la següent figura es mostra un

INTRODUCCIÓ

esquema de les diferents proteïnes d'unió a p21^{Cip1} i en la taula 1 s'indica la implicació funcional d'aquestes unions. En apartats següents d'aquesta introducció veurem la importància i implicació en la modulació de la funcionalitat de p21^{Cip1} causada per les unions més rellevants amb altres proteïnes.

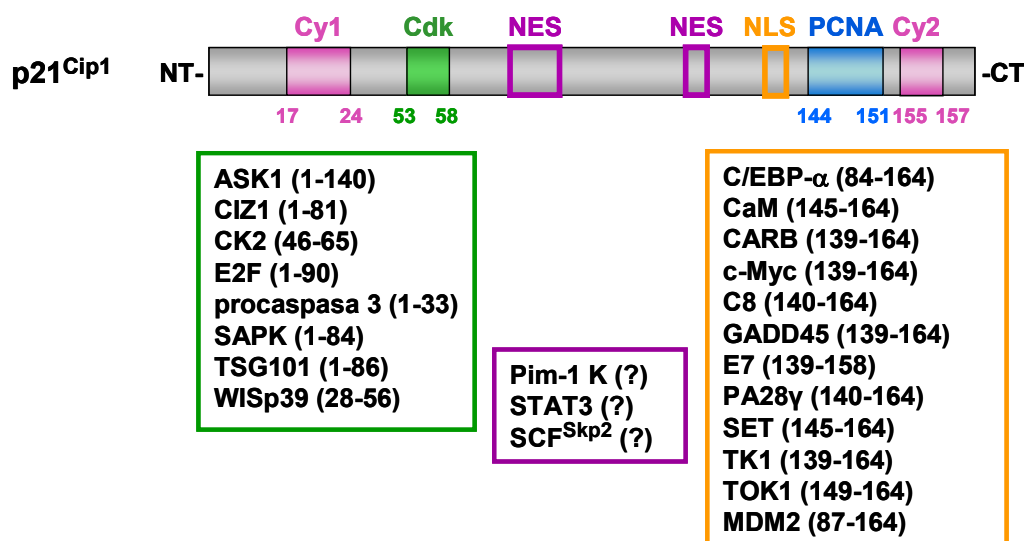


Figura 10: Esquema de les noves proteïnes d'unió a p21^{Cip1} on s'indica el domini d'interacció entre les dues proteïnes en els casos coneguts.

Cal destacar que, p21^{Cip1}, igual que les altres proteïnes de la família Cip/Kip, és una proteïna amb molta plasticitat estructural i es considera com a una proteïna desestructurada capaç d'adoptar conformacions terciàries després d'unir-se a altres proteïnes (Esteve *et al.*, 2003). Com acabem de veure, p21^{Cip1} interacciona pel domini carboxi terminal amb diferents proteïnes com: PCNA, CaM i SET, entre d'altres. Gràcies a la plasticitat de p21^{Cip1} i sobretot del seu domini carboxi terminal, p21^{Cip1} adopta diferents conformacions terciàries depenent de la proteïna amb la que interaccioni. Per exemple, el domini carboxi terminal de p21^{Cip1} adopta una estructura estesa quan es troba unit a PCNA o a SET, mentre que si està unit a CaM presenta una estructura en alfa hèlix (Esteve *et al.*, 2003).

proteïna d'unió	domini d'unió a p21 ^{Cip1}	funció	referència
ASK1	1-140	inhibició de ASK1	(Asada <i>et al.</i> , 1999)
C8 subunitat-α	140-164	reclutament de p21 ^{Cip1} al proteasoma	(Touitou <i>et al.</i> , 2001)
Calmodulina	145-164	regulació de la entrada de p21 ^{Cip1} al nucli	(Taulés <i>et al.</i> , 1999)
CARB	CT	competeix amb p21 ^{Cip1} per a unir-se a ciclina B1	(McShea <i>et al.</i> , 2000)
C/EBP-α	84-164	regulació dels nivells de p21 ^{Cip1}	(Timchenko <i>et al.</i> , 1996)
CIZ1	1-81	regulació de la localització cel·lular de p21 ^{Cip1}	(Mitsui <i>et al.</i> , 1999)
CK2	46-65	disminució de l'activitat de CK2 i fosforilació de p21 ^{Cip1}	(Gotz <i>et al.</i> , 1996)
c-Myc	139-164	regulació de la transcripció depenent de c-Myc	(Kitaura <i>et al.</i> , 2000)
E2F	1-90	supsressió de la transcripció depenent d'E2F	(Delavaine and La Thangue, 1999)
E7	139-158	bloquejar l'activitat de p21 ^{Cip1} sobre l'activitat de la Cdk	(Funk <i>et al.</i> , 1997)
GADD45	139-164	augment de l'aturada del cicle cel·lular	(Kearsey <i>et al.</i> , 1995)
mdm2	87-164	redueix l'estabilitat de p21 ^{Cip1}	(Jin <i>et al.</i> , 2003)
PA28γ (REGγ)	140-164	afavoreix la degradació independent d'ubiquïtina de p21 ^{Cip1}	(Chen <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2007)
Pim-1 K	?	fosforila a p21 ^{Cip1}	(Wang <i>et al.</i> , 2002)
Procaspasa 3	1-33	bloqueja l'activitat de la procaspasa 3	(Suzuki <i>et al.</i> , 1999a)
SAPK	1-84	inhibició de l'activitat de SAPK	(Shim <i>et al.</i> , 1996)
SCF^{Skp2}	?	Ubiquïtinització de p21 ^{Cip1}	(Hwang <i>et al.</i> , 2007)
SET	145-164	complex p21 ^{Cip1} /SET inhibeix cdk1-ciclina B	(Canela <i>et al.</i> , 2003)
STAT3	?	inhibició de la transcripció depenent de STAT3	(Coqueret and Gascan, 2000)
TK1	139-164	bloqueja l'associació de p21 ^{Cip1} a Cdk2	(Huang and Chang, 2001)
TOK1	149-164	augment de la inhibició de cdk2	(Ono <i>et al.</i> , 2000)
TSG101	1-86	augment de la inhibició dels complexos cdk-ciclina	(Oh <i>et al.</i> , 2002)
WISp39	28-56	estabilització de p21 ^{Cip1}	(Jascur <i>et al.</i> , 2005)

Taula 1: Proteïnes d'unió a p21^{Cip1}.

Aquesta flexibilitat conformacional suggereix que esdeveniments com ara interaccions amb altres proteïnes o fosforilacions, siguin els encarregats de modificar el plegament de la proteïna i ajudar de donar-li la conformació adient. Aquests canvis conformacionals als que es sotmet $p21^{Cip1}$ són els que li permeten regular diferents funcions cel·lulars i a més, podrien estar modulant l'habilitat de $p21^{Cip1}$ d'inhibir els complexos Cdk-ciclina (revisat a (Besson *et al.*, 2008)).

2.3 Funcions de $p21^{Cip1}$

$p21^{Cip1}$ és el membre fundador de la família Cip/Kip, i com a tal, la primera funció amb la que es va relacionar va ser l'aturada del cycle cel·lular. Com acabem de veure, cada cop es descriuen més proteïnes d'unió a $p21^{Cip1}$, aquest fet insinua que les funcions de $p21^{Cip1}$ no només estan relacionades amb el seu paper com a regulador del cycle cel·lular, sinó totes aquestes interaccions proteiques fan que $p21^{Cip1}$ es trobi immersa en moltes altres funcions cel·lulars que fins ara eren desconegudes i inesperades. Diferents treballs descriuen un paper de $p21^{Cip1}$ en la regulació de l'apoptosi, la senescència, la diferenciació, la migració cel·lular, la replicació del DNA i fins i tot com a cofactor transcripcional. Cal destacar que aquests esdeveniments poden ser dependents o independents de p53 i que totes aquestes funcions, no només depenen de la interacció de $p21^{Cip1}$ amb altres proteïnes, sinó que també hi juga un paper molt important la localització cel·lular de la $p21^{Cip1}$ com veurem més endavant (revisat en (Dotto, 2000;Chang *et al.*, 2000b;Roninson, 2002;Coqueret, 2003;Besson *et al.*, 2008)).

2.3.1 $p21^{Cip1}$ i el cycle cel·lular

Inhibició dels complexos Cdk-ciclina:

Les proteïnes de la família Cip/Kip, i per tant, $p21^{Cip1}$, van ser caracteritzades inicialment com a proteïnes encarregades d'inhibir el cycle cel·lular mitjançant la unió i inhibició dels complexos Cdk-ciclina. $p21^{Cip1}$ es va considerar inhibidor universal de les Cdk-ciclins, tot i tenir poca afinitat per a inhibir el complex Cdk1-ciclina B (revisat en (Sherr and Roberts, 1999)).

Inicialment, $p21^{Cip1}$ va ser aïllada formant part de complexos Cdk-ciclina actius (Zhang *et al.*, 1993;Zhang *et al.*, 1994;Harper *et al.*, 1995;La Baer *et al.*, 1997). Sorprenentment, tot i la associació de $p21^{Cip1}$ a aquests complexos continuava havent

fosforilació de pRb. Per tal d'explicar aquest fet es va proposar que la inhibició de l'activitat Cdk per p21^{Cip1} només era possible quan els nivells de p21^{Cip1} eren prou elevats com per a trobar varies molècules de p21^{Cip1} unides al complex Cdk-ciclina i que, per tant, la relació 1:1 no afectaria a l'activitat de la Cdk, de manera que canvis en la estequiometria eren els responsables de la diferent inhibició de p21^{Cip1} sobre l'activitat Cdk en la transició G₁-S (Sherr and Roberts, 1995; Sherr and Roberts, 1999).

Estudis posteriors discuteixen que l'efecte inhibitori de la unió de p21^{Cip1} sobre diferents complexos Cdk-ciclina pot ser diferent i que no depèn exclusivament de l'estequiometria com s'havia postulat anteriorment. Demostren que una sola molècula de p21^{Cip1} sí que és capaç d'inhibir els complexos formats per Cdk2, però no observen una inhibició significativa dels complexos ciclina D-Cdk4/6 associats a p21^{Cip1} (Zhang *et al.*, 1994; La Baer *et al.*, 1997; Hengst *et al.*, 1998; Adkins and Lumb, 2000).

Aquests resultats porten a un nou model de funcionament on es proposa que ni p21^{Cip1}, ni p27^{Kip1}, són capaços d'inhibir els complexos formats per ciclina D (Sherr and Roberts, 1999). El model proposa que la proliferació cel·lular depèn de l'existència de Cdk2 lliure; segons aquest model, els complexos naixents formats per ciclina D s'unirien i segrestarien a p21^{Cip1} (o també a p27^{Kip1}) i d'aquesta manera s'aconseguiria deixar els complexos Cdk2-ciclina E lliures fet que permetria l'activitat de Cdk2 al final de la fase G₁ i la progressió a través del cicle cel·lular. Per tant, serien els propis complexos ciclina D-Cdk4/6 els encarregats de segrestar a p21^{Cip1} i a p27^{Kip1} i d'aquesta manera evitarien la inhibició per part de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} dels complexos formats per Cdk2 (revisat en (Sherr and Roberts, 1999; Sherr and Roberts, 2004)). Aquest model explicaria els resultats obtinguts en ratolins *knockout* per a ciclina D1 i D2, els quals presenten una menor activitat de Cdks, possiblement perquè en absència de ciclina D, p21^{Cip1} s'associaria més fàcilment als complexos formats per Cdk2-ciclina E (Perez-Roger *et al.*, 1999).

Un estudi recent, proposa un nou model per a la regulació dels complexos Cdk4-ciclina D basat en l'estat de fosforilació de p27^{Kip1}. Aquest model proposa que p27^{Kip1} unida als complexos Cdk4-ciclina D pot actuar de manera inhibidora o no inhibidora depenent de l'estat de fosforilació de les tirosines Y88 i Y90 situades en el domini d'unió a Cdk. Observen com la p27^{Kip1} fosforilada de les cèl·lules proliferants no inhibeix els complexos Cdk4-ciclina D a diferència de la p27^{Kip1} no fosforilada present en les cèl·lules no proliferants (James *et al.*, 2008). Posteriorment es va poder observar com la interacció entre la p27^{Kip1} no fosforilada i la Cdk4 evitava la fosforilació activadora del T-loop de la Cdk per part de la CAK. En canvi, si la p27^{Kip1} està

fosforilada, la CAK pot fosforilar a Cdk4 sense necessitat que es dissociï de p27^{Kip1} (Ray *et al.*, 2009). De moment, no s'ha descrit cap model similar per a p21^{Cip1} tot i que podria ser que la seva capacitat inhibidora sobre els complexos Cdk-ciclina també estigués regulada per mecanismes de fosforilació ja que diversos treballs mostren com la fosforilació és una potent eina capaç de regular un gran nombre de funcions p21^{Cip1}.

També cal destacar que la forma activa de Cdks només es troba en el nucli, per tant, només les formes nuclears de p21^{Cip1} poden ser considerades com a inhibidors dels complexos Cdk-ciclina. Però, com veurem més endavant, p21^{Cip1} també es troba al citoplasma i possiblement també sobre el DNA on podria estar realitzant altres funcions (revisat en (Coqueret, 2003)).

Un dels papers proposats per a p21^{Cip1} en el citoplasma seria el d'ajudar a la ciclina D a unir-se a la Cdk i formar el complex ciclina D-Cdk. p21^{Cip1} actuaria, per tant, com a factor d'assemblatge entre aquestes dues proteïnes, ja que, per exemple, la pèrdua del gen de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} en fibroblasts primaris de ratolí perjudica la formació dels complexos Cdk4-ciclina D1 (Cheng *et al.*, 1999a). A més, aquestes cèl·lules no poden transportar eficientment a la ciclina D a dins del nucli. Per tant la p21^{Cip1} citoplasmàtica no només ajuda a la formació del complex, sinó que també promou la localització nuclear dels complexos formats per ciclina D, ja que la ciclina D no conté cap senyal NLS, i podria ser la pròpia p21^{Cip1} la que aportés aquest senyal per a permetre el transport cap al nucli del complex sencer. Tot i així, s'ha pogut comprovar que baixos nivells de ciclina D poden entrar al nucli en absència de p21^{Cip1} i p27^{Kip1}, aquest fet suggereix que el paper de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} intensifica aquesta entrada.

Però p21^{Cip1}, no només intervé en la regulació de l'entrada de ciclina D al nucli, sinó que també juga un paper molt important en la regulació de la seva estabilitat. p21^{Cip1} bloqueja la interacció entre ciclina D1 i l'exportina CRM1, ja que p21^{Cip1} tapa la senyal NES de la ciclina D1; aquest fet permet un augment dels nivells de ciclina D1 a l'interior del nucli (Alt *et al.*, 2002).

Així doncs, totes aquestes observacions porten a la conclusió que la unió de les proteïnes Cip/Kip als complexos ciclina D-Cdk4, permet l'estabilitat del complex i facilita el seu import cap a nucli, sense inhibir l'activitat de la Cdk associada a la ciclina D (La Baer *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1999a). Per tant, tot i el primer paper descrit de p21^{Cip1} com a inhibidor dels complexos Cdk-ciclina en el nucli, posteriorment s'ha pogut comprovar que, quan p21^{Cip1} es troba al citoplasma, el seu paper és molt

diferent al esperat, ja que s'encarrega l'augmentar l'associació dels complexos formats per ciclina D i de transportar-los i acumular-los en el nucli.

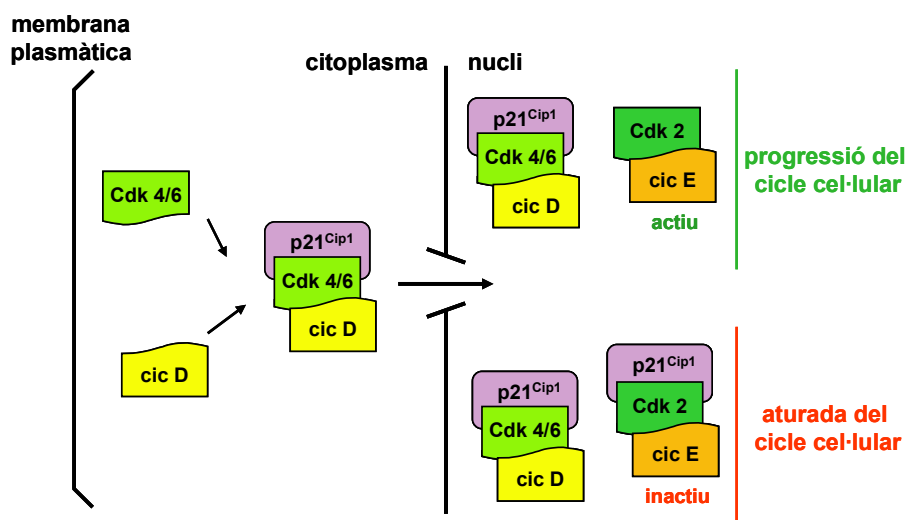


Figura 11: Regulació dels complexos Cdk-ciclina de la fase G₁ per p21^{Cip1}. p21^{Cip1} regula la formació dels complexos Cdk4/6-ciclina D en el citoplasma i els ajuda a entrar en el nucli. Un cop en el nucli, els complexos Cdk4/6-ciclina D segresten a p21^{Cip1} de tal manera que els complexos formats per Cdk2 estan lliures i actius i permeten la progressió del cycle cel·lular. Un augment dels nivells de p21^{Cip1} provoca la saturació de complexos Cdk4/6-ciclina D i la unió de molècules de p21^{Cip1} als complexos Cdk2-ciclina E, inhibint l'activitat cinasa de la Cdk2 i aturant el cycle cel·lular (adaptada de (Coqueret, 2003)).

p21^{Cip1} no només actua com a inhibidor del cycle cel·lular en fase G₁, com acabem de veure (Sherr and Roberts, 1999), sinó que també té un paper com a inhibidor del cycle en la transició G₂-M (Bunz *et al.*, 1998; Cayrol *et al.*, 1998; Taylor and Stark, 2001; Wendt *et al.*, 2005), tot i que com ja hem comentat en altres apartats d'aquesta introducció, la principal via activa en el *checkpoint* de G₂/M és la via encarregada de fosforilar a Cdc25 i inhibir la seva activitat, d'aquesta manera s'evita l'activació del complex Cdk1-ciclina B i la entrada en mitosi.

Tot i així, existeixen diferents evidències del paper de p21^{Cip1} en l'aturada del cycle cel·lular en fase G₂/M (revisat a (Taylor and Stark, 2001)). p21^{Cip1} està present en la cèl·lula durant la fase G₁, els seus nivells decauen durant la fase S i tornen a augmentar durant la fase G₂ (Dulic *et al.*, 1998). Durant les fases G₂ i mitosi, p21^{Cip1} s'acumula en el nucli on també es pot associar als complexos Cdk-ciclina A i Cdk-ciclina B i pot provocar una aturada transitòria del cycle cel·lular. La trobada d'una menor acumulació de ciclina B1 en el nucli en MEFs p21^{Cip1}-/- indica que potser p21^{Cip1} podria regular també la localització nuclear de ciclina B1 i per tant, podria regular l'activitat del complex Cdk1-ciclina B (Dulic *et al.*, 1998).

D'altra banda, diferents treballs mostren com per tal que hi hagi una aturada del cicle cel·lular després del dany al DNA en fase S o G₂ és necessària l'activació transcripcional de p21^{Cip1}. Per exemple, experiments amb cèl·lules HCT116 deficientes en del gen de p21^{Cip1} exposades a radiació ionitzant demostren com aquestes cèl·lules no poden aturar correctament el cicle cel·lular en fase G₂ després de ser sotmeses al dany, de manera similar a experiments realitzats en cèl·lules HCT116 deficientes en p53. Tot i així, la mancança de p53 o p21^{Cip1} en aquestes cèl·lules danyades no impedeix la progressió cap a la mitosi que acabarà en citocinesi aberrant (Bunz *et al.*, 1998).

Es proposen quatre mecanismes mitjançant els quals p21^{Cip1} participa en la inhibició de l'activitat de Cdc2 (Cdk1) i provoca l'aturada del cicle cel·lular en fase G₂ (revisat en (Taylor and Stark, 2001)). En primer lloc, p21^{Cip1} inhibeix l'activitat de les CdKs mitjançant la unió directa als complexos Cdk-ciclina com ja hem comentat anteriorment. En alguns estudis, p21^{Cip1} immunoprecipita amb ciclina B1 en cèl·lules que sobreexpressen p53 o p21^{Cip1} (Medema *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999). D'altra banda, estudis *in vitro* mostren com p21^{Cip1} pot inhibir a Cdk1, tot i que p21^{Cip1} és menys eficient en la inhibició de Cdk1 que en la inhibició d'altres Cdks (Harper *et al.*, 1995). Tot i així, p21^{Cip1} podria estar inhibint el complex Cdk1-ciclina B en presència de dany al DNA, en aquest cas, es creu que serien necessaris uns nivells elevats de p21^{Cip1} per inhibir eficientment aquest complex. Experiments en *Xenopus* proposen un segon mecanisme mitjançant el qual p21^{Cip1} podria inhibir a Cdk1. Aquests experiments suggereixen que és necessària la presència de Cdk2 activa per a generar Cdc2 (Cdk1 en humans) activa i per tant, quan p21^{Cip1} inhibeix a Cdk2 estaria provocant una disminució de l'activitat de Cdc2. Tot i aquestes evidències, el mecanisme mitjançant el qual Cdk2 activa Cdc2 en *Xenopus* és desconegut i també es desconeix l'existència d'un mecanisme similar en mamífers (Guadagno and Newport, 1996). El tercer mecanisme proposa que la sobreexpressió de p21^{Cip1} interfereix amb la fosforilació activadora de CAK sobre Cdk1 en cèl·lules U2OS. Així doncs, es proposa que la unió de p21^{Cip1} a Cdk1 bloqueja l'accés de CAK i evita l'activació de Cdk1 fet que provoca una aturada del cicle en fase G₂ (Hitomi *et al.*, 1998; Smits *et al.*, 2000). Finalment, el quart mecanisme està basat en la unió de p21^{Cip1} a PCNA. L'expressió d'un mutant de p21^{Cip1} que s'uneix a PCNA però no a les Cdks és capaç d'aturar les cèl·lules de càncer colorectal DLD1 en G₂; en canvi, l'expressió d'un mutant de p21^{Cip1} que s'uneix a les Cdks però no a PCNA no provoca aturada del cicle cel·lular en G₂ (Cayrol *et al.*, 1998). Aquests resultats suggereixen que quan p21^{Cip1} inhibeix el PCNA durant el procés de síntesi del DNA estaria causant dany al DNA durant la fase S que portaria a la inhibició de Cdk1 i a la parada del cicle en G₂. Així

doncs, tots aquests mecanismes, demostren com p21^{Cip1} participa en la parada del cicle en fase G₂ depenent del context cel·lular.

Inhibició del PCNA:

Posteriorment, es va demostrar que p21^{Cip1} també pot modular la progressió del cicle cel·lular independentment de la unió a ciclines i Cdks mitjançant la inhibició dels components de la maquinària de replicació del DNA. Aquest fet és possible ja que la seqüència de p21^{Cip1} conté dos dominis separats responsables de la inhibició de Cdks i del PCNA de manera independent (Luo *et al.*, 1995; Goubin and Ducommun, 1995; Pan *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b; Waga *et al.*, 1994). A més, la unió de p21^{Cip1} a PCNA no afecta a la inhibició dels complexos Cdk-ciclina units a p21^{Cip1} (Zhang *et al.*, 1994).

Els primers indicis de la possible interacció entre p21^{Cip1} i PCNA van sorgir a partir dels aïllaments en cèl·lules proliferants de complexos quaternaris, formats per una Cdk, una ciclina, p21^{Cip1} i PCNA (Xiong *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993). En estudis posteriors, es va demostrar que p21^{Cip1} i PCNA podien unir-se directament (Waga *et al.*, 1994; Flores-Rozas *et al.*, 1994), així com també ho poden fer PCNA i Cdk2 (Koundrioukoff *et al.*, 2000). El fet d'unir-se a PCNA era un dels trets diferencials de la regió carboxi terminal de p21^{Cip1} respecte a la resta de proteïnes de la família Cip/Kip; posteriorment es va veure que p57^{Kip2} també s'unia a PCNA per l'extrem carboxi terminal (Watanabe *et al.*, 1998).

El PCNA és una proteïna que embolcalla la doble hèlix de DNA i funciona com a una anella ajudant al desplaçament de la DNA polimerasa δ i ε. El PCNA facilita la càrrega de la polimerasa a sobre les cadenes de DNA, i ajuda a la processivitat i al correcte funcionament d'aquestes DNA polimerases durant la replicació del DNA (Stillman, 1994; Kelman and Hurwitz, 1998). A més del paper en la replicació del DNA, el PCNA també actua en diferents formes de reparació del DNA, com per exemple en la reparació per escissió de nucleòtids (NER) (Shivji *et al.*, 1992; Nichols and Sancar, 1992). Diferents treballs proposen que aquests dos papers funcionals del PCNA, en la replicació i en la reparació del DNA, estan regulats per la interacció del PCNA amb proteïnes específiques i diferents per a cada una d'aquestes funcions (revisat a (Dotto, 2000)).

PCNA s'uneix a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, entre els aminoàcids 144-151 (Goubin and Ducommun, 1995; Warbrick *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b) i aquesta unió bloqueja l'activitat del PCNA com a cofactor de la DNA polimerasa δ, inhibint així

l'elongació de les cadenes de DNA i la progressió del cicle cel·lular (Waga *et al.*, 1994; Flores-Rozas *et al.*, 1994). Cayrol i col·laboradors observen que l'expressió de p21^{Cip1} en cèl·lules de càncer de colon humà deficientes en p53, permet la inhibició de la síntesi de DNA i provoca una aturada del cicle cel·lular en fase G1 i fase G2 de manera dependent de PCNA. Afegeixen que aquests resultats també s'observen si es sobreexpressa un mutant de p21^{Cip1} que no pot unir Cdks, de manera que aquest efecte és independent de la unió de p21^{Cip1} als complexos Cdk-ciclina. Aquests resultats demostren un cop més que p21^{Cip1} pot inhibir la progressió del cicle cel·lular per dos mecanismes independents (Cayrol *et al.*, 1998).

Com hem vist, la unió de p21^{Cip1} al PCNA pot inhibir la replicació del DNA, en canvi, el paper de PCNA en la reparació del DNA (NER) no es veu afectat per la unió a p21^{Cip1} (Shivji *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994). Tot i que estudis posteriors van suggerir que p21^{Cip1} pot inhibir la NER en condicions específiques (Pan *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1999). També cal destacar que la unió de p21^{Cip1} al PCNA no afecta a la càrrega del PCNA sobre el DNA ni a la mobilitat del PCNA per sobre les cadenes de DNA (Podust *et al.*, 1995).

La diferent modulació de la p21^{Cip1} sobre les funcions del PCNA, pot ser deguda a que p21^{Cip1} competeixi amb altres proteïnes per a unir-se al PCNA i que aquestes altres proteïnes ajudin al PCNA en alguna de les seves funcions. Per exemple, el lloc d'unió de p21^{Cip1} al PCNA es superposa al lloc d'unió de PCNA amb altres proteïnes que intervenen en el metabolisme del DNA com per exemple, Fen 1 (essencial per a la replicació del DNA en els fragments d'Okazaki) (Li *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996) o la DNA metil-transferasa MCMT (Chuang *et al.*, 1997). Així doncs, la competència entre aquests enzims i p21^{Cip1} podria explicar el perquè la unió de p21^{Cip1} a PCNA inhibeix la funció replicativa i no la funció de reparació. En el cas de MCMT, si p21^{Cip1} trenca la unió entre PCNA i MCMT, p21^{Cip1} podria estar regulant els nivells de metilació del DNA durant la replicació i possiblement també durant la reparació del DNA (Chuang *et al.*, 1997).

Estudis més recents, mostren com la unió al PCNA pot ser modulada per fosforilacions reversibles de la p21^{Cip1} en el seu extrem carboxi terminal (Scott *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2002). Fosforilacions en la T145 per PKB/Akt, S146 per PKC ζ o S160 per PKC de la p21^{Cip1}, disminueixen l'afinitat de la unió entre p21^{Cip1} i PCNA (revisat a (Child and Mann, 2006)). Com veurem tot seguit, existeixen altres proteïnes com: (HPV)-16 E7, c-Myc i GADD45 que també modulen la unió entre p21^{Cip1} i PCNA ja que competeixen amb el PCNA per a unir-se a p21^{Cip1}.

Proteïnes d'unió a p21^{Cip1} implicades en la regulació del cicle:

Com hem vist a l'apartat de proteïnes d'unió a p21^{Cip1}, algunes d'aquestes proteïnes també estan implicades en la regulació del cicle cel·lular i modulen l'activitat de p21^{Cip1} sobre els complexos Cdk-ciclina, ja sigui augmentant o disminuint el potencial d'inhibició de p21^{Cip1}, ja que formen complexos quaternaris que poden alterar la conformació de p21^{Cip1}. Tot seguit explicarem algunes d'aquestes proteïnes amb més detall:

- L'oncoproteïna del virus del papil·loma humà (HPV)-16 E7, s'uneix a p21^{Cip1} i anul·la la funció de p21^{Cip1} com a inhibidor dels complexos Cdk-ciclina, especialment dels complexos formats per Cdk2. A més, E7 també inhibeix la capacitat de p21^{Cip1} de bloquejar la síntesi de DNA dependent de PCNA, ja que E7 competeix amb el PCNA per a unir-se a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}. En canvi, E7 no trenca l'associació de p21^{Cip1} amb els complexos Cdk-ciclina tot i que sí que afecta a la inhibició d'aquests complexos dependent de p21^{Cip1} (Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997). Una possibilitat que explicaria aquest fenomen és que la unió de p21^{Cip1} als complexos Cdk-ciclina és, per si sola, insuficient per a inhibir l'activitat de les Cdk i que és necessària alguna altra regió de p21^{Cip1} ara distorsionada degut a la unió amb E7. Aquest mateix comportament de p21^{Cip1} s'ha pogut observar en estudis amb la p21^{Cip1} mutada en un sol aminoàcid (aa94) (Balbin *et al.*, 1996).
- Estudis en el nostre laboratori, van demostrar que la proteïna SET també pot associar-se a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, i no interfereix amb la unió de p21^{Cip1} als complexos Cdk-ciclina. Sorprenentment, la unió de SET a p21^{Cip1} provoca la reversió de la inhibició del complex Cdk2-ciclina E i un augment de la inhibició del complex Cdk1-ciclina B (Estanyol *et al.*, 1999; Canela *et al.*, 2003). Podria ser, igual que amb el cas de E7, que la unió de SET a p21^{Cip1} provoqui canvis conformacionals que no afecten a la unió de p21^{Cip1} amb els complexos Cdk-ciclina, però sí que modulen la seva activitat.
- La proteïna CARB (CIP-1-Associated Regulator of Cyclin B1) també s'uneix a l'extrem C-terminal de p21^{Cip1}. Aquesta proteïna es troba associada preferentment al centrosoma i als pols del fus mitòtic, tot i que en absència de p21^{Cip1}, també s'associa a la ciclina B1. Sembla que la unió entre CARB i p21^{Cip1}

afavoriria l'alliberament de la ciclina B1 i d'aquesta manera s'estaria afavorint la progressió a través de la fase M del cycle cel·lular (McShea *et al.*, 2000).

- El factor de transcripció c-Myc regula un gran nombre de gens relacionats amb el cycle cel·lular. Més endavant veurem la importància de la unió entre p21^{Cip1} i c-Myc en la regulació transcripcional. Cal destacar que c-Myc s'uneix a p21^{Cip1} per la mateixa regió que PCNA, d'aquesta manera, quan C-Myc s'uneix a p21^{Cip1}, aconsegueix rescatar parcialment l'activitat del PCNA i la síntesi del DNA (Kitaura *et al.*, 2000).
- Com ja s'ha vist extensament al llarg de la introducció, la fosforilació de pRb pels complexos Cdk-ciclina permet l'alliberament del factor de transcripció E2F i la progressió pel cycle cel·lular. D'una banda, p21^{Cip1} controla l'activitat dels complexos Cdk-ciclina, d'aquesta manera pot actuar indirectament sobre l'activitat transcripcional d'E2F i influir en la progressió del cycle cel·lular. D'altra banda, p21^{Cip1} es pot unir a E2F de manera directa facilitant així la regulació de l'activitat d'E2F de manera independent de pRb. A més, s'ha pogut comprovar que p21^{Cip1} també pot regular la transcripció *in vitro* (Delavaine and La Thangue, 1999).
- La proteïna induïda com a resposta al dany al DNA, GADD45, és una proteïna nuclear implicada en l'aturada de la proliferació, l'apoptosi i la estabilitat del DNA. GADD45 pot interaccionar amb p21^{Cip1} i també amb PCNA a través de regions diferents. La seva implicació en la regulació del cycle cel·lular és deguda a la competència que s'estableix entre p21^{Cip1} i GADD45 per a unir-se al PCNA, afectant així a la regulació de l'activitat del PCNA per p21^{Cip1} (Kearsey *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995a).
- La timidina cinasa 1, TK1, és un enzim que participa en la formació de dTTPs. p21^{Cip1} interacciona directament amb la TK1 a través del domini carboxi terminal. Aquesta interacció entre p21^{Cip1} i TK1 afecta a l'activitat de p21^{Cip1} ja que bloqueja l'associació entre p21^{Cip1} i Cdk2; d'aquesta manera, TK1 interfereix en la regulació del cycle cel·lular per part de p21^{Cip1} (Huang and Chang, 2001).
- La proteïna TOK1α (*p21 and Cdk-associated protein-1*) s'uneix de manera directa a la regió c-terminal de p21^{Cip1} i té un patró d'expressió similar al de p21^{Cip1} al llarg del cycle cel·lular. TOK1α també pot unir-se a la forma activa de Cdk2 i ho fa via la unió a p21^{Cip1}, formant així un complex ternari. D'aquesta

manera, TOK1 α augmenta l'efecte inhibidor de p21^{Cip1} sobre l'activitat cinasa de Cdk2 (Ono *et al.*, 2000).

En general, podem definir a p21^{Cip1} com un potent inhibidor dels complexos Cdk-ciclina, tot i que totes aquestes evidències recents fan visible que el potencial inhibidor de p21^{Cip1} depèn del context cel·lular ja que es pot veure regulat per interaccions amb altres proteïnes.

2.3.2 Paper de p21^{Cip1} en l'apoptosi

Existeix gran controvèrsia sobre el paper de p21^{Cip1} en la regulació de l'apoptosi. Un gran nombre de treballs suggereixen que p21^{Cip1} realitza un paper antiapoptòtic, mentre que altres treballs posicionen a aquesta proteïna com a proapoptòtica.

Per tal que una cèl·lula pugui desencadenar un programa d'apoptosi, cal un seguit d'esdeveniments complexos i seqüencials que es poden resumir en tres passos: iniciació, execució i degradació, els quals són portats a terme per diferents proteïnes, on destacarem la família de les caspases com a proteïnes executores d'aquest programa de mort cel·lular. La iniciació de l'apoptosi pot donar-se per dues vies diferents: la via extrínseca, on l'activació de les caspases s'inicia com a resposta a l'activació de receptors de mort de la superfície cel·lular mitjançant lligands específics; o bé la via intrínseca, on senyals intracel·lulars varien la permeabilitat de la membrana mitocondrial provocant l'alliberament de molècules que activaran les caspases (revisat a (Budihardjo *et al.*, 1999)). És interessant recordar que p21^{Cip1} s'ha trobat associada i controlant algunes d'aquestes proteïnes reguladores de l'apoptosi com veurem més endavant.

La p21^{Cip1} podria estar involucrada en la modulació de l'apoptosi a tres nivells diferents:

1. En determinades situacions, l'expressió de les ciclines, l'activació de les Cdks i el trànsit a través del cicle cel·lular és un pas necessari per a l'activació de les caspases i l'apoptosi. La possibilitat que els efectes antiapoptòtics de p21^{Cip1} siguin causats per la inhibició dels complexos Cdk-ciclina es reforça pel fet que s'observen efectes similars als de la p21^{Cip1} quan únicament s'expressen mutants dominants negatius de les Cdks que impedeixen l'activació del programa d'apoptosi (Meikrantz and Schlegel, 1996; Levkau *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 2000).

2. La p21^{Cip1} també podria protegir a les cèl·lules de l'apoptosi ja que pot actuar sobre molècules específiques involucrades directament en el procés apoptòtic, com són les caspases 8 i 10, la caspasa 3, la SAPK o la ASK1 (cadascuna d'aquestes interaccions serà explicada a continuació). L'associació de p21^{Cip1} a aquestes proteïnes podria veure's afectada per la localització cel·lular de la pròpia p21^{Cip1}. De fet, p21^{Cip1} és per ella mateixa un substrat de les caspases i com a conseqüència del tall dependent de caspasa, p21^{Cip1} perd el seu extrem carboxi terminal, que conté la senyal NLS, provocant una localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}. El tall de p21^{Cip1} afecta a la parada del cicle cel·lular, ja que p21^{Cip1} perd la seva capacitat d'unir-se a PCNA i de localitzar-se al nucli, i com a conseqüència tampoc podrà inhibir els complexos Cdk-ciclina (Levkau *et al.*, 1998; Gervais *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999).

3. Finalment, la p21^{Cip1} actuaria de manera indirecta sobre l'apoptosi ja que s'ha vist que un augment en l'expressió de p21^{Cip1} pot induir gens que codifiquen per a proteïnes amb activitat antiapoptòtica (Chang *et al.*, 2000b).

A continuació descriurem alguns d'aquests processos on l'acció de p21^{Cip1} modula l'apoptosi i la relació entre p21^{Cip1} i algunes de les proteïnes d'unió relacionades amb aquest procés.

Com hem indicat anteriorment, les caspases són proteïnes efectores de l'apoptosi, i la seva activació és necessària per a desencadenar la mort cel·lular programada. S'han identificat unes 10 caspases diferents, entre les quals, la caspasa 3 juga un paper important en la via extrínseca de l'apoptosi mitjançada per Fas (Budihardjo *et al.*, 1999). La caspasa 3 es troba en el citoplasma en forma de proenzim (procaspasa 3) i s'activa per proteòlisi després de l'estimulació de Fas. p21^{Cip1} ha estat descrita com un inactivador de la caspasa 3 gràcies a la capacitat que té per associar-se al precursor procaspasa 3 (Suzuki *et al.*, 1998). Aquesta unió entre el domini amino terminal de p21^{Cip1} i la procaspasa 3 impedeix l'activació de la caspasa 3, ja que queda emmascarat el lloc de tall necessari per a la seva activació i d'aquesta manera, s'aconsegueix protegir a les cèl·lules davant de l'apoptosi induïda per Fas. Sembla ser que les mitocòndries estarien implicades en la formació del complex procaspasa 3-p21^{Cip1}, i que l'ATP i la proteïna cinasa PKA (*protein kinase A*) també serien importants, ja que la cinasa PKA fosforila a p21^{Cip1}, possiblement en les serines 2 i/o 15, i que és aquesta p21^{Cip1} fosforilada la que s'uneix a la procaspasa 3 (Suzuki *et al.*, 1999b; Suzuki *et al.*, 2000). D'altra banda, si la caspasa 3 ja està activada, la p21^{Cip1} no s'hi pot unir i p21^{Cip1} es converteix en un substrat de la caspasa 3 (Levkau *et al.*,

1998;Gervais *et al.*, 1998;Zhang *et al.*, 1999). S'ha pogut observar que el producte truncat de p21^{Cip1} resultant del tall per caspasa 3 no és capaç d'aturar el cicle cel·lular ni d'inhibir l'apoptosi (Zhang *et al.*, 1999).

La subfamília de cinases SAPKs (*stress-activated protein kinases*), que són molt semblants a les cinases de la família JNKs, s'activen en resposta a una gran varietat d'estrès cel·lular, incloent el dany al DNA, tractaments amb TNF- α o el xoc tèrmic. Les cinases SAPKs fosforilen factors de transcripció importants per a l'activació de les vies senyalitzadores d'estrès cel·lular. És interessant ressaltar que p21^{Cip1} s'ha trobat unida directament a SAPK. La unió entre p21^{Cip1} i SAPK té lloc a través de l'extrem amino terminal de p21^{Cip1} (aminoàcids 1-84), i no només inhibeix l'activitat catalítica intrínseca de SAPK, sinó que també bloqueja la seva fosforilació i la seva activació. D'aquesta manera, mitjançant la unió a SAPK, p21^{Cip1} participa directament en la regulació de les vies activades per l'estrès cel·lular com per exemple el dany al DNA (Shim *et al.*, 1996).

Asada i col·laboradors observen com p21^{Cip1} pot actuar també per sobre de les cinases que acabem de mencionar, unint-se i inhibint a la cinasa ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*). Durant la diferenciació de monòcits, p21^{Cip1} adquireix una localització citoplasmàtica i és aquesta p21^{Cip1} citoplasmàtica la que s'associa a ASK1 amb la conseqüent inhibició de la seva activitat i de la cascada de senyalització de les MAPK, proporcionant a les cèl·lules un fenotip de resistència a l'apoptosi (Asada *et al.*, 1999).

Existeix un gran nombre de treballs on analitzen detalladament la implicació de p21^{Cip1} en l'apoptosi en uns tipus cel·lulars específics i sota uns estímuls apoptòtics determinats. Els diferents estudis arriben a conclusions a vegades contraposades sobre el paper de p21^{Cip1} en l'apoptosi (pro-apoptòtica o anti-apoptòtica) i de si aquesta funció de p21^{Cip1} és dependent o independent de p53 (revisat en (Gartel and Tyner, 2002;Liu *et al.*, 2003;Gartel, 2005)). Un dels models cel·lulars on millor s'ha estudiat el paper de p21^{Cip1} en l'apoptosi, és en la línia cel·lular de càncer de colon HCT116 i en la seva línia derivada HCT116 p21^{-/-}, on p21^{Cip1} ha estat mutada per recombinació homòloga (Waldman *et al.*, 1995). La controvèrsia que gira entorn al paper de p21^{Cip1} en l'apoptosi s'ampliarà en la discussió d'aquesta tesi.

2.3.3 p21^{Cip1} i senescència

p21^{Cip1} també ha estat relacionada amb la senescència. La inducció de p21^{Cip1} és essencial per a la sortida del cicle cel·lular no només com a resposta temporal davant el dany al DNA, sinó també és essencial per a produir una aturada permanent associada a la senescència o a la diferenciació terminal de diferents tipus cel·lulars (revisat a (Roninson, 2002)).

Si recordem, un dels primers estudis on es va descriure p21^{Cip1} pretenia trobar gens els quals la seva expressió s'induïa en cèl·lules senescentes (Noda *et al.*, 1994). Noda i col·laboradors, estudiaven aquests gens en cultius de fibroblasts humans senescentes i van comprovar com un dels gens *sdi* (*senescent cell-derived inhibitors*) s'expressava entre 10 i 20 vegades més en cèl·lules senescentes comparat amb cèl·lules joves. Van poder observar com l'expressió d'aquest gen *sdi*, *sdi1*, augmentava en paral·lel al fenotip cel·lular senescent i a la pèrdua de proliferació cel·lular (Noda *et al.*, 1994). Posteriorment es va poder comprovar com aquest gen *sdi1*, localitzat al braç p del cromosoma 6, codificava per a p21^{Cip1}.

Altres estudis també proposen una regulació de la senescència per part de p21^{Cip1}. Per exemple, Dulic i col·laboradors van observar que en cèl·lules senescentes hi havia una acumulació de complexos Cdk2-ciclina E i Cdk2-ciclina D1 inactius, probablement units a p21^{Cip1} (Dulic *et al.*, 1993). A més, la sobreexpressió de p21^{Cip1} sota un promotor induïble en línies cel·lulars humanes, indueix l'aturada del cicle cel·lular i un fenotip senescent. En aquestes línies cel·lulars, l'expressió de p21^{Cip1} inhibeix gens implicats en la mitosi, la replicació del DNA i la reparació i, en canvi, indueix gens associats a senescència i gens implicats en malalties d'edat avançada com l'arteriosclerosi i l'Alzheimer (Chang *et al.*, 2000b). S'ha pogut observar com l'expressió de p21^{Cip1} o de p16^{INK4a} és suficient per a induir la senescència en diferents línies immortals de fibroblasts humans (Vogt *et al.*, 1998).

2.3.4 p21^{Cip1} i la diferenciació cel·lular

A més de les funcions ja descrites per a p21^{Cip1}, també s'ha vist que aquesta proteïna juga un paper complex en la diferenciació, ja que la sortida del cicle cel·lular és indispensable per a la diferenciació terminal d'alguns tipus cel·lulars. Existeix un gran nombre de treballs que demostren que l'expressió de p21^{Cip1} augmenta durant la diferenciació en diverses línies cel·lulars.

La inducció de p21^{Cip1} s'ha observat durant els processos de diferenciació en cèl·lules hematopoètiques (Jiang *et al.*, 1994; Steinman *et al.*, 1994), en múscul esquelètic (Parker *et al.*, 1995) i en mioblasts en cultiu on l'expressió de p21^{Cip1} precedeix a la dels marcadors musculars (Halevy *et al.*, 1995) entre d'altres (revisat en (Sherr and Roberts, 1995; Gartel, 2006)). L'expressió de p21^{Cip1} també s'indueix en la diferenciació terminal d'alguns tipus cel·lulars com les cèl·lules mielomonocítiques cap a monòcits (Asada *et al.*, 1999). L'estimulació per TNF- α , induueix la diferenciació de cèl·lules sanguínies perifèriques mononuclears cap a osteoclasts mitjançant la inducció de p21^{Cip1} (Kwak *et al.*, 2005). En alguns d'aquests casos la p21^{Cip1} és induïda de manera independent de p53 (Parker *et al.*, 1995), mentre que en altres la seva inducció si que depèn de p53.

Curiosament, han aparegut alguns treballs que correlacionen el paper de p21^{Cip1} en la diferenciació amb una localització citoplasmàtica de la proteïna. Per exemple, la diferenciació monocítica es troba lligada a la translocació o retenció de p21^{Cip1} en el citoplasma (Asada *et al.*, 1999). La translocació de p21^{Cip1} del nucli cap al citoplasma correlaciona amb una conversió dels miofibroblasts pancreàtics cap a fibroblasts (Manapov *et al.*, 2005). En la diferenciació neuronal també trobem que l'expressió de p21^{Cip1} al citoplasma contribueix en el procés de desenvolupament de les neurones nounates, en aquest cas inhibint l'activitat Rho cinasa, com veurem en el següent apartat (Tanaka *et al.*, 2002). És interessant estudiar en quins mecanismes està intervenint la p21^{Cip1} citoplasmàtica per tal d'influir sobre la diferenciació, tal i com hem comentat anteriorment, en alguns casos es creu que tindria una influència directa sobre l'apoptosi.

Tot i aquestes evidències on es mostra una inducció de p21^{Cip1} durant el procés de diferenciació, cal destacar que el paper de p21^{Cip1} en la diferenciació cel·lular aixeca polèmica, ja que la seva funció no està del tot clara. Actualment es considera que p21^{Cip1} té un paper dual com a inductor i inhibidor de la diferenciació depenent del tipus cel·lular i de l'estadi específic de diferenciació (revisat a (Gartel, 2006)).

Per exemple, p21^{Cip1} juga un paper positiu en els primers estadis de la diferenciació de queratinòcits, mentre que té un paper negatiu en les fases terminals d'aquesta diferenciació (Missero *et al.*, 1996; Di Cunto *et al.*, 1998). A més, és necessària la baixada de l'expressió de p21^{Cip1} en la diferenciació dels osteoblasts ja que la seva presència inhibeix aquesta diferenciació (Bellosta *et al.*, 2003). Un altre exemple molt evident d'aquesta dualitat és el protagonitzat per Steinman i

col·laboradors, ja que van ser un dels primers a descriure el paper de p21^{Cip1} com a inductor de la diferenciació en cèl·lules hematopoiètiques (Steinman *et al.*, 1994) mentre que actualment han descrit que realitza el paper oposat actuant com a inhibidor de la diferenciació cap a cèl·lules mieloides (Ghanem and Steinman, 2006).

Dins de tota aquesta polèmica, és interessant destacar l'estudi de diferenciació en cèl·lules de leucèmia humanes totipotents realitzat per Muñoz-Alonso i col·laboradors. En aquest model cel·lular, l'expressió condicional de p21^{Cip1} o de p27^{Kip1} provoca l'aturada de la proliferació i estimula a les cèl·lules cap a la diferenciació. La sobreexpressió de p21^{Cip1} promou la diferenciació d'aquestes cèl·lules cap a megacariòcits, mentre que p27^{Kip1} promou la diferenciació cap a eritròcits. Aquest model cel·lular posa de manifest que tot i que p21^{Cip1} i p27^{Kip1} tenen funcions redundants, també posseeixen funcions biològiques exclusives (Munoz-Alonso *et al.*, 2005).

Tots aquests treballs obren encara més preguntes sobre el rol de p21^{Cip1} en la diferenciació. Els mecanismes específics de perquè en un tipus cel·lular p21^{Cip1} actua com a inhibidor de la diferenciació mentre que en altres tipus cel·lulars la indueix, són desconeguts. És per això que calen més evidències per tal de poder entendre com la p21^{Cip1} modula la diferenciació.

2.3.5 Paper de p21^{Cip1} en la migració i el citoesquelet

Estudis en llevats van suggerir una possible funció de les proteïnes Cip/Kip en la regulació del citoesquelet i la mobilitat cel·lular, que posteriorment es va comprovar que també succeïa en cèl·lules de mamífer. En cèl·lules de mamífer, la dinàmica del citoesquelet està regulada per la família de les Rho GTPases d'on se'n coneixen 20 membres. Rho i el seu efector Rho-cinasa (ROCK) juguen un paper molt important en la regulació de la formació de fibres d'estrès, els contactes focals i la contractibilitat de les fibres del citoesquelet d'actina i miosina (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Les proteïnes de la família Cip/Kip inhibeixen la via de senyalització de Rho/ROCK a diferents nivells, afectant a l'organització del citoesquelet i a la mobilitat cel·lular (revisat (Besson *et al.*, 2004)). D'altra banda, Rho també és capaç de regular els nivells de p21^{Cip1} i p27^{Kip1}, creant així un feedback negatiu entre aquestes proteïnes (revisat a (Coqueret, 2003; Besson *et al.*, 2008)). La importància d'aquesta xarxa de relacions entre els inhibidors de Cdks i la via de senyalització de Rho mostra uns

mecanismes bàsics de coordinació entre les funcions del citoesquelet i la divisió cel·lular, que són necessaris per al correcte funcionament d'aquests.

Centrant-nos en la $p21^{Cip1}$, diferents estudis indiquen que la $p21^{Cip1}$ citoplasmàtica pot unir-se i inhibir a ROCK1 i modular l'organització del citoesquelet d'actina (Tanaka *et al.*, 2002; Lee and Helfman, 2004). La inhibició de ROCK per $p21^{Cip1}$, promou l'extensió de neurites en cèl·lules de neuroblastoma i en neurones hipocampals (Tanaka *et al.*, 2002). A més, la inhibició de ROCK per $p21^{Cip1}$ també pot jugar un paper clau durant la progressió tumoral augmentant la mobilitat cel·lular. En cèl·lules NIH3T3 transformades per Ras, els nivells de $p21^{Cip1}$ citoplasmàtics són elevats, i és en el citoplasma on $p21^{Cip1}$ inhibeix l'activitat de ROCK i provoca la pèrdua de les fibres d'estrès d'actina (Lee and Helfman, 2004). Aquests estudis suggereixen que la localització de $p21^{Cip1}$ en el citoplasma en cèl·lules transformades contribueix no només a favor de la proliferació cel·lular, sinó també a un increment de la mobilitat cel·lular contribuint a un fenotip invasiu i a la metàstasi.

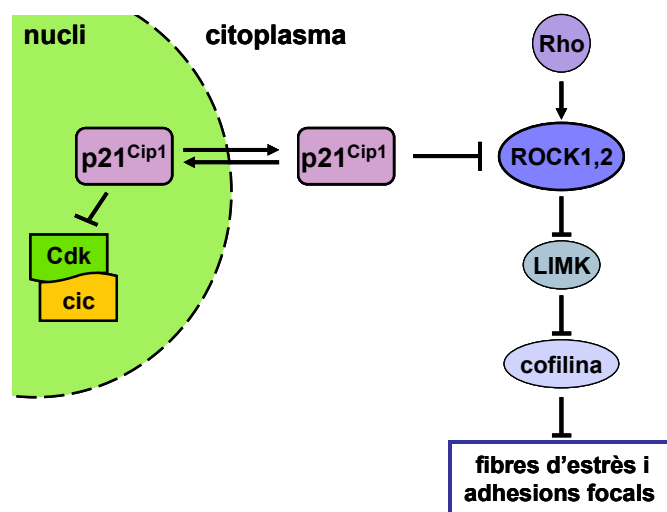


Figura 12: Esquema de la regulació de la via de Rho i del citoesquelet per part de la $p21^{Cip1}$ citoplasmàtica. El paper de Rho és crucial per a la correcta organització del citoesquelet. Rho modela el citoesquelet d'actina i els microtúbuls a través de l'activació del seu efector ROCK1 i 2, el qual activa a la proteïna cinasa LIMK. LIMK és la encarregada de fosforilar i inhibir el factor despolaritzador d'actina cofilina, aconseguint un augment en la polimerització d'actina i una estabilització de les fibres d'estrès. Quan $p21^{Cip1}$ es localitza en el citoplasma pot inhibir els efectors de Rho (ROCK1 i 2) i modular d'aquesta manera l'organització del citoesquelet d'actina (adaptada de (Besson *et al.*, 2004)).

2.3.6 p21^{Cip1} com a regulador transcripcional

Diferents estudis suggereixen que les proteïnes Cip/Kip podrien funcionar com a cofactors transcripcionals. En models on p21^{Cip1} s'acobla artificialment al DNA, s'ha vist que pot actuar com a un repressor transcripcional (Delavaine and La Thangue, 1999). Aquests models permeten construir una hipòtesi molt interessant on es suggereix que les formes nuclears de p21^{Cip1} no actuen només com a inhibidors dels complexos Cdk-ciclina, sinó que simultàniament inhibeixen la transcripció de gens implicats en el creixement cel·lular i en la resposta a mitògens; d'aquesta manera p21^{Cip1} actua des de diversos angles per a poder regular el cicle cel·lular i inhibir-lo de manera més eficient.

S'ha vist que p21^{Cip1} regula l'activitat d'alguns factors de transcripció com NF-κB, STAT3, c-Myc, E2F i el receptor d'estrògens (Coqueret and Gascan, 2000; Perkins, 2002; Coqueret, 2003; Fritah *et al.*, 2005; Besson *et al.*, 2008) i l'expressió de p21^{Cip1} inhibeix diferents gens implicats en la progressió del cicle cel·lular com els gens que codifiquen per a la DNA polimerasa α, la topoisomerasa II, la ciclina B1 i la Cdk1, impedit així una segregació cromosòmica inapropiada després del dany al DNA (Chang *et al.*, 2000a; Chang *et al.*, 2000b). A més, p21^{Cip1} estimula la transactivació de la histona acetilasa CBP/p300 (Snowden *et al.*, 2000; Gregory *et al.*, 2002) i aquesta modulació de l'activitat de CBP/p300 podria indicar que p21^{Cip1} actuaria com un regulador global dels promotors depenent de CBP mitjançant la regulació de l'activitat de CBP o el contacte de CBP amb les RNA polimerases. El significat biològic d'aquestes interaccions encara no és del tot conegut, per exemple p21^{Cip1}, mitjançant l'associació a E2F1, actuaria com a repressor transcripcional sobre Wnt4 i Cdc25A, prevenint el desenvolupament de tumors després del dany al DNA (Devgan *et al.*, 2005; Vigneron *et al.*, 2006).

Com ja hem comentat en l'apartat 2.3.1, la proteïna p21^{Cip1} pot unir-se directament a la regió amino terminal d'E2F, aquesta unió li permet la regulació de l'activitat transcripcional d'E2F de manera independent de pRb i Cdk-ciclina (Delavaine and La Thangue, 1999). Estudis recents mostren que p21^{Cip1} també pot unir-se a l'extrem amino terminal de c-Myc i interfereix amb la formació dels complexos c-Myc-Max, inhibint la transcripció depenent de c-Myc (Kitaura *et al.*, 2000). Al mateix temps, com hem comentat abans, la unió entre c-Myc i p21^{Cip1} modula la capacitat d'inhibir la síntesi de DNA per part de p21^{Cip1} ja que c-Myc competeix amb el PCNA per a unir-se al domini carboxi terminal de p21^{Cip1}. Kitaura i col·laboradors, proposen que el balanç

de la inactivació recíproca entre c-Myc i p21^{Cip1} pot determinar processos cel·lulars com la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi (Kitaura *et al.*, 2000).

p21^{Cip1} també interacciona directament amb els factors de transcripció STAT3 i n'inhibeix la seva activitat, tot i que el domini d'interacció entre aquestes dues proteïnes encara és desconegut. Els factors STAT són proteïnes citoplasmàtiques que en resposta a l'estimulació dels receptors de citoquines transloquen al nucli i activen la transcripció de gens diana específics. Aquesta interacció obre les portes a un nou paper de p21^{Cip1}, on s'insinua que p21^{Cip1} podria estar també implicada en la regulació de diferents cascades de senyalització intracel·lular (Coqueret and Gascan, 2000).

Tots aquests exemples, fan pensar que l'activitat transcripcional de la p21^{Cip1} nuclear, i de les altres proteïnes Cip/Kip, podria estar relacionada amb la inhibició o la retroalimentació negativa de gens implicats en la progressió del cicle cel·lular. La funció transcripcional de p21^{Cip1} és probablement independent de l'activitat sobre els complexos Cdk-ciclina i l'aturada del cicle cel·lular, aquesta nova funció de p21^{Cip1} pot funcionar com a mecanisme paral·lel per tal d'aconseguir una parada del cicle més eficient.

2.4 Regulació dels nivells de p21^{Cip1}: transcripció i degradació

Transcripció:

Els nivells de p21^{Cip1} són baixos en cèl·lules quiescents, però augmenten ràpidament quan les cèl·lules són estimulades amb factors de creixement a l'inici de la fase G₁, posteriorment la seva expressió comença a créixer a mesura que les cèl·lules avancen per la fase G₁.

Existeixen diferents senyals que regulen els nivells i l'activitat de p21^{Cip1}, la seva expressió està controlada a nivell transcripcional per mecanismes dependents i independents de p53. Tot i així, el paper de p21^{Cip1} més descrit i documentat és el seu paper en la via de p53. p21^{Cip1} està regulada transcripcionalment de manera directa per p53, la qual s'indueix en resposta a dany en el DNA com ja hem explicat anteriorment (El-Deiry *et al.*, 1993; El Deiry *et al.*, 1994). Recentment, s'ha observat que p53 indueix la transcripció de nous trànscrips de p21^{Cip1} en cèl·lules humanes. L'existència d'aquests trànscrips alterns mostra la complexitat del gen de p21^{Cip1} i obre nous camins d'investigació (Radhakrishnan *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓ

Tot i que la p53 és el principal factor de transcripció de p21^{Cip1}, l'expressió de p21^{Cip1} és normal en embrions i en teixits de ratolins deficientes de p53. Aquest fet insinua que un augment dels nivells de p21^{Cip1} pot ser el resultat d'altres mecanismes transcripcionals independents de p53. Tot i així, encara que la p53 no sigui indispensable en la inducció de la transcripció de p21^{Cip1}, la irradiació en ratolins normals o p53^{-/-}, suggereix que la regulació de p21^{Cip1} dependent de p53 sí que és crítica en resposta al dany al DNA (Dulic *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1995).

L'expressió de p21^{Cip1} també és elevada en alguns teixits durant el desenvolupament o en la sortida del cicle cel·lular. En el cas de la diferenciació terminal, la inducció de p21^{Cip1} és independent de p53. En cèl·lules tractades amb alguns factors de creixement o amb determinats agents de diferenciació s'activa la transcripció de p21^{Cip1} per mecanismes independents de p53 (revisat a (Gartel and Tyner, 1999); (Liu *et al.*, 2003)). Així doncs, l'expressió de p21^{Cip1} pot ser induïda per sèrum, àcid retinoic, vitamina D3 i els factors de creixement: NGF, EGF, TGF-β, PDGF, IGF i FGF.

Un gran nombre de factors de transcripció, incloent STATs, E2Fs, AP1, AP2, Sp1/Sp3, BRCA1, Smads, C/EBPα, C/EBPβ i bHLH estimulen la transcripció de p21^{Cip1} a través d'elements *cis* en el promotor de p21^{Cip1} (revisat en (Gartel and Tyner, 1999; Liu *et al.*, 2003)).

Per contra, també s'han identificat altres factors que reprimeixen els nivells basals de transcripció, com c-Myc i HBP1 (Gartel *et al.*, 1998; Gartel *et al.*, 2001; Gartel and Radhakrishnan, 2005). HBP1 (*HMG-box protein-1*), és una proteïna d'unió a pRB que pot reprimir el promotor de p21^{Cip1} i inhibir la inducció de l'expressió de p21^{Cip1} per E2F, per tant, l'acció de E2F i HBP1 sobre el aquest promotor tindria efectes oposats (Gartel *et al.*, 1998). La repressió de la transcripció per part de c-Myc sembla ser indirecta, tot i que està del tot clar el seu mecanisme d'acció. D'una banda c-Myc pot unir-se i inhibir l'activitat del factor de transcripció Sp1/Sp3, que com hem dit anteriorment indueix la transcripció de p21^{Cip1} i d'altra banda podria estar interferint en l'activació de la transcripció per part de Miz-1 (Gartel *et al.*, 2001; Gartel and Radhakrishnan, 2005). Amb tot això, la repressió del promotor de p21^{Cip1} per part de c-Myc, podria estar contribuint a l'habilitat de c-Myc per a promoure la proliferació cel·lular.

A més, algunes vies de senyalització també modulen la transcripció de p21^{Cip1}, com és l'exemple de l'oncogen Ras. Ras provoca la senescència prematura en

fibroblasts primaris acompanyada d'una acumulació de p53, p21^{Cip1} i p16^{Ink4a} (Serrano *et al.*, 1997). Aquesta inducció de p21^{Cip1} per Ras i p53 requereix dels llocs d'unió a Sp1 (Kivinen *et al.*, 1999). Altres treballs mostren un paper antagonista de Myc sobre la inducció de p21^{Cip1} mitjançada per Ras, aquests efectes són independents de Miz-1 però dependents de Sp1 (Vaque *et al.*, 2005).

Amb tots aquests elements reguladors del promotor de p21^{Cip1}, i d'altres que no hem mencionat, es demostra que p21^{Cip1} és capaç d'actuar com a sensor cel·lular i d'integrar un gran nombre de senyals tant extra com intracel·lulars, que afectaran als nivells proteics de p21^{Cip1} per a poder finalment conduir la cèl·lula cap a proliferació o aturada del cicle cel·lular.

Patrons d'expressió:

En la majoria de teixits ratolí, ja sigui durant el desenvolupament o en l'animal adult, l'expressió de p21^{Cip1} és independent de p53 (Macleod *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1995). Tot i així, la majoria dels teixits requereixen de p53 per a induir els nivells de p21^{Cip1} en resposta al dany al DNA, com per exemple després d'irradiar l'animal amb radiacions γ . Aquests resultats mostren com l'expressió de p21^{Cip1} en els teixits normals no és dependent de p53, mentre que la inducció de p21^{Cip1} després del dany al DNA requereix de p53. A més, l'expressió de p21^{Cip1} té un paper fonamental en la sortida del cicle cel·lular cap a estadis terminals de la diferenciació (Macleod *et al.*, 1995) i cap a la senescència (Noda *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997). Així doncs, en l'animal adult, l'expressió de p21^{Cip1} es troba principalment en teixits diferenciats i en teixits amb un recanvi cel·lular elevat com la pell o el tracte gastrointestinal (Huppi *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1995; Gartel *et al.*, 1996a). D'altra banda, la sobreexpressió de p21^{Cip1} indueix l'expressió de gens responsables de malalties associades amb la edat com per exemple la enfermetat d'Alzheimer (Chang *et al.*, 2000b).

Degradació:

p21^{Cip1} és una proteïna inestable, amb una vida mitja al voltant de 30 minuts. La principal via de degradació de p21^{Cip1} és la via del proteasoma, ja sigui de manera dependent o independent d'ubiquïtina (Sheaff *et al.*, 2000; Touitou *et al.*, 2001; Bloom *et al.*, 2003; Bendjennat *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006).

Bornstein i col·laboradors, van observar la implicació del complex de la SCF^{Skp2} ubiquïtina lligasa en la degradació de p21^{Cip1} en la fase S (Bornstein *et al.*, 2003), en un procés similar al de la degradació de p27^{Kip1}. És el complex Cdk2-ciclina E el que s'encarrega de fosforilar a p21^{Cip1} en la serina 130 al mateix temps que es forma un

INTRODUCCIÓ

complex trimèric (Cdk2-ciclina E- p21^{Cip1}) necessari per al reconeixement de la ubiquitina lligasa SCF^{Skp2}. A diferència de p27^{Kip1}, la fosforilació de p21^{Cip1} estimula la seva ubiquitinització però no és absolutament necessària per a aquest procés (Bornstein *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Fins i tot, s'ha pogut observar la interacció directa entre p21^{Cip1} i SCF^{Skp2} en cèl·lules tractades amb H₂O₂ (Hwang *et al.*, 2007). Més recentment, altres E3-ubiquitina lligases també han estat implicades en la degradació de p21^{Cip1} de manera dependent d'ubiquitina com per exemple p53RFP (*p53-inducible RING-finger protein*) (Ng *et al.*, 2003) i CRL4^{Cdt2} (Abbas *et al.*, 2008). En el cas de CRL4^{Cdt2}, la seva activitat és dependent de la interacció de p21^{Cip1} amb PCNA. Finalment, l'acció de SCF^{Skp2} i CRL4^{Cdt2} és redundant ja que totes dues promouen la degradació de p21^{Cip1} durant la fase S del cicle cel·lular, en absència de dany.

D'altra banda, tot i que p21^{Cip1} pugui ser ubiquitinitzada, aquest pas no és imprescindible per a la seva degradació per proteasoma (Sheaff *et al.*, 2000), ja que la construcció de mutants de p21^{Cip1} que no es podien ubiquitinitzar *in vivo* també són sensibles a l'activitat del proteasoma. Aquest fet es podria explicar per la capacitat d'unió directa de l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} amb la subunitat C8 del proteasoma 20S, ja que aquesta unió condueix a p21^{Cip1} a una ràpida degradació independent d'ubiquitina (Touitou *et al.*, 2001). Treballs posteriors demostren que la unió de p21^{Cip1} amb PA28γ, una subunitat activadora del proteasoma 20S, facilita la degradació de p21^{Cip1} de manera independent d'ubiquitina (Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). En canvi, altres treballs es contraposen a aquests descobriments ja que descriuen que la cadena d'ubiquitina a l'extrem amino terminal és crítica per a fer de p21^{Cip1} un substrat del proteasoma i per tant, en aquest cas, la proteòlisi de p21^{Cip1} sí que requereix d'ubiquitinització (Bloom *et al.*, 2003).

Altres fosforilacions, com veurem en el següent apartat d'aquesta introducció, també poden modular els nivells de p21^{Cip1}, com per exemple la fosforilació en el residu serina 114 per part de la GSK-3β (*glycogen synthase kinase 3β*), (Lee *et al.*, 2007). Però no només la fosforilació de p21^{Cip1} pot regular l'estabilitat de la proteïna, ja que interaccions amb altres proteïnes i canvis en la localització cel·lular també poden influenciar en la seva estabilitat. Per exemple, la unió a Cdks incrementa la degradació via proteasoma de p21^{Cip1}; en canvi, la unió a PCNA protegeix a p21^{Cip1} de la degradació (Cayrol and Ducommun, 1998; Rousseau *et al.*, 1999). La ciclina D també interfereix en la degradació proteasomal de p21^{Cip1}, ja que competeix amb la subunitat C8 per a unir-se a p21^{Cip1} i d'aquesta manera pot impedir la seva degradació (Coleman *et al.*, 2003). Una altra proteïna d'unió a p21^{Cip1}, TSG101, també és capaç de regular

l'estabilitat de $p21^{Cip1}$ ja que podria interferir en la unió de $p21^{Cip1}$ amb C8 i prevenir la degradació de $p21^{Cip1}$ independent d'ubiquïtina. A més, TSG101 és una proteïna amb efectes sobre la diferenciació cel·lular dels queratinòcits i podria ser que $p21^{Cip1}$ actués de mitjancera en aquestes funcions (Oh *et al.*, 2002).

Treballs més recents identifiquen una nova proteïna WISp39 que estabilitza la $p21^{Cip1}$ i preveu la degradació de $p21^{Cip1}$ via proteasoma. WISp39 juntament amb Hsp90, s'uneix a l'extrem amino terminal de $p21^{Cip1}$ i impedeix la seva ubiquïtinització. Així doncs, aquest complex format per WISp39 i Hsp90 regula l'estabilitat de la proteïna (Jascur *et al.*, 2005).

Una altra regulació interessant dels nivells de $p21^{Cip1}$, s'estableix entre $p21^{Cip1}$ i el factor de transcripció C/EBP- α . El factor de transcripció C/EBP- α està relacionat amb el control del creixement cel·lular i la diferenciació. S'han observat nivells elevats de C/EBP- α en hepatòcits quiescents i en adipòcits diferenciats. D'una banda, C/EBP- α activa el promotor de $p21^{Cip1}$; d'altra banda, la unió directa entre C/EBP- α i $p21^{Cip1}$ induïx la pròpia estabilització de $p21^{Cip1}$ i per tant ajuda a la inhibició de la proliferació (Timchenko *et al.*, 1996; Timchenko *et al.*, 1997).

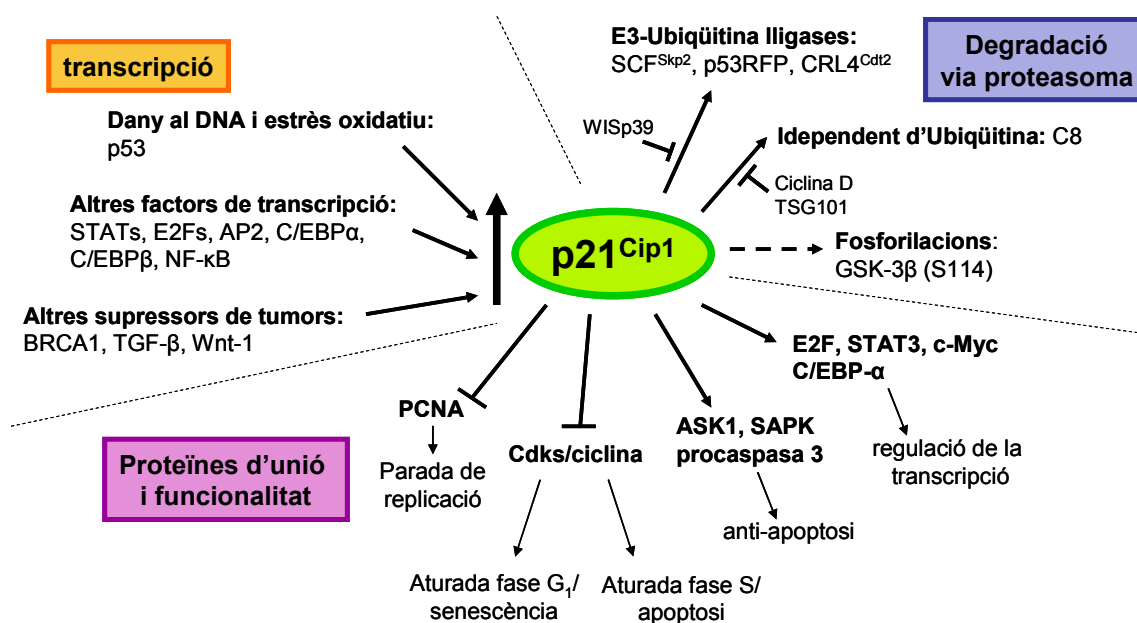


Figura 13: Esquema de la regulació dels nivells de $p21^{Cip1}$ i d'algunes de les seves principals funcions.

2.5 Modificacions post-traduccionals de p21^{Cip1}: la fosforilació

Com acabem de veure, la fosforilació de p21^{Cip1} pot regular l'estabilitat de la proteïna però no només això, ja que la fosforilació també pot afectar a la interacció de p21^{Cip1} amb altres proteïnes i pot modular la seva localització subcel·lular. Els treballs en el camp de la fosforilació de p21^{Cip1} són relativament recents, en els últims anys s'han identificat un gran nombre de residus de p21^{Cip1} que pateixen aquest tipus de modificació i que obren un gran ventall de possibilitats per a la modulació de p21^{Cip1}. Com es pot observar en la figura 12, molts d'aquests residus fosforilables es troben situats en l'extrem carboxi terminal de la proteïna; regió on es troba situat el domini d'unió a PCNA i la senyal NLS, que podran ser modulats per les fosforilacions adjacents.

Precisament, en el nostre laboratori es va realitzar un dels primers estudis de la fosforilació de p21^{Cip1}, on s'observa com la p21^{Cip1} present en els complexos Cdk2-ciclina A era fosforilada *in vitro* per la pròpia Cdk2 del complex (Jaumot *et al.*, 1997). El fet de que una CKI sigui substrat de la seva diana Cdk va ser descrit paral·lelament en el cas de la p27^{Kip1} (Vlach *et al.*, 1997; Sheaff *et al.*, 1997), i en els dos casos, aquesta fosforilació semblava estar relacionada amb l'estabilitat de la proteïna, afavorint la seva degradació i per tant, la progressió del cicle cel·lular.

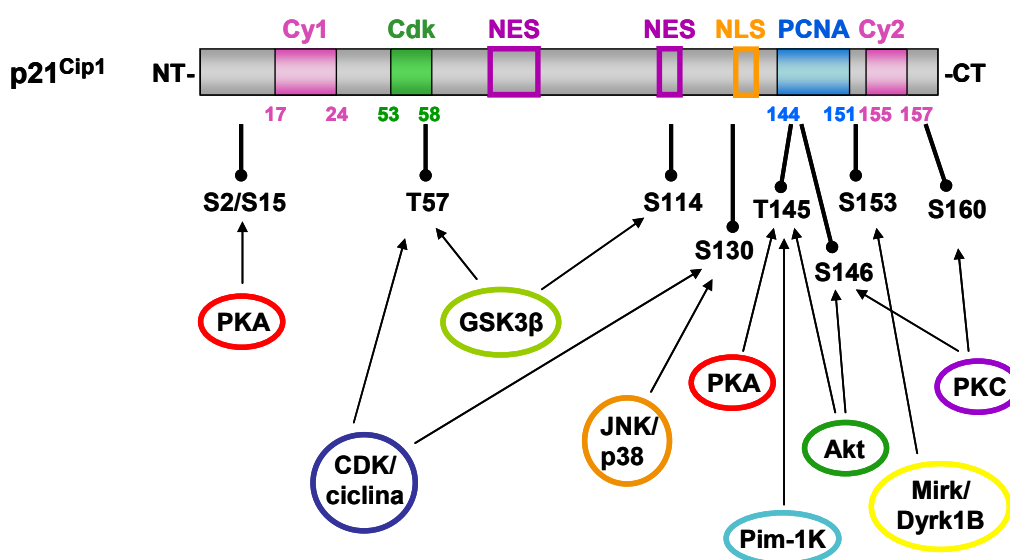


Figura 14: Esquema de l'estructura de p21^{Cip1} i dels residus fosforilables descrits fins al moment amb les principals cinases que els fosforilen.

Fins aquest moment, s'han descrit diferents cinases responsables de la fosforilació de p21^{Cip1}, aquestes cinases són: Akt (PKB), PKA, PKC, Pim-1K, GSK3 β , Cdks, JNK/p38, Mirk/Dyrk1B i la CK2. A continuació revisarem quins residus fosforilen cada una d'aquestes cinases i quins efectes tenen sobre la p21^{Cip1}.

En primer lloc, s'ha descrit que la cinasa CK2 pot fosforilar a p21^{Cip1} *in vitro*, a més, és interessant recordar que CK2 és una de les proteïnes d'unió a p21^{Cip1}. Tot i així, encara es desconeix el residu diana de la fosforilació i la funcionalitat d'aquesta fosforilació (Romero-Oliva and Allende, 2001).

S2/S15:

Com es pot observar en la figura 12, l'extrem amino terminal de la proteïna no presenta gaires residus modificats per la fosforilació. Tot i això, l'estudi portat a terme per Suzuki i col·laboradors proposa la fosforilació de les serines S2 i S15 de la p21^{Cip1} per part de la cinasa PKA (*protein kinase A*) (Suzuki *et al.*, 2000). Segons aquest estudi, p21^{Cip1} és substrat de PKA, al mateix temps que aquesta cinasa regula la formació del complex procaspasa 3-p21^{Cip1}. Una possible explicació d'aquests resultats seria la fosforilació del domini d'unió a procaspasa 3 per part de PKA, és dins d'aquest domini on es troben situades les S2 i S15, que per tant són candidates a ser fosforilades. Així doncs, la fosforilació d'aquestes dues serines per PKA afavorirà la formació del complex procaspasa 3-p21^{Cip1} i aquest fet tindrà implicacions en la resistència a l'apoptosi iniciada per Fas (Suzuki *et al.*, 2000).

T57/S114:

La cinasa GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3*), també pot fosforilar a p21^{Cip1} en dos residus diferents: la treonina 57 (Rossig *et al.*, 2002) i la serina 114 (Lee *et al.*, 2007). És possible que la fosforilació en el residu T57 tingui implicacions amb la unió i regulació de p21^{Cip1} als complexos Cdk-ciclina, ja que aquest residu està situat dins de la regió d'unió a les Cdks (revisat a (Child and Mann, 2006)). Pel que fa a la fosforilació de la S114, s'ha relacionat amb una regulació a la baixa dels nivells de p21^{Cip1}, ja que aquesta fosforilació afavoreix la degradació de p21^{Cip1} via proteasoma (Lee *et al.*, 2007). Rossig i col·laboradors també observen com la sobreexpressió de GSK3 β , provoca una disminució dels nivells de p21^{Cip1} indicant que l'activació d'aquesta cinasa desencadena la degradació de p21^{Cip1} (Rossig *et al.*, 2002), tot i que aquest tipus d'experiment no permet descartar si el residu implicat és la T57 o la S114.

S130:

Tal i com hem dit abans, va ser en el nostre laboratori on es va veure per primer cop que la p21^{Cip1} era fosforilada pel complex Cdk2-ciclina A, però es desconeixia quin era el residu diana d'aquesta fosforilació (Jaumot *et al.*, 1997). Altres estudis també van demostrar la fosforilació *in vitro* de p21^{Cip1} per part del complex Cdk2-ciclina A (Hengst *et al.*, 1998). Posteriorment, es va identificar la fosforilació *in vitro* del residu S130 pel complex Cdk2-ciclina E (Zhu *et al.*, 2005). Aquesta fosforilació permetria la degradació de p21^{Cip1} ja que com acabem de veure en l'apartat de la degradació de p21^{Cip1}, la fosforilació de la S130 afavoriria el reconeixement de p21^{Cip1} per part del complex de la SCF^{Skp2} ubiquitina lligasa (Bornstein *et al.*, 2003). Més recentment, s'ha pogut observar que la Cdk6 també pot fosforilar aquest residu (Jarviluoma *et al.*, 2006); en aquest treball, la p21^{Cip1} fosforilada en la S130 no presenta canvis en l'estabilitat ni alteració de la seva localització.

D'altra banda, el residu S130 també pot ser fosforilat *in vivo* per les cinases JNK1 i p38 α (Kim *et al.*, 2002), les quals s'activen sota condicions d'estrès i desencadenen una resposta apoptòtica. Sembla ser que la fosforilació de la S130 per aquestes dues cinases, augmenta l'estabilitat de la p21^{Cip1} (Kim *et al.*, 2002). El fet que la fosforilació d'aquest residu no indueixi un canvi de localització de p21^{Cip1} (Jarviluoma *et al.*, 2006) i que l'efecte principal de l'activació de la via JNK1/p38 sigui modulació de la transcripció, suggereix que la fosforilació en la S130 pot estar regulant l'activitat transcripcional de p21^{Cip1} en el nucli (revisat en (Child and Mann, 2006))

T145:

La treonina 145 és el residu fosforilable més ben caracteritzat de la p21^{Cip1}. La cinasa encarregada de fosforilar la T145 és Akt, o també coneguda com PKB (*protein kinase B*) (Zhou *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002), una serina/treonina cinasa relacionada amb la regulació de la proliferació i de la supervivència cel·lular i que actua per sota de la PI3K.

Una altra serina/treonina cinasa, la PKA, també pot fosforilar *in vitro* el residu T145 de p21^{Cip1} (Scott *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001). Igual que la fosforilació dels residus S2 i S15 de p21^{Cip1} per PKA, es probable que la fosforilació de la T145 també estigui relacionada amb una major resistència a l'apoptosi. Finalment, la T145 també pot ser fosforilada *in vitro* i *in vivo* per la cinasa Pim-1K, que és també una serina/treonina cinasa i a més, és una proteïna d'unió a p21^{Cip1}. Aquesta fosforilació regula la distribució subcel·lular de p21^{Cip1}, ja que al ser fosforilada per Pim-1K, p21^{Cip1} transloca cap al citoplasma (Wang *et al.*, 2002).

En termes generals, la fosforilació de la T145 de p21^{Cip1} comporta dos canvis per a la proteïna. En primer lloc, p21^{Cip1} perd la seva habilitat d'unir-se a PCNA ja que el residu T145 està dins de la pròpia seqüència d'unió a PCNA (Rossig *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). La segona conseqüència de la fosforilació en el residu T145, és la relocalització de p21^{Cip1} del nucli cap al citoplasma (Zhou *et al.*, 2001), tot i que en aquest cas no tots els treballs hi estan d'acord (Rossig *et al.*, 2001). Una possible explicació d'aquesta relocalització de p21^{Cip1} del nucli al citoplasma, seria el fet que el residu T145 està situat molt proper a la senyal NLS de p21^{Cip1} i podria interferir amb el reconeixement de la senyal NLS per part de les importines, com ja s'ha descrit en altres casos (Harreman *et al.*, 2004). La relocalització de p21^{Cip1} al citoplasma és un fet molt interessant ja que exposa a p21^{Cip1} davant de diferents proteïnes d'unió (com hem vist a la taula 1) i això li permet una modulació d'altres funcions cel·lulars (com ja hem pogut veure en altres apartats d'aquesta introducció i com discutirem més àmpliament en la discussió d'aquesta tesi).

S146:

La fosforilació de la serina 146 adjacent a la T145 també ha estat documentada. S'ha observat que Akt pot fosforilar a la S146 *in vitro* i *in vivo*, tot i que aquesta cinasa té preferència per a fosforilar la T145 (Li *et al.*, 2002). Aquesta fosforilació augmenta significativament l'estabilitat de p21^{Cip1}. Però és la cinasa PKC (*protein kinase C*) qui fosforila preferentment la S146 en dues de les seves isoformes PKC η (Kashiwagi *et al.*, 2000) i PKC ζ (Scott *et al.*, 2002). Scott i col·laboradors proposen que la fosforilació de la S146 per Akt és indirecta i és realment PKC ζ l'encarregada de fosforilar aquest residu, ja que aquesta cinasa actua per sota d'Akt. En aquest cas, la fosforilació de la S146 augmenta la inestabilitat de p21^{Cip1} i, igual que en el cas de la T145, redueix la unió entre p21^{Cip1} i PCNA (Scott *et al.*, 2002).

S153:

Durant la realització d'aquesta tesi, va aparèixer la primera evidència de la fosforilació del residu serina 153 de la p21^{Cip1}, per part de la cinasa Mirk/Dyrk1B durant la diferenciació de mioblasts (Mercer *et al.*, 2005). Mercer i col·laboradors proposen una localització de p21^{Cip1} al citoplasma i un augment de la supervivència cel·lular com a principal paper d'aquesta fosforilació. Els resultats d'aquest treball es van publicar paral·lelament a les observacions d'aquesta tesi, és per aquest motiu que ampliarem els efectes de la fosforilació del residu S153 en l'apartat de discussió.

S160:

La cinasa PKC és també la responsable de fosforilar aquest residu, a més de fosforilar la S146 com ja hem vist anteriorment (Scott *et al.*, 2000). El residu S160 també es troba situat en l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, proper a la regió d'unió del PCNA, la fosforilació d'aquest residu comporta, igual que en el cas de la T145 i la S146, una disminució de la unió entre aquestes dues proteïnes.

2.6 p21^{Cip1} knockouts i càncer

Inicialment, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2} van ser considerades proteïnes supressores de tumors degut al seu paper com a inhibidors de la proliferació cel·lular. Estudis posteriors van mostrar que la situació no era tan simple ja cada cop hi ha més evidències que indiquen que les proteïnes de la família Cip/Kip tenen un paper important en altres funcions cel·lulars com per exemple la transcripció, l'apoptosi o la migració cel·lular entre d'altres, i per tant tindrien un paper com a oncogens depenent del context cel·lular. En el cas de p21^{Cip1}, s'ha vist que aquest paper dual com a supressora de tumors o com a oncogen va lligat a canvis en la localització cel·lular d'aquesta proteïna.

Malgrat el gran nombre de funcions que pot regular p21^{Cip1}, no es tracta d'una proteïna essencial per a la viabilitat cel·lular com ho demostra el fet que ratolins *knockout* de p21^{Cip1} són viables (Deng *et al.*, 1995; Brugarolas *et al.*, 1995). Inicialment es va suggerir que els ratolins *knockout* de p21^{Cip1} tenien un desenvolupament normal i sense desenvolupar tumors fins als 7 mesos d'edat (Deng *et al.*, 1995; Brugarolas *et al.*, 1995). Estudis posteriors indiquen que aquests ratolins són més susceptibles a generar tumors espontanis en una mitjana d'edat de 16 mesos, mentre que els ratolins control no ho fan fins passats dos anys (Martin-Caballero *et al.*, 2001), senyalant la importància d'aquest gen com a supressor de tumors.

Cal destacar que els estudis realitzats amb MEFs (fibroblasts embrionaris de ratolí) deficientes en p21^{Cip1}, provinents d'aquests animals *knockout*, veuen compromesa la seva habilitat d'aturar-se en G₁ en resposta al dany al DNA i senyalen, per tant, un paper essencial de p21^{Cip1} en la inducció de la parada del cicle cel·lular (Deng *et al.*, 1995; Brugarolas *et al.*, 1995).

Estudis clínics d'anàlisi de tumors humans porten també a conclusions oposades. Tot i ser clau en la regulació del cicle cel·lular, les mutacions que inactiven el gen

cdkn1a són poc freqüents, igual que en el cas de p27^{Kip1}, i algunes d'elles afecten principalment a la activitat de p21^{Cip1} com a inhibidor de Cdks; en canvi, mutacions en altres proteïnes supressores de tumors com p53 i p16^{INK4a}, les quals actuen en les mateixes vies de *checkpoint* que p21^{Cip1}, si que es troben mutades freqüentment en diversos tipus de càncer (revisat a (Shiohara *et al.*, 1997; Roninson, 2002)). De fet, com hem comentat anteriorment, el gen *p53* és el gen més freqüentment mutat en els càncers humans.

D'una banda, la pèrdua de p21^{Cip1} és sinònim de progressió tumoral i mal diagnòstic en alguns tipus de càncer com s'ha pogut observar en càncers colorectals i cervicals, entre d'altres; d'altra banda, la sobreexpressió o la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} és un marcador de mal pronòstic i d'agressivitat tumoral en carcinomes de pàncrees, pit, pròstata, ovari, cèrvix i en glioblastomes (Biankin *et al.*, 2001; Roninson, 2002). Altres estudis arriben a la conclusió que tant uns nivells de p21^{Cip1} baixos com alts són marcadors de mal pronòstic, mentre que nivells moderats de p21^{Cip1} comportarien diagnòstics més favorables. En base a aquestes observacions, sembla que la exclusió de p21^{Cip1} fora del nucli comporta la pèrdua de les seves funcions com a supressor de tumors i, en canvi, accentua altres funcions que promouen el desenvolupament tumoral, mostrant un cop més el paper dual de p21^{Cip1}.

3. REGULACIÓ DE PROTEÏNES PER Ca^{2+} , CaM I PKC

La calmodulina (CaM) forma part del conjunt de proteïnes d'unió a $\text{p}21^{\text{Cip}1}$ que ja hem descrit anteriorment. Ja que un dels primers objectius d'aquesta tesi és l'estudi de la unió entre $\text{p}21^{\text{Cip}1}$ i CaM, dedicarem una part de la introducció a explicar alguns conceptes de la regulació intracel·lular de proteïnes mitjançant calci (Ca^{2+}), CaM i la proteïna cinasa C (PKC).

3.1 Calci i calmodulina

El calci (Ca^{2+}), considerat inicialment com a element estructural de dents i ossos, és el segon missatger més utilitzat en processos de senyalització cel·lular i és capaç de modular un gran nombre de processos com la proliferació, la secreció i el tràfic vesicular entre d'altres (Berridge *et al.*, 2000; Carafoli, 2002).

La concentració de Ca^{2+} extracel·lular és de 1mM, mentre que la intracel·lular és molt menor, les cèl·lules quiescents tenen una concentració citosòlica de 100nM, que sota certs estímuls pot arribar a 500-1000nM. Aquesta diferència de concentració demostra l'existència de mecanismes que controlen acuradament l'entrada i sortida de Ca^{2+} de l'interior cel·lular, com són les bombes de Ca^{2+} de la membrana plasmàtica i el reticle endoplasmàtic o l'existència de proteïnes tamponadores de l'excés de Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2000).

Diferents estímuls promouen el moviment de Ca^{2+} des de l'exterior de la cèl·lula o des dels llocs d'emmagatzematge cel·lulars (reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi, mitocondris, nucli i lisosomes) i augmenten la concentració de Ca^{2+} intracel·lular. És aquest Ca^{2+} lliure el que actua com a missatger cel·lular. Gràcies a l'existència de mecanismes que ràpidament disminueixen la concentració intracel·lular, s'aconsegueix generar polsos de Ca^{2+} que seran els encarregats de modular diferents funcions cel·lulars. La regulació precisa dels nivells de Ca^{2+} permet crear una xarxa de senyals coordinada en l'espai i en el temps; però si es sobrepassa els límits espaials o temporals dels polsos de Ca^{2+} pot portar conseqüències dràstiques per a la cèl·lula com la mort cel·lular per necrosi o apoptosi (Chin and Means, 2000; Berridge *et al.*, 2000).

El Ca^{2+} pot actuar directament sobre proteïnes efectores o a través de proteïnes d'unió a Ca^{2+} que fan d'intermediàries entre els senyals de Ca^{2+} i la resposta cel·lular.

Existeix un gran nombre de proteïnes sensors dels nivells de Ca^{2+} intracel·lulars, entre aquestes proteïnes hi trobem la CaM.

La CaM és una de les proteïnes d'unió a Ca^{2+} més estudiades, és considerada com a un sensor de Ca^{2+} universal, molt sensible a la variació dels nivells de Ca^{2+} intracel·lulars. Està altament conservada en els organismes eucariotes i participa en la regulació d'una gran varietat d'esdeveniments cel·lulars (Toutenhoofd and Strehler, 2000). En absència de Ca^{2+} , la CaM presenta una conformació tancada, plegada sobre si mateixa (apoCaM); la unió de la CaM a quatre àtoms de Ca^{2+} , indueix un canvi conformacional en la CaM (holoCaM). Aquest canvi conformacional fa que la CaM obri la seva estructura deixant exposats residus hidrofòbics que permeten la interacció amb proteïnes efectores, també anomenades proteïnes d'unió a CaM (*Calmodulin Binding Proteins*, CaMBPs) i d'aquesta manera es transmet i s'executa el missatge generat pel Ca^{2+} . Cal destacar que l'apoCaM, tot i tenir una conformació més tancada, també és capaç d'interaccionar amb algunes CaMBPs (Chin and Means, 2000).

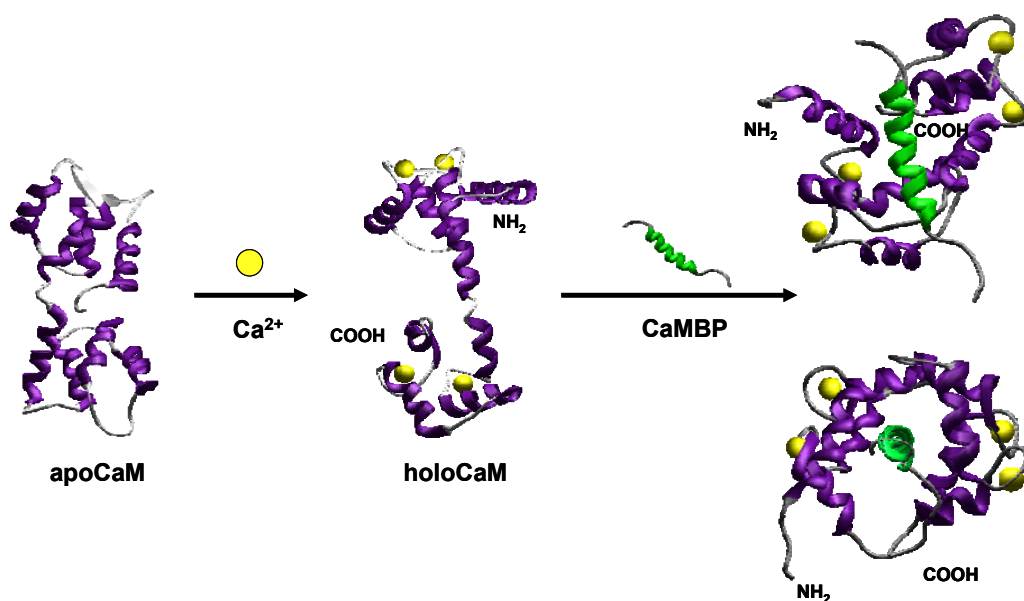


Figura 15: Esquema representatiu de la CaM. Representació de la CaM en absència de Ca^{2+} (apoCaM), unida als quatre àtoms de Ca^{2+} (holoCaM) i unida a una CaMBP. Els primers estudis cristal·logràfics de la CaM van permetre descriure la estructura tridimensional de la proteïna: dos regions globulars connectats per una hèlix- α , cada una de les regions globulars pot unir dos ions de Ca^{2+} i aquesta unió provoca un canvi conformacional a la proteïna (Babu *et al.*, 1985). Posteriorment, es va cristal·lografar la estructura de la CaM unida a un pèptid corresponent al domini d'unió a CaM d'una CaMBP, d'aquesta manera es va poder observar com el domini central hèlix- α canvia la seva conformació per tal d'unir-se a les CaMBPs. A més, es va poder observar la importància del Ca^{2+} en el manteniment de la estructura necessària per al reconeixement de les CaMBPs (Meador *et al.*, 1993).

3.2 Proteïnes d'unió a CaM

Les CaMBPs, són un grup molt divers de proteïnes, que pateixen canvis d'activitat com a resposta en la variació dels nivells de Ca^{2+} lliure; no són capaces d'unir ions de Ca^{2+} directament i és per això que utilitzen a la CaM com a sensor inicial i mediador del senyal de Ca^{2+} . Les CaMBPs es classifiquen segons el seu requeriment de Ca^{2+} en la unió a CaM i es poden agrupar en tres grups: dependents de Ca^{2+} , independents de Ca^{2+} i inhibides per Ca^{2+} . La unió de la CaM amb les diferents CaMBPs pot ser de naturalesa molt diversa i tot i que es coneixin els dominis d'interacció de moltes CaMBPs, es desconeix una seqüència consens d'unió a CaM. Els dominis d'unió a CaM d'algunes CaMBPs, consisteix en una seqüència d'uns 20 aminoàcids aproximadament que adopten una conformació d'hèlix- α amfipàtica (James *et al.*, 1995).

L'any 2000, Chin and Means elaboren una classificació de les CaMBPs molt més detallada segons els seus requisits de Ca^{2+} i els efectes que té la unió a CaM en la seva activitat (Chin and Means, 2000). Segons aquests paràmetres, classifiquen a les CaMBPs en sis grups com es mostra a la següent taula:

Classe	Unió a CaM	Efecte de la CaM
A	Irreversible, independent de Ca^{2+}	Indispensable per activar-se, CaM com a subunitat
B	En absència de Ca^{2+}	Activació
C	A altes concentracions de Ca^{2+}	Activació
D	En presència de Ca^{2+}	Inhibició
E	En presència de Ca^{2+}	Activació depenent d'una cinasa
F	En presència de Ca^{2+}	Activació que li permet activar altres CaMBPs

Taula 2: Classificació de les CaMBPs segons Chin i Mens.

La unió de la CaM pot activar els seus efectors mitjançant tres mecanismes diferents. En primer lloc, la CaM pot unir-se al domini regulador de l'efector, fent que es separi del centre catalític i deixar-lo lliure per a poder unir-se al seu substrat. Un exemple d'aquest mecanisme d'activació serien algunes de les cinases dependents de CaM (CaMK). En segon lloc, també pot ser que la CaM produeixi un canvi de conformació de l'efector, provocant la remodelació d'aquest i la formació del centre catalític, com seria el cas de l'adenilat ciclasa. L'últim mecanisme consisteix en la inducció de la dimerització de proteïnes de membrana que esdevenen canals iònics (Hoeflich and Ikura, 2002).

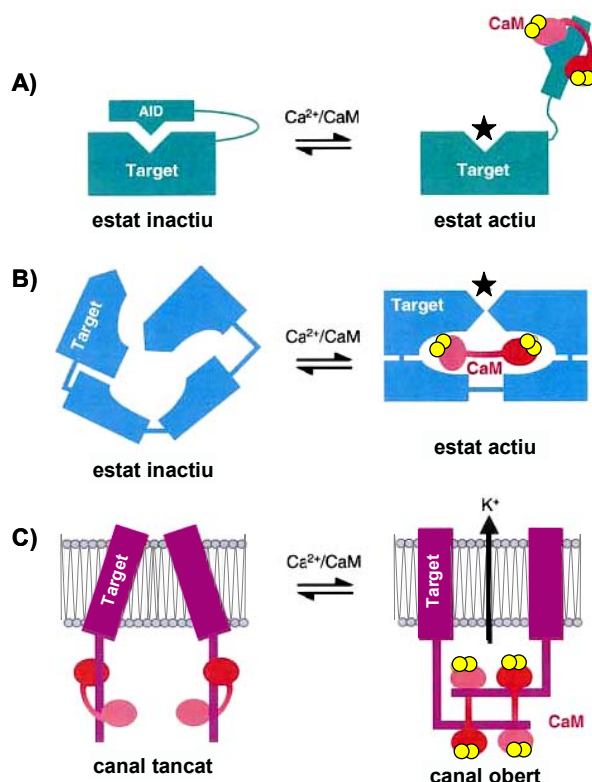


Figura 16: Mecanismes d'activació de proteïnes CaMBPs per CaM. A) Alliberament de l'autoinhibició. B) Remodelació del centre catalític. C) Dimerització. Els ions de calci estan representats en groc i els llocs actius mitjançant un asterisc (adaptat de (Hoeflich and Ikura, 2002)).

3.3 Processos regulats per CaM

La CaM regula processos fisiològics molt diversos com el tràfic intracel·lular i la secreció, el citoesquelet i la mobilitat cel·lular, l'homeòstasi iònica, la transcripció gènica i la neurotransmissió, entre d'altres. La participació de la CaM en tots aquests processos és indirecta i ho fa a través de les CaMBPs. Cal destacar que actualment la quantitat de CaMBPs descrites és molt elevada i és aquesta diversitat de CaMBPs la que li permet a la CaM modular un gran nombre de funcions cel·lulars com a resposta a la variació dels nivells de Ca^{2+} . El nostre grup de recerca fa anys que s'ha centrat en la investigació sobre la CaM i ha aportat diferents treballs on s'identifiquen noves CaMBPs i on s'evidencia el paper de la CaM com a reguladora a diferents nivells del tràfic intracel·lular i de la progressió del cicle cel·lular.

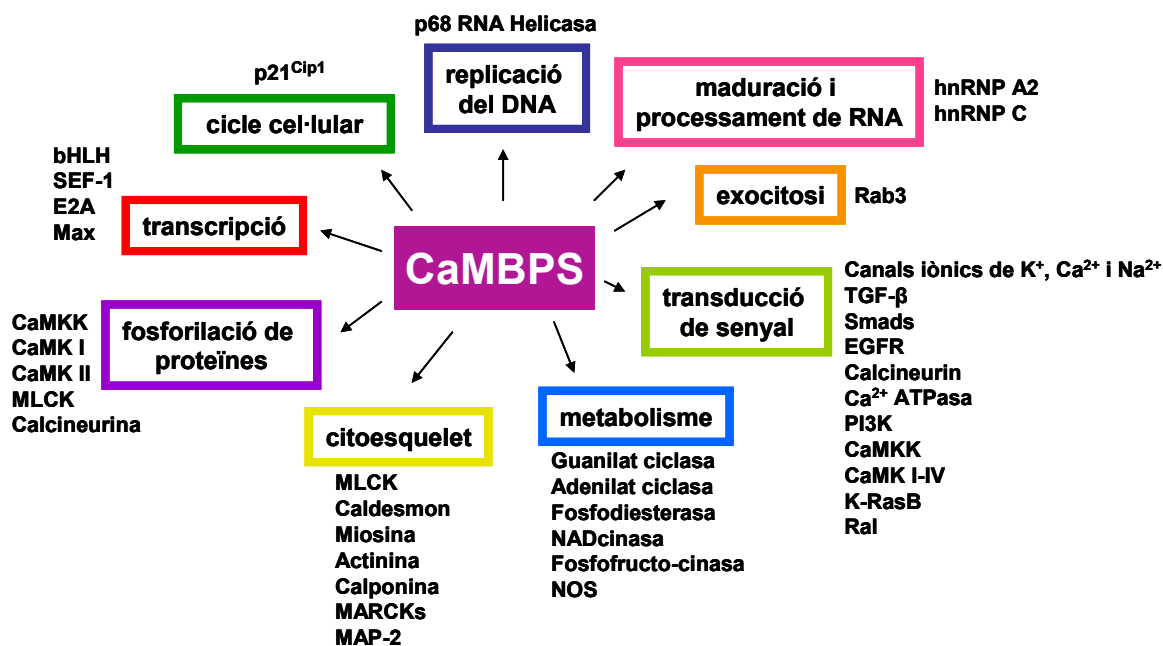


Figura 17: Esquema d'algunes CaMBPs, agrupades segons el procés en el que intervien.

Així doncs, diferents treballs evidencien la participació del Ca²⁺ i de la CaM en la progressió del cicle cel·lular. A través dels efectes observats en tractaments amb drogues anti-CaM, es va poder veure quina era la participació de la CaM en les diferents etapes del cicle cel·lular. La CaM és important en l'entrada al cicle de les cèl·lules quiescents (transició G₀-G₁) (Chafouleas *et al.*, 1984), en la transició G₁-S i en la progressió a través de la fase S (Hidaka *et al.*, 1981; Chafouleas *et al.*, 1982) i en la mitosi (Sasaki and Hidaka, 1982).

Tot i que la via del Ca²⁺/CaM és essencial per al creixement i divisió cel·lular, encara no està del tot clar de quina manera regula aquests processos. Diferents estudis mostren que la via de Ca²⁺/CaM pot regular la proliferació cel·lular a través de dues CaMBPs: la calcineurina (una serina/treonina fosfatasa) i la família multifuncional de CaMK (proteïnes cinases dependents de Ca²⁺/CaM). La calcineurina i la família de les CaMK representen les CaMBPs més importants en el cicle cel·lular, tot i que no són essencials per a la proliferació en tots els tipus cel·lulars. En la fase G₁, la CaM és essencial per a l'activació de Cdk4 i per a l'acumulació al nucli dels complexos Cdk4-ciclina D i per a la hiperfosforilació de pRb (Taulés *et al.*, 1998). Tractaments cel·lulars utilitzant la ciclosporina A, un inhibidor de la calcineurina, mostren variació en la expressió de la Cdk4 i la ciclina D1. Aquests resultats situen a la calcineurina com a promotor de l'acumulació dels nivells de ciclina D1 al principi de la fase G₁,

responsable de promoure una correcta formació del complex Cdk4-ciclina D. Les CaMKs també són necessàries per a la fase G_1 , ja que tractaments amb KN-93, inhibidor específic de CaMKs, impedeixen la progressió a través de la fase G_1 en cèl·lules normals i transformades, provocant una aturada abans de l'activació del complex Cdk4-ciclina D, i també atura la progressió de la fase G_2 . Probablement, CaMKI és l'encarregada de regular l'activació de les Cdks de la fase G_1 , mentre que CaMKII s'encarrega d'incrementar l'activitat la fosfatasa Cdc25 i promou l'activació de cdc2 (Cdk1) per a la transició G_2 -M. A més, la inhibició de la calcineurina o les CaMKs al final de la fase G_1 o S, provoca una acumulació de p21^{Cip1} i p27^{Kip1}, respectivament i aquest increment dels nivells de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} són suficients per a causar una inactivació de Cdk2 i aturar el cicle cel·lular (revisat a (Kahl and Means, 2003)).

Tots aquests treballs mostren com la via de Ca^{2+} /CaM està implicada en la regulació de l'activitat de les Cdks i del correcte manteniment dels nivells de p21^{Cip1} i p27^{Kip1}. S'ha vist que en un gran nombre de tumors humans, aquesta via de regulació de la proliferació cel·lular mitjançant Ca^{2+} /CaM està alterada (revisat a (Kahl and Means, 2003)).

3.4 Proteïna cinasa C

La família de les proteïnes cinasa C (PKCs) forma part de la superfamília de les cinases A-G-C. Aquesta família de cinases està present en tots els eucariotes i en humans inclou 10 isoformes diferents. Les PKCs funcionen com a serina/treonina cinases i són reguladores essencials de diferents processos cel·lulars com el creixement, la diferenciació i la supervivència, entre d'altres. Les PKCs també han estat relacionades amb malalties com la diabetis, el càncer i la isquèmia cardíaca.

Les diferents isoformes de les PKCs estan àmpliament distribuïdes en els diferents teixits de mamífers. Estudis genètics en ratolins *knock-out* indiquen que és probable una certa redundància entre les diferents isoformes (Parker and Murray-Rust, 2004). Les isoformes de la família PKC, han estat classificades en tres grups segons la seva homologia i la capacitat d'unir cofactors: fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG), Ca^{2+} o altres segons missatgers. Segons aquesta classificació, els tres grups de PKCs són: PKCs clàssiques o convencionals (cPKC), PKCs noves (nPKCs) i PKCs atípiques (aPKC) (revisat a (Parker and Murray-Rust, 2004)). La taula 3 mostra les isoformes que pertanyen a cada grup i els cofactors necessaris per a activar-se.

Grup	Isoformes	Cofactors
cPKC	PKC α , β I, β II, γ	Activades per PS, DAG i Ca ²⁺
nPKC	PKC δ , ϵ , η , θ	Sensibles a PS i DAG però no a Ca ²⁺
aPKC	PKC ζ , λ I	Sensibles a PS, no s'activen per DAG ni Ca ²⁺

Taula 3: Grups i isoformes de la família de les PKCs.

L'estructura de les PKCs inclou els dominis conservats, C1-C4, i les regions variables, V1-V5. A més, les PKCs tenen un domini autoregulator que actua com a pseudosubstrat inhibint el domini catalític; aquest domini autoregulator està situat a l'extrem amino. El domini C1, està present en les PKCs clàssiques i noves i és el responsable de la unió a DAG. El domini C2, present en les PKC clàssiques, uneix Ca²⁺ i PS. Aquest domini C2 també està present en les PKCs noves però no és funcional i en canvi, no existeix en els PKCs atípics, això fa pensar que el cofactor PS pot unir-se a les PKCs en altres regions que no siguin el domini C2. El domini catalític, es troba situat a la regió carboxi terminal entre els dominis C3 i V5, com es pot observar en la figura 18. La seqüència d'unió a l'ATP està situada en el domini C3, i és en el domini C4 és on es troba el lloc d'unió al substrat i la regió de transferència del grup fosfat (Liu and Heckman, 1998).

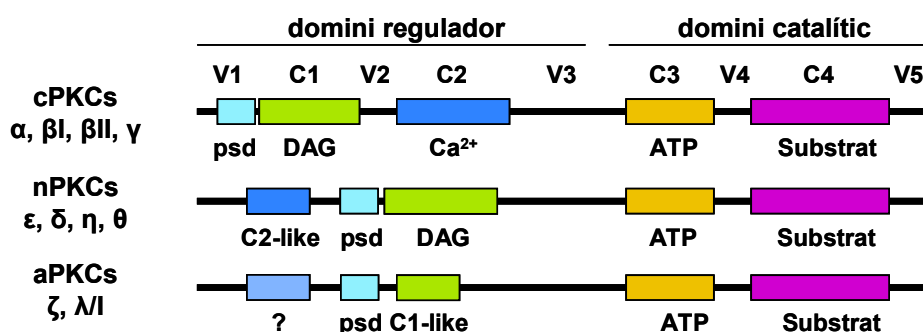


Figura 18: Representació esquemàtica de l'homologia de seqüència entre les isoformes de la família de les PKCs. "psd" representa el pseudosubstrat i "?" el domini regulador per cofactors de les aPKCs. Figura adaptada de (Way *et al.*, 2000; Parker and Murray-Rust, 2004).

La modulació de l'activitat catalítica de les PKCs no té lloc únicament per Ca²⁺ i DAG, sinó que s'han descrit altres mecanismes de regulació a nivell transcripcional, traducional i post-traducional. Un dels mecanismes més importants de regulació és la fosforilació, que és essencial per a l'activació de les PKCs. La localització d'aquestes cinases també és molt important per a la seva activació ja que condiciona la interacció de les PKCs amb els seus substrats, i per tant l'especificitat d'acció de les PKCs sobre

els diferents esdeveniments cel·lulars. Podem trobar activitat PKC en diferents compartiments cel·lulars com ara a la membrana plasmàtica, als endosomes, al Golgi i al nucli (Parker and Murray-Rust, 2004; Poole *et al.*, 2004).

Diferents treballs mostren un gran nombre de proteïnes associades a PKC, també anomenades C-KIPs (*PKC-interacting proteins*). Algunes d'aquestes C-KIPs tenen el paper de dirigir a la PKC cap als seus activadors, cap als seus substrats o cap a compartiments cel·lulars específics. Entre els substrats de les PKCs trobem un gran nombre de proteïnes associades al citoesquelet que contribueixen a la correcta reorganització del citoesquelet. La idea emergent és que aquestes C-KIPs participen en altres vies de senyalització i d'aquesta manera s'aconsegueix integrar diferents vies de senyalització i regular més acuradament els processos cel·lulars (Jaken and Parker, 2000).

Igual que passava amb la CaM, la gran quantitat de proteïnes que interaccionen amb les PKCs li donen l'oportunitat de participar en respostes cel·lulars molt diverses. Entre aquests processos s'inclouen la diferenciació, la contracció, la migració, la proliferació, l'apoptosi i el tràfic vesicular (Dempsey *et al.*, 2000).

3.5 Regulació de proteïnes per CaM i PKC

És interessant mencionar que alguns dels substrats de PKC són també CaMBPs com per exemple: receptor de EGF (EGFR), ErbB2/HER, MARCKS, neuromodulina entre d'una llista de més de quinze proteïnes (revisat a (Chakravarthy *et al.*, 1999)).

Diverses evidències suggereixen que $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i PKCs competeixen entre elles per portar a terme les seves accions sobre els seus substrats, ja que en molts casos comparteixen el mateix lloc d'unió. Així doncs, si la CaM s'uneix a la CaMBP, evita la fosforilació per PKC i si per contra, la PKC fosforila el seu substrat, la CaM ja no s'hi podrà unir. Així, aquestes proteïnes permetrien una regulació creuada de dues de les vies de senyalització més importants: $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ i PKC (Chakravarthy *et al.*, 1999; Jaken and Parker, 2000).

Un exemple d'aquesta regulació és la proteïna K-Ras. K-Ras, també va ser identificat, en el nostre laboratori, com una d'aquestes proteïnes que són substrats de PKC i al mateix temps CaMBPs (Villalonga *et al.*, 2002). Per tant, K-Ras està sota la regulació d'aquestes dues proteïnes i tal i com acabem d'explicar, la unió de K-Ras a CaM evita la fosforilació de K-Ras per PKC.

3.6 p21^{Cip1}, CaM i PKC

Però la relació entre p21^{Cip1}, CaM i PKC va més enllà de la que hem descrit anteriorment.

Els estudis realitzats per la Dra. Marta Taulés en el nostre laboratori, demostren la unió directa entre CaM i p21^{Cip1}. Les evidències que demostren l'existència d'aquesta unió són: la unió *in vitro* de p21^{Cip1} purificada a CaM, la coimmunoprecipitació d'aquestes dues molècules a partir d'extractes cel·lulars i la colocalització de CaM i p21^{Cip1} *in vivo* detectada mitjançant microscòpia electrònica (Taulés *et al.*, 1999). A més, en el mateix estudi, observen que és el domini carboxi terminal de la p21^{Cip1} el responsable de la interacció amb CaM i que el tractament amb drogues anti-CaM disminueix l'acumulació nuclear de p21^{Cip1}. Conclouen que la interacció entre CaM i p21^{Cip1} és important per a la translocació al nucli de p21^{Cip1} i dels complexos Cdk4-ciclina D (Taulés *et al.*, 1999). Així doncs, descriuen a la p21^{Cip1} com una CaMBP, característica que no comparteix amb la p27^{Kip1} tot i les semblances estructurals entre les dues proteïnes.

Posteriorment, també en el nostre laboratori, la Dra. Aina Rodríguez, identifica el domini d'interacció entre p21^{Cip1} i CaM. Basant-se en l'estudi anterior, l'anàlisi de l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} va portar a identificar el domini d'interacció amb la CaM situat entre els aminoàcids 145-164 de la p21^{Cip1} (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005).

A més, aquesta regió de la p21^{Cip1} situada entre els aminoàcids 145-164 adopta una estructura d'hèlix- α amfipàtica que, com ja hem comentat anteriorment, és l'estructura normalment requerida per a la unió a la CaM. Sorprenentment i en contra dels resultats esperats, observen com els mutants puntuals en l'estructura d'hèlix- α de p21^{Cip1} (p21PK2 i p21DID) que no poden unir CaM, continuen localitzant-se al nucli (Rodríguez-Vilarrupla, 2003).

Aquests darrers resultats porten a la hipòtesi que la regulació de la entrada al nucli de p21^{Cip1} no és exclusiva de la seva unió amb la CaM, sinó que existeix algun altre mecanisme capaç de regular aquesta entrada. Com ja hem explicat en altres seccions de la introducció, la p21^{Cip1} és una proteïna que presenta una acurada regulació posttranscripcional a través de diverses modificacions com per exemple la fosforilació. A més, tot just acabem de veure que diverses proteïnes es regulen per

CaM i PKC de manera oposada. Assajos de fosforilació *in vitro* i *in vivo* mostren com la p21^{Cip1} es substrat de PKC i com la CaM és capaç d'inhibir aquesta fosforilació (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005).

Aquests resultats obren una porta interessant a l'estudi de la regulació espacial de p21^{Cip1} per aquestes dues vies Ca²⁺/CaM i PKCs, situant a la p21^{Cip1} com una d'aquestes proteïnes on hi convergeixen diferents vies de senyalització. A més, aquesta regulació espacial de p21^{Cip1} pot tenir conseqüències molt significatives per a la cèl·lula, ja que la localització cel·lular d'aquesta proteïna és determinant per al desenvolupament de les diferents funcions que pot realitzar.

4. EL NUCLÈOL

A mida que avançàvem en el desenvolupament d'aquesta tesi, el nuclèol prenia importància en el nostre estudi. A més, aquest orgànul nuclear tot i que fa segles que va ser descrit, està tornant a ser objecte de nombrosos estudis en els últims anys que el relacionen amb el cicle cel·lular i l'oncogènesi. És per aquest motiu que li dedico un apartat d'aquesta introducció.

4.1 El nuclèol: fàbrica de ribosomes

El nuclèol és l'estructura més gran visible a l'interior del nucli de les cèl·lules eucariotes. Gràcies a aquest fet, el seu estudi va començar paral·lelament al desenvolupament de la microscòpia, fa més de dos segles i des d'aleshores ha estat objecte d'un gran nombre d'investigacions.

La primera funció descrita per al nuclèol va ser la biogènesi de les subunitats ribosòmiques. En el nuclèol es transcriuen els DNAs ribosòmics (rDNAs) donant lloc als RNAs ribosòmics (rRNAs), es processen els rRNAs i s'assemblen per a formar ribosomes. El nuclèol també és l'orgànul on s'assemblen altres complexos ribonucleoproteics com per exemple les telomerases i on també es processen els RNAs de transferència (tRNAs) necessaris per a la síntesi proteica (revisat en (Hernandez-Verdun, 2006; Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008)).

A diferència d'altres orgànuls cel·lulars, el nuclèol no té una membrana que el separa de la resta de components nuclears, sinó que és un agregat de macromolècules al voltant dels gens que codifiquen per als rRNAs. Aquest fet permet i facilita l'associació i dissociació dels nuclèols al llarg del cicle cel·lular, sent fins a un màxim de deu nuclèols al final de la mitosi i només un nuclèol al final de la fase G₂. En les cèl·lules de mamífer, el nuclèol es desorganitza en la profase i es torna a formar al final de la mitosi fent servir la maquinària nucleolar existent del cicle previ. Durant la interfase, els nuclèols també són dinàmics ja que constantment reben i responen a senyals relacionades amb els creixement o el metabolisme cel·lular. A més, la mida del nuclèol reflexa l'activitat de síntesi de ribosomes propi de cada cèl·lula. Per exemple, en cèl·lules ciclants, el nuclèol és una estructura prominent dins del nucli, mentre que en estadis terminals de la diferenciació, el nuclèol adopta una mida limitada. La regulació de l'activitat del nuclèol és molt important per a la cèl·lula ja que és la

responsable de mantenir un *pool* de ribosomes suficients per a les necessitats proteiques de la cèl·lula (Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008).

Així doncs, la formació dels nuclèols té lloc al finalitzar la mitosi i es formen al voltant dels rDNAs, principalment es tracta d'una acumulació de la maquinària necessària per a la transcripció dels gens que codifiquen per als rRNAs i per al processament d'aquests rRNAs. El procés de formació i assemblatge de les subunitats ribosòmiques requereix de les següents etapes (revisat a (Scheer and Hock, 1999; Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Leary and Huang, 2001; Fatica and Tollervey, 2002; Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008)):

- en primer lloc, cal la transcripció del gens rDNA per part de la RNA polimerasa I (RNA pol I), aquests gens s'organitzen en repeticions en tàndem cap-cua en el que s'anomena regions organitzadores del nuclèol (NORs, *nucleolar organizer regions*) que en el cas dels humans, es troben en els cromosomes 13, 14, 15, 21 i 22.
- el resultat de la transcripció és un transcrit precursor de rRNA, pre-rRNAs 47S/45S, que és tallat per proteïnes processadores per tal de formar els rRNAs 28S, 18S i 5.8S.
- els rRNAs 28S, 18S i 5.8S son processats i es sotmeten a altres modificacions per part de les petites ribonucleoproteïnes nucleolars (snoRNPs, *small nucleolar ribonucleoproteins*) fins a donar finalment els rRNAs madurs.
- finalment, els rRNAs madurs s'assemblen amb les proteïnes ribosomals i amb 5SRNA, per a formar les subunitats ribosòmiques 40S i 60S, ja en el component granular.
- les subunitats ribosòmiques interaccionen amb la maquinària de sortida del nucli que les conduirà cap al citoplasma on tindrà lloc la formació del ribosoma complet.

Les diferents etapes d'aquest procés de síntesi dels ribosomes, així com la maquinària encarregada d'aquesta síntesi, estan distribuïdes en diferents subregions que conformen els tres compartiments principals del nuclèol. Aquests tres compartiments poden diferenciar-se quan s'observen els nuclèols amb el microscopi electrònic i són (Tschochner and Hurt, 2003; Hernandez-Verdun, 2006; Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008; Cmarko *et al.*, 2008):

- Centres fibril·lars (FCs, *fibrillar centers*): és on es concentra la maquinària encarregada de la transcripció, la RNA polimerasa I, i factors de transcripció com l'UBF (*upstream binding factor*) necessaris per a la iniciació de la RNA pol I.

INTRODUCCIÓ

Comença la transcripció dels rDNA, donat lloc al pre-rRNA 47S/45S tot i que la major part dels transcrits naixents es situen en la frontera entre els FCs i el DFC.

- Component dens fibrillar (DFC, *dense fibrillar component*): finalitza la transcripció dels rDNAs i tot seguit comença el processament del pre-rRNA 47S/45S. En primer lloc, l'*splicing* del pre-rRNA 47S/45S dona lloc als rRNAs 28S, 18S, 5.8S, que posteriorment seran modificats ja que es aquí on s'acumulen les snoRNPs i altres proteïnes implicades en el processament inicial dels rRNAs com la fibril·larina.

- Component granular (GC, *granular component*): és la regió on hi té lloc la maduració final dels rRNAs, gràcies a la participació de proteïnes com la B23/NPM (*nucleophosmin*). Els rRNAs 5.8S i 28S juntament amb el rRNA 5S (que s'ha transcrit fora del nuclèol per la RNA pol III) s'assemblen amb proteïnes ribosomals per a donar lloc a la subunitat 60S del ribosoma, d'altra banda el rRNA 18S s'assembla amb altres proteïnes ribosomals i dóna lloc a la subunitat 40S. Les subunitats ribosomals 40S i 60S són exportades al citoplasma on s'uniran als RNAs missatgers (mRNAs) i formaran ribosomes funcionals.

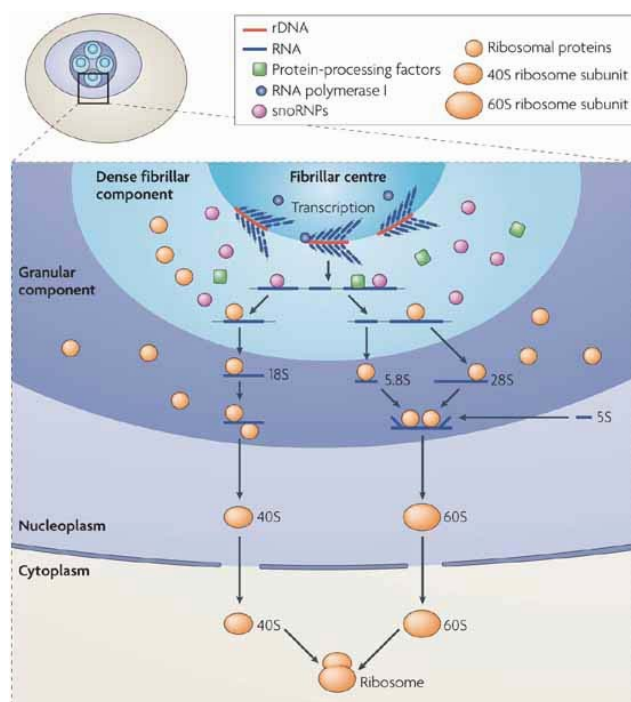


Figura 19: Esquema de la formació de ribosomes i dels compartiments nucleolars. La transcripció del rDNA per la RNA polimerasa I té lloc als centres fibril·lars i a la frontera amb el component dens fibril·lar. Els transcrits pre-rRNA són tallats i modificats per les snoRNPs en el component dens fibril·lar. En el component granular hi té lloc la maduració final dels rRNAs i l'assemblatge amb les proteïnes ribosomals per a formar les subunitats ribosòmiques 40S i 60S que seran exportades cap al citoplasma on s'uniran a mRNAs i formaran ribosomes funcionals (Boisvert *et al.*, 2007).

Un cas especial és el dels nuclèols de les neurones sensorials ganglionars de rata. Casafont i col·laboradors descriuen l'existència de centres fibril·lars gegants (GFCs, *giant fibrillar centers*) envoltats parcialment per DFC en els nuclèols d'aquestes neurones. Mitjançant tècniques d'immunocitoquímica observen que aquests GFCs estan enriquits amb UBF i, a més, també contenen RNA polimerasa I, DNA topoisomerasa I, SUMO-1 i UBC9 (Casafont *et al.*, 2007).

Aquesta organització del nuclèol en tres compartiments és l'organització característica dels nuclèols amb una correcta activitat de síntesi de ribosomes. Si la biogènesi de ribosomes es bloqueja, ja sigui perquè s'inhibeix la transcripció del rDNA o el processament i/o transport dels rRNA, el nuclèol pateix una reorganització dels seus components formant nuclèols segregats (Sirri *et al.*, 2008). Tot i que l'organització estructural del nuclèol està íntimament lligada amb la seva funcionalitat com a fàbrica de ribosomes, el manteniment d'aquesta estructura no està del tot clar. Sirri i col·laboradors proposen que l'activitat Cdk és indispensable per a la formació i manteniment de l'organització nucleolar i per tant de la seva funcionalitat (Sirri *et al.*, 2002). A més, diferents treballs proposen que per a una correcta organització del nuclèol és necessari la fosforilació d'algunes proteïnes nucleolars, com per exemple la B23/NPM, per part de la cinasa CK2 (Meggio and Pinna, 2003; Louvet *et al.*, 2006). Aquest fet indica que la correcta organització no depèn exclusivament de l'activitat del nuclèol sinó que també hi estan implicades altres variants com l'activitat CK2 i un correcte funcionament del cicle cel·lular.

Cal recordar, que fins fa poc, el contingut proteic del nuclèol era pràcticament desconegut. Actualment, els avenços en proteòmica han permès avançar molt en aquest cap i han fet possible l'obtenció del proteoma del nuclèol on s'han identificat més de 700 proteïnes que localitzen al nuclèol (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2006). La comparació del proteoma nucleolar entre humans i *Saccharomyces Cerevisiae*, indica que un 90% de les proteïnes nucleolars humanes tenen clar homòleg en llevat, aquest fet demostra que el proteoma nucleolar està altament conservat al llarg de l'evolució. Tot i així, les regles i senyals que dirigeixen aquestes proteïnes cap al nuclèol són encara incertes, a diferència de les que governen la localització nuclear.

El posterior anàlisi de les dades obtingues per proteòmica, indica que aproximadament un 30% de les proteïnes nucleolars tenen alguna funció relacionada amb la biogènesi de les subunitats ribosòmiques. D'altra banda, és molt sorprenent la gran diversitat de proteïnes trobades al nuclèol relacionades amb altres funcions

cel·lulars com el processament dels pre-RNAs missatgers (pre-mRNA), el control del cicle cel·lular, la replicació del DNA, proteïnes del citoesquelet i xaperones entre d'altres (Leung *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2006; Boisvert *et al.*, 2007). A més, s'han trobat unes 130 proteïnes humanes no caracteritzades fins al moment. Aquesta gran diversitat de proteïnes que poden ser localitzades en el nuclèol obre la porta a que altres processos cel·lulars, fins ara impensables, puguin tenir lloc als nuclèols o dirigir-se a través d'ells.

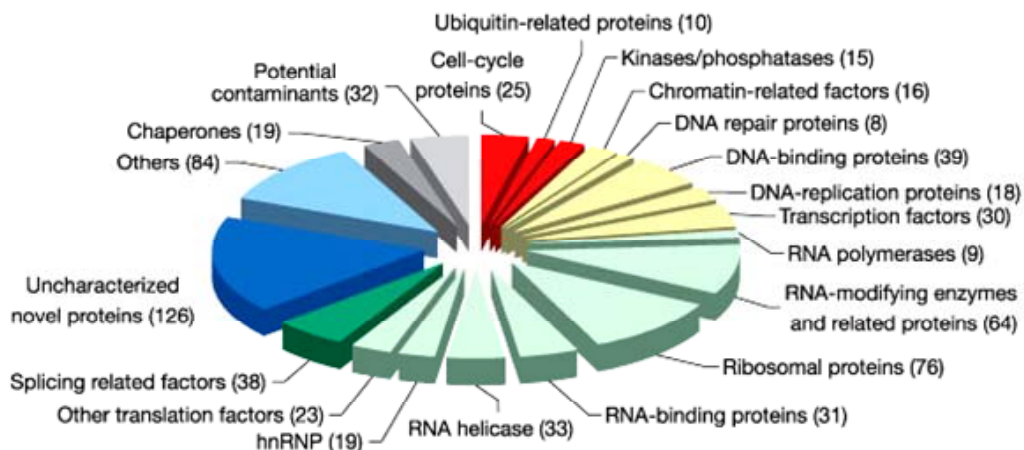


Figura 20: Classificació de les proteïnes nucleolars agrupades segons categories funcionals. El nombre entre parèntesi indica les proteïnes identificades per a cada categoria (Andersen *et al.*, 2005).

Recentment, s'ha analitzat de manera quantitativa el proteoma del nuclèol sota diferents condicions metabòliques, com per exemple després d'un tractament amb un inhibidor de la transcripció com la Actinomicina D (Andersen *et al.*, 2005). Aquest tipus d'anàlisi permet la comparació dels proteomes sota diferents estímuls en busca de canvis en la composició proteica i obre la porta a un estudi més exhaustiu de les proteïnes que es poden localitzar en resposta a diferents situacions, insinuant que, el nuclèol, és un òrganul altament dinàmic i sensible a les variacions de la cèl·lula.

Tal i com hem comentat anteriorment, les senyals de localització nuclears (NLSs) estan molt ben caracteritzades, mentre que les senyals o seqüències de localització nucleolar (NoLSs) encara no estan ben definides. S'han descrit diverses NoLSs, totes elles riques en residus bàsics, tot i que no s'ha arribat a trobar cap seqüència consens (revisat a (Sirri *et al.*, 2008)). La capacitat d'un gran nombre de proteïnes d'adoptar una localització nucleolar s'ha correlacionat amb la capacitat d'interaccionar amb la proteïna B23/NPM, ja que és una proteïna majoritària en el nuclèol i transloca constantment entre el nucli i el citoplasma (Borer *et al.*, 1989). És per aquest motiu que

B23/NPM podria actuar com a transportadora per a aquelles proteïnes nucleolars que no contenen NoLSs. Reforçant aquesta hipòtesi, experiments recents mostren com B23/NPM dirigeix a la proteïna supressora de tumors ARF cap al nuclèol (Korgaonkar *et al.*, 2005).

Gràcies a l'evolució de les tècniques de microscòpia confocal que han permès una major definició d'imatges fins i tot en cèl·lules vives, han començat a sorgir un gran nombre de treballs que estudien la dinàmica de les proteïnes dins del nucli. Aquests treballs mostren com les proteïnes nuclears poden difondre a través del nucleoplasma, associar-se i dissociar-se dels compartiments nuclears, i com, de la mateixa manera, les proteïnes nucleolars s'intercanvien constantment amb les del nucleoplasma (Phair and Misteli, 2000). Aquest tipus de treballs ajuden a entendre l'arquitectura nuclear i la dinàmica de proteïnes existent entre els diferents compartiments nuclears: nucleoplasma, nuclèol, *cajal bodies*, *speckles*... La dinàmica de les proteïnes nuclears serà un tema clau en la discussió d'aquesta tesi.

4.2 Noves funcions del nuclèol

Com acabem de veure, el nuclèol és clau en la coordinació de la síntesi i assemblatge de les subunitats ribosòmiques, la qual s'havia descrit com la seva principal funció estretament lligada al control del creixement cel·lular i la proliferació. Tot i així, els estudis de proteòmica nucleolar mostren un gran nombre de proteïnes que no tenen cap relació amb la síntesi de ribosomes i que insinuen la participació del nuclèol en altres funcions cel·lulars. Actualment, diferents estudis posicionen al nuclèol com a regulador del cicle cel·lular, la senescència i de les respostes a estrès. Altres funcions no convencionals del nuclèol serien el seu paper en les infeccions virals, l'export nuclear i el segrest de proteïnes reguladores, entre d'altres. Totes aquestes funcions del nuclèol obren un camp d'investigació desconegut fins fa solament una dècada i que actualment estan aportant nova informació que complementa la ja coneguda de diferents processos cel·lulars. Existeixen un gran nombre de treballs basats en la revisió de les múltiples funcions del nuclèol (Olson *et al.*, 2002; Raska *et al.*, 2006; Hernandez-Verdun, 2006; Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008).

El nuclèol com a sensor de l'estrès:

De totes aquestes noves funcions on hi està implicat, ens centrarem en el paper del nuclèol en la resposta a estrès cel·lular, ja que es la funció més rellevant en els nostres estudis.

INTRODUCCIÓ

Com a resposta a estrès extra o intracel·lular, la cèl·lula atura la síntesi de rRNA i la producció de ribosomes. Aquesta inhibició de la funció nucleolar en resposta a estrès està acompanyada de la pertorbació de l'estructura nucleolar, de la parada del cicle cel·lular i de l'estabilització de p53 (Mayer and Grummt, 2005). Tot i així, la manera com el nuclèol detecta les senyals d'estrès cel·lular i com aconsegueix establir els nivells de p53, no està del tot clara.

Rubbi i Milner estudien la resposta cel·lular de 13 agents diferents que indueixen l'estabilització de p53 i observen detalladament el comportament del nuclèol en els diferents casos (Rubbi and Milner, 2003). Entre els diferents agents que utilitzen n'hi ha que provoquen dany al DNA i també inhibidors de la síntesi de RNA, entre d'altres. 11 dels 13 agents estudiats causen una disrupció del nuclèol acompanyada d'un alliberament dels components nucleolars, com per exemple la B23/NPM que transloca cap al nucleoplasma, fet que ja havia estat descrit anteriorment (Chan *et al.*, 1996). Així doncs, un factor comú d'aquests agents que provoquen estrès cel·lular, és l'augment dels nivells de p53 com a conseqüència de la disrupció del nuclèol. Els 2 agents que no provoquen una disrupció nucleolar són la leptomicina B i MG132, ja que no causen estrès cel·lular, sinó que augmenten els nivells de p53 interferint en el seu transport cap al citoplasma o en la seva degradació via proteasoma, respectivament (Freedman and Levine, 1998; Klibanov *et al.*, 2001). Aquest fet, juntament amb els resultats anteriors fa pensar que la desestructuració nucleolar aconsegueix establir els nivells de p53 tot prevenint la seva degradació. De manera interessant, Rubbi i Milner, van ser capaços de distorsionar el nuclèol microinjectant UBF i sense causar dany al DNA. Aquest darrer experiment, mostra com la disrupció del nuclèol és capaç d'establir p53 en absència de dany al DNA, creant una relació directa entre el correcte funcionalment nucleolar i els nivells cel·lulars de p53. Segons aquest treball, el nuclèol és un sensor de l'estrès cel·lular i és el responsable de mantenir els nivells baixos de p53, els quals ràpidament augmenten si el nuclèol deixa de funcionar correctament com a resposta a l'estrès (Rubbi and Milner, 2003).

De quina manera el nuclèol regula els nivells de p53? Com ja hem comentat anteriorment, p53 és clau en la resposta a estrès cel·lular, ja que nivells elevats de p53 aturen el cicle cel·lular o dirigeixen a la cèl·lula cap a l'apoptosi (revisat a (Ryan *et al.*, 2001)). Una manera evident i ràpida d'augmentar els nivells de p53 seria alterant l'equilibri entre la seva síntesi i la seva degradació. p53 es sintetitza contínuament, però en absència d'estrès els seus nivells són baixos gràcies a l'acció de mdm2 (hdm2 en humans), una E3 lligasa que ubiquitinitza a p53. Un cop ubiquitinitzada, p53 és exportada del nucli cap al citoplasma on serà degradada via proteasoma. D'altra

banda, alguns estímuls com l'estrès cel·lular o senyals oncogènics, augmenten l'expressió de ARF (p14ARF en humans i p19ARF en ratolins) *Alternative Reading Frame*, ja que és producte del mateix gen que p16^{INK4a} però a partir d'una pauta de lectura diferent. ARF pot unir-se a mdm2 i regular així la seva capacitat d'ubiquitinitzar a p53. Normalment, ARF està segrestada al nuclèol i d'aquesta manera mdm2 es manté lliure i capaç de promoure la degradació de p53 (figura 21). Un augment d'expressió o canvi de localització d'ARF permet que pugui unir-se a mdm2; quan ARF s'uneix a mdm2 evita la formació del complex p53-mdm2 i per tant la degradació de p53. Mitjançant aquest mecanisme la cèl·lula és capaç d'augmentar els nivells de p53 en el nucleoplasma i activar la resposta a estrès cel·lular (revisat a (Olson, 2004; Boisvert *et al.*, 2007)).

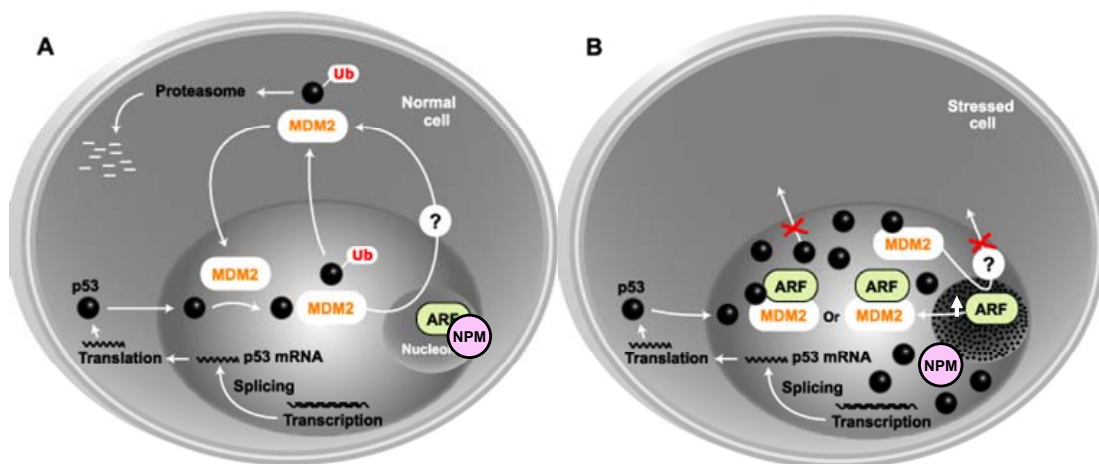


Figura 21: Esquema del paper del nuclèol en la estabilització de p53. (A) En la cèl·lula normal, els nivells de p53 es mantenen baixos degut a la ubiquitinització de p53 per part de mdm2, seguit d'un export cap al citoplasma i degradació de p53 via proteasoma. El complex p53-mdm2-Ub pot ser transportat directament des del nucleoplasma o el nuclèol pot estar implicat en aquest export. La proteïna ARF, que regula l'activitat de mdm2, es localitza normalment en el nuclèol unida a la B23/NPM (NPM). (B) Sota condicions d'estrès cel·lular, el nuclèol es disrupciona i ARF surt del nuclèol cap al nucleoplasma. Un cop al nucleoplasma pot unir-se a mdm2 i inhibir la seva activitat, ja sigui formant un complex binari o ternari format per p53-mdm2-ARF. La inhibició de mdm2 no permet la sortida de mdm2 i p53 cap al citoplasma. Un altre model alternatiu suggereix que el pas a través del nuclèol és essencial per a l'export del complex i que la disrupció del nuclèol impedeix aquesta via d'export nuclear (adaptada de (Olson, 2004)).

Però mdm2 no només pot unir-se a ARF en el nuclèol, ja que s'ha vist que també pot unir-se a les proteïnes ribosomals L5, L11 i L23 i al rRNA 5S, de la mateixa manera que els complexos mdm2-p53 també pot unir-se a la proteïna ribosomal L5, al rRNA 5S. A més, també s'ha descrit que p53 pot unir-se covalentment al rRNA 5.8S. Una possibilitat seria la formació d'un complex ribonucleoproteic format per rRNA 5S,

INTRODUCCIÓ

proteïna L5, mdm2, p53 i possiblement rRNA 5.8S el qual podria estar implicat en el transport de ribosomes des del nucli cap al citoplasma (Fontoura *et al.*, 1992; Marechal *et al.*, 1994; Dai *et al.*, 2006).

Tot i així, existeix certa controvèrsia de la relació entre ARF i mdm2. Tao i Levine no creuen que sigui directament la unió entre ARF i mdm2 la que reguli els nivells de p53. Aquest grup proposa que mdm2 s'exporta a través del nuclèol i que és ARF qui inhibeix aquest export nuclear de mdm2, d'aquesta manera l'estabilització de p53 seria deguda a que ARF no deixa sortir els complexos p53-mdm2 fora del nucli (Tao and Levine, 1999). El que si que està clar, tot i la controvèrsia, és que l'estabilització de p53 depèn principalment de la interacció i/o localització entre ARF i mdm2.

Existeix una gran varietat d'hipòtesis sobre el mecanisme d'export de p53. Un possible mecanisme mitjançant el qual el nuclèol pot regular l'estabilitat de p53 seria que el propi nuclèol, amb participació d'ARF, sigui necessari per a l'export dels complexos p53-mdm2 i que, com a conseqüència de la disrupció nucleolar, aquest procés quedés inhibit. Diferents treballs proposen aquest model d'export de p53 entre d'altres (Sherr and Weber, 2000; Zhang and Xiong, 2001). Sherr i Weber proposen el terme "*ride the ribosome*" (anar a cavall del ribosoma) com una via de sortida dels complexos p53-mdm2 des del nucli cap al citoplasma i indiquen que ARF podria interferir en aquesta via. De manera interessant, indiquen que p53 no s'ha pogut veure en el nuclèol fins al moment i per tant, aquesta via d'export transnucleolar hauria de ser una via molt ràpida (Sherr and Weber, 2000).

Amb tot això, encara ens falta una peça clau per a poder entendre la regulació de la via p53/ARF/mdm2 i es tracta de saber qui regula la interacció entre ARF i mdm2. Sembla que el candidat perfecte per a regular aquesta interacció seria la nucleophosmina (B23/NPM). La major part d'ARF present en la cèl·lula es troba unida a B23/NPM, d'aquesta manera, B23/NPM segresta a ARF en el nuclèol i la manté aïllada de les seves funcions en el nucleoplasma (Bertwistle *et al.*, 2004) A més, la regulació d'aquestes dues proteïnes és bidireccional, ja que B23/NPM és essencial per al manteniment dels nivells basals d'ARF i un augment dels nivells d'ARF després d'un estímul oncogènic promou la degradació de B23/NPM (Lindstrom and Zhang, 2006). ARF s'uneix a B23/NPM a través dels mateixos dominis amb els que s'uneix a mdm2, i per tant, B23/NPM pot estar controlant la localització d'ARF i competir amb mdm2 per a unir-se a ARF i, de manera indirecta, regular els nivells de p53 (Korgaonkar *et al.*, 2005). En resposta a estrès cel·lular, ARF i B23/NPM pateixen una redistribució dins del nucli que els hi permetria regular la resposta de p53. Per exemple, l'exposició a

radiació UV provoca una mobilització transitòria d'ARF des del nuclèol al nucleoplasma que permet la formació dels complexos ARF-mdm2 i la regulació dels nivells de p53. Per tant, segons aquest model, l'activitat d'ARF està controlada per la seva sublocalització nucleolar i no tant pels seus nivells d'expressió (Lee *et al.*, 2005). Cal destacar, que els motius pels quals el dany al DNA causa el trencament del complex ARF-NPM són desconeguts, algunes possibilitats apunten a una possible fosforilació de NPM durant la resposta al dany, que provocaria el trencament del complex (revisat a (Gjerset, 2006)).

Tot i així, existeixen altres treballs que proposen un model diferent mitjançant el qual la B23/NPM regula l'activitat de p53 després del dany al DNA. Un d'aquests treballs apunta a una possible interacció directa entre B23/NPM i p53, provocant un augment dels nivells de p53 i la seva activació transcripcional com a resposta a diferents tipus d'estrès cel·lular (Colombo *et al.*, 2002). Reafirmant aquests resultats, Kurki i col·laboradors demostren que en resposta a radiació UV, B23/NPM es relocalitza del nuclèol cap al nucleoplasma on interacciona amb p53 i HDM2 (Kurki *et al.*, 2004).

Aquesta diversitat d'experiments, mostra com la regulació de la resposta de p53 davant el dany al DNA per part de B23/NPM és més complexa de la que es pensava inicialment. El que sí que queda clar, és que tots aquests resultats donen suport al model proposat en el qual el nuclèol actua com a sensor de l'estrès cel·lular per sobre de p53 i és ARF qui connecta les senyals d'estrès nucleolar amb els efectors presents en el nucleoplasma que engegaran la resposta davant l'estrès cel·lular. Tot i així, un millor coneixement de les interaccions entre els diferents membres de la via de p53/ARF/mdm2 ajudaria a entendre encara millor la regulació de p53.

Una altra via que també regula l'activitat del nuclèol en la resposta a estrès i en la qual no hi entrarem en detall, és la via JNK2 i TIF-IA (revisat a (Mayer and Grummt, 2005)). D'una banda, TIF-IA, és un factor de transcripció essencial per a la iniciació de la RNA Polimerasa I. La inactivació de TIF-IA comporta la disrupció del nuclèol, l'aturada del cicle cel·lular, l'augment dels nivells de p53 i la inducció de l'apoptosi. La depleció de TIF-IA afavoreix la unió de mdm2 a proteïnes ribosomals com la L11, i conseqüentment disminueix la interacció entre mdm2 i p53, fet que permetrà un augment dels nivells cel·lulars de p53 (Yuan *et al.*, 2005). D'altra banda, TIF-IA és també responsable de la transducció dels senyals extracel·lulars a la maquinària de la RNA Polimerasa I (Bodem *et al.*, 2000). Com ja hem comentat anteriorment, quan les cèl·lules estan exposades a estrès cel·lular aturen ràpidament la síntesi de rRNA. TIF-

IA conté una seqüència consens d'unió a cinasa JNK2 (*c-jun N-terminal protein kinase 2*) i quan JNK2 s'activa per diferents tipus d'estrès cel·lular fosforila a TIF-IA i l'inactiva. Aquesta fosforilació de TIF-IA té dos efectes; en primer lloc, impedeix la interacció de TIF-IA amb la RNA polimerasa I i en segon lloc provoca la translocació de TIF-IA del nuclèol cap al nucleoplasma. En tots dos casos s'aconsegueix inhibir la síntesi de ribosomes com a resposta al context cel·lular desfavorable (Mayer *et al.*, 2005). Aquests resultats destaquen el paper de JNK2 en la protecció de la síntesi de rRNA davant de conseqüències no favorables per a la cèl·lula i el paper central de TIF-IA com a transmissor de l'estat de la cèl·lula a la maquinària nucleolar.

4.3 Nuclèol i malalties humanes

Les enfermetats humanes relacionades amb un mal funcionament del nuclèol es poden agrupar en dos categories principals:

- Càncer i malalties amb un augment de l'activitat nucleolar: un mal funcionament de la via p53/ARF/mdm2 és freqüent en la majoria de càncers i es creu que és essencial per al desenvolupament de tumors. Generalment, en les cèl·lules cancerígenes, la mida dels nuclèols està augmentada com a conseqüència d'una elevada activitat nucleolar i d'una elevada proliferació cel·lular.
- Infeccions virals: diferents estudis mostren el paper del nuclèol en les infeccions virals, ja que els virus necessiten de la maquinària nucleolar per a fabricar proteïnes indispensables per a la seva pròpia replicació.

A més, deficiències en algun dels components dels nuclèols s'han vist associades a malalties humanes com els síndromes de Werner, de Bloom o de Rothmund-Thomson entre d'altres. Alteracions en el nuclèol també estan presents en malalties neurodegeneratives humanes com per exemple, en l'enfermetat d'Alzheimer (revisat a (Hernandez-Verdun, 2006; Gjerset, 2006; Boisvert *et al.*, 2007; Sirri *et al.*, 2008)).

OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL D'AQUESTA TESI

Estudiar els mecanismes reguladors de la localització intracel·lular de p21^{Cip1} i els possibles efectes sobre la funcionalitat de p21^{Cip1} d'aquests canvis de localització.

OBJECTIUS CONCRETS DE L'ESTUDI

- Caracterització del residu de p21^{Cip1} fosforilat per PKC.
- Anàlisi de les implicacions funcionals de la fosforilació de p21^{Cip1}.
- Caracterització de la localització intracel·lular de p21^{Cip1} en resposta al dany al DNA.
- Anàlisi dels mecanismes implicats en la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol.

MATERIALS I MÈTODES

1. Plàsmids

A continuació es detallen els plàsmids utilitzats en aquesta tesi, el seu origen i el cDNA que contenen:

Taula 1: Principals plàsmids utilitzats en aquesta tesi.

insert	vector	procedència
GST-p21WT	pGEX-KG _m Pharmacia Biotech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
GST-CTp21WT	pGEX-KG _m Pharmacia Biotech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
GST-CTp21S153D	pGEX-KG _m Pharmacia Biotech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
GST-CTp21S153A	pGEX-KG _m Pharmacia Biotech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
His-CaM	pET, Novagen	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
GFP-p21WT	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21CT	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21NT	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21NLS	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21T145D	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21S146D	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21S153D	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Sònia Brun, Universitat de Barcelona.
GFP-p21S160D	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21S146DS160D	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21S153DS160D	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.
GFP-p21T145DS153D	pEGFP-C1, Clontech	Aquesta tesi
GFP-p21S146DS153D	pEGFP-C1, Clontech	Aquesta tesi
GFP-p21S153A	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona.

MATERIALS I MÈTODES

HA-p21WT	pMT2HA	Dr. Carles Serra, IDIBAPS, Barcelona
HA-p21NLS	pMT2HA	Dra. Sònia Brun, Universitat de Barcelona
HA-p21T145D	pMT2HA	Dra. Sònia Brun, Universitat de Barcelona
HA-p21S153D	pMT2HA	Aquesta tesi
HA-p21S153A	pMT2HA	Aquesta tesi
HA-p21DID	pMT2HA	Dra. Sònia Brun, Universitat de Barcelona
DsRED-p21WT	DsRED, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
DsRED-p21NLS	DsRED, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
DsRED-p21CT	DsRED, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
DsRED-p21CT-NLS	DsRED, Clontech	Dra. Aina Rodriguez-Vilarrupla, Universitat de Barcelona
GFP-SET	pEGFP, Clontech	Dra. Núria Canela, Universitat de Barcelona
CFP-Cdk2	pECFP-C1, Clontech	Dra. Francesca Mateo, Universitat de Barcelona
CFP-p27	pECFP-C1, Clontech	María Pérez, Universitat de Barcelona
GFP-SUMO-1	pEGFP-C1, Clontech	Dr. RT Hay, University of Dundee, UK.
GFP-SUMO-1-ΔGly-Gly	pEGFP-C1, Clontech	Dra. Sònia Brun, Universitat de Barcelona.
YFP-U2AF65	pEYFP, Clontech	Dr. A Lamond, University of Dundee, UK.
GFP-NPM	pEGFP-C1, Clontech	Dr. Jason D, Weber Washington University (Yu <i>et al.</i> , 2006)
GFP-NPMdL	pEGFP-C1, Clontech	Dr. Jason D, Weber Washington University (Yu <i>et al.</i> , 2006)

Els plàsmids creats en aquesta tesi s'han realitzat seguint la metodologia descrita en (Rodriguez-Vilarrupla, 2003). Per a més informació sobre aquests plàsmids adreceu-vos a aquesta referència o a: (Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2002; Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2005)

2. Cultius Cel·lulars

2.1 Models cel·lulars i manteniment de cèl·lules en cultiu

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

- **COS-7**: Cèl·lules de ronyó de mico
- **NIH3T3**: Línia immortalitzada de fibroblasts de ratolí
- **HCT116**: Línia tumoral de morfologia epitelial, procedent de càncer colorectal humà. En aquest treball també s'han fet servir dues línies derivades, una d'elles amb deficiència en el gen de p21^{Cip1}: HCT116 p21^{-/-} (Waldman *et al.*, 1995) i l'altra amb deficiència del gen p53: HCT116 p53^{-/-} (Bunz *et al.*, 1998).

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

Els medis i condicions de cultiu que s'han utilitzat per a cada línia són els següents:

- **HCT116, HCT116 p21^{-/-} i HCT116 p53^{-/-}**: es mantenen en una barreja 1:1 de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Biological Industries):HAM F12 (Biological Industries) suplementat amb 2mM L-Glutamina (Merk), 1% aminoàcids no essencials (Biological Industries), 1mM d'àcid pirúvic (Sigma), antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50µg/ml d'estreptomicina) (Biological Industries) i 10% de sèrum boví fetal (FCS, *foetal calf serum*, Biological Industries).
- **COS-7**: es fan créixer amb DMEM suplementat amb 2 mM L-Glutamina, 1% aminoàcids no essencials, 1mM d'àcid pirúvic, antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50µg/ml d'estreptomicina) i 5% de sèrum boví (FCS).
- **NIH3T3**: s'han cultivat sempre en condicions subconfluents per impedir que es transformessin, es mantenen en medi DMEM suplementat amb 2 mM L-Glutamina, 1% aminoàcids no essencials, 1mM d'àcid pirúvic, antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50µg/ml d'estreptomicina) i 10% de sèrum boví (DCS, *donor calf serum*).

El tampó PBS (*Phosphate Buffered Saline*) utilitzat per a rentar les cèl·lules té la següent composició: 7,65 g/l NaCl; 0,21 g/l KH₂PO₄ pH 7.2; 0,9 g/l Na₂HPO₄·2H₂O. Abans de fer-lo servir ha d'estar autoclavat.

2.2 La sembra de les cèl·lules

Pel manteniment de les cèl·lules en cultiu és necessari tripsinitzar-les per tal de desenganxar-les del suport de plàstic on es cultiven (flascons i plaques de diferents superfícies, TPP) abans de que arribin a la confluència.

- En primer lloc retirem el medi on creixen les cèl·lules i fem dos rentats de les cèl·lules amb PBS temperat a 37°C.
- S'afegeix un volum petit de tripsina 1x -EDTA per tal que cobreixi la superfície de cultiu i s'incuba a 37°C fins que les cèl·lules es desenganxen.
- Seguidament neutralitzem l'acció de la tripsina afegint el mateix volum de medi suplementat amb 10% FCS.
- D'aquesta suspensió de cèl·lules realitzem la dilució adient per al subcultiu o per a l'experiment.

2.3 Congelació i descongelació de cèl·lules

Congelació:

- Agafem un cultiu cel·lular subconfluent per tal d'optimitzar les condicions en les que es troben les cèl·lules.
- Tripsinitzem les cèl·lules tal i com acabem d'explicar en l'apartat 2.2.
- Comptem el número de cèl·lules/ml amb la cambra de Neubauer.
- La suspensió de cèl·lules es centrifuga durant 5 min a 2500 rpm, i es descarta el sobrenedant.
- Es resuspenen les cèl·lules amb el medi necessari per a fer alíquotes entre $1-1,5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml.
- A cada criotub hi posarem 800 μ l de medi que conté les cèl·lules i 200 μ l de DMSO 50% (10% de concentració final de DMSO).
- Afegim el DMSO gota a gota amb agitació constant i congelem ràpidament a -20°C, 2 o 3 hores després passem el criotub a -80°C.
- Després de 2 o 3 dies a -80°C, els vials de les cèl·lules s'enmagatzemen en N₂ líquid fins al moment de la seva descongelació.

Descongelació:

- Escalfem a 37°C 25 ml de medi de cultiu suplementat per a cada criotub.
- Un cop agafem les cèl·lules del contenidor de N₂ líquid mantenim el criotub de cèl·lules en neu carbònica, ja que el DMSO a temperatura ambient és tòxic per a les cèl·lules.
- Les cèl·lules es descongegen ràpidament introduint petits volums del medi escalfat dins del criotub i passant les cèl·lules al tub que conté el medi. Es repeteix el procediment fins a que es descongeli tot el contingut del criotub.

- Centrifuguem durant 5 min a 2500 rpm el tub que conté els 25 ml de medi amb les cèl·lules descongelades.
- Aspirarem el sobrenedant i resuspenem les cèl·lules en un volum petit de medi fresc suplementat.
- Les cèl·lules descongelades es sembren en un flascó de cultiu F25.

2.4 Transfecció de les cèl·lules

La transfecció de les cèl·lules ens permet expressar de manera transitòria una determinada proteïna en una línia cel·lular concreta. Les tècniques que hem utilitzat es basen en la inclusió del DNA plasmídic que codifica per a la proteïna desitjada en liposomes que al fusionar-se amb la membrana plasmàtica lliuren el DNA a l'interior de la cèl·lula. S'han utilitzat els sistemes de transfecció Effectene[®] (Quiagen), per a la transfecció de les cèl·lules COS-7, i Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen), per a la transfecció de les cèl·lules NIH3T3 i HCT116. En tots dos sistemes, hem seguit el protocol indicat pel fabricant, tot i que en el cas de la Lipofectamina, en alguns casos hem modificat la relació DNA(μ g):lipofectamina(μ l) per tal d'optimitzar la transfecció.

Les cèl·lules COS-7 i NIH3T3 s'utilitzen per als experiments 24h després de la transfecció. En canvi, les cèl·lules HCT116 creixen més ràpidament, i per tal d'obtenir la correcta densitat cel·lular en el moment de realitzar els experiments, es tripsinitzen a les 6 hores després de la transfecció i es reparteixen en noves plaques.

2.5 Tractaments cel·lulars

Quan s'indica en els resultats, les cèl·lules van ser incubades amb les següents drogues o productes (Taula 2). Les drogues eren afegides a les cèl·lules en cultiu. El temps de tractament de cada un dels compostos pot variar en els diferents experiments i és per aquest motiu que s'indica en el peu de cada figura o en el text.

Els tractaments en les cèl·lules HCT116 sempre es realitzen amb una densitat cel·lular del 20-25%. En el cas que es fessin servir cèl·lules HCT116 prèviament transfectades, els tractaments es realitzen 24 hores després de la transfecció i amb una densitat cel·lular del 20-25%.

Taula 2: Productes, dosis experimentals i casa comercial.

reactius	dosis experimentals	casa comercial	descripció
<i>TPA</i>	100 nM	Calbiochem	Activador de la proteïna cinasa PKC
<i>W13</i>	15 µg/ml	Sigma	Inhibidor de la CaM
<i>Adriamicina (Adr)</i>	0,15 µg/ml o 0,3 µg/ml	SIGMA	Agent intercalant en el DNA, inhibidor de la topoisomerasa II i causant de dany al DNA
<i>MG132</i>	10 µM	Stressgen	Inhibidor del proteasoma
<i>Cafeïna (Caf)</i>	5 mM	SIGMA	Inhibidor de les cinases ATM i ATR
<i>Actinomicina D (ActD)</i>	0.05 µg/ml	SIGMA	Inhibidor selectiu de la RNAPol I (PinoI-Roma and Dreyfuss, 1991;Torrano <i>et al.</i> , 2006)
<i>LLum UV</i>	30, 60 o 120 J/m ²	UV Stratalinker 1800 (Stratagene)	Radiació causant de dany al DNA

3. Cultius Bacterians

3.1 Soques i medis de cultiu

Hem utilitzat les següents soques bacterianes:

- *E. Coli* DH5α, per a l'obtenció de DNA plasmídic.
- BL21pLys, per a expressar i, posteriorment, purificar proteïnes de fusió.

El medi de cultiu emprat per a fer créixer aquestes dues soques ha estat un medi ric anomenat LB (Luria-Bertani) que conté, 10g/L Triptona, 5 g/L d'extracte de llevat i 5 g/L NaCl. S'afegeixen al medi LB els antibiòtics Ampicilina o Kanamicina (1mg/mL), segons el tipus de plàsmid que continguin els bacteris i Cloramfenicol si es tracta de la soca BL21 pLyS.

3.2 Transformació bacteriana

El procés de transformació es basa en la incorporació d'un DNA plasmídic dins de les cèl·lules bacterianes competents DH5α o BL21pLys:

- Es descongelen els bacteris competents en gel.
- S'afegeixen uns 0,5µg de DNA plasmídic (0,5-1µl) a 100µl de cèl·lules competents i s'incuba durant 30 min en gel.
- Es sotmet a un xoc tèrmic de 45 segons a 42°C i seguidament es deixa 2 min en gel.
- S'afegeix 1ml de medi LB sense cap tipus d'antibiòtic i s'incuba 1 h a 37°C en agitació.
- Es centrifuga 1 min a 6000 rpm i es descarten 900µl del sobrenedant.

- Amb la resta de medi es resuspenen les cèl·lules i es plaquegen en plaques de LB amb antibiòtic. L'antibiòtic dependrà de la resistència que tingui el plàsmid transformat.
- S'incuba la placa tota la nit a 37° C a l'espera de formació de colònies bacterianes.

3.3 Obtenció i purificació de DNA

Per a la purificació de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians s'han utilitzat els *kits* comercials: Nucleospin® Plasmid QuickPure per minipreps i NucleoBond® Xtra Midi Plus per midipreps (Macherey-Nagel).

Els plàsmids utilitzats en aquesta tesi apareixen en l'apartat 1 dels materials i mètodes, Taula 1.

3.4 Expressió i purificació de proteïnes de fusió

Els plàsmids codificants per a la CaM, per a la proteïna p21^{Cip1} sencera (GST-p21WT), per al fragment GST-p21CT i per a diverses mutacions d'aquest fragment: CTp21S153D i CT-p21S153A, van ser transformats en cèl·lules de *E.coli* de la soca BL21pLys.

Per a l'expressió i purificació de proteïnes de fusió amb GST s'ha seguit el mètode descrit per J.V. Frangioni (Frangioni and Neel, 1993). L'expressió de proteïnes recombinants o fragments de proteïnes en *E.Coli* es va fer pel sistema de proteïnes de fusió amb l'enzim glutatió-S-Transferasa (GST). Aquest sistema d'expressió utilitza els vectors pGEX i permet la purificació ràpida de les proteïnes fusionades amb GST, gràcies a l'afinitat de l'enzim a un dels seus substrats, el glutatió reduït. Així doncs, per aïllar la proteïna de fusió amb GST de la resta de proteïnes bacterianes s'utilitza el glutatió reduït unit covalentment a boletes de sefarosa. Un cop unida la proteïna de fusió, la elució es realitza afegint un excés de glutatió reduït lliure per tal de desfer la unió entre GST i les boletes de sefarosa, quedant la GST-proteïna lliure i en solució.

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

Expressió de proteïnes:

El primer pas és la clonació del cDNA de la proteïna que vulguem expressar en un vector d'expressió procariota. En el nostre cas vam utilitzar el vector pGEX-KGm per a la p21 i tots els seus mutants o el pET per a la expressió de la calmodulina humana. Seguidament es transformen aquests plàsmids a la soca bacteriana BL21pLys. Aquesta soca és defectiva en certes proteases i té una paret menys resistent i, a més, expressa lisozim (pel fet de tenir integrat el plàsmid pLys), la qual cosa facilita la seva lisi i la fa idònia per a l'expressió de proteïnes recombinants.

Una vegada els bacteris estan transformats, es fan créixer en cultius grans, seleccionant-los amb Ampicilina i Cloramfenicol, que són les resistències que confereixen el vector pGEX i el vector pLys respectivament. O bé, seleccionant-los amb Carbenicil·lina i Cloramfenicol en el cas de la CaM clonada dins d'un vector pET.

Inducció i purificació de proteïnes fusionades a GST:

Per a la inducció de l'expressió s'utilitza l'Isopropil- β -D-tiogalactopirinosid (IPTG). Segons el següent procediment:

- S'inocula una colònia o varies, obtingudes de la transformació de les cèl·lules bacterianes, en 5 ml de medi LB amb ampicilina i cloramfenicol. Es deixen créixer tota la nit a 37°C i en agitació.
- S'amplifica el cultiu fins al volum adient. Normalment entre 0,5 i 1 litre.
- Es deixa créixer el cultiu fins a la fase exponencial ($OD_{600nm} = 0,8-1$). Es recullen 10 μ l de bacteris sense induir.
- S'indueix l'expressió proteica afegint 0,5 mM d'IPTG i s'incuba 4 hores a 37°C en agitació. Es recullen 10 μ l de bacteris induïts.
- Es recullen els bacteris per centrifugació a 5000 rpm durant 10 minuts a 4°C. En aquest punt es pot congelar el precipitat de cèl·lules a -80°C per a la seva utilització posterior.
- Per a comprovar la inducció prèviament a la purificació, podem fer un gel de SDS-poliacrilamida on es carreguen les mostres de bacteris no induïts i de bacteris induïts i es visualitza amb una tinció amb blau de *Coomassie*. D'aquesta manera comprovem que la inducció de la proteïna s'ha fet correctament i si és així, procedirem amb la seva purificació.
- Es lisen els bacteris en tampó NETN (20mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NonidetP40 (Igepal®, SIGMA)) que conté inhibidors de proteases: 1mM PMSF, 1 μ M Aprotinina, 10 μ M Leupeptina.
- Per a ajudar a la lisi bacteriana, es fan diversos cicles de congelació i descongelació a -80°C i es sonica en gel, 4x 20 segons
- Es clarifica el lisat per centrifugació durant 15 minuts en un rotorSS34 (Sorvall) a 15000 rpm, i es guarda el sobrenedant en gel.
- S'afegeix resina de glutatió-sefarosa (Glutathione-Sepharose-4B®, Amersham Pharmacia Biotech), aproximadament 1ml per cada 5 mg de proteïna de fusió (que equivalen aproximadament a 0,5-1 litres de cultiu inicial bacterià). Ho incubem durant 1 hora a 4°C en agitació.
- Es fan tres rentats exhaustius de 50 ml amb tampó NETN
- Afegir 2-5 ml de tampó d'elució (50mM Tris-HCl pH 9.6, 120mM NaCl, 20mM Glutatió reduït) i ho incubem durant 30min a 4°C en rotació.
- Recollir la proteïna eluïda per centrifugació (5min a 3000 rpm).

- La proteïna purificada se sol dialitzar amb el tampó adequat per a l'assaig en el que la vulguem emprar. Es guarda a -80°C .
- Posteriorment, es valorarà la concentració proteica d'1 μl dels sobrenedant pel mètode de Bradford.

Inducció i purificació de proteïnes fusionades a pET:

Per a la purificació de la CaM recombinant humana partim del seu cDNA clonat en un plasmidi pET transformat en la mateixa soca d'*E. Coli*, BL21pLys.

- Fem créixer la soca de bacteris BL21pLys transformats amb el cDNA de la CaM recombinant humana en poc volum de medi LB i carbenicil·lina i cloramfenicol.
- Ampliem el cultiu fins a obtenir-ne un litre a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ aproximada de 1-1.2. Es recullen 10 μl de bacteris sense induir.
- Induïm la expressió de la proteïna amb 1mM d'IPTG durant 3 hores. Es recullen 10 μl de bacteris induïts.
- Centrifuguem el cultiu a 12000 rpm durant 15min.
- Per a comprovar la inducció prèviament a la purificació, podem fer un gel de SDS-poliacrilamida on es carreguen les mostres de bacteris no induïts i de bacteris induïts i es visualitza amb una tinció amb blau de *Coomassie*. D'aquesta manera comprovem que la inducció de la proteïna s'ha fet correctament i si és així, procedirem amb la seva purificació.
- Lisem els bacteris en 50 ml de Tampó Lys B (50mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA i 0.2mM PMSF) per cada litre de cultiu bacterià.
- Soniquem, en gel, 4 vegades durant 30 segons.
- Centrifuguem 20 min a 14000 rpm a 4°C .
- Bullim durant 5 minuts a 95°C .
- Tornem a centrifugar 20 minuts a 14000 rpm a 4°C
- Recollim el sobrenedant i hi afegim 5mM CaCl_2 i ho guardem a -20°C fins al moment de la seva purificació.
- Per a la purificació de la CaM utilitzem una columna preparada amb una reïna de Phenyl-Sepharose[®] (Pharmacia), que té la propietat de poder unir la CaM gràcies a l'afinitat d'aquesta pels radicals hidrofòbics de la reïna.
- Normalment treballarem reciclant una columna que ja ha estat utilitzada en una purificació anterior, en aquest cas, hem de fer passar per la columna uns 100ml d'una solució 8M Urea per tal d'eliminar possibles restes de proteïna d'alguna purificació anterior.
- Equilibrem la columna fent passar 200 ml de tampó CQB (50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM CaCl_2 , 0.1M NaCl).

- Carreguem la mostra a la columna, recollim el primer *Flow-Through* i el tornem a carregar a la columna per tal d'optimitzar la unió de la CaM a la columna.
- Rentem amb uns 300 ml de tampó CWB (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM CaCl₂, 0.1M NaCl).
- Tornem a rentar amb 300 ml de tampó CHSWB (50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM CaCl₂, 0.5M NaCl) per tal d'eliminar les proteïnes que s'hagin unit a la reïna mitjançant forces electrostàtiques.
- Eluïm la CaM amb volums petits de tampó CEB (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EGTA). A continuació procediríem com en qualsevol proteïna a la seva diàlisi i liofilització, si convé.

4. Electroforesi, transferència i immunodetecció

4.1 Obtenció de lisats cel·lulars

Partint de la quantitat de cultiu cel·lular que hem necessitat segons el tipus d'experiment realitzat, tant siguin cèl·lules control com cèl·lules tractades, el protocol que hem seguit per a l'obtenció de lisats cel·lular és el següent:

- Es retira el medi de les plaques i es fan 2 rentat amb PBS.
- S'afegeix el volum de PBS necessari per a cobrir la superfície de la placa, i sobre una base amb gel, es rasca el cultiu amb un *scraper* fins a desenganxar totes les cèl·lules.
- Es recullen les cèl·lules en tubs mantinguts en gel i es centrifuga durant 2 min a 10.000 rpm en una microfuga d'eppendorfs. Es descarta el sobrenedant.
- Es congelen els *pellets* secs a -20°C o bé es continua el procés
- Es resuspen el *pellet* de cèl·lules amb un tampó de lisi 2% SDS (*Sodium Dodecil Sulfat*), 67mM Tris-HCl pH 6.8 i es soniquen dues vegades durant 20 segons en gel.
- Posteriorment, es valora la concentració proteica amb el mètode de Lowry.

4.2 Fraccionaments cel·lulars

Durant la realització d'aquesta tesi, es van posar a punt dos mètodes de fraccionament cel·lular que permetessin analitzar la localització de p21^{Cip1} en els diferents compartiments cel·lulars.

- Fraccionament de nuclis

Per tal d'obtenir un fraccionament eficient de les cèl·lules COS-7 que ens permetés analitzar les fraccions de nucli i citoplasma sense que la proteïna p21^{Cip1}, de baix pes

molecular, sortís a través dels porus nuclears i ens contaminés la fracció de citoplasma, vam posar a punt el següent mètode de fraccionament:

- Fem créixer les cèl·lules COS-7 en plaques de 60mm al 80% de confluència (normalment 2 o 3 plaques per condició experimental).
- Rentem les cèl·lules amb PBS fred i cobrim la superfície de la placa amb 0,5 ml de PBS fred.
- Fem saltar les cèl·lules de la placa utilitzant un *scraper*, recollir en un eppendorf i centrifugar 3 minuts a 2000 rpm a 4°C.
- Rentem dos cops amb PBS
- Resuspenem les cèl·lules en 300 µl de tampó A (10mM Hepes pH 7.4; 1mM EDTA, 1mM DTT) suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 10µg/ml leupeptina; 0,1U/ml aprotinina, 1mM ortovanadat, 50mM NaF)
- Es trenquen les membranes cel·lulars a través de passar la suspensió cel·lular 15 vegades a través d'una agulla de 23-gauge. El trencament de les membranes cel·lulars es confirma mitjançant l'observació al microscopi.
- S'afegeixen 300 µl de tampó B (50mM Hepes pH 7.4; 500mM sucrosa, 10mM Mg₂SO₄) i es centrifuguen les cèl·lules durant 15 minuts a 2500 rpm a 4°C.
- Es recull el sobrenedant (fracció citoplasmàtica), d'alíquota i es guarda a -20°C.
- El *pellet* es resuspen en 300 µl de tampó A més 300 µl de tampó B i s'homogeneïtza novament amb 5 passades a través d'una agulla de 23-gauge. El trencament de les membranes cel·lulars i l'obtenció de nuclis sencers es confirma mitjançant l'observació al microscopi.
- La suspensió cel·lular es centrifuga durant 10 minuts a 2000 rpm i a 4°C sobre 1,5 ml d'un coixí de sucrosa (0.88M sucrosa; 0,5mM MgCl₂).
- Descartem el sobrenedant i rentem el *pellet* de nuclis una vegada amb 500 µl de tampó A més 500 µl de tampó B i el centrifuguem durant 10 minuts a 1700 rpm.
- El *pellet* (fracció nuclear) es resuspen amb 50-100 µl de tampó de lisi (2% SDS i 67 mM Tris-HCl pH 6.8) i es sonica dues vegades durant 20 segons per a trencar completament el DNA.
- Totes les fraccions es quantifiquen mitjançant el mètode de Lowry i processades mitjançant una electroforesi d'una dimensió.
- Es va confirmar la puresa de les fraccions per WB utilitzant marcadors específics per a cada compartiment cel·lular.

Tots els passos es van realitzar a 4°C i tots els tampons han d'estar a 4°C.

- Purificació de nuclèols

El mètode utilitzat permet obtenir una fracció purificada de nuclèols i es basa en el mètode descrit per (Andersen *et al.*, 2002), amb algunes modificacions:

- 30×10^6 cèl·lules, de cada condició experimental, es renten amb PBS fred, es tripsinitzen, i es centrifuguen 3 min a 500g; es resuspen amb 10ml de PBS i fem un segon rentat.
- Resuspenem les cèl·lules en 1ml de tampó A (10mM HEPES-KOH pH 7.9; 1,5mM $MgCl_2$; 10mM KCl; 0.5mM DTT) amb inhibidors de proteases i fosfatases (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 10µg/ml leupeptina; 0,1U/ml aprotinina, 1mM ortovanadat, 50mM NaF).
- Incubem les cèl·lules en el tampó A durant 10 minuts en gel.
- Homogeneïtzem el *pellet* i trenquem les membranes cel·lulars, passant la suspensió cel·lular 15 vegades a través d'una agulla de 23-gauge seguit de 10 passades a través d'una agulla de 25-gauge. El trencament de les membranes cel·lulars va ser confirmat mitjançant la observació al microscopi de contrast de fase.
- Agafem 50µl de la suspensió cel·lular (fracció total o TCL, *total cell lysate*)
- Centrifuguem la suspensió cel·lular a 228g durant 5 minuts a 4°C.
- El sobrenedant₁ (fracció citoplasmàtica) va ser recollit i guardat a -20°C per al posterior anàlisi.
- El *pellet* (fracció nuclear) va ser resuspès en 600µl de tampó B (0,25M sucrosa; 10mM $MgCl_2$ i inhibidors de proteases i fosfatases).
- Vam tornar a homogeneïtzar el *pellet* de nuclis, 10 passades a través d'una agulla de 23-gauge, per tal d'assegurar-nos el trencament complet de les membranes cel·lulars i la obtenció de nuclis purs i sencers. Comprovem al microscopi.
- Centrifuguem la suspensió a 1430g durant 5 minuts a 4°C sobre 600µl d'un coixí de sucrosa (tampó C: 0,35M sucrosa; 0,5mM $MgCl_2$ i inhibidors de proteases i fosfatases).
- El *pellet* el resuspenem amb 600µl de tampó C i el soniquem 6 vegades durant 10 segons en gel, fent servir la potència al 5 del sonicador. Observem al microscopi de contrast de fase que no hi hagi nuclis sencers, els nuclèols es veuen com a cossos refringents.
- La mostra sonicada es va col·locar sobre 600µl d'un coixí de sucrosa (tampó D: 0,88M sucrosa, 0,5M $MgCl_2$ i inhibidors de proteases i fosfatases) i es centrifuga durant 10 minuts a 2800g a 4°C.
- El sobrenedant₂ (fracció de nucleoplasma) va ser recollida i guardada a -20°C.
- El *pellet* que conté els nuclèols va ser rentat amb 500µl del tampó C i va ser centrifugat durant 2 min a 2000g a 4°C. Vam observar en el microscopi de contrast de fase la puresa d'aquest *pellet* de nuclèols.

- Vam resuspendre el *pellet* de nuclèols en 50µl de tampó de lisi (2% SDS, 67mM Tris-HCl pH 6.8) i vam guardar-lo a -20°C.
- En el moment de l'anàlisi, les altres fraccions recollides durant el procediment també van ser lisades amb el mateix tampó de lisi i sonicades 2 vegades durant 20 segons.
- Totes les fraccions van ser quantificades mitjançant el mètode de Lowry i processades mitjançant una electroforesi d'una dimensió.
- Es confirma la puresa de les fraccions per WB utilitzant marcadors específics per a cada compartiment, i marcadors dels possibles compartiments contaminants.

Tots els passos es van realitzar a 4°C i tots els tampons han d'estar a 4°C.

4.3 Valoració de la concentració de proteïna

Amb la finalitat d'igualar la quantitat de proteïna de les diferents mostres d'un mateix experiment ja sigui obtingudes a partir d'extractes cel·lulars o dels diferents mètodes de fraccionament, hem utilitzat el mètode de Bradford (Bradford, 1976) o el mètode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) de quantificació de proteïnes. És necessària la quantificació de les mostres per tal de carregar els gels d'acrilamida correctament. Hem utilitzat majoritàriament el mètode de Lowry, ja que la major part de les mostres cel·lulars han estat obtingudes amb el tampó de lisi que conté 2% de SDS, i aquesta concentració de SDS no és compatible amb el mètode de Bradford.

4.4 Electroforesi en una dimensió

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

La tècnica es basa en la diferent migració de les proteïnes desnaturalitzades amb SDS a través d'una matriu d'acrilamida i bis-acrilamida sota l'efecte d'un camp elèctric. Gràcies al SDS, les proteïnes quedaran carregades negativament i migraran cap al pol positiu, separant-se exclusivament pel seu pes molecular.

En el nostre cas, per a analitzar la proteïna p21^{Cip1}, el percentatge d'acrilamida dels gels és del 12%. Les altres proteïnes s'han analitzat en gels de percentatges diferents segons el pes molecular de cada una de les proteïnes.

Es carrega la mateixa quantitat de proteïna (prèviament quantificada per Lowry o Bradford) en cada un dels carrils per a cada experiment. Les mostres de proteïnes provinents dels extractes cel·lulars o de les diferents subfraccions cel·lulars es carreguen en aquests gels resolutius. Prèviament preparem les mostres amb un tampó que conté: 2% SDS (per desnaturalitzar); 0,5 mg/ml ditiotreitòl (DTT) (per trencar ponts di-sulfur); 10% glicerol i 0,1mg/ml blau de bromofenol. Just abans de carregar les mostres les bullim durant 3 minuts per tal de desnaturalitzar completament les proteïnes i trencar tots els ponts di-sulfur.

4.5 Electroforesi en dues dimensions

La tècnica d'electroforesi bidimensional ens permet separar les proteïnes d'una barreja segons dues propietats independents: el punt isoelèctric (pI) i el pes molecular. Aquestes propietats combinades ens permeten identificar i separar diferents proteïnes d'igual pes molecular, com per exemple diferents isoformes d'una mateixa proteïna o una proteïna amb modificacions post-traduccionals. Nosaltres hem fet servir aquesta tècnica amb la finalitat d'estudiar la fosforilació de la proteïna p21^{Cip1}.

L'electroforesi bidimensional consta de dues parts: una primera dimensió on separem les proteïnes segons el seu punt isoelèctric i una segona dimensió on les proteïnes seran separades segons el seu pes molecular (veure apartat 4.4). En aquesta tesi, vam fer servir el mètode IEF (*Isoelectric focusing*) per a separar les proteïnes segons el seu punt isoelèctric amb un sistema de tires de gradient de pH anomenat "IPG Strip" (Bio-Rad).

El procediment que vam fer servir per a la preparació de les mostres i l'electroforesi bidimensional és el següent:

Preparació de les mostres

- En primer lloc vam fer un *pellet* de les cèl·lules en cultiu ($1,5 \times 10^6$ cèl·lules per condició experimental).
- Vam lisar les cèl·lules amb 200µl de tampó de lisi (0,3% SDS; 50mM Tris-HCl pH8; 200mM dithioerythriol [DTE]).
- Vam bullir les mostres durant 5 minuts i seguidament les vam refredar durant 2 minuts a 4°C.
- Els lisats cel·lulars van ser incubats amb una barreja de DNasa i RNasa A (en una concentració final de 250µg/ml cada una) durant 10 minuts en gel.
- Seguidament, vam precipitar les proteïnes amb una solució al 80% d'acetona freda durant 20 minuts en gel.
- Centrifuguem a 14000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Apareix un precipitat de color blanquinós. Eliminem el sobrenedant i deixem assecar a l'aire el *pellet* (en aquest punt es pot parar el procediment i congelar les mostres).
- Un cop els *pellets* ja estan completament secs, es resuspenen amb 200µl de tampó Urea (9M Urea; 4% CHAPS {3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}; 65mM DTE; 0,1% amfòlits [Bio-Lyte 3/10, no.163-1113; Bio-Rad]).
- Centrifuguem a 14000 rpm durant 15 minuts a 4°C.
- Recollim el sobrenedant i en quantifiquem les proteïnes pel mètode de Bradford.
- Preparem les mostres amb 50µg de proteïna i les diluïm amb el tampó Urea fins a un volum final de 125µl.

Tractament amb fosfatasa

- El tractament amb fosfatasa es va realitzar en les cèl·lules recollides, abans de processar les mostres. Es van tractar les cèl·lules amb fosfatasa λ (400 U/ μ l; Calbiochem) en 20 μ l de tampó P (150mM Tris-HCl pH8; 2mM NaCl; 2mM EDTA; 10% glicerol; 0,2% Nonidet P-40; 5mM DTT; 2nM MnCl₂; 100 μ g/ml BSA) amb inhibidors de proteasa (1mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 10 μ g/ml leupeptina; 0,1U/ml aprotinina) durant 30 minuts a 30°C.

Electroforesi 2D

- La primera dimensió es va realitzar amb el mètode de l'enfoc isoelèctric (IEF). Vam utilitzar tires de gel IPG prefabricades que contenen un gradient de pH (ReadyStrip IPG Strip, 7 cm, pH 3-10; no.163-2000 [Bio-Rad]) i les vam col·locar en el sistema PROTEAN IEF (no.165-4000; Bio-Rad).
- L'aplicació de la mostra i la rehidratació de les tires es va dur a terme seguint el mètode passiu indicat per les instruccions del fabricant (Bio-Rad).
- L'enfoc isoelèctric es va realitzar des de 12500V a 20000V per hora.
- Després de córrer la primera dimensió, les tires es van equilibrar durant 10 minuts en agitació amb 1 ml de tampó d'Equilibri (6M Urea; 0,375M Tris-HCl pH8.8; 2% SDS, 20% glicerol i 2% [w/v] DTE).
- La segona dimensió es va portar a terme segons el mètode de Laemmli, tal i com acabem de descriure, amb algunes adaptacions.
- Vam preparar un gel d'acrilamida resolútiu d'1mm de gruix.
- Vam col·locar les tires equilibrades a sobre, en contacte amb el gel i sense bombolles entre el gel i la tira, i vam sellar-les col·locant a sobre la tira una solució 1% agarosa en tampó electròlit, que es solidificarà.
- Seguidament vam córrer la segona dimensió.
- Després de l'electroforesi 2D, els gels van ser transferits a membranes de Immobilon-P® (Millipore) i analitzats per Western blot (com explicarem a continuació).

4.6 Tinció de gels

Per tal de tenyir les proteïnes dels gels de poliacrilamida i poder visualitzar el patró proteic general, hem utilitzat la tinció de blau de *Coomassie*.

Aquesta tècnica permet estudiar el patró general de totes les proteïnes d'una mostra, un cop resoltes en un gel de SDS-poliacrilamida. Tot i que és menys sensible que altres tècniques, és la tinció d'elecció per la seva senzillesa i rapidesa.

Una vegada finalitzada l'electroforesi, s'incuba el gel durant 10-20 minuts a temperatura ambient i en agitació suau amb solució de tinció de blau de *Coomassie* (2,5 mg/ml *Coomassie Brilliant Blue* G250, 45% metanol, 10% àcid acètic). A continuació, es procedeix a destenyir el

gel per treure l'excés de colorant afegint al gel una solució destenyidora (10% àcid acètic, 50% metanol) i s'incuba el temps necessari fins a visualitzar bé el patró de bandes.

4.7 Western blot: electrotransferència i immunodetecció

La tècnica del *Western blot* ens permet identificar una proteïna concreta present en una mostra. És necessari resoldre les proteïnes de la mostra mitjançant les tècniques electroforètiques. La primera part de la tècnica del *Western blot* consisteix en l'electrotransferència i la segona, en la immunodetecció.

Electrotransferència

Consisteix en transferir les proteïnes separades en els gels SDS-PAGE a una membrana, en el nostre cas una membrana d'Inmobilon-P® (Millipore) durant 2 hores a 4°C, a 60 V. Durant la electrotransferència les proteïnes del gel es transfereixen a la membrana. Es posa el gel i la membrana en contacte i per acció d'un camp elèctric les proteïnes desnaturalitzades amb el SDS i per tant, carregades negativament, migren cap a la membrana (pol positiu) i hi quedaran retingudes.

Immunodetecció

Un cop tenim les proteïnes transferides a la membrana podem realitzar l'estudi de proteïnes concretes mitjançant l'ús d'anticossos específics. La immunodetecció, és una tècnica indirecta, és a dir, l'anticòs que s'uneix a la proteïna o anticòs primari no està marcat. Per a visualitzar-lo, s'utilitza un anticòs secundari específic contra les immunoglobulines de l'espècie on s'ha produït l'anticòs primari. És aquest anticòs secundari el que està conjugat amb un enzim i ens permet la detecció. El protocol utilitzat majoritàriament per a la immunodetecció és el següent:

- S'incuba la membrana amb la Solució de Bloqueig (5% de llet desnatada en pols [o 5% de BSA, en el cas de l'anticòs anti-fosfo-Ser153p21] en TBST [0,05% Tween 20 en TBS; TBS, 50mM TrisHCl pH 7.5, 150mM NaCl], en agitació i a temperatura ambient, durant 1h.
- Rentem les membranes 3 vegades durant 10 minuts amb TBST (opcional).
- S'incuba la membrana amb l'anticòs primari diluït en Solució d' Anticossos (1% BSA; 0,5% llet en pols; 0,02% azida sòdica en TBS). Cada anticòs primari té una dilució específica que es pot consultar a la taula d'anticossos següent. El temps d'incubació pot variar des d'una hora a temperatura ambient fins a tota la nit a 4°C. Normalment hem incubat les membranes durant 1 hora i mitja en agitació i a temperatura ambient.
- Rentem les membranes 3 vegades durant 5 minuts amb TBST.

- S'incuba la membrana amb l'anticòs secundari (Bio-Rad) específic per l'hoste de l'anticòs primari utilitzat (ratolí, conill, ovella, etc.) conjugat amb peroxidasa, durant 1 hora a temperatura ambient. La dilució que fem servir és aproximadament 1:2000-1:4000 en TBST.
- Rentem les membranes 3 vegades durant 10 minuts amb TBST.
- Rentem una vegada amb TBS.
- Revelem la immunodetecció amb ECL (Enhanced Chemiluminiscence, Amersham Biosciences): La reacció de l'enzim peroxidasa amb el seu substrat produirà una reacció de luminescència, la qual podrem detectar mitjançant la impressió de la llum en films fotogràfics (Hyperfilm ECL, Amersham) i revelant-ho després.

Els anticossos amb els quals s'han incubat les membranes en aquesta tesi són els següents:

Taula 3: Característiques dels principals anticossos utilitzats per *Western blot*.

DIANA	DILUCIÓ	FONT I REFERÈNCIA
p21 ^{Waf-1}	1/200	Calbiochem (Ab-1 OP64)
p21	1/200	Santa Cruz Biotechnology (C-19; sc-397)
fosfo-Ser153p21	2 µg/ml	Fabricació pròpia*
Lamina B	1/200	Santa Cruz Biotechnology (M20; sc-6217)
GAP120	1µg/ml	Upstate Biotech (05-178)
fosfo-MARCKS	1/500	Cell Signaling (no 2741)
HA clone 12CA5	1µg/ml	Roche (1583816)
C23 (nucleolin)	1/600	Santa Cruz Biotechnology (MS3; sc-8031)
fibrilarin	1/200	Santa Cruz Biotechnology (H140; sc-25397)
Serina193-fosforilada H2Ax	1/1000	Upstate Biotechnology (05-636)
Actina	1/200	Santa Cruz Biotechnology (C-11; sc-1615)
p53	1/250	Neo Markers (Ab-5, MS186)

* L'anticòs anti-fosfo-Ser153p21 va ser produït en ratolí contra el pèptid MTDYHS*KRRLLFC per la empresa Isogene Life Science. Va sorgir el problema de que el sèrum que contenia l'anticòs anti-fosfo-Ser153p21 també reconeixia a la proteïna no fosforilada. Per tal de resoldre aquest problema vam tornar a purificar l'anticòs. En primer lloc, vam fer passar el sèrum per una columna de CnBr

que contenia la proteïna Ctp21 i *flow-through* d'aquesta columna, és a dir, el que no es quedava retingut en la columna, el vam fer passar per una segona columna de CnBr que contenia el pèptid fosforilat. L'eluit d'aquesta segona columna contenia l'anticòs anti-fosfo-Ser153p21, que després d'aquesta purificació si que reconeixia específicament el pèptid fosforilat.

5 Microscòpia de fluorescència

5.1 Immunocitoquímica

Mitjançant una immunocitoquímica, o també anomenada immunofluorescència, es pot detectar la localització intracel·lular de proteïnes específiques, a través de la unió d'anticossos específics contra les proteïnes que volem analitzar. Cal un anticòs secundari conjugat a un fluorocrom que ens permetrà visualitzar la localització de la proteïna al microscopi de fluorescència. En alguns dels nostres experiments, vam transfectar les cèl·lules amb plàsmids que codificaven per una proteïna acoblada a un *tag* fluorescent (GFP, CFP, YFP, DsRED), de manera que no calia utilitzar cap anticòs per a detectar-la, tot i que a vegades s'ha combinat la transfecció d'una proteïna fluorescent i una immunocitoquímica per a detectar la localització d'una altra proteïna d'interès. En el cas de les cèl·lules transfectades amb un *tag* fluorescent que no s'utilitzen per a una immunocitoquímica igualment s'han de rentar, fixar i muntar com el protocol de les immunocitoquímiques, per tal de ser visualitzades al microscopi de fluorescència. El protocol d'immunocitoquímica presenta variacions segons la proteïna que volem analitzar, a continuació explicarem el protocol més general i en la taula 4 s'especifiquen les modificacions per a cada un dels anticossos emprats.

El protocol d'immunocitoquímica que vam fer servir majoritàriament és el següent:

- Es sembren les cèl·lules sobre cubreobjectes i 24 hores després de la sembra es realitzen els tractaments adients. En el cas de les cèl·lules HCT116, si les cèl·lules s'han de transfectar, es sembren sense cubreobjectes i 24 hores després es realitzen les transfeccions, 6 hores després de les transfeccions es replanten les cèl·lules sobre cubreobjectes i 24 hores després es realitzen els tractaments.
- Passat el temps de tractament necessari es treuen els cubreobjectes de la placa i es fan dos rentats amb PBS.
- Fixar les cèl·lules amb paraformaldehid (PFA) 4% en PBS durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS.
- Permeabilitzar amb Tritó X-100 0,2% en PBS (o 1% Tritó X-100 en funció de l'anticòs, per exemple: UBF i Cleaved Caspasa-3) 10 minuts a temperatura ambient.
- Fer cinc rentats de 2 minuts amb PBS.

- Bloqueig amb 1% BSA en PBS durant 1 hora a temperatura ambient.
- Incubar les cèl·lules amb anticòs primari diluït en la solució de bloqueig 1 hora o 1 hora i mitja a 37°C en una cambra humida.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS
- Incubar les cèl·lules amb anticòs secundari anti-rabbit o anti-mouse conjugat amb Alexa-488 (Molecular Probes), Alexa-594 (Molecular Probes) o Cy5 (Jackson) diluïts 1:500 en la solució de bloqueig durant 45 minuts-1 hora a 37°C en una cambra humida.
- Fer tres rentats de 5 minuts amb PBS.
- Fer un rentat amb aigua MiliQ.
- Muntar els cubreobjectes sobre un portaobjectes amb 4-5 µl de Mowiol® (Calbiochem)
- Observar les mostres al microscopi de fluorescència.

(Com a control negatiu, es processa paral·lelament a la immunocitoquímica un cubreobjecte amb les cèl·lules però sense incubar-les amb l'anticòs primari. D'aquesta manera sabrem la senyal de fons (*background*) que dona l'anticòs secundari)

Taula 4: Característiques dels principals anticossos utilitzats per immunocitoquímica.

DIANA	DILUCIÓ	INCUBACIÓ ANTICÒS PRIMARI	FONT I REFERÈNCIA
HA (clone 12CA5)	1/200	1% BSA en PBS 1 h i 30 min a 37°C	Roche (1583816)
p21 ^{Waf-1}	1/200	1% BSA en PBS 1 h i 30 min a 37°C	Calbiochem (Ab-1, OP64)
p21	1/100	1% BSA en PBS 1 h i 30 min a 37°C	Santa Cruz Biotechnology (C-19; sc-397)
UBF	1/100	1% BSA; 0,1% Tween; 0,1% tritó en PBS Tota la nit a 4°C	Santa Cruz Biotechnology (F-9; sc-13125)
fibril·larina (fibrillarín)	1/50	1% BSA en PBS 1 h i 30 min a 37°C	Santa Cruz Biotechnology (H-140; sc-25397)
p53	1/25	1% BSA en PBS 1 h i 30 min a 37°C	Santa Cruz Biotechnology Pab-240; (sc-99)
mdm2	1/100	1% BSA en PBS 1 h i 30 min a 37°C	Calbiochem (Ab-1; OP46)
PCNA	1/50	1% BSA; 0,1% Tween en PBS Tota la nit a 4°C	Oncogene (Ab-1; NA03)
Ciclina E	1/50	1% BSA; 0,1% Tween en PBS Tota la nit a 4°C	Santa Cruz Biotechnology (HE12; sc-247)
SUMO-1 (anti-GMP1)	1/50	en PBS 1x Tota la nit a 4°C	Zymed (33-2400)
SUMO-1	1/100	en PBS 1x Tota la nit a 4°C	Santa Cruz Biotechnology (D-11; sc-5308)
Serina193- fosforilada H2Ax	1/100	en PBS 1x 1 h i 30 min a 37°C	Upstate Biotechnology (Clone JBW301; 05-636)

Cleaved Caspasa-3	1/200	1% BSA; 0,1% Tween; 0,1% tritó en PBS Tota la nit a 4°C	Cell Signaling (Asp175; 9661)
Ubc9	1/50	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	Abcam (ab-30502)
hnRNPA2	1/1000	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	(Bossier <i>et al.</i> , 1995)
Proteïnes del complex del porus nuclear	1/500	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	Abcam (Mab414; ab-24609)
CBP	1/100	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	Santa Cruz Biotechnology (sc-369)
PML	1/200	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	Santa Cruz Biotechnology (sc-5621)
Ub-proteïna conjugada	1/50	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	BioMol/Afinity (UG-9510)
Proteasoma 20S	1/50	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	BioMol (PW-8195)
PA28Y (Psmc3)	1/100	en PBS 1x Tota la nit a 4°C	BD antibodies (P83620; 611181)
Topoisomerasa I	1/75	1% BSA en PBS Tota la nit a 4°C	Human autoimmune serum D106 (Dr. Miguel Lafarga)
FITC-Human	1/75	PBS 1x 1 h a 37°C	Jackson (109-095-088)

5.2 Tincions de DNA, RNA i actina

El marcatge de DNA de les cèl·lules fixades provinents d'una immunocitoquímica o de cèl·lules transfectades amb una proteïna fluorescent va realitzar amb dos tipus de marcadors del DNA:

- DAPI (dilució 1:10.0000 en PBS)
- To-pro3 Iodide (concentració final de 1 µM, Invitrogen)

El marcatge del RNA de les cèl·lules fixades provinents d'una immunocitoquímica o de cèl·lules transfectades amb una proteïna fluorescent es va realitzar amb Iodur de propidi (concentració final de 1 µg/ml, Sigma).

Els tres tipus de marcadors s'afegien en les cèl·lules que havien crescut sobre els cubreobjectes i havien estat fixades i permeabilitzades, o bé al final de la immunocitoquímica just abans del muntatge amb el Mowiol. Les tincions es feien durant 5 minuts a temperatura ambient.

Per a detectar les fibres d'estrès, vam fer servir fal·loïdina (*Phalloidin*) conjugada amb Alexa 594, dilució 1:500 (Molecular Probes) que es va afegir durant la incubació amb l'anticòs secundari.

5.3 Microscòpia de fluorescència

La quantificació de la localització de p21^{Cip1} en el nucli o en el citoplasma o bé en el nuclèol, s'han fet mitjançant les observacions de les preparacions en un microscopi de fluorescència Axio-plan Zeiss.

5.4 Microscòpia confocal

Imatges

Les imatges corresponents a immunocitoquímiques o a les cèl·lules transfectades amb proteïnes fluorescents van ser preses amb un microscopi confocal espectral Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) equipat amb un microscopi invertit Leica DMIRE2, làsers d'argó i HeNe.

Les imatges corresponents als marcatges: Alexa488 (Molecular Probes) o GFP, Alexa594 (Molecular Probes) o Iodur de propidi, Cy5 (Jackson) o To-pro3 Iodide i contrast de fase van ser adquirides de manera seqüencial fent servir un objectiu APO Ph3 63x amb oli d'immersió i obertura numèrica 1.32, equipat amb la òptica necessària per a adquirir imatges en contrast de fase. Es van fer servir les línies de laser 488, 543 i 633 nm, respectivament, excitació *beam splitter triple dichroic* 488/543/633 nm, rangs de detecció d'emissió: 500-540 nm, 580-620 nm i 645-700 nm respectivament i amb una obertura de *pinhole* de 1 *Airy unit*.

Pel·lícules de formació i recuperació del cos intranucleolar (*Time-lapse*)

Per tal d'obtenir les filmacions en contrast de fase (*Time-lapse*), les cèl·lules HCT116 control o tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24 hores es van fer créixer sobre cubreobjectes de vidre de 22 mm de diàmetre i es van muntar en una cambra Attofluor (Molecular Probes, Invitrogen). D'una banda vam tractar les cèl·lules control i vam agafar imatges per tal de seguir la formació del cos intranucleolar durant 24 hores. D'altra banda, per a poder observar la recuperació de les cèl·lules amb cos intranucleolar, vam retirar el medi de les cèl·lules tractades durant 24 hores i seguir la seva recuperació durant 60 hores. Tots dos experiments es van dur a terme a 35,5°C i 5% de CO₂. Les imatges van ser preses amb un microscopi confocal espectral Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) fent servir un objectiu APO Ph3 63x amb oli d'immersió i obertura numèrica 1,32, equipat amb la òptica necessària per a adquirir imatges en contrast de fase. Es va adquirir una imatge cada 10 minuts i de cada imatge es van adquirir 5 plans en l'eix z per a poder seguir la cèl·lula en el cas que es desplaçés amunt o avall. Les imatges es van realitzar en un format de 1024x1024, amb zoom 2 i tamany de píxel de 119x119 nm.

Quan s'indica, les imatges van ser adquirides amb un microscopi confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany), equipat amb un microscopi invertit DMI6000, laser d'argó i un objectiu APO 63x preparat per a immersió en glicerol i obertura numèrica de 1,3.

Contactes nuclèol amb proteïnes dels porus nuclears (Leica TCS SP5)

Les imatges corresponents a les cèl·lules sotmeses a immunocitoquímica per a detectar les proteïnes dels porus nuclears (Alexa 488) i marcades amb iodur de propidi, van ser adquirides de manera seqüencial amb excitació *AOBS beam-splitter*, rangs de detecció d'emissió 500-535 nm, 592-700 nm, respectivament i amb una obertura de *pinhole* de 1 *Airy unit*. Les imatges es van realitzar en un format de 1024x512, amb zoom 5 i tamany de píxel de 48x48 nm. Les seccions òptiques es van realitzar cada 300 nm.

Anàlisi de l'estructura tridimensional del nuclèol (3D) (Leica TCS SP5)

Per tal d'estudiar l'estructura sencera dels cossos intranucleolars, es van realitzar imatges seqüencials del nuclèol de cèl·lules vives tractades amb ADR i transfectades amb GFP-p21WT per a evitar els possibles artefactes en l'estructura tridimensional degudes a la fixació i el muntatge de les cèl·lules. Durant l'adquisició les cèl·lules vives es mantenen a 35,5°C i 5% de CO₂. Les imatges van ser adquirides fent servir la línia de laser 488 nm, amb excitació *AOBS beam-splitter*, rang de detecció d'emissió 500-600 nm i amb una obertura de *pinhole* de 1 *Airy unit*. Les imatges es van adquirir en un format de 1024x512, amb zoom 6, i tamany de píxel 40x40 nm. Les seccions òptiques es van realitzar cada 152 nm.

5.5 Experiments de fotoextinció: FLIP i FRAP

Les cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT o GFP-p21NLS es van fer créixer sobre cubreobjectes de vidre de 22 mm de diàmetre i es van muntar en una cambra Attofluor (Molecular Probes, Invitrogen). Tots els experiments es van dur a terme a 35,5°C i 5% de CO₂.

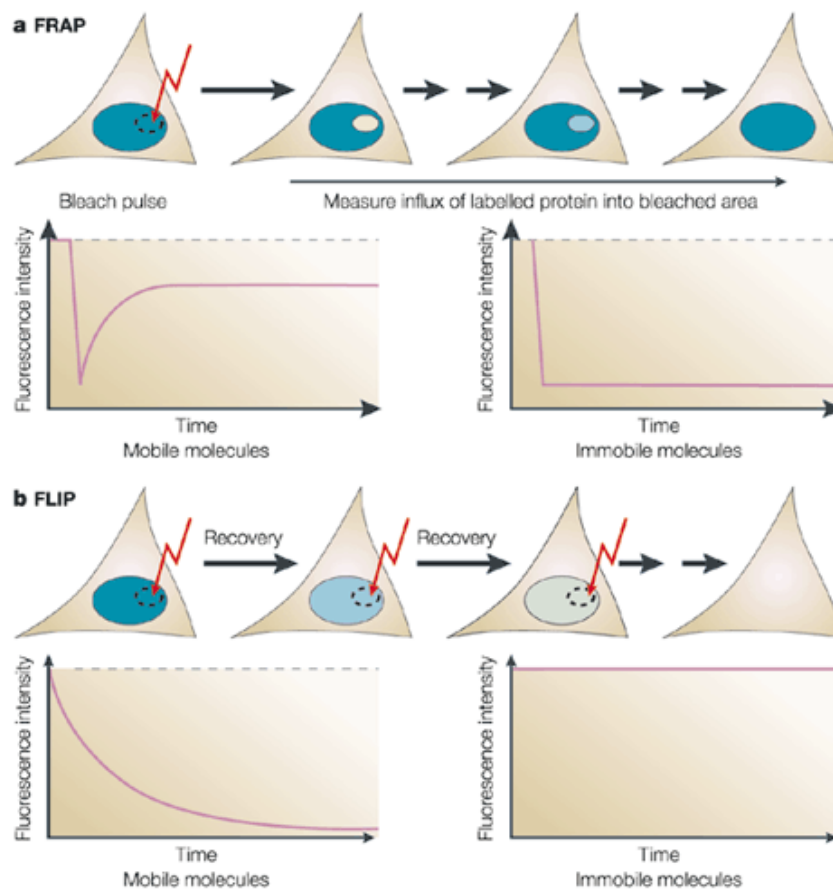
La fotoextinció o fotoapagat de la fluorescència d'un fluoròfor anomenada en anglès com a *photobleach*, és la alteració del fluoròfor induïda per la llum a alta intensitat que provoca la extinció de la pròpia fluorescència del fluoròfor.

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

Els experiments de FRAP del nuclèol i del nucleoplasma, s'han realitzat utilitzant el microscopi confocal espectral LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany), acoblat a una cambra climàtica amb control de temperatura i CO₂, i fent servir un làser d'argó (100mW) i un objectiu d'immersió en glicerol 63x amb obertura numèrica de 1,3. Les imatges de GFP van ser adquirides amb la línia de laser 488 nm (AOTF 1-2%, 30% intensitat del laser d'argó, 100mW) rangs de detecció d'emissió 500-600 nm, amb un format de 256x256 píxels, tamany de píxel 137x137 nm i amb una obertura de *pinhole* de 1.5 *Airy units*.

Es van adquirir 10 imatges de la fluorescència cel·lular inicial (cèl·lula sencera) en intervals de 224 ms seguides de 4 imatges de fotoextinció (només de l'àrea circular de 4,9 µm² senyalada) amb potència màxima de les línies de làser (476/488/496 nm). Per tal de resoldre eficientment la ràpida recuperació inicial de la fluorescència, la fotoextinció es va realitzar amb

el mode *Leica Fly Mode* a 1400Hz, en el qual el làser funciona en dues direccions: quan avança produeix la fotoextinció (làser al màxim de potència) i quan retrocedeix capta una imatge de la fluorescència total de la cèl·lula (làser a la potència adient per a adquirir imatges): d'aquesta manera ens permet adquirir una imatge entre cada una de les passades de fotoextinció. Després de la fotoextinció vam adquirir 200 imatges amb un interval de 224 ms per tal de poder analitzar posteriorment la recuperació de l'àrea fotoextingida.



Esquema representatiu dels experiments de FRAP i FLIP. (A) En els experiments de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP), es fotoextingeix la fluorescència d'una àrea petita, ja que hi dirigim el làser durant un temps curt a màxima intensitat que crema la fluorescència del fluoròfor. Seguidament, agafem imatges al llarg del temps i analitzem la cinètica de recuperació de la fluorescència en l'àrea fotoextingida, la recuperació de la fluorescència dependrà de la mobilitat de la proteïna que estiguem analitzant. Quan més mòbil sigui la proteïna observarem més recuperació de la fluorescència. **(B)** En els experiments de *Fluorescence Loss In Photobleaching* (FLIP), es fotoextingeix repetidament la fluorescència d'una àrea determinada i es mesura contínuament la fluorescència d'una àrea veïna o d'un altre compartiment cel·lular. La cinètica de pèrdua de fluorescència és dependent de la mobilitat de la proteïna dins d'un compartiment cel·lular o entre compartiments. Quan més mobilitat tingui una proteïna, més ràpidament perdrem la fluorescència total (Phair and Misteli, 2001).

Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP)

Els experiments de FLIP s'han dut a terme en un microscopi confocal espectral LEICA TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) acoblat a una cambra climàtica amb control de temperatura i CO₂, i fent servir un làser d'argó (100mW) i un objectiu d'immersió en oli 63x amb obertura numèrica de 1,32. Les imatges de GFP van ser adquirides amb la línia de laser 488 nm (AOTF 3-5%), rangs de detecció d'emissió 500-600 nm i amb una obertura de *pinhole* de 4.94 *Airy units*. Una cèl·lula propera que no era fotoextingida també era adquirida en cada experiment com a control de la pèrdua de fluorescència intrínseca durant l'adquisició d'imatges.

Experiments de FLIP entre el nucleoplasma i el nuclèol: Per als experiments de FLIP entre el nucleoplasma i el nuclèol, s'ha utilitzat el software de Leica *Fly Mode*, que permet captar imatges en les dues direccions de funcionament del làser. S'han fet 1000 cicles de 357ms/cicle a 800 Hz, en un format de 128x512 píxels. Cada cicle s'ha definit de la següent manera: fotoextinció (*bleach*) en una àrea circular de 8,5 μm^2 durant "X fly forward" (la direcció en que avança el làser), utilitzant el làser a màxima potència (100%) i amb un tamany de píxel de 116nm; durant el "X fly back" (retrocediment del làser) es recull la fluorescència utilitzant la intensitat de làser fixada als valors inicials de la imatge (3-5%). La pèrdua de fluorescència s'ha quantificat en totes les imatges adquirides en el "X fly back" en una l'àrea circular definida (8,5 μm^2) dins del nuclèol o en el nucleoplasma. La fluorescència del fons (*background*) s'ha mesurat en un camp a l'atzar de fora de la cèl·lula.

Experiments de FLIP entre el nucli i el citoplasma: Per als experiments de FLIP entre el nucli i el citoplasma, els paràmetres s'han ajustat per tal de poder millorar la fotoextinció i l'estudi de la connexió entre aquests compartiments, donada la gran presència de GFP-p21 en el nucli comparada amb el citoplasma. Els canvis s'han realitzat d'acord a estudis previs publicats d'export nuclear de c-myc (Arabi *et al.*, 2003), que han permès optimitzar la tècnica. Una àrea definida del citoplasma s'amplia 32 vegades amb el zoom (32x; tamany de píxel de 14x14 nm) i es fotoextingeix repetidament durant 1 segon amb la intensitat del làser al 100%. Entre cada un dels polsos de fotoextinció, adquirim una imatge de la cèl·lula amb una intensitat de làser entre 3-5% (zoom 1,7x; tamany de píxel de 273x273 nm). Un cicle complet té una duració de 4 segons i cada experiment té una duració de 14 minuts. Les imatges es van adquirir a 800 Hz amb un format de 512x512. La fluorescència d'una cèl·lula control es va determinar per a cada imatge i va ser comparada amb la fluorescència inicial per tal de determinar si ha hagut pèrdua de fluorescència durant l'adquisició de les imatges.

Anàlisi de les imatges i paràmetres descriptius de la cinètica de fotoextinció

La mitja de la intensitat de fluorescència de les regions d'interès al llarg del temps va ser quantificada fent servir el software Image J (Wayne Rasband, NIH, USA). Per tal d'avaluar i comparar els resultats de diferents cèl·lules i de diferents experiments de fotoextinció, la mitja

de la intensitat de fluorescència en la regió d'interès, en cada un dels punts, va ser corregida per la pèrdua de fluorescència d'una cèl·lula no fotoextingida i va ser normalitzada segons s'ha descrit per Rabut i Ellenberg (Rabut G and Ellenberg J, 2005).

Intensitat de fluorescència

Per a cada temps, la intensitat de fluorescència en la regió d'interès (I_{rel}) es calcula com:

$$I_{rel} = (T_0 * I_t) / (T_t * I_0)$$

On T_0 és la intensitat de fluorescència de la cèl·lula control en el temps 0; T_t és la intensitat de la cèl·lula control en el temps t; I_0 és la intensitat de la fluorescència de la regió d'interès en el temps 0; I_t és la intensitat de la fluorescència de la regió d'interès en el temps t.

Fracció mòbil

La fracció mòbil en la regió d'interès es calcula de la següent manera:

En els experiments de FRAP:

$$M_f = (F_{end} - F_{post}) / (F_0 - F_{post})$$

En els experiments de FLIP:

$$M_f = (F_0 - F_{end}) / F_0$$

On F_{end} és la intensitat mitja de l'àrea d'interès quan ha arribat a l'equilibri (plateu), F_{post} és la intensitat de l'àrea d'interès després de la fotoextinció (en els experiments de FRAP) i F_0 és la intensitat mitja de l'àrea d'interès a temps 0 (abans de la fotoextinció).

Corbes

Per a ajustar les corbes vam fer servir el software Graphpad Prism Software v.3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

Les corbes de FRAP es van ajustar assumint l'equació *one-phase exponential from bottom then increase to top* i les corbes de FLIP es van ajustar assumint l'equació *one-phase exponential decay*.

Temps mig

Es defineix el temps mig, com el temps necessari per al intercanvi de la meitat de la fracció mòbil entre les regions fotoextingida i no fotoextingida.

6 Microscòpia electrònica

6.1 Microscòpia electrònica convencional

Vam fer servir el següent protocol per a la observació estructural mitjançant microscòpia electrònica de les cèl·lules HCT116 control o tractades amb Adr:

- Rentar les plaques (una placa de 100 mm o dues plaques de 60 mm) amb PBS fred

MATERIALS I MÈTODES

- Fixar les cèl·lules amb 5 ml de solució fixadora (3% glutaraldehid en 0,1M tampó cacodilat) durant 30 minuts a temperatura ambient.
- Retirem 4 ml de la solució fixadora i amb el ml restant fem saltar les cèl·lules fixades de la placa utilitzant un *scraper*, recollim en un eppendorf i deixem les cèl·lules durant 4 hores a temperatura ambient o tota la nit a 4°C
- Centrifuguem 5 minuts a 7000 rpm
- Centrifuguem 5 minuts a 12000 rpm
- Rentem els *pellets* tres vegades amb 0,1M tampó cacodilat
- Les cèl·lules del *pellet* es post-fixen 2% tetraòxid d'osmi (OsO₄)
- Deshidratació dels *pellets* utilitzant concentracions creixent d'etanol
- Finalment, les mostres són incloses en resina Araldite i tallades en seccions ultrafines.
- Les seccions ultrafines es tenyeixen amb acetat d'uranil i citrat de plom i s'analitzen amb un microscopi electrònic Philips EM208.

6.2 Immunogold

Per a les immunodeteccions amb partícules d'or de p21^{Cip} o SUMO-1 en les cèl·lules HCT116 control o tractades amb ADR, vam fer servir el següent protocol:

- Rentar les plaques (una placa de 10 cm o dues plaques de 6cm) amb PBS fred
- Fixar les cèl·lules amb 4% paraformaldehid en 0,1M tampó cacodilat, 30 minuts a temperatura ambient
- Fer saltar les cèl·lules fixades de la placa utilitzant un *scraper*, recollir en un eppendorf i centrifugar 1 minut en la microfuga per a fer un *pellet* amb les cèl·lules
- Els *pellets* van ser rentats, tres vegades, amb 0,1M tampó cacodilat
- Deshidratació dels *pellets* utilitzant concentracions creixents de metanol a -20°C
- Finalment, les mostres són incloses en Lowicryl K4M a -20°C, polimeritzades amb radiació UV i tallades en seccions ultra fines.
- Els talls ultrafins es monten en reixetes de níquel
- S'incuben amb glicina 0,1M en PBS durant 15 minuts.
- Es bloquegen amb 5% BSA en PBS durant 1h.
- S'incuben durant 1 hora amb l'anticòs primari: anti-p21 rabbit policlonal (C-19, sc-397, Santa Cruz Biotechnology) o anti-SUMO-1 rabbit policlonal (FL-101, sc-9060, Santa Cruz Biotechnology) diluïts 1:50 en PBS amb 1% BSA i 0,1 M Glicina
- Rentar els talls amb PBS
- Incubar durant 1 hora amb l'anticòs secundari goat anti-rabbit IgG acoblat a partícules d'or de 10 nm (BioCell, UK) diluït 1:50 en PBS amb 1% BSA
- Les reixetes es tenyeixen amb citrat de plom i acetat d'uranil.
- Les mostres s'observen en un microscopi electrònic Philips EM208, a 60kV.

(Com a control, seccions ultrafines es van tractar i processar paral·lelament a les seccions analitzades però sense incubar-les amb els anticossos primaris)

7 Tècniques “*in vitro*”

7.1 Assaigs d'unió de CaM-Sefarosa a proteïna purificada

Per a analitzar la presència de proteïnes d'unió a partir proteïna purificada, hem fet servir una cromatografia d'afinitat fent ús de la resina de CaM-Sefarosa comercial (CNBr-activated Sepharose™-4B, Amersham Pharmacia Biotech). La CaM s'uneix específicament a les seves proteïnes diana (CaMBPs) en presència de Ca^{2+} , cada condició a analitzar es divideix en dos: una part és incubada amb la resina en presència de Ca^{2+} i l'altra en presència del quelant EGTA. Aquest últim és un control intern de l'assaig, ja que la unió serà específica si es troba únicament en la fracció unida a la resina i en presència de Ca^{2+} . Un altre control seria també incubar el lisat amb la Sefarosa sola. L'assaig d'unió a partir proteïna purificada es realitza de la següent manera:

- Purifiquem la proteïna que volem analitzar com hem explicat en l'apartat 3.4. En el nostre cas, vam purificar GST-CTp21WT, GST-CTp21S153A i GST-CTp21S153D.
- Incubem la proteïna (1-10µg) en tampó de “*pull-down*” (TPD) que conté: 50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% Tritò X-100.
- Dividir la proteïna en dos parts iguals (d'uns 20µl cada una) i afegir-les a dos tubs de 1,5 ml que contenen 20 µl de resina CaM-Sepharosa (1:1, vol/vol) prèviament incubada amb 2% BSA durant 30 minuts i rentada amb TPD. Un dels tubs conté 0,1 mM CaCl_2 i l'altre conté 1 mM EGTA.
- Incubar 2 hores a 4°C en rotació.
- Passat aquest temps, centrifuguem la resina, recollim 25 µl de fracció no unida (*not bound*) i la fracció unida la rentem 4 vegades amb TPD que conté 0,1 mM de CaCl_2 o EGTA a 1 mM depenent de la condició.
- Afegir 30 µl de tampó de mostra 2x a la fracció unida per tal d'eluir les proteïnes.
- Les fraccions unides i la part proporcional de fracció no unida (*not bound*) o de fracció inicial (*Input*) són sotmeses a una electroforesi SDS-PAGE i analitzades amb una tinció de blau *Coomassie*.

7.2 Assaigs d'unió de pèptids-Sefarosa a CaM purificada

En primer lloc vam demanar la síntesi dels següents pèptids de p21^{Cip1}: WTp21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ i S153Dp21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴, a la unitat de síntesi de pèptids de la Universitat de Barcelona i vam immobilitzar els pèptids a la Sefarosa (BrCN-activated-Sepharose®-4B; Pharmacia-Biotech) seguint el procediment indicat pel fabricant. Per a analitzar la unió de la CaM a els pèptids

sintètics de p21^{Cip1} vam purificar CaM recombinant humana tal i com hem descrit en l'apartat 3.4.

L'assaig d'unió entre els pèptids-Sefarosa i la CaM es realitza de manera semblant al que acabem d'explicar en el punt 7.1 amb algunes modificacions:

- Preparem tants tubs eppendorf com condicions que vulguem estudiar amb 20 µl de pèptid-Sefarosa. Igual que en l'apartat anterior, incubarem cada condició per duplicat, un dels tubs conté 0,1 mM CaCl₂ i l'altre conté 1 mM EGTA.
- Rentem dues vegades la resina amb 1ml de tampó de "pull-down" (TPD) que conté: 50 mM Tris-HCl pH 7.4; 400 mM NaCl; 1% Tritò X-100.
- Diluïm la CaM (1-10µg) en tampó de TPD fins a obtenir-ne un volum de 20µl per condició experimental.
- Incubem els pèptids-Sepharosa amb la CaM (1:1). Preparem els tubs per duplicat ja que un dels tubs conté 0,1 mM CaCl₂ i l'altre conté 1 mM EGTA.
- Incubar 2 hores a 4°C en rotació.
- Passat aquest temps, centrifuguem la resina, recollim 25 µl de fracció no unida (*not bound*) i la fracció unida la rentem 4 vegades amb TPD que conté 0,1 mM de CaCl₂ o EGTA a 1 mM depenent de la condició.
- Afegir 30 µl de tampó de mostra 2x a la fracció unida per tal d'eluir les proteïnes.
- Les fraccions unides i la part proporcional de fracció no unida (*not bound*) són sotmeses a una electroforesi SDS-PAGE i analitzades amb una tinció de blau *Coomassie*.

7.3 BIAcore

Per tal de determinar si dues proteïnes interaccionen directament hem fet servir un biosensor anomenat BIAcore T100 (Biomolecular Interaction Analysis). Aquest instrument utilitza el fenomen òptic de la ressonància del plasmó en superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) per a monitoritzar les interaccions entre dues molècules.

En els nostres experiments hem unit i immobilitzat la proteïna PCNA recombinant produïda en *E.coli* a un xip sensor tipus CM5, que conté una matriu de dextrans carboximetilats. La unió la vam fer pel mètode d'amines.

Proteïna GST-CTp21WT (aminoàcids 91-164) o GST-CTp21S153D (aminoàcids 91-164) van ser diluïdes a diferents concentracions en tampó BIAcore (HBS-EP) que conté 0,01 M Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3mM EDTA. Cada mostra es va injectar de manera independent sobre el xip de PCNA a una velocitat de 15 µl/min durant 3 minuts. La regeneració de la matriu es va portar a terme amb una solució 0,1% (pes/volum) SDS. Les interaccions entre les proteïnes i el PCNA van ser detectades i presentades en format sensograma on es mostren les

unitats de ressonància al llarg del temps. Les cinètiques d'associació entre les proteïnes es van calcular amb el software BIAevaluation (versió 3.0.2.; Amersham Pharmacia Biotech).

8 Tècniques “*in vivo*”

8.1 Assaig de viabilitat: MTS

Els assaigs de viabilitat MTS són una forma colorimètrica de determinar la viabilitat de les cèl·lules en condicions determinades de proliferació o citotoxicitat. La solució comercial (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent, Promega) conté el compost MTS en un solvent en el que és estable. El tetrazolium MTS és reduït per les cèl·lules donant lloc a un compost colorimètric soluble en el medi de cultiu. Aquesta reducció del compost és produïda per les deshidrogenases de les cèl·lules metabòlicament vives. Els assaigs es realitzen afegint aquest compost al medi i s'incuba durant 1-4 hores i passat aquest temps es llegeix a una absorbància de 490 nm en un lector colorimètric de plaques de Elisa.

- Les cèl·lules HCT116 o HCT116p21-/- es van sembrar amb una pipeta multicanal en plaques de 96 pouets. Van sembrar 4000 cèl·lules/pou, havíem diluït les cèl·lules en el volum necessari per a afegir 100µl de suspensió cel·lular a cada pou.
- 24 hores després de la sembra les cèl·lules es van tractar amb les dosis creixents d'Adr durant 24 hores. La droga l'afegíem a la concentració adient en un volum de 100µl.
- Després del tractament afegim a cada pouet 20 µl de reactiu MTS i l'incubem entre 1 i 2 hores (observem un canvi en el color del medi dels pouets que passen de groc a marró).
- Quan ja hi ha hagut canvi de color, llegim la placa en un lector de plaques a 490 nm.

Per a quantificar la viabilitat cel·lular, es calcula la mitja de cada condició que s'ha fet per triplicat. També es té en compte que en la viabilitat de les cèl·lules control del primer carril i de l'últim carril no tinguin una diferència superior al 20%, ja que si és així no podrem fer servir la placa perquè considerarem que hi ha hagut un error en la sembra de les cèl·lules. Als valors mitjos d'absorbància de cada condició li restarem el valor mig d'absorbància dels pouets que només contenien medi.

8.2 Assaig de formació de clons

Aquest tipus d'assaig és un bon mètode per a mesurar la capacitat de formació de clons i la supervivència de les cèl·lules a un tractament determinat:

MATERIALS I MÈTODES

- Es sembra el mateix número de cèl·lules HCT116 en cada placa de 60mm (cada condició es fa per triplicat); en el nostre cas vam sembrar 500 cèl·lules/placa.
- 24 hores després de la sembra, les cèl·lules es tracten amb la dosi corresponent d'Adr.
- Després de 3 hores de tractament, es retira el medi de les plaques i es renten amb PBS.
- Afegim medi nou a les cèl·lules i les deixem créixer durant dues setmanes sense cap droga en un incubador, assegurant-nos que no s'assequi el medi de les plaques.
- Rentem les plaques amb PBS
- Tenyim els clons de cèl·lules amb una solució de Cristall Violeta (1%) i etanol (70%) durant dos minuts
- Traiem el colorant i rentem les cèl·lules dos vegades amb aigua destil·lada i les deixem secar
- Contem visualment el número de clons en cada una de les plaques (cada clon conté almenys unes 50 cèl·lules per a que el puguem detectar visualment)
- Calculem la supervivència de les cèl·lules en cada una de les condicions

8.3 Detecció de cèl·lules en fase S (BrdU)

Una manera de mesurar la síntesi de DNA *in vivo* (és a dir, si les cèl·lules es troben a la fase S del cicle cel·lular) és la utilització d'un anàleg de les bases nitrogenades del DNA, la 5'-bromo-2' deoxiuridina (BrdU). La incorporació de la BrdU a la doble cadena de DNA es detecta mitjançant una immunocitoquímica amb anticossos específics anti-BrdU. El protocol que hem utilitzat és el següent, adaptat de (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002):

- Fer créixer les cèl·lules sobre cubreobjectes de vidre. Si és necessari, prèviament transfectarem les cèl·lules amb els plàsmids desitjats.
- Afegir BrdU (*stock*: 3 mg/ml), fent una dilució 1:1000 al medi de cultiu de les cèl·lules i deixem incubar de 8 a 10 hores
- Una vegada transcorregut el temps d'incubació, retirem el medi de cultiu i fem dos rentats de les cèl·lules amb PBS
- Fixar les cèl·lules amb 4% paraformaldehid durant 10 minuts a temperatura ambient
- Rentar amb PBS
- Permeabilitzar les cèl·lules amb una solució de Tritó X-100 al 0,2% en PBS durant 5 minuts a temperatura ambient
- Rentar amb PBS
- Bloquejar amb una solució al 0,1% Tween i 1% BSA en PBS durant 20 minuts a temperatura ambient

- Incubar durant 90 minuts amb DNasa (Roche) diluïda 1:1 en PBS. La incubació es realitza sobre una gota en una cambra humida a temperatura ambient
- Incubar amb l'anticòs primari anti-BrdU (Roche; 1170376) durant 1 hora a 37°C en una cambra humida
- Rentar amb PBS
- Incubar amb l'anticòs secundari anti-mouse durant 1 hora a 37°C en cambra humida
- 3 rentats amb PBS
- Muntar els cubreobjectes sobre portaobjectes amb 5 µl de medi de muntatge Mowiol
- Procedir al recompte de cèl·lules marcades amb BrdU mitjançant la observació amb un microscopi de fluorescència

8.4 Determinació de les fases del cicle cel·lular per citometria de flux (FACS)

Per a determinar el percentatge de cèl·lules en cadascuna de les fases del cicle es pot fer una tinció del contingut de DNA amb Iodur de Propidi o amb To-pro3 Iodide, seguit de l'anàlisi per citometria de flux. En el nostre cas, les cèl·lules en cultiu sotmeses a diferents temps de tractament amb ADR i degut a la interferència de l'ADR en el marcatge del DNA amb Iodur de Propidi, hem fet servir una tinció amb To-pro3 Iodide. El procediment és el següent:

- Recollir les cèl·lules en suspensió en tubs separats per a cada condició experimental (no ens interessa perdre les cèl·lules que no estan enganxades, ja que poden ser cèl·lules mortes i si no les tinguéssim en compte estaríem perdent informació).
- Tripsinitzar les cèl·lules en cultiu, neutralitzar la tripsina afegint el mateix volum de medi suplementat i ajuntar les cèl·lules amb les cèl·lules corresponents a la mateixa condició experimental que estaven en suspensió i que hem recollit prèviament.
- Centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm a temperatura ambient.
- Es descarta el sobrenedant i es fan dos rentats amb PBS.
- Centrifugar durant 5 minuts a 1500 rpm.
- Resuspendre el *pellet* de cèl·lules en 0,5ml de PBS + 4,5ml de etanol 70% (fred -20°C). Aquesta solució serveix per a fixar les cèl·lules.
- Conservar a 4°C com a mínim durant 2 hores. En el nostre cas, hem deixat les cèl·lules a 4°C durant tota la nit.
- El dia de la lectura, centrifuguem les cèl·lules per eliminar la solució de fixació i tot seguit fem un rentat amb PBS.
- Resuspenem el *pellet* i l'incubem durant 30 minuts a temperatura ambient amb una solució de marcatge que conté: 0,1% tritó X-100 (Sigma); 0,2 mg/ml RNAasa lliure de DNasa (Sigma) i 2 µM To-pro3 Iodide (Molecular Probes)

El contingut de DNA va ser mesurat per citometria de flux (FACS Canto II BD Analyzer, Becton Dickinson) i analitzat utilitzant el software WinMDi 2.9 per a cada una de les condicions experimentals.

8.5 Viabilitat cel·lular

El mateix numero de cèl·lules es va sembrar en cada una de les plaques. 24 hores després de la sembra, les cèl·lules es van tractar amb les diferents dosis d'Adr i durant els diferents temps. Abans del tractament amb Adr (temps=0h) cada placa p35 conté 300.000 cèl·lules. A més, cada condició experimental la fem per triplicat en cada un dels experiments. Un cop finalitzat el temps de tractament, les cèl·lules es van tripsinitzar i es van tenyir amb Blau tripà. Es van comptar les cèl·lules viables (tenyides de blau) fent servir una cambra de Neubauer i vam representar una gràfica amb el número de cèl·lules en cada tractament

8.6 Activitat transcripcional del nuclèol (*Run-on transcription assay*)

Per a la immunodetecció del RNA naixent, vam incubar les cèl·lules amb polsos de 5'fluorouridina (5'-FU) (Sigma) tal i com ja ha estat descrit anteriorment (Boisvert *et al.*, 2000; Torrano *et al.*, 2006). En resum, 5'-FU es va afegir a una concentració final de 2mM al medi de les cèl·lules en cultiu. Després de 15 minuts, les cèl·lules es van fixar durant 10 minuts a temperatura ambient amb 3,7% de paraformaldehyd en tampó HEPER (30 mM Hepes, 65mM Pipes, 2 mM EGTA i 2mM MgCl₂) suplementat amb 0,5% Tritó X-100. La incorporació de 5'-FU en els RNA naixents es va detectar amb un anticòs anti-UTP halogenada (1:50 en tampó HEPER, anti-BrdU clone BU-33; Sigma) i un anticòs secundari conjugat amb Texas-Red (Jackson Laboratories).

RESULTATS

Antecedents

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori, van demostrar com p21^{Cip1} i CaM s'unien de manera directa i com aquesta interacció era important per a la translocació al nucli de p21^{Cip1} i dels complexos Cdk4-ciclina D (Taulés *et al.*, 1999).

Posteriorment, també en el nostre laboratori, es va observar que la unió entre p21^{Cip1} i CaM tenia lloc a través de l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} (CT-p21) i no en l'extrem amino terminal (NT-p21); a més, únicament es produïa unió entre les dues proteïnes en presència de Ca²⁺ (Figura A) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005). Seguidament, un anàlisi detallat dels pèptids de l'extrem carboxi terminal, va permetre identificar el domini d'unió entre aquestes dues proteïnes situat entre els aminoàcids 140-164 de la proteïna p21^{Cip1} (Figura B) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005).

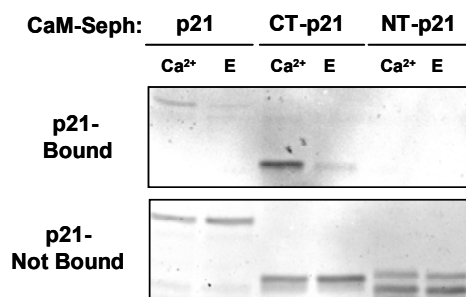


Figura A: Anàlisi del domini d'unió de p21^{Cip1} a CaM. Assaig de pulldown amb CaM-Sepharosa. La proteïna p21 sencera, l'extrem NT-p21 (aa 1-90) i l'extrem CT-p21 (aa 91-164), van ser expressades i fusionades a GST i es va abalitzar la seva capacitat d'unir-se a CaM-Sepharosa en presència de Ca²⁺ o EGTA (E).

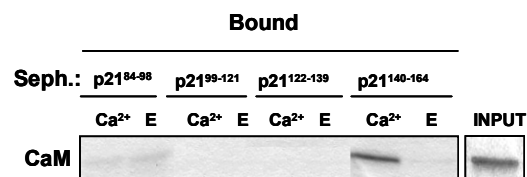


Figura B: Anàlisi del domini d'unió de p21^{Cip1} a CaM. Assaig de pulldown amb pèptids de l'extrem CT de p21 acoblats a Sepharosa. Estudi de la unió de CaM purificada als diferents pèptids en presència de Ca²⁺ o EGTA (E).

Tot i que es desconeix una seqüència consens d'unió a CaM, un dels dominis d'unió a CaM més freqüents en les CaMBPs consisteix en una seqüència d'uns 20 aminoàcids capaç d'adoptar una estructura d'hèlix- α amfipàtica. Resultats previs del nostre grup d'investigació indicaven que la regió carboxi terminal de p21^{Cip1}, entre els aa 145-164, pot adoptar una conformació d'hèlix- α (Esteve *et al.*, 2003) i per tant va esdevenir una regió candidata per a l'estudi de la unió entre aquestes dues proteïnes tal i com ja havíem vist en la figura B. De fet, la creació de dos mutants del pèptid

ANTECEDENTS

p21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ (aa 145-164): en primer lloc, un mutant que impedia la formació de l'estructura d'hèlix- α (pèptid p21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ amb la seqüència ¹⁴⁶PKTPK¹⁵⁰, en comptes de la seqüència normal ¹⁴⁶SMTDF¹⁵⁰) i en segon lloc, un mutant que reduïa la hidrofobicitat (pèptid p21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ amb la seqüència ¹⁵⁷DID¹⁵⁹, en comptes de la seqüència ¹⁵⁷LIF¹⁵⁹), va permetre analitzar la unió de la CaM a aquests dos mutants. Com es mostra en la figura C, els pèptids mutats no poden unir CaM en comparació a la seqüència normal del pèptid p21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ (WT) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005). A més, les mateixes mutacions realitzades en el fragment GST-CT-p21 (aa 91-164) també impedeixen la unió de CT-p21 a CaM (Figura D) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005). Aquests resultats varen permetre arribar a la conclusió que l'estructura d'hèlix- α amfipàtica present en la regió carboxi terminal de p21^{Cip1} és essencial per a la unió entre p21^{Cip1} i CaM.

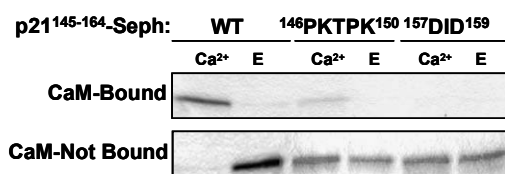


Figura C: Anàlisi del domini d'unió de p21^{Cip1} a CaM. Estudi de la unió de la CaM purificada als pèptids WT o mutats de la regió p21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ acoblats a Sepharosa, en presència de Ca²⁺ o EGTA (E).

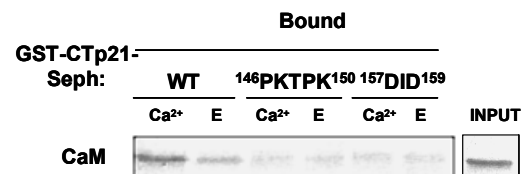


Figura D: Anàlisi del domini d'unió de p21^{Cip1} a CaM. Assaig de pulldown amb els pèptids de l'extrem CT de p21 (mutats o WT) acoblats a Sepharosa. Estudi de la unió de la CaM purificada als diferents pèptids en presència de Ca²⁺ o EGTA (E).

És interessant ressaltar que aquest domini d'interacció entre p21^{Cip1} i CaM està íntimament lligat a la senyal NLS de p21^{Cip1} (aa 140-142) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002), a més, experiments anteriors varen mostrar com la inhibició de la CaM inhibia l'acumulació nuclear de p21^{Cip1} i d'altres proteïnes (Taules *et al.*, 1998; Taules *et al.*, 1999), aquests resultats insinuaven un paper en la regulació del transport nuclear de p21^{Cip1} per part de la CaM. Sorprenentment, i en contra dels resultats esperats, la Dra. Aina Rodríguez va observar com els dos mutants de la estructura d'hèlix- α de p21^{Cip1}: p21¹⁴⁶PKTPK¹⁵⁰ (p21PK2) i p21¹⁵⁷DID¹⁵⁹ (p21DID) continuen localitzant-se al nucli tot i no unir CaM (Rodríguez-Vilarrupla, 2003). Aquestes darreres observacions varen portar a la hipòtesi que la regulació de l'entrada al nucli de la proteïna p21^{Cip1} no es deu exclusivament a la seva unió amb la CaM, sinó que existeix algun altre mecanisme encarregat d'aquesta regulació.

L'increment de treballs sobre la fosforilació de l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} i la possible implicació d'aquestes fosforilacions en la regulació de la localització de p21^{Cip1} (Scott *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Child and Mann, 2006), va fer pensar que potser la CaM estava interferint en la fosforilació de p21^{Cip1} per les cinases PKB (Akt) o PKC. L'anàlisi de la fosforilació *in vitro* de CT-p21 per PKB i PKC, va mostrar com totes dues cinases són capaces de fosforilar GST-CT-p21; però de manera molt interessant, es va observar com la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC s'inhibeix en presència de CaM i Ca²⁺, mentre que la fosforilació per part de PKB no es veu afectada per la CaM (Figura E) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2005).

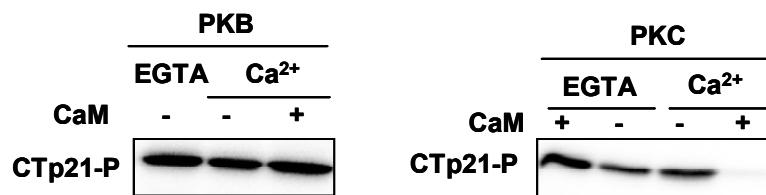


Figura E: Efecte de la CaM en la fosforilació de p21^{Cip1} per PKB i PKC. Assaig de fosforilació *in vitro* per les cinases PKB o PKC, del pèptid GST-CT-p21 purificat en presència (+) o absència (-) d'EGTA, Ca²⁺, o CaM.

Tot seguit, la Dra. Montserrat Jaumot va analitzar la fosforilació *in vivo* de p21^{Cip1} per PKC mitjançant electroforesis bidimensionals i va observar com els patrons de fosforilació de p21^{Cip1} resultaven afectats al sotmetre les cèl·lules a tractaments on s'activava la PKC (TPA) i s'inhibia la CaM (W13). En el cas de les cèl·lules amb la PKC activada i la CaM inhibida (TPA+W13) va poder observar un desplaçament dels *spots* més àcids de p21^{Cip1} indicant que *in vivo* la CaM estaria prevenint la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC (Rodríguez-Vilarrupla, 2003).

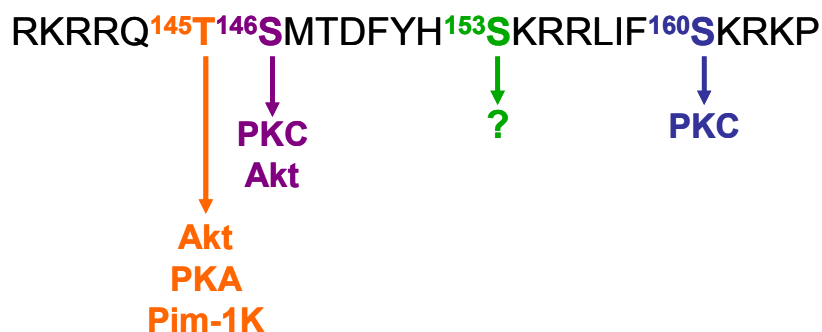
I. Estudi de la funcionalitat de la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC

Com hem vist a l'apartat d'antecedents, estudis previs del nostre grup d'investigació havien demostrat la unió directa entre p21^{Cip1} i CaM i com la unió de la CaM a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} impedia la fosforilació d'aquesta última per part de la proteïna cinasa PKC. Tot i així, encara desconexíem el residu sobre el qual tenia lloc la fosforilació per part de PKC i quins eren els efectes d'aquesta fosforilació sobre la proteïna p21^{Cip1}.

I.1 Estudi de la localització cel·lular dels residus pseudofosforilats

En primer lloc vam voler estudiar quins eren els possibles residus de l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, situats dins del domini d'unió de la CaM, que podrien ser fosforilats per PKC. Tal i com s'ha documentat a la introducció, la proteïna p21^{Cip1} és susceptible a ser fosforilada en diferents residus per part de diverses cinases. A més, és interessant recordar que la major part d'aquests residus fosforilables descrits fins al moment es troben en l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, el mateix extrem on el nostre grup ha descrit anteriorment el domini d'unió a CaM (Taules *et al.*, 1999;Rodriguez-Vilarrupla, 2003;Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2005) i el senyal NLS de localització nuclear de p21^{Cip1} (Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2002).

Basant-nos en l'anàlisi de l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, vam buscar quins eren els possibles residus fosforilables que podrien estar implicats en la regulació de p21^{Cip1} per PKC i CaM. Alguns d'aquests residus ja havien estat descrits per altres proteïnes cinases, com hem explicat en la introducció:



RESULTATS I

A partir d'aquests residus candidats a ser fosforilats per PKC, la Dra. Aina Rodríguez va crear mutants puntuals de la seqüència de la proteïna p21^{Cip1} en diferents vectors d'expressió: pEGFP, DsRED i pGEX-KG_m (Rodríguez-Vilarrupla, 2003). Es van crear dos tipus de mutacions diferents:

- en primer lloc, el residu potencialment fosforilable va ser canviat a un àcid aspàrtic (D), imitant la presència d'una fosforilació real en el residu: T145D, S146D, S153D i S160D. A més, la Dra. Aina Rodríguez també va realitzar dues de les combinacions possibles de mutants dobles: S146DS160D i S153DS160D (Rodríguez-Vilarrupla, 2003). Posteriorment, durant el desenvolupament d'aquesta tesi, es van realitzar dues de les altres combinacions possibles de dobles mutants: T145DS153D i S146DS153D, tal i com s'indica en l'apartat de materials i mètodes.

-en segon lloc, el residu potencialment fosforilable va ser substituït per una alanina (A), que impedia la fosforilació del residu, tot i la presència de la cinasa. Aquest canvi es va efectuar per als següents residus: T145A, S146A, S153A i S160A (Rodríguez-Vilarrupla, 2003).

Un dels efectes més descrits de la fosforilació de p21^{Cip1} per diferents proteïnes cinasa és el canvi de localització cel·lular de la pròpia p21^{Cip1} (Scott *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Com ja hem vist anteriorment, la interacció entre CaM i p21^{Cip1} és important per a la translocació de p21^{Cip1} cap al nucli (Taulés *et al.*, 1999) i, a més, la CaM és capaç d'inhibir la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC.

Amb tot aquest trencaclosques, el primer objectiu que ens vam plantejar va ser analitzar els possibles canvis en la localització cel·lular dels diferents mutants pseudofosforilats. En primer lloc, vam transfectar cèl·lules COS amb plàsmids de p21^{Cip1} fusionats a GFP, 24h després de la transfecció vam fixar les cèl·lules i les vam processar per tal de poder-les observar al microscopi de fluorescència. Els plàsmids transfectats van ser: p21WT (que correspon a la seqüència sencera de la proteïna p21^{Cip1}), p21NLS (que presenta una mutació puntual en la senyal NLS d'entrada al nucli) (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002) i diferents mutants mimètics de fosforilació de la regió carboxi terminal de p21^{Cip1}.

Tal i com es mostra en la figura I.1, l'expressió del plàsmid GFP-p21WT en el microscopi posava de manifest dos patrons d'expressió de p21^{Cip1} diferenciats: algunes cèl·lules presentaven p21^{Cip1} només en el nucli, mentre que en altres cèl·lules p21^{Cip1} es localitzava en el nucli i en el citoplasma; aquest segon grup el vam poder diferenciar novament en dos subgrups: en el primer subgrup podíem observar més expressió de

p21^{Cip1} en el nucli que en el citoplasma i en el segon subgrup els nivells d'expressió entre els dos compartiments eren semblants.

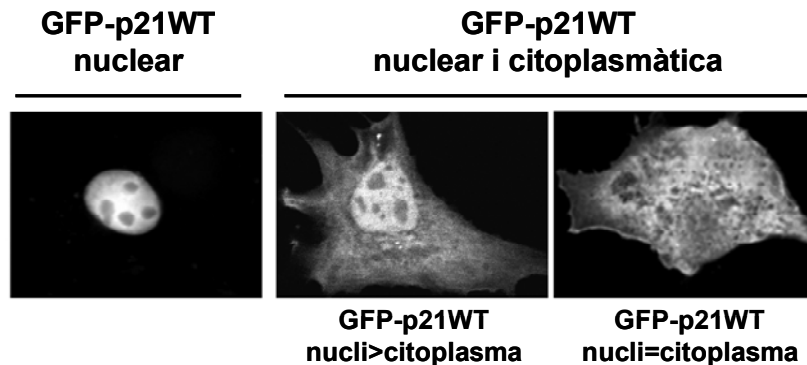


Figura 1.1: Estudi de la localització cel·lular de GFP-p21WT. Exemples d'imatges obtingudes amb un microscopi confocal de la distribució cel·lular de GFP-p21WT transfectat en cèl·lules COS i analitzat 24h després de la transfecció.

Basant-nos en els diferents patrons de distribució subcel·lular que pot adoptar GFP-p21WT, vam quantificar el percentatge de cèl·lules COS transfectades amb cada un dels diferents mutants de GFP-p21 que presentaven únicament localització nuclear de p21^{Cip1} respecte el total de cèl·lules transfectades (Figura 1.2).

La gràfica de la figura 1.2 mostra clarament com GFP-p21WT es localitza preferentment en el nucli, en un $85\% \pm 7,7\%$ de les cèl·lules transfectades; en canvi, GFP-p21NLS rarament es troba exclusivament en el nucli, només en un percentatge molt baix ($2,3\% \pm 2,1\%$) de cèl·lules. En el cas dels mutants de pseudofosforilació, no observem diferències significatives en GFP-p21T145D, GFP-p21S146D ni GFP-p21S160D; només observem diferències significatives en el mutant GFP-p21S153D que presenta una situació intermèdia entre la localització de GFP-p21WT i de GFP-p21NLS. GFP-p21S153D es localitza exclusivament en el nucli en un percentatge menor de cèl·lules ($49\% \pm 7,7\%$) que els altres mutants simples mimètics de fosforilació, indicant una preferència per a la localització citoplasmàtica d'aquest mutant. També vam voler analitzar la distribució intracel·lular dels dobles mutants mimètics de fosforilació; els resultats indiquen que la mutació simultània de T145D i S153D provoca un increment de cèl·lules amb una localització de p21^{Cip1} en el citoplasma. En canvi, la combinació de S153D amb S146D o S160D presenta uns nivells de p21^{Cip1} citoplasmàtica similars als observats per al mutant simple S153D.

RESULTATS I

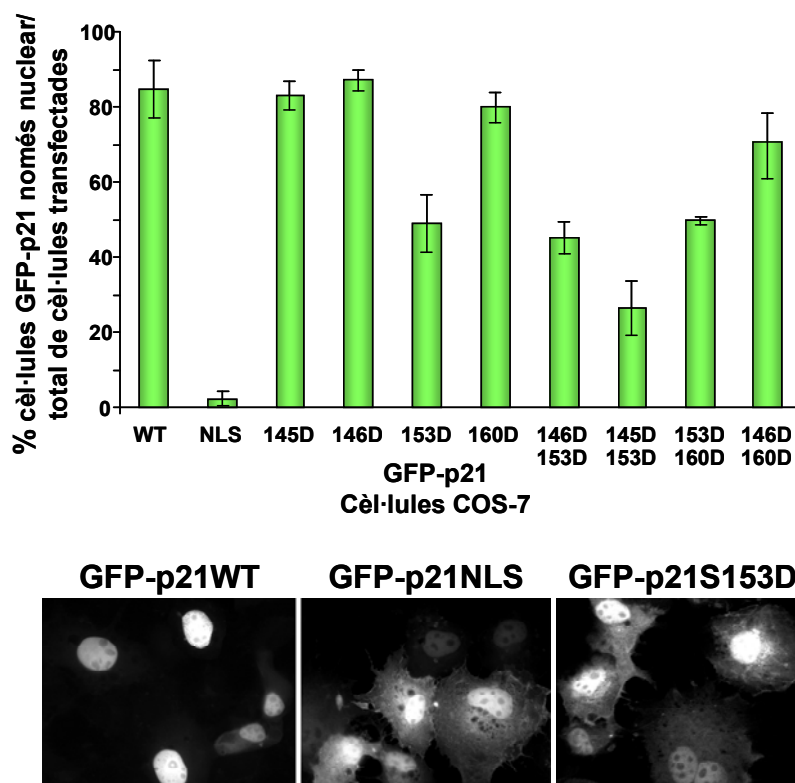


Figura I.2: Estudi de la localització intracel·lular dels diferents mutants de GFP-p21 en cèl·lules COS. (A) Quantificació del percentatge de cèl·lules COS transfectades amb els diferents mutants de GFP-p21 que presenten GFP-p21 exclusivament en el nucli respecte al total de cèl·lules transfectades. Les dades representen la mitja de tres experiments i les barres indiquen les desviacions estàndard. (B) Imatges representatives de la localització cel·lular de cada un dels mutants.

Treballs anteriors havien descrit que, en fibroblasts *HER-2/neu* 3T3 transformats, la fosforilació del residu T145 per la cinasa Akt induïa la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} (Zhou *et al.*, 2001). Com mostra la gràfica de la figura I.2, en el model de cèl·lules COS no vam observar un canvi de localització significatiu en els mutants amb el residu pseudofosforilat T145D, per aquest motiu vam repetir les transfeccions d'alguns dels mutants pseudofosforilats en les cèl·lules NIH 3T3 (Figura I.3).

En les cèl·lules NIH3T3, el percentatge de cèl·lules que presenten GFP-p21WT o GFP-p21NLS només en el nucli, és molt similar als resultats obtinguts en les cèl·lules COS. En el mutant GFP-p21S153D observem una tendència a la localització en el citoplasma, igual que en les cèl·lules COS. En les cèl·lules NIH3T3 i d'acord amb els resultats de Zhou i col·laboradors, el mutant GFP-p21T145D presenta una major localització de p21^{Cip1} en el citoplasma, uns nivells semblants als obtinguts per GFP-p21S153D. A més, el doble mutant GFP-p21T145DS153D presenta molt poques cèl·lules amb presència de p21^{Cip1} només al nucli, indicant clarament una tendència a la localització citoplasmàtica d'aquest mutant.

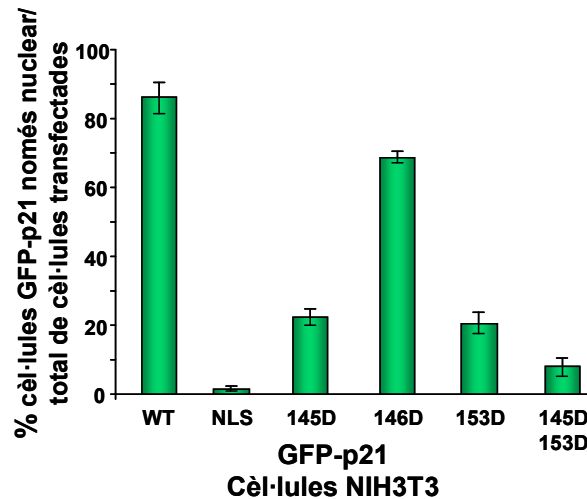


Figura I.3: Estudi de la localització intracel·lular dels diferents mutants de GFP-p21 en cèl·lules NIH3T3. Quantificació del percentatge de cèl·lules NIH3T3 transfectades amb els diferents mutants de GFP-p21 que presenten GFP-p21 exclusivament en el nucli respecte al total de cèl·lules transfectades. Les dades representen la mitja de tres experiments i les barres indiquen les desviacions estàndard.

Així doncs, vam poder observar com la mutació S153D tenia el mateix efecte sobre la localització de p21^{Cip1} en els dos models cel·lulars; aquest fet feia pensar que la pseudofosforilació d'aquest residu tenia un efecte més general que la dels altres residus estudiats. A més, no s'havia descrit cap cinasa responsable de la fosforilació del residu S153, fins al moment; en canvi la fosforilació del residu T145 havia estat àmpliament descrita en altres treballs. Per aquests motius, ens vam centrar en l'estudi del residu S153 durant el nostre treball.

Per corroborar els resultats obtinguts en els experiments anteriors on observàvem que l'efecte de la mutació S153D es reflexava en un augment de la localització de p21^{Cip1} al citoplasma, vam posar a punt un mètode de fraccionament cel·lular que ens permetés obtenir fraccions separades de nucli i citoplasma. Va ser difícil aconseguir fraccions netes dels dos compartiments cel·lulars que reflectissin el patró del plàsmid GFP-p21WT observat en el microscopi, ja que p21^{Cip1} és una proteïna petita que té tendència a sortir pel porus nuclear durant el fraccionament cel·lular i aquest fet emascarava els nostres resultats. Finalment vam aconseguir un mètode de fraccionament cel·lular que ens permetia obtenir fraccions pures dels dos compartiments tal i com s'explica en l'apartat de materials i mètodes.

Vam transfectar cèl·lules COS amb els plàsmids GFP-p21WT, GFP-p21NLS o GFP-p21S153D i 24 hores després de la transfecció vam fraccionar les cèl·lules per a obtenir fraccions de nucli (Nu) i de citoplasma (Cit). Com s'observa en la figura I.4, el mutant S153D es localitza principalment al citoplasma, mostrant una tendència similar

RESULTATS I

a GFP-p21NLS, mentre que GFP-p21WT es localitza majoritàriament en el nucli. Aquest resultat dona suport a la hipòtesi que la fosforilació del residu S153 és crucial per a la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}.

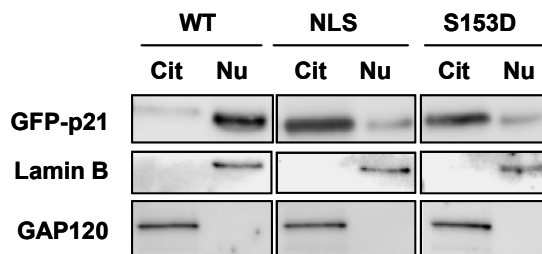


Figura I.4: Fraccionament de cèl·lules COS. Cèl·lules COS van ser transfectades amb GFP-p21WT (WT), GFP-p21NLS (NLS) o GFP-p21S153D (S153D). 24h després de la transfecció es van fraccionar fins a obtenir fraccions nuclears (Nu) i citoplasmàtiques (Cit) com s'indica en els materials i mètodes. Mostres corresponents al mateix percentatge (5% de la fracció total obtinguda) de fracció citoplasmàtica i nuclear van ser processades i sotmeses a electroforesi. La quantitat de GFP-p21 de cada fracció va ser analitzada mitjançant un Western Blot amb anticòs anti-p21. Lamina B i GAP120 van ser utilitzats com a marcadors de puresa de les fraccions nuclears i citoplasmàtiques, respectivament.

Per confirmar l'efecte de la fosforilació de la serina 153 sobre la localització cel·lular de p21^{Cip1}, vam analitzar la localització de p21^{Cip1} fusionada a l'epítot HA. Vam transfectar els plàsmids HA-p21WT, HA-p21NLS i HA-p21S153D en els dos models cel·lulars estudiats (cèl·lules COS i cèl·lules NIH3T3) i vam repetir la quantificació de les cèl·lules que presentaven p21^{Cip1} només en el nucli respecte al total de cèl·lules transfectades per a cada mutant. D'acord amb els resultats obtinguts amb els mutants fusionats a GFP (Figures I.2 i I.3), el percentatge de cèl·lules amb presència de HA-p21 només en el nucli és inferior en el mutant de p21^{Cip1} pseudofosforilat en el residu serina 153 (HA-p21S153D) en comparació a HA-p21WT (Figura I.5).

A més, com es mostra en la figura I.5.B vam poder observar com algunes de les cèl·lules que expressaven HA-p21NLS o HA-p21S153D presentaven molt poca expressió de p21^{Cip1} en el nucli, sent a vegades inferior la localització de p21^{Cip1} en el nucli que en el citoplasma. Aquest patró d'expressió de p21^{Cip1} no el vam poder observar quan les cèl·lules expressaven els mutants fusionats a GFP (Figura I.1), probablement perquè el propi GFP té afinitat per a localitzar-se al nucli i l'expressió de GFP-p21NLS o GFP-p21S153D dóna lloc a una molècula capaç de travessar els porus nuclears simplement per l'afinitat nuclear de GFP.

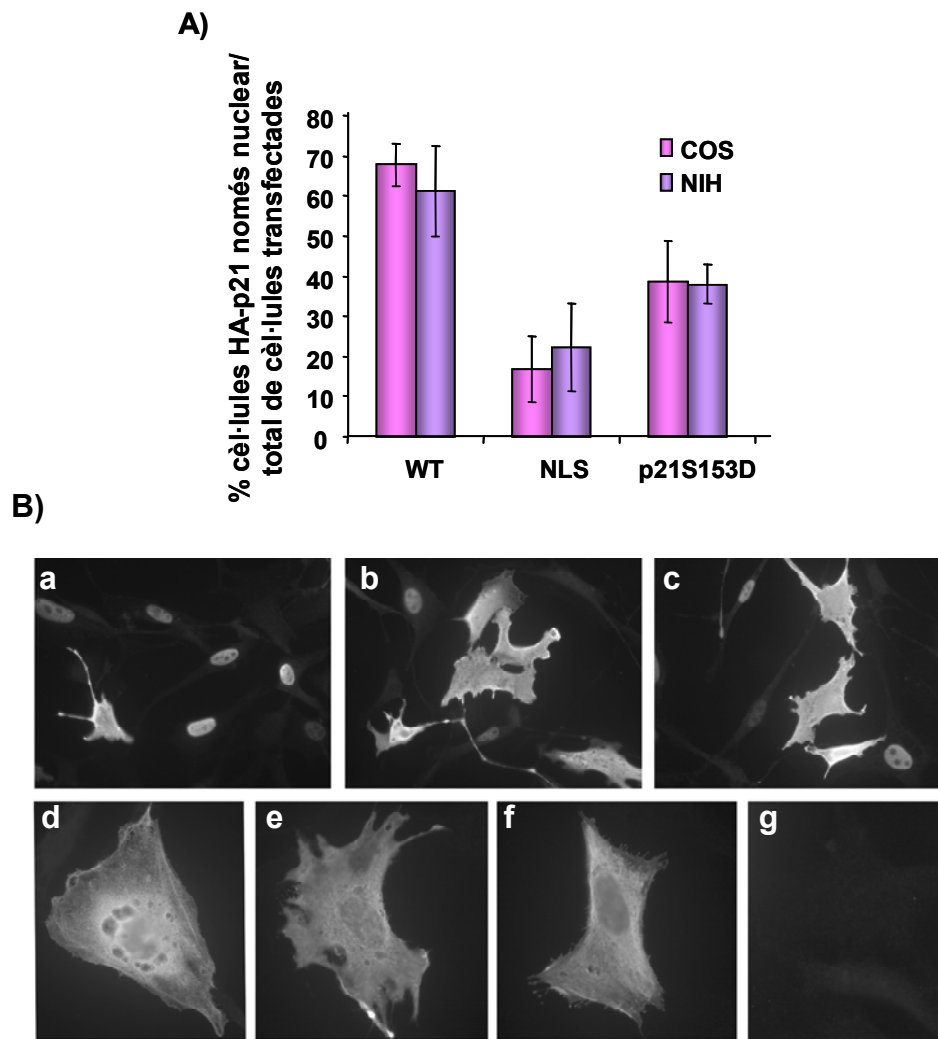


Figura I.5: Estudi de la localització intracel·lular dels diferents mutants de HA-p21 en cèl·lules COS i NIH3T3. Cèl·lules COS o NIH3T3 van ser transfectades amb els plàsmids HA-p21 que s'indiquen a la figura i 24h després de la transfecció van ser analitzades mitjançant una immunocitoquímica per a detectar la localització intracel·lular de la proteïna HA-p21 expressada **(A)** Quantificació del percentatge de cèl·lules COS i NIH3T3 transfectades amb HA-p21WT, HA-p21NLS o HA-p21S153D que presenten HA-p21 exclusivament en el nucli respecte al total de cèl·lules transfectades. Les dades representen la mitja de tres experiments i les barres indiquen les desviacions estàndard. **(B)** Imatges representatives de la localització de HA-p21WT (a), HA-p21NLS (b) i HA-p21S153D (c) en cèl·lules NIH3T3. Imatges a més augment de cèl·lules NIH3T3 transfectades amb HA-p21S153D amb localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} (d, e i f) i d'una cèl·lula no transfectada (g).

I.2 La fosforilació *in vivo* del residu serina 153 de p21^{Cip1} està regulada per CaM i PKC

Com hem explicat a l'apartat d'antecedents, la Dra. Montserrat Jaumot va realitzar electroforesis bidimensionals que li van permetre observar la fosforilació *in vivo* de p21^{Cip1} per PKC i, a més, els patrons obtinguts per les electroforesi

bidimensionals sota diferents estímuls indicaven que la presència de la CaM estava prevenint aquesta fosforilació (Rodríguez-Vilarrupla, 2003).

En primer lloc, i seguint els indicis dels resultats obtinguts amb les transfeccions del mutant pseudofosforilat S135D, vam analitzar si aquest residu estava fosforilat *in vivo*. Vam transfectar cèl·lules COS amb els plàsmids HA-p21WT o HA-p21S153A (on l'aminoàcid serina estava substituït a alanina, donant lloc a un mutant de p21^{Cip1} no fosforilable). Després de 48h de transfecció vam lisar les cèl·lules i les vam processar. Els extractes proteics procedents d'aquestes cèl·lules es van separar mitjançant una electroforesi bidimensional i la mobilitat de HA-p21 es va analitzar amb un Western blot utilitzant un anticòs anti-HA. Com es mostra en la figura I.6, l'electroforesi bidimensional de HA-p21WT mostra un patró de diferents spots que desapareixen si tractem les cèl·lules amb fosfatasa lambda (PPλ), deixant únicament un sol *spot* que correspon al *spot* més bàsic. Aquests resultats indiquen que HA-p21WT es tracta d'una fosfoproteïna *in vivo*. D'altra banda, HA-p21S153A mostra un patró diferent amb un major *spot* bàsic que no variava excessivament després del tractament amb la fosfatasa. Aquests resultats senyalen a la serina 153 com un residu preferent de fosforilació de p21^{Cip1} en les cèl·lules COS.

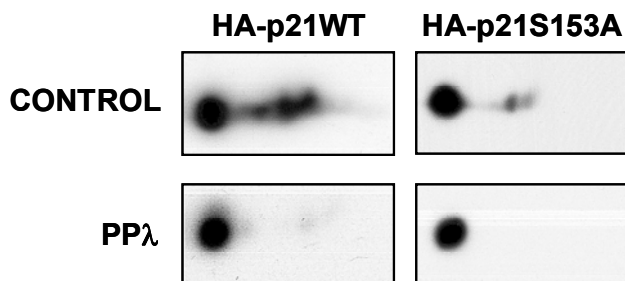


Figura I.6: p21^{Cip1} es fosforila en el residu Ser153 *in vivo*. Cèl·lules COS van ser transfectades amb HA-p21WT o HA-p21S153A durant 48h. Cèl·lules control o tractades amb fosfatasa λ (PPλ) van ser processades i sotmeses a una electroforesi bidimensional (com s'indica a l'apartat de materials i mètodes), seguidament van ser transferides a membranes i analitzades mitjançant Western Blot amb un anticòs anti-HA.

Seguidament, vam voler analitzar si aquesta fosforilació estava regulada per CaM i PKC. Amb aquesta finalitat, vam generar un anticòs que reconeixia específicament la forma fosforilada de p21^{Cip1} en la Ser153. Confirmant els resultats obtinguts en l'electroforesi bidimensional, vam poder detectar p21^{Cip1} fosforilada en el residu Ser153 (fosfo-Ser153 p21) en les cèl·lules COS transfectades amb HA-p21WT. En canvi, no es detectava senyal en les cèl·lules transfectades amb HA-p21S153A, indicant que la substitució de la serina per una alanina impedeix la fosforilació d'aquest residu i indicant també que l'anticòs reconeix específicament la fosforilació de la

Ser153, independentment del fet que p21^{Cip1} pugui estar fosforilada en altres residus (Figura I.7.A).

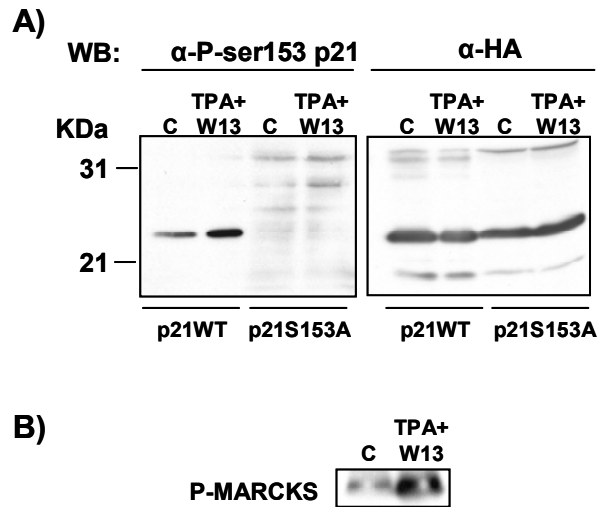


Figura I.7: La fosforilació *in vivo* del residu Ser153 de p21^{Cip1} està regulada per CaM i PKC. Cèl·lules COS van ser transfectades amb HA-p21WT o HA-p21S153A durant 48h. **(A)** Cèl·lules proliferants no tractades (C) o tractades amb TPA (100nM) i W13 (1,5μg/ml) durant 45 minuts (TPA+W13) van ser processades i sotmeses a electroforesi, seguidament van ser transferides a membranes i analitzades mitjançant Western Blot amb un anticòs anti-fosfo-Ser153 (α-P-ser153 p21) o anti-HA (α-HA) com a control d'expressió de HA-p21 i de càrrega, tal i com s'indica a la figura. **(B)** Les mateixes mostres de cèl·lules control (C) i tractades (TPA+W13) van ser analitzades mitjançant Western Blot amb un anticòs anti-fosfo-MARCKs, com a control del correcte funcionament del tractament amb TPA+W13.

Tot seguit vam voler estudiar si l'acció de la CaM o la PKC tenia algun efecte sobre la fosforilació de la Ser153. Després de transfectar les cèl·lules COS amb HA-p21WT o HA-p21S153A, vam tractar les cèl·lules amb TPA un activador de la PKC i amb W13, un inhibidor de la CaM. Després de 45 minuts de tractament amb TPA+W13 vam recollir els extractes cel·lulars, les proteïnes es van resoldre mitjançant una electroforesi seguida de detecció amb l'anticòs fosfo-Ser153 p21. Vam poder observar com després del tractament, augmentava la fosforilació de la Ser153 de p21^{Cip1}, mentre que no vam observar cap variació de la fosforilació d'aquest residu en les cèl·lules transfectades amb HA-p21S153A com era d'esperar. Com a control de càrrega vam carregar la mateixa quantitat de mostra en un altre gel i el vam processar paral·lelament, després vam realitzar una detecció amb un anticòs anti-HA i vam poder comprovar com tots els carrils havien estat carregats de manera equitativa (Figura I.7.A). A més, per a confirmar l'activació de PKC durant el tractament amb TPA vam analitzar la fosforilació d'un altre substrat de PKC: MARCKS (*myristilated alanine-rich C kinase substrate*) pel qual existeixen anticòs comercials que detecten la seva fosforilació. En la figura I.7.B podem veure com, en els mateixos lisats cel·lulars que el

western blot anterior, la fosforilació de MARCKS també augmenta amb el tractament TPA i W13.

I.3 La fosforilació per PKC de p21^{Cip1} en el residu Ser153 indueix la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}

Els resultats obtinguts fins al moment, suggereixen que la fosforilació per PKC del residu Ser153 de la p21^{Cip1} pot ser important per a regular la localització intracel·lular de la pròpia p21^{Cip1}. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, vam transfectar cèl·lules COS amb HA-p21WT o HA-p21S153A i vam analitzar les distribucions intracel·lulars d'aquestes proteïnes en cèl·lules control i en cèl·lules tractades durant 45 minuts amb TPA+W13. 24 hores després de la transfecció, vam fixar les cèl·lules i vam realitzar una immunocitoquímica amb un anticòs anti-HA. Com es pot observar en la figura I.8, el tractament de les cèl·lules amb TPA+W13 provoca una disminució en un 40% de les cèl·lules que expressen HA-p21WT només en el nucli respecte a les cèl·lules no tractades, indicant que el tractament afavoreix la localització de p21^{Cip1} en el citoplasma. A més, aquest tractament no afecta significativament a la distribució intracel·lular de la proteïna HA-p21S153A. Aquests resultats indiquen que la fosforilació del residu serina 153 és crítica per a la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} en resposta a l'activació de la PKC acompanyada de la inhibició de la CaM.

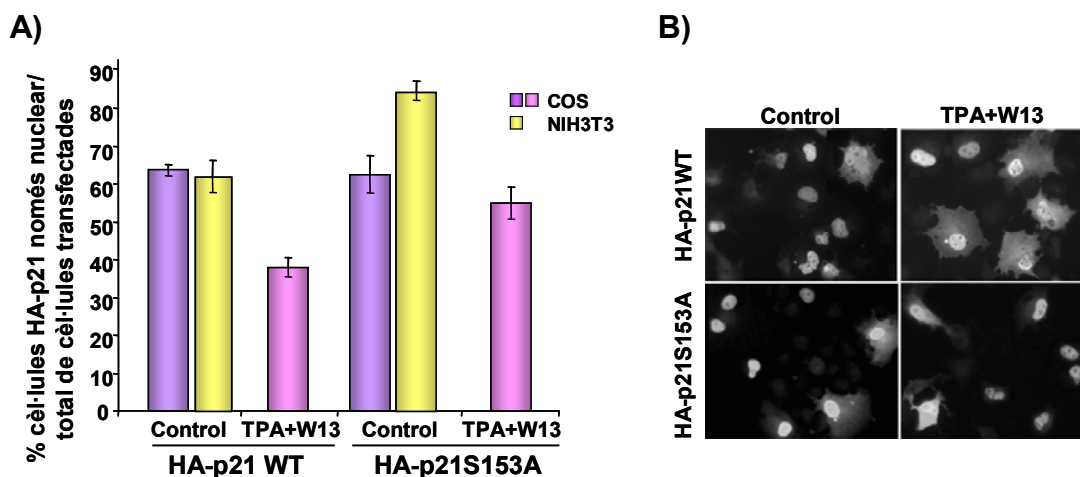


Figura I.8: Efecte de la inhibició de la CaM i l'activació de la PKC sobre la localització cel·lular de HA-p21. Cèl·lules COS van ser transfectades amb HA-p21WT o HA-p21S153A i després de 24 h van ser tractades amb TPA (100nM) i W13 (1,5µg/ml) durant 45 minuts (TPA+W13) o bé es van processar sense tractar (Control). Seguidament es van fixar les cèl·lules i van ser sotmeses a una immunocitoquímica amb un anticòs anti-HA com s'indica als materials i mètodes. **(A)** Les cèl·lules amb expressió de HA-p21 únicament nuclear van ser contades i quantificades. El gràfic mostra la mitja de tres experiments diferents i les barres representen la desviació estàndard. **(B)** Imatges representatives de cada una de les condicions.

Quan la proteïna HA-p21S153A era expressada en cèl·lules NIH3T3 observàvem un major % de cèl·lules amb localització nuclear d'aquesta proteïna (85%) que en aquelles cèl·lules que expressaven HA-p21WT (62%), indicant que en cèl·lules NIH3T3 proliferants la fosforilació de la Ser153 de p21^{Cip1} és rellevant. En les cèl·lules NIH3T3, igual que havíem observat en les cèl·lules COS, la localització de HA-p21S153A no es veia afectada pel tractament amb TPA i W13.

I.4 La pseudofosforilació del residu Ser153 de p21^{Cip1} inhibeix la unió entre p21^{Cip1} i CaM

Seguidament, vam voler analitzar si la fosforilació de p21^{Cip1} en la serina 153 afectava a la interacció entre p21^{Cip1} i CaM. D'una banda vam analitzar, mitjançant assajos de pulldown, l'associació de la CaM amb el pèptid de p21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ corresponent a la seqüència WT del domini d'unió a CaM, o amb el mateix pèptid mutat en posició S153 (on en comptes d'una serina hi trobem un àcid aspàrtic, mimetitzant l'estat de fosforilació en aquest residu) units a sefarosa (Figura I.9.A). D'altra banda també vam analitzar, mitjançant pulldown, l'associació de la CaM al domini carboxi terminal de p21^{Cip1} expressat com a proteïna de fusió a GST (GST-CTp21WT) per a poder-la comparar amb l'associació de la CaM a dos variants mutades d'aquest domini carboxi terminal (GST-CTp21S153D i GST-CTp21S153A) (Figura I.9.B). En tots dos experiments, la pseudofosforilació de la Ser153 inhibeix la unió de la CaM al domini d'unió de p21^{Cip1} descrit anteriorment.

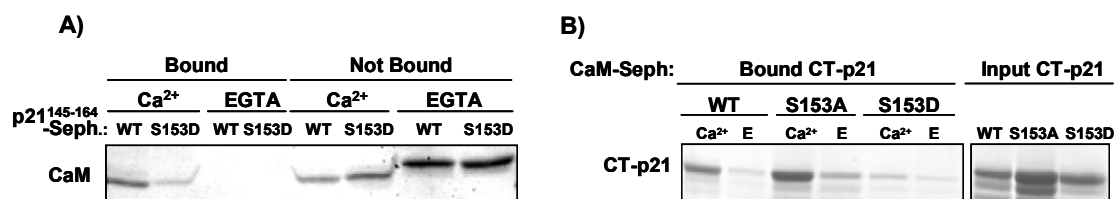


Figura I.9: Anàlisi de la unió de la CaM a p21WT, p21S153D i p21S153A. (A) Els pèptids WTp21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ o S153Dp21¹⁴⁵⁻¹⁶⁴ van ser conjugats a boles de Sefarosa. La unió de la CaM a aquests pèptids en presència de Ca²⁺ o d'EGTA (E), va ser analitzada mitjançant un assaig de pulldown com s'indica a l'apartat de materials i mètodes. Les fraccions totals de CaM unida (bound) o no unida (not bound) es van sotmetre a electroforesi seguida d'una tinció amb blau *coomassie*. (B) CT-p21WT, CT-p21S153A i CT-p21S153D van ser expressades com a proteïnes de fusió a GST i la seva capacitat d'unió a CaM-Sefarose va ser analitzada en presència de Ca²⁺ o d'EGTA (E). La fracció total unida (bound CT-p21) i mostres amb la mateixa quantitat de p21 que la utilitzada per a l'assaig de pulldown (input CT-p21), es van sotmetre a electroforesi seguida d'una tinció amb blau *coomassie*.

I.5 La unió de la CaM a la p21^{Cip1} no és essencial per a la translocació nuclear de p21^{Cip1}

A continuació, vam analitzar si la localització citoplasmàtica de p21^{S153D} era deguda exclusivament a la seva incapacitat d'unir CaM. Per a descartar aquesta possibilitat, vam estudiar la distribució cel·lular del mutant de p21^{157DID¹⁵⁹} que, com hem vist en els antecedents (Figura D), no pot unir CaM. A més, la Dra. Aina Rodríguez va comprovar mitjançant un assaig de fosforilació *in vitro*, que GST-CTp21^{157DID¹⁵⁹} no es podia fosforilar per PKC (Rodríguez-Vilarrupla, 2003).

Vam transfectar cèl·lules COS amb els plàsmids HA-p21WT o HA-p21^{157DID¹⁵⁹} i vam analitzar la distribució cel·lular d'aquestes proteïnes de fusió mitjançant una immunocitoquímica amb un anticòs anti-HA. Com es pot observar en la figura I.10, la proporció de cèl·lules control amb una distribució només nuclear de p21WT o p21^{157DID¹⁵⁹}, era similar en els dos casos, indicant que la interacció de p21^{Cip1} amb la CaM no és essencial, per si sola, en la inducció de la localització nuclear de p21^{Cip1}, ja que d'una banda p21^{157DID¹⁵⁹} no pot unir CaM i en canvi es localitza en el nucli. A més, vam repetir l'experiment en cèl·lules transfectades amb els mateixos plàsmids i tractades amb TPA i W13 durant 45 minuts. En aquest cas, vam poder observar un augment de la distribució citoplasmàtica de HA-p21WT en les cèl·lules tractades amb TPA i W13 respecte a les cèl·lules control. D'altra banda, no vam observar diferències en la localització cel·lular de HA-p21^{157DID¹⁵⁹} entre les cèl·lules tractades i les cèl·lules control. Aquest resultat ens indica que quan p21^{Cip1} (p21^{157DID¹⁵⁹}) no es pot fosforilar per PKC, la seva distribució cel·lular no es veu afectada pel tractament amb TPA i W13.

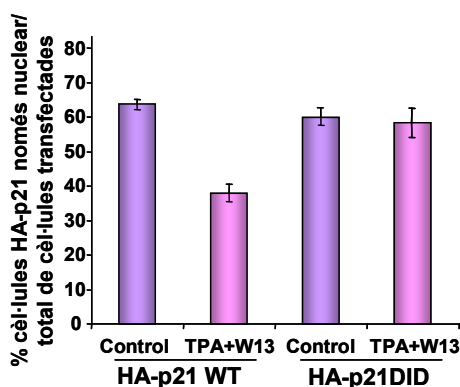


Figura I.10: El mutant p21^{157DID¹⁵⁹} que no pot unir CaM i no es pot fosforilar per PKC, té una distribució nuclear. Cèl·lules COS van ser transfectades amb els plàsmids HA-p21WT o HA-p21^{157DID¹⁵⁹} i 24h després de la transfecció van ser tractades amb TPA (100nM) i W13 (1,5µg/ml) durant 45 minuts (TPA+W13) o bé es van processar sense tractar (Control). Seguidament es van fixar les cèl·lules i van ser sotmeses a una immunocitoquímica amb un anticòs anti-HA. Les cèl·lules amb expressió de HA-p21 nuclear van ser contades i quantificades. El gràfic mostra la mitja de tres experiments diferents i les barres representen la desviació estàndard.

I.6 Estudi de la funcionalitat de la p21^{Cip1} fosforilada en la Ser153

Com ja hem comentat en la introducció d'aquesta tesi, diferents treballs documenten com la p21^{Cip1} és capaç de modular un gran nombre de funcions depenent de la seva localització cel·lular i de les proteïnes amb les que s'associa. Mentre que la p21^{Cip1} nuclear és la encarregada d'inhibir la síntesi del DNA i d'aturar el cicle cel·lular, la p21^{Cip1} citoplasmàtica s'ha relacionat amb la disrupció de les fibres d'estrès i amb la regulació de l'apoptosi (revisat a (Dotto, 2000;Coqueret, 2003;Besson *et al.*, 2008)).

I.6.1 Disrupció de les fibres d'estrès

En primer lloc vam analitzar si quan HA-p21S153D o HA-p21S145D es localitzaven en el citoplasma, mantenien la mateixa eficiència en la inhibició de les fibres d'estrès que HA-p21WT o HA-p21NLS citoplasmàtiques. Com s'havia descrit anteriorment, la p21^{Cip1} citoplasmàtica pot unir-se i inhibir a la cinasa ROCK1 responsable del manteniment del citoesquelet d'actina i de la formació de les fibres d'estrès (Tanaka *et al.*, 2002;Lee and Helfman, 2004).

Amb aquest objectiu, vam transfectar cèl·lules NIH3T3 amb les diferents construccions de HA-p21 i seguidament vam realitzar una immunocitoquímica anti-HA juntament amb una detecció de l'actina mitjançant el marcador fal·loïdina (*phalloidin*). Vam quantificar el percentatge de cèl·lules que presentaven fibres d'estrès en el seu citoplasma per a cada un dels mutants de p21^{Cip1} i també per a les cèl·lules no transfectades. Com podem veure en la gràfica de la Figura I.11.A, el 68% de les cèl·lules no transfectades presenten fibres d'estrès en el citoplasma. En la quantificació dels mutants de p21^{Cip1}, vam diferenciar les cèl·lules que presentaven una expressió de p21^{Cip1} nuclear o les cèl·lules amb expressió de p21^{Cip1} nuclear i citoplasmàtica. Com es mostra en la figura I.11.A i B, quan HA-p21 (WT, NLS, S153D o T145D) es localitza en el citoplasma és capaç de disrupcionar les fibres d'estrès independentment de quin sigui el mutant de p21^{Cip1}, tots ells ho fan amb la mateixa eficiència i només un percentatge baix de les cèl·lules que presenten HA-p21 en el citoplasma presenten una formació de les fibres d'estrès correcta. D'altra banda, si HA-p21 s'expressa únicament en el nucli, les fibres d'estrès no es veuen afectades i el percentatge de cèl·lules amb fibres d'estrès és similar al de les cèl·lules no transfectades ; tot i així, cal destacar que aquest patró de HA-p21 en el nucli és el majoritari per a HA-p21WT (figura I.5.A), però és minoritari en el cas dels mutants HA-p21NLS, HA-p21S153D i HA-p21T145D. Aquests resultats ens indiquen que sempre

que la p21^{Cip1} es localitza en el citoplasma és capaç d'inhibir la formació de fibres d'estrès, independentment de la fosforilació de la Ser153 o de la Thr145.

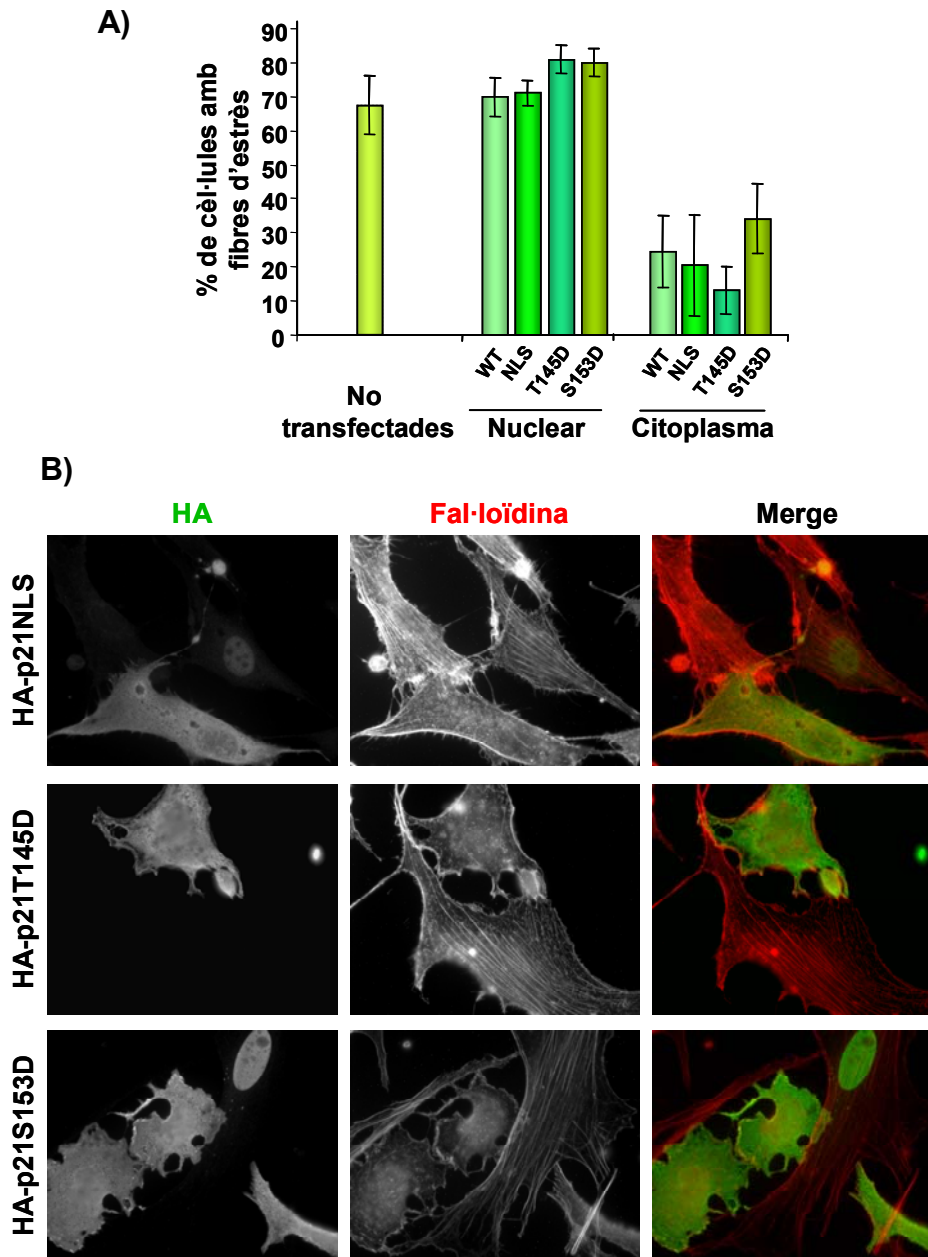


Figura I.11: Efecte de l'expressió de HA-p21S135D en la formació de les fibres d'estrès. Cèl·lules NIH3T3 van ser transfectades amb els plàsmids HA-p21 que s'indiquen a la figura i 24h després de la transfecció van ser analitzades mitjançant una immunocitoquímica amb un anticòs anti-HA, per a detectar l'expressió de HA-p21, i amb una tinció de fal·loïdina (Phalloidin-Alexa), per a detectar la presència de les fibres d'estrès. **(A)** Representació gràfica del percentatge de cèl·lules transfectades amb els diferents mutants de HA-p21, amb expressió de p21^{Cip1} al nucli o al citoplasma, que presenten fibres d'estrès. La gràfica representa la mitja de tres experiments diferents i les barres corresponen a la desviació estàndard. **(B)** Imatges representatives obtingues amb un microscopi confocal de la disrupció de les fibres d'estrès en aquelles cèl·lules que presenten p21^{Cip1} citoplasmàtica (p21NLS, p21T145D, p21S153D), a diferència de les que presenten p21^{Cip1} exclusivament nuclear.

I.6.2 Inhibició de la síntesi de DNA

A continuació, vam voler analitzar l'efecte de la fosforilació en altres funcions de p21^{Cip1}. Vam estudiar si la capacitat de p21^{Cip1} d'unir a PCNA es veia afectada per la fosforilació en la Ser153 ja que aquest residu està dins del domini d'unió a PCNA. Per a dur a terme aquest anàlisi, vam realitzar un assaig de BIAcore que permet analitzar l'afinitat entre dues proteïnes, en el nostre cas entre GST-CTp21WT i PCNA o bé entre GST-CTp21S153D i PCNA. L'anàlisi de BIAcore va indicar que tant p21WT com p21S153D tenien la mateixa afinitat per a unir-se al PCNA: 1.3 μ M i 1.4 μ M respectivament (Figura I.12).

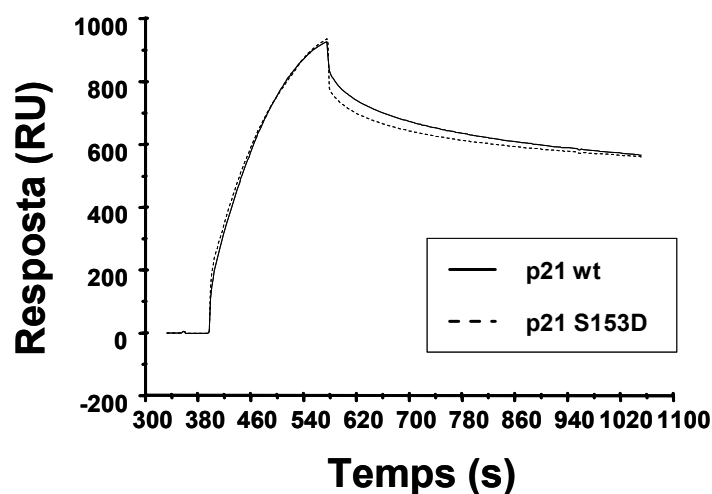


Figura I.12: Efecte de pseudofosforilació del residu Ser153 de p21^{Cip1} en la interacció amb el PCNA. Estudi de la capacitat d'unió de CT-p21WT i CT-p21S153D purificats a PCNA mitjançant un anàlisi amb BIAcore com s'explica en els materials i mètodes. La figura mostra les corbes d'afinitat obtingues amb 2 μ M de CT-p21. RU, unitats de resonància.

Un cop havíem comprovat l'afinitat del mutant pseudofosforilat p21S153D per a unir el PCNA, ens vam preguntar si p21S153D tenia la mateixa capacitat d'inhibir la síntesi de DNA que p21WT, quan es localitzava en el nucli. Vam transfectar cèl·lules COS amb GFP-control, GFP-p21WT i GFP-p21S153D i vam mesurar la capacitat que tenien les cèl·lules transfectades d'incorporar BrdU, quantificant únicament aquelles cèl·lules que presentaven GFP-p21 en el nucli. Com es mostra en la gràfica de la figura I.13.A, un 65% de les cèl·lules que expressaven GFP-control presenten incorporació de BrdU; en canvi, només un 18% de les cèl·lules que expressen GFP-p21WT o GFP-p21S153D en el nucli són BrdU positives indicant que la presència en el nucli d'aquestes proteïnes inhibeix la síntesi de DNA. A més, no s'observen diferències entre GFP-p21WT i GFP-p21S153D indicant que la pseudofosforilació de p21^{Cip1} en el residu Ser153 no afecta a la inhibició de la síntesi del DNA.

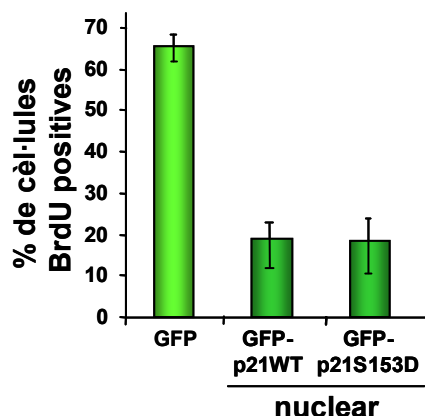


Figura I.13: Efecte de pseudofosforilació del residu Ser153 de p21^{Cip1} en la inhibició de la síntesi del DNA. Cèl·lules COS van ser transfectades amb GFP-control (GFP), GFP-p21WT o GFP-p21S153D i després de 24h van ser incubades amb BrdU durant 10h. Seguidament es va detectar la incorporació de BrdU mitjançant una immunocitoquímica anti-BrdU. La gràfica mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules BrdU positives del total de cèl·lules transfectades i amb localització nuclear de GFP-p21 per a cada un dels mutants. La gràfica representa la mitja de tres experiments diferents i les barres corresponen a la desviació estàndard.

I.7 Estudi de la funcionalitat de la p21^{Cip1} citoplasmàtica: paper en l'apoptosi

Una de les funcions més estudiades de p21^{Cip1} en el citoplasma és el paper d'aquesta proteïna en la regulació de l'apoptosi. Aquesta funció de p21^{Cip1} no està lliure de controvèrsia ja que d'una banda nombrosos estudis descriuen un paper de p21^{Cip1} com a inhibidora de l'apoptosi, mentre que d'altra banda un gran nombre d'estudis situen a aquesta proteïna com a inductora de l'apoptosi (revisat a (Gartel and Tyner, 2002;Liu *et al.*, 2003)). Tot i així, cal destacar que una particularitat d'aquests estudis és que s'han realitzat en models cel·lulars molt diversos i amb diferents estímuls inductors d'apoptosi, és per això que la conclusió més adient que en podríem treure és que el paper de p21^{Cip1} sobre l'apoptosi depèn del context cel·lular específic en cada un dels estudis.

En primer lloc, ens vam preguntar si podríem estudiar el paper de p21^{Cip1} sobre l'apoptosi amb les eines disponibles al laboratori i en segon lloc, si la fosforilació del residu S153 de p21^{Cip1} tenia algun tipus d'efecte sobre aquesta funció de p21^{Cip1}.

I.7.1 Estudi de l'apoptosi causada per Adriamicina en cèl·lules HCT116 i HCT116 p21^{-/-}

Per a estudiar el paper de p21^{Cip1} en l'apoptosi vam escollir les cèl·lules HCT116 de càncer de colon humà com a model cel·lular ja que en el laboratori disposàvem de la línia d'HCT116 deficient en p21^{Cip1} (HCT116 p21^{-/-}). Com a agent causant de dany cel·lular ens vam centrar en la Adriamicina (Adr), també anomenada Doxorubicina. L'Adr és un compost antineoplàsic de la família de les antraciclina i de la qual s'han descrit diferents efectes sobre la cèl·lula; un dels mecanismes d'acció principal de l'Adr és que s'intercala en el DNA tot inhibint l'acció de la topoisomerasa II i induint talls en la doble cadena de DNA (Burden and Osheroff, 1998).

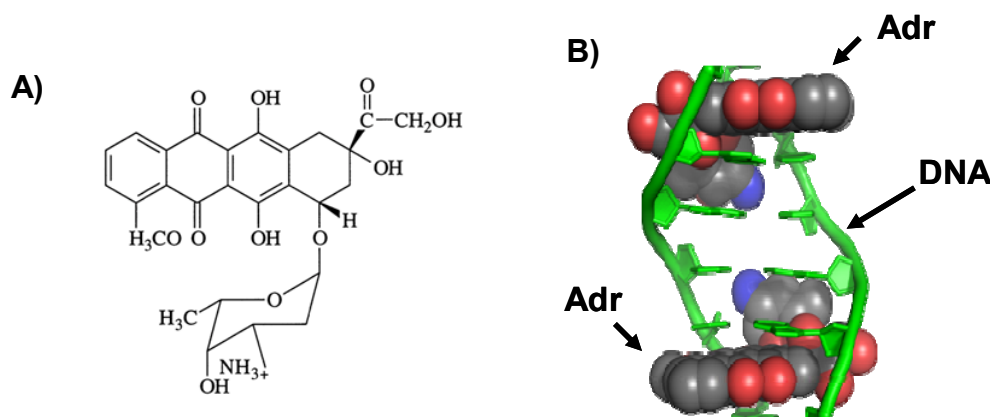


Figura I.14: (A) Estructura d'una molècula d'Adriamicina (Zeman *et al.*, 1998) (B) Esquema de dos molècules d'Adriamicina intercalades en una doble hèlix de DNA.

La DNA topoisomerasa II és l'enzim encarregat de desenrotllar la doble hèlix de DNA per tal de permetre la seva transcripció i replicació. La DNA topoisomerasa II catalitza el tall de l'enllaç fosfodiéster, permetent que les cadenes estiguin relaxades i torna a unir l'enllaç donant l'estructura necessària per a la transcripció de les cadenes de DNA durant el cicle cel·lular. En els darrers anys, les topoisomerases (I i II) han agafat importància en els tractaments de quimioteràpia per al càncer i per aquest motiu s'ha desenvolupat un ampli ventall d'inhibidors de les topoisomerases, com per exemple l'Adriamicina. Els inhibidors de topoisomerases, bloquegen l'acció d'aquest enzim generant talls de cadena simples o dobles que tenen efectes sobre la integritat del genoma i que per tant activaran la resposta cel·lular enfront al dany al DNA provocant una parada del cicle cel·lular o si el dany es major i irreparable, portaran la cèl·lula cap a un programa de mort cel·lular programada, l'apoptosi. La Adr s'intercala en el DNA bicatenari de manera que inhibeix tant la transcripció com la replicació del DNA i estabilitza el complex format per la topoisomerasa II i el DNA després d'haver tallat la doble hèlix, d'aquesta manera l'Adr impedeix que es torni a unir el tall,

provocant una parada en el procés de replicació o transcripció (Burden and Osheroff, 1998; Zeman *et al.*, 1998). En clínica, l'Adr s'utilitza per al tractament de leucèmies, limfomes de Hodgkin's i d'altres tipus de càncer com ara el càncer de mama, d'estómac, d'ovari, de pulmó i mieloma múltiple entre d'altres.

En primer lloc vam voler analitzar si les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} eren més sensibles al tractament amb Adr que les cèl·lules HCT116. Vam realitzar assaigs de viabilitat cel·lular amb la tècnica colorimètrica del MTS on analitzàvem la resposta dels dos tipus cel·lulars davant diferents dosis d'Adr. La senyal generada (la intensitat de color) en cada un dels pous és directament proporcional al nombre de cèl·lules viables (activitat metabòlica) en cada un dels pous (Figura I.15). Com s'observa en la figura, les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} són menys viables que les cèl·lules HCT116, sobretot a concentracions baixes d'Adr. Per exemple, a 0,1 µg/ml d'Adr, les cèl·lules HCT116 presenten un 83,6% de viabilitat mentre que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} només tenen un 59,6% de viabilitat i a 0,5 µg/ml d'Adr, les cèl·lules HCT116 tenen 73,4% de viabilitat en contraposició al 40,1% de les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}.

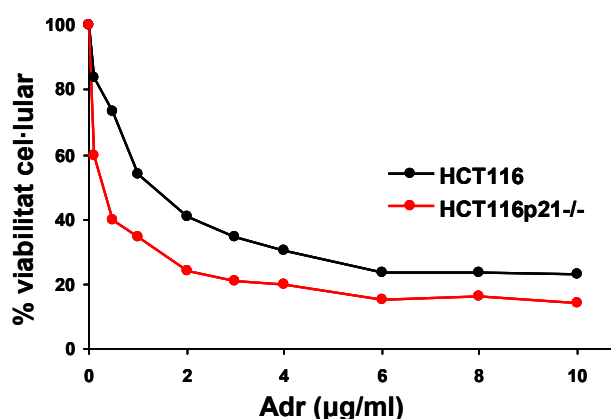


Figura I.15: Assaig de viabilitat cel·lular de cèl·lules HCT116 i HCT116 p21^{-/-} tractades amb Adr durant 24h. Vam sembrar el mateix nombre de cèl·lules per a cada condició en cada un dels pous de les plaques de 96 pous, després de 24h vam tractar les cèl·lules amb diferents dosis d'Adr. Passades 24h de tractament, vam afegir el reactiu de MTS que es redueix en presència d'activitat mitocondrial donant lloc a un color blavós que serà llegit per un colorímetre, com s'explica amb més detall a l'apartat de materials i mètodes. Cada punt de la gràfica representa la mitja de dos experiments on s'ha analitzat cada condició per triplicat per tal d'evitar al màxim la variabilitat en el moment de sembrar les cèl·lules.

En segon lloc vam realitzar un assaig de viabilitat cel·lular per formació de focus on analitzàvem la supervivència de les cèl·lules HCT116 i HCT116 p21^{-/-} davant del tractament amb Adr. Com es pot veure en la figura I.16, en tots dos tipus cel·lulars el tractament amb Adr durant 3h afecta a capacitat clonogènica d'aquestes cèl·lules. Cal destacar que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} són més sensibles al tractament ja que com

s'observa en la imatge i en la gràfica, la seva capacitat de formar focus en resposta al tractament amb Adr es veu més afectada que en les cèl·lules HCT116. A més, també és important destacar que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}, proliferen més a poc a poc que les cèl·lules HCT116 ja que com s'observa en la columna control de l'assaig de clons, tot i sembrar el mateix nombre de cèl·lules en els dos tipus cel·lulars, les cèl·lules HCT116 formen un major nombre de clons i més grans que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}, aquest fet podria estar indicant que les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tenen alguna altra mancança a nivell de la regulació del cicle cel·lular.

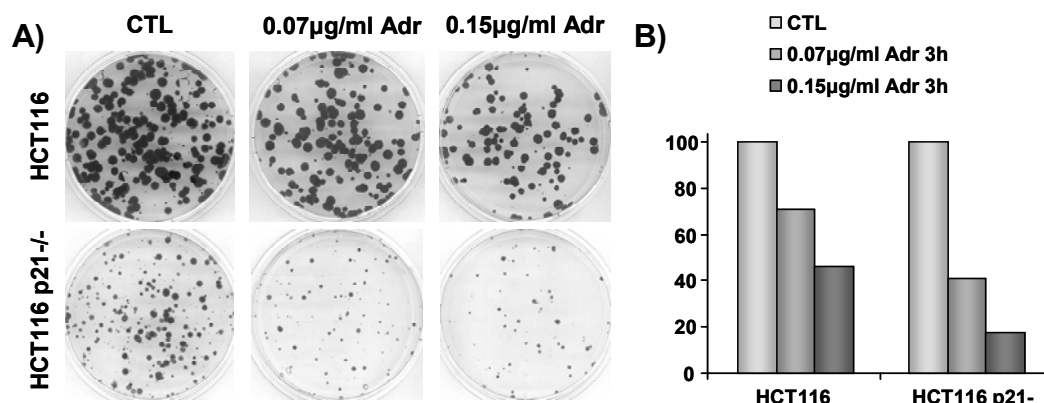


Figura 1.16: Assaig de viabilitat cel·lular per formació de focus en cèl·lules HCT116 i HCT116 p21^{-/-} tractades amb Adr durant 3h. Vam sembrar el mateix número de cèl·lules per a cada condició en cada una de les plaques i 24h després les vam tractar durant 3h amb les dosis indicades d'Adr. Passades les 3h vam eliminar l'Adr del medi i vam rentar cuidadosament les plaques afegint medi net i deixant créixer les cèl·lules dins de l'incubador durant 2 setmanes. Passat aquest temps, es van tenyir els clons amb cristall violeta i es van contar per a cada condició i per a cada experiment. **(A)** Imatges representatives de la formació de focus en cèl·lules HCT116 i HCT116p21^{-/-}. **(B)** Gràfica amb els resultats normalitzats de dos experiments diferents amb tres rèpliques per a cada condició.

1.7.2 Estudi de l'apoptosi causada per Adriamicina en els diferents mutants de p21^{Cip1}

Amb les dues aproximacions realitzades, assaig de viabilitat amb MTS i assaig de formació de focus, vam poder comprovar com les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} eren més sensibles que les cèl·lules HCT116 al dany causat per l'Adr. El següent objectiu que ens vam plantejar va ser analitzar si els diferents mutants pseudofosforilats de p21^{Cip1} tenien una resposta diferent a la pròpia p21^{Cip1} en la regulació de l'apoptosi.

Per tal d'assolir aquest objectiu ens vam trobar amb alguna dificultat. En primer lloc, vam intentar repetir els experiments de MTS en cèl·lules HCT116 i HCT116 p21^{-/-} transfectades amb els diferents mutants, però el principal inconvenient va ser que les

cèl·lules HCT116 es divideixen molt ràpidament i per tant, tot i tenir una bona transfecció inicial i degut a que l'experiment en qüestió necessitava el manteniment de les cèl·lules transfectades durant tres dies, al final de l'experiment en el moment en que volíem analitzar la resposta de cada un dels mutants davant el dany al DNA, el percentatge de transfecció era baix. Aquest fet impedia l'observació de diferències significatives en assaigs de MTS on es tracta a la població sencera com un tot, ja que l'efecte de les cèl·lules transfectes quedava difós entre el comportament de la població cel·lular total. És per aquest motiu que vam centrar-nos en un altre mètode de detecció de l'apoptosi, i era molt important que el mètode escollit permetés analitzar les cèl·lules una per una per a poder observar diferències entre les cèl·lules transfectades i les cèl·lules no transfectades. Entre els mètodes disponibles per a l'anàlisi de l'apoptosi, vam escollir el comptatge de cossos apoptòtics ja que a través de la observació cèl·lula a cèl·lula amb el microscopi de fluorescència podíem estudiar el comportament de les cèl·lules transfectades per a cada un dels mutants.

La segona dificultat amb la que ens vam trobar, va ser que les cèl·lules HCT116 no formaven cossos apoptòtics durant la resposta al dany al DNA. Com es mostra en la figura I.17, les cèl·lules HCT116 augmenten l'expressió de p21^{Cip1} en resposta al tractament amb Adr. Tot i que no es mostri en la figura, en cèl·lules ciclants sense tractar amb Adr, el nombre de cèl·lules que expressen p21^{Cip1} és molt baix i la seva expressió pràcticament no es pot detectar per Western blot; en canvi, l'expressió de p21^{Cip1} en les cèl·lules HCT116 és elevada en resposta al dany al DNA mitjançant Adr i en resposta a l'estrès oxidatiu provocat amb l'aigua oxigenada (H₂O₂). A més, la immunocitoquímica de p21^{Cip1} mostra com en aquest tipus cel·lular l'expressió de p21^{Cip1} és uniforme en totes les cèl·lules tot i que com acabem de comentar, la tinció dels nuclis amb DAPI ens indica que aquestes cèl·lules no estan entrant en un procés de mort cel·lular per apoptosi. D'altra banda les cèl·lules COS també van ser analitzades sota els mateixos estímuls de dany al DNA i estrès oxidatiu. Com s'observa en el Western blot, les cèl·lules COS també augmenten l'expressió de p21^{Cip1} com a resposta a l'Adr i en menor quantitat davant de l'estrès oxidatiu. De totes maneres, en totes dues condicions, l'expressió de p21^{Cip1} és molt inferior a la de les cèl·lules HCT116. A més, com s'observa en les dues imatges d'immunocitoquímica, l'expressió de p21^{Cip1} en les cèl·lules COS no és uniforme i justament és en aquelles cèl·lules que no expressen p21^{Cip1} les que tenen tendència a formar cossos apoptòtics. La resposta de les cèl·lules NIH3T3 als dos tractaments també va ser analitzada tot i que aquest tipus cel·lular pràcticament no expressa p21^{Cip1} com a resposta als tractaments.

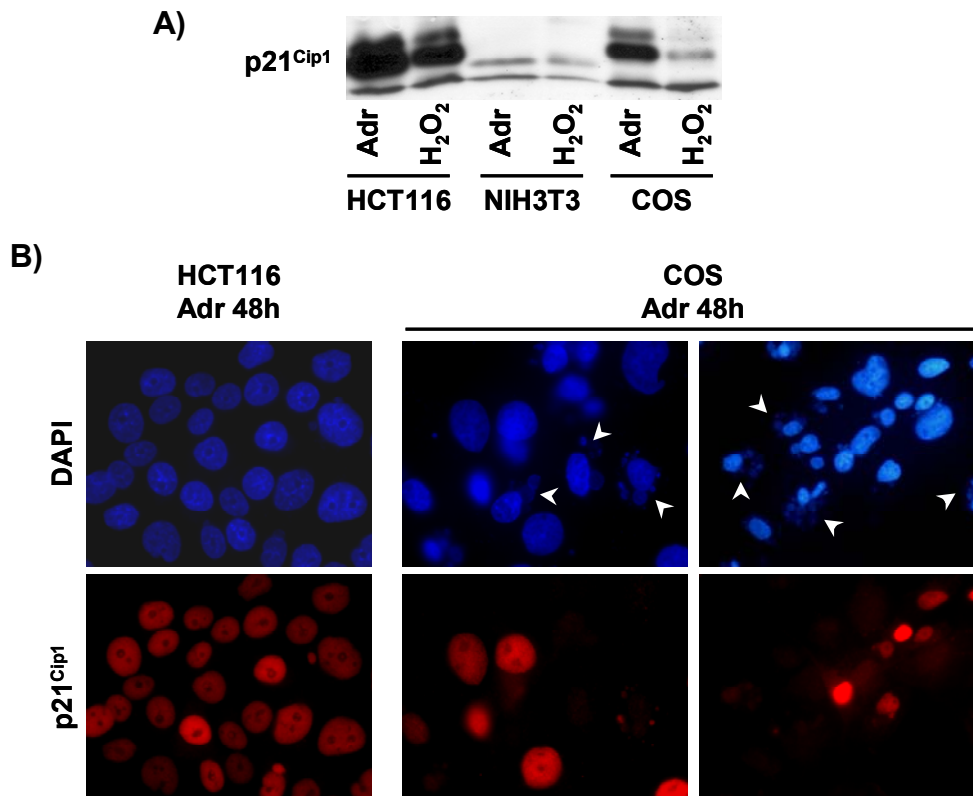


Figura I.17: Estudi de la resposta de diferents models cel·lulars al dany al DNA i a l'estrès oxidatiu. **(A)** Cèl·lules HCT116, NIH3T3 i COS van ser tractades durant 30 h amb 0,225 µg/ml d'Adr o amb 500nM H₂O₂ 30%. Seguidament es van recollir els *pellets*, es va lisar i la mateixa quantitat de proteïna (50µg) va ser sotmesa a electroforesi seguida de detecció mitjançant un Western blot amb un anticòs anti-p21 policlonal. **(B)** Imatges representatives de cèl·lules HCT116 i COS tractades amb 0,225 µg/ml d'Adr durant 34h. Després de fixar les cèl·lules, es va realitzar una immunocitoquímica anti-p21 (amb un anticòs policlonal C-19) i una tinció de DAPI per a marcar el DNA. Els caps de fletxa senyalen alguns dels nuclis en forma de cossos apoptòtics.

Aquest anàlisi, ens portava a dues conclusions. D'una banda, podem observar un cop més com les cèl·lules que expressen p21^{Cip1} (en el model de cèl·lules COS) tenen protecció davant la mort per apoptosi i d'altra banda, el model de cèl·lules COS sembla un bon model per a analitzar l'efecte dels diferents mutants de p21^{Cip1} en l'apoptosi.

En primer lloc vam transfectar els plàsmids HA-p21WT, HA-p21NLS i els mutants de pseudofosforilació HA-p21T145D i HA-p21S153D en les cèl·lules COS. 24 hores després de la transfecció, vam tractar les cèl·lules amb 0,225 µg/ml d'Adr durant 34 h, i seguidament vam realitzar una immunocitoquímica anti-HA juntament amb una tinció nuclear amb DAPI. Vam quantificar el percentatge de cèl·lules no transfectades que presentaven cossos apoptòtics després del tractament amb Adr i vam repetir la quantificació per a cada un dels mutants transfectats, és a dir, vam quantificar el

percentatge de cèl·lules transfectades per cada un dels mutants que presenta cossos apoptòtics respecte el total de cèl·lules transfectades. Com podem veure en la gràfica de la Figura I.18, el 38,5% de les cèl·lules no transfectades presenta formació de cossos apoptòtics com a resposta al tractament amb ADR; en canvi, tant en les cèl·lules transfectades amb HA-p21WT com en les cèl·lules transfectades amb els mutants de p21^{Cip1} (HA-p21NLS, HA-p21T145D i HA-p21S153D) el percentatge de cossos apoptòtics disminueix dràsticament, per exemple en el cas de HA-p21S153D només un 5,9% de les cèl·lules transfectades presenta cossos apoptòtics. Així doncs, aquests resultats indiquen que la pseudofosforilació del residu T145D o S153D no afecta a la capacitat d'inhibir l'apoptosi de la pròpia p21^{Cip1}, ja que aquests dos mutants inhibeixen l'apoptosi igual de eficientment que p21^{Cip1}.

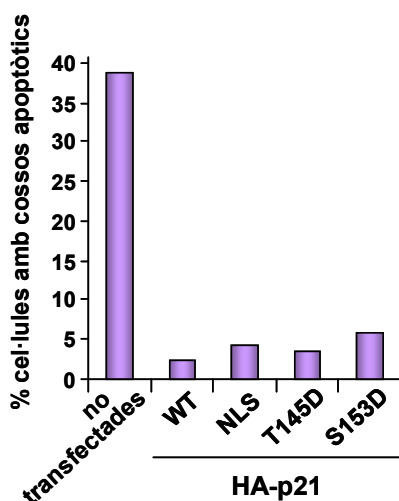


Figura I.18: Estudi de la resposta dels mutants de pseudofosforilació al dany al DNA. Cèl·lules COS van ser transfectades amb HA-p21WT, HA-p21NLS, HA-p21T145D o HA-p21S153D. 24 hores després de la transfecció es van tractar les cèl·lules amb 0,225 µg/ml d'ADR durant 34 h. Seguidament es van fixar i es va realitzar una immunocitoquímica amb un anticòs anti-HA i una tinció amb DAPI per a marcar el DNA. Mitjançant l'observació de les cèl·lules en un microscopi de fluorescència, es va realitzar un comptatge dels cossos apoptòtics per a cada una de les condicions. La gràfica mostra la mitja del percentatge de cossos apoptòtics de dos experiments per separat amb tres rèpliques per a cada condició.

Seguidament, vam voler analitzar si diferents fragments de la proteïna tenien més o menys capacitat d'inhibir l'apoptosi. Com hem explicat detalladament a la introducció, d'una banda, a l'extrem amino terminal de p21^{Cip1} és on s'hi localitza els dominis d'unió a les Cdk's i a les ciclines i és també en aquest extrem on s'han descrit les unions a proteïnes relacionades amb l'apoptosi: ASK1, procaspasa 3 i SAPK (revisat a (Dotto, 2000)). D'altra banda, a l'extrem carboxi terminal és on es localitza el senyal NLS de la p21^{Cip1} (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002). Vam transfectar les cèl·lules COS amb GFP-p21WT, GFP-p21CT i GFP-p21NT i vam repetir les condicions de dany al DNA de l'experiment anterior i la quantificació del percentatge

de cèl·lules que presentaven cossos apoptòtics després del tractament amb ADR. Com podem veure en la gràfica de la Figura I.19, el 37,7% de les cèl·lules no transfectades presenta formació de cossos apoptòtics com a resposta al tractament amb ADR; en canvi, tant en les cèl·lules transfectades amb GFP-p21WT com amb GFP-p21NT el percentatge de cèl·lules amb cossos apoptòtics disminueix fins a un 18%-20%, respectivament. Sorprenentment, les cèl·lules transfectades amb GFP-p21CT presenten un percentatge de cossos apoptòtics semblant al de les cèl·lules no transfectades, indicant que aquest fragment de la proteïna no té la mateixa capacitat d'inhibir l'apoptosi que la p21^{Cip1} sencera.

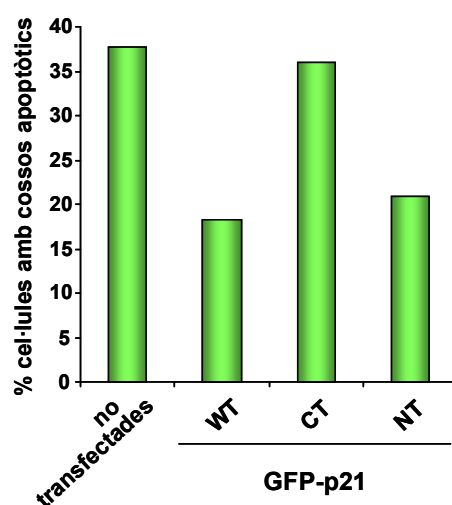


Figura I.19: Estudi de la resposta de diferents mutants de p21^{Cip1} al dany al DNA. Cèl·lules COS van ser transfectades amb GFP-p21WT, GFP-p21CT i GFP-p21NT. 24 hores després de la transfecció es van tractar les cèl·lules amb 0,225 µg/ml d'ADR durant 34 h. Seguidament es van fixar i es va realitzar una tinció amb DAPI per a marcar el DNA. Mitjançant l'observació de les cèl·lules en un microscopi de fluorescència, es va realitzar un contacte dels cossos apoptòtics per a cada una de les condicions. La gràfica mostra la mitja del percentatge de cossos apoptòtics de dos experiments per separat amb tres rèpliques per a cada condició.

Per tal de corroborar els resultats obtinguts amb els mutants GFP, vam transfectar les cèl·lules amb els mutants DsRED, ja que com hem comentat anteriorment, els mutants GFP de p21^{Cip1} tenen tendència a localitzar-se al nucli tot i no tenir la senyal NLS. Vam repetir l'experiment anterior transfectant les cèl·lules COS amb els plàsmids DsRED-buit (∅) i diferents mutants de DsRED-p21 (WT, NLS, CT i CT-NLS) i vam quantificar novament el percentatge de cèl·lules que presentaven cossos apoptòtics. La gràfica de la figura I.20, mostra l'increment del percentatge de cossos apoptòtics per a cada condició. Les cèl·lules no transfectades i les cèl·lules transfectades amb el plàsmid DsRED-∅ tenen un percentatge similar entre elles, del 38-39%, molt semblant també al percentatge obtingut en els altres experiments. D'altra banda, s'observa com la transfecció de DsRED-p21WT o NLS inhibeix

RESULTATS I

notablement la formació de cossos apoptòtics en les cèl·lules que expressen el plàsmid. En canvi, de la mateixa manera que havíem observat en els mutants GFP, la expressió de DsRED-p21CT no té la mateixa capacitat d'inhibir la formació de cossos apoptòtics. Sorprenentment, DsRED-p21CT-NLS sí que és capaç d'inhibir l'apoptosi de manera comparable a p21WT.

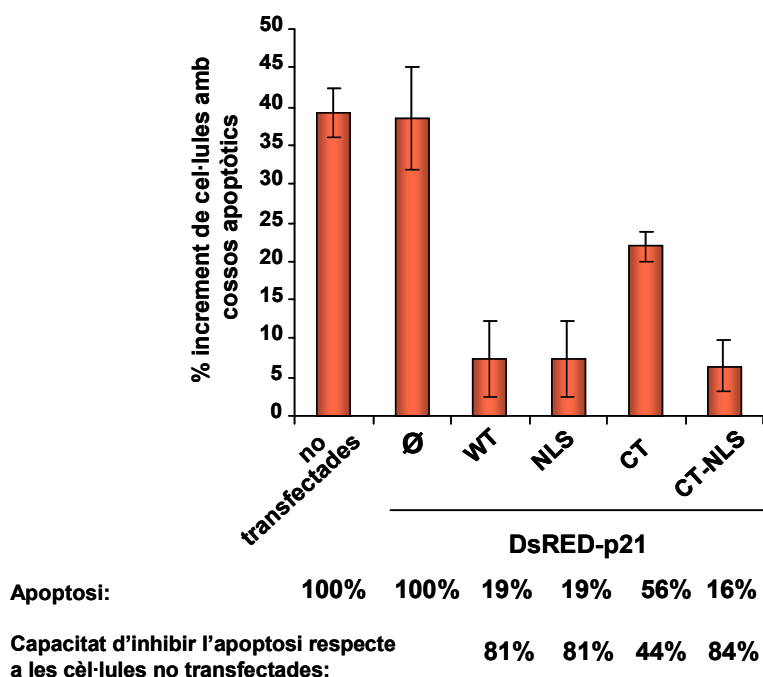


Figura I.20: Estudi de la resposta de diferents mutants de p21^{Cip1} al dany al DNA. Cèl·lules COS van ser transfectades amb diferents plàsmids de DsRED (Ø, p21WT, p21NLS, p21CT i p21CT-NLS). 24 hores després de la transfecció es van tractar les cèl·lules amb 0,225 µg/ml d'Adr durant 34 h. Seguidament es van fixar i es va realitzar una tinció amb DAPI per a marcar el DNA. Mitjançant l'observació de les cèl·lules en un microscopi de fluorescència, es va realitzar un comptatge dels cossos apoptòtics per a cada una de les condicions de les cèl·lules sense tractar i de les cèl·lules tractades. La gràfica mostra la mitja de l'increment de percentatge de cossos apoptòtics de dos experiments per separat amb tres rèpliques per a cada condició.

Aquests resultats obren un camí interessant sobre el paper de p21^{Cip1} en la regulació de l'apoptosi ja que com acabem d'observar, no tots els fragments de la proteïna són igual d'eficients en la inhibició de l'apoptosi. A més, el fet que p21CT-NLS tingui un comportament diferent davant la resposta al dany al DNA que p21CT estaria indicant que potser aquest fragment de la proteïna també es capaç d'inhibir alguna proteïna relacionada amb l'activació de l'apoptosi encara no descrita, i aquesta inhibició només seria possible quan p21^{Cip1} es troba present en el citoplasma.

II. Estudi de la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol

Després d'analitzar el paper de la fosforilació del residu Ser153 de p21^{Cip1} i com aquesta fosforilació és capaç de regular la localització de p21^{Cip1}, vam voler estudiar altres mecanismes de regulació de la localització de p21^{Cip1}. El model de les cèl·lules HCT116 en resposta al dany cel·lular ens va semblar un bon model ja que ens permetia estudiar un increment dels nivells de p21^{Cip1} i analitzar si el dany al DNA comportava algun tipus de canvi en la localització cel·lular de p21^{Cip1}.

II.1 El tractament amb 0,15 µg/ml Adr provoca una parada del cicle cel·lular en G₂/M i una baixa mort cel·lular

Com ja hem explicat anteriorment, p21^{Cip1} augmenta en resposta al dany al DNA degut principalment a un augment dels nivells de p53. En el primer bloc de resultats vam analitzar el paper de p21^{Cip1} en l'apoptosi i vam observar com la manca de p21^{Cip1} en les cèl·lules HCT116 provocava que aquestes cèl·lules fossin més sensibles a la mort per apoptosi.

Per tal d'analitzar amb detall l'augment dels nivells de p21^{Cip1} en resposta al dany al DNA i si aquest dany és capaç d'induir un canvi en la localització de p21^{Cip1}, vam voler analitzar quina era la resposta de les cèl·lules HCT116 a diferents dosis i diferents temps de tractament amb Adr.

En primer lloc vam analitzar quin era l'efecte de l'Adr en el cicle cel·lular de les cèl·lules HCT116. Mitjançant estudis de FACS vam observar els canvis produïts en el cicle cel·lular de les cèl·lules HCT116 asincròniques com a resposta a diferents dosis i diferents temps de tractament amb Adr. Per tal de visualitzar el contingut de DNA cel·lular vam utilitzar una tinció amb To-pro3, ja que aquesta tinció no quedava emmascarada amb el propi color de l'Adr. Finalment, després d'alguns assaigs preliminars, vam fer servir una concentració d'Adr de 0,15 µg/ml ja que tractaments de 24 o 48 hores induïen una parada en el cicle cel·lular en fase G₂/M (Figura II.1.A) i en canvi, a aquestes dosis, la mort per apoptosi (població sub-G₁) era molt baixa (Figura II.1.B). Com s'observa en la figura II.1, el tractament durant 48 hores amb el doble de dosi que l'anterior (0,3 µg/ml d'Adr), induïa un augment de la població cel·lular en sub-G₁, i per tant aquesta dosi no era adient per al nostre estudi ja que provocava una major mort cel·lular

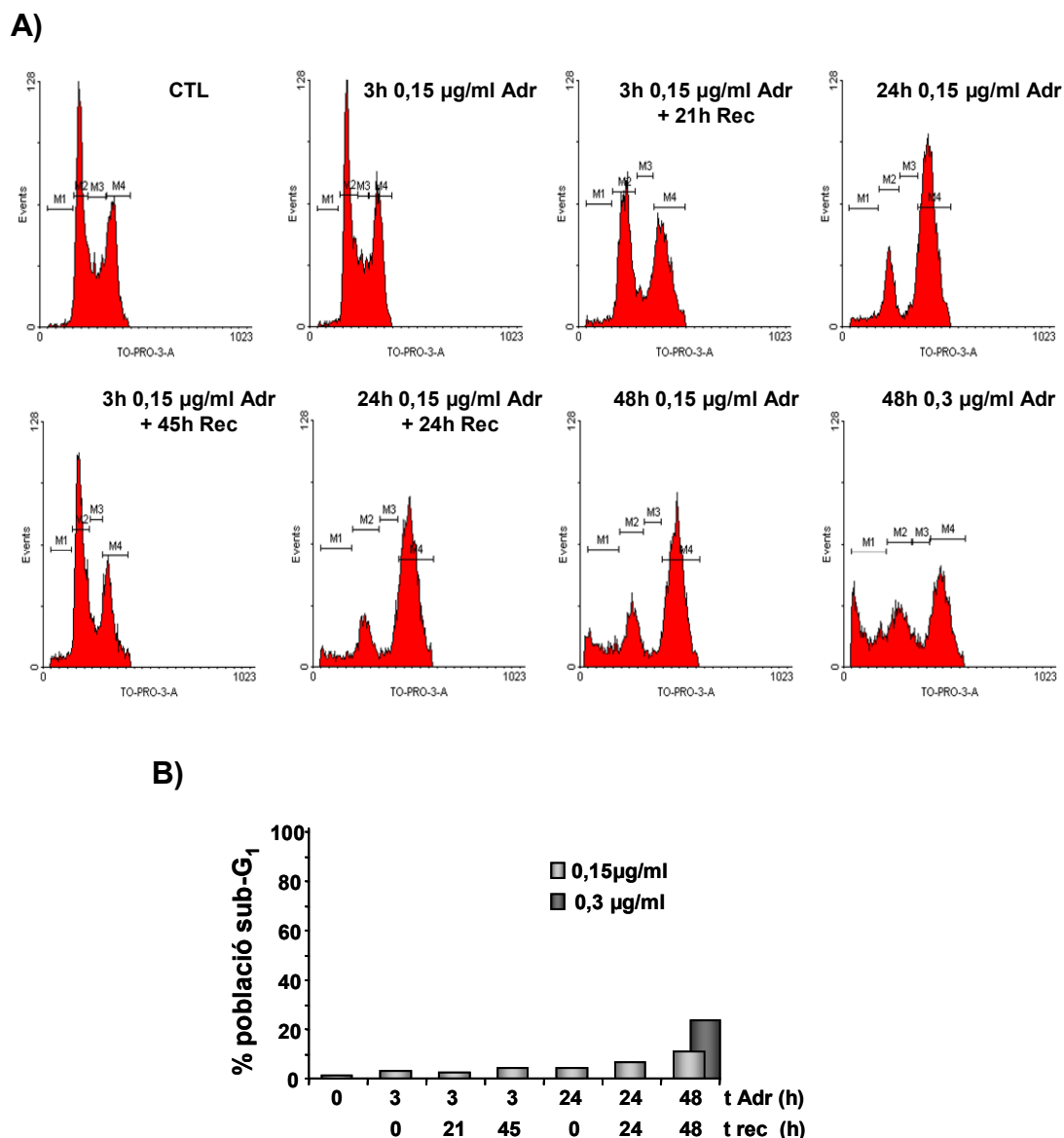


Figura II.1: Estudi del cicle cel·lular en resposta a Adr. Vam tractar les cèl·lules HCT116 amb Adr durant tot el temps (3h, 24h o 48h) o durant 3 o 24 hores seguides d'un temps de recuperació (Rec) tal i com s'indica a la figura. Després del tractament, vam processar les cèl·lules i vam analitzar el contingut de DNA mitjançant un anàlisi de FACS. **(A)** Gràfics del contingut de DNA de cada una de les condicions analitzades. **(B)** Quantificació del percentatge de la població cel·lular en fase sub-G₁ després dels diferents tractaments amb Adr.

Seguidament, vam analitzar la capacitat de proliferació i la viabilitat de les cèl·lules HCT116 sotmeses al tractament amb Adr. Com es pot veure a la figura II.2, la població de cèl·lules en cultiu sense tractament creix exponencialment a les 24 hores i novament a les 48 hores, mentre que el tractament amb Adr 0,15 µg/ml durant 24 hores o 48 hores provoca una aturada de l'increment del nombre de cèl·lules. En canvi, si sotmetem les cèl·lules a un tractament amb la mateixa dosi d'Adr però només durant 3 hores i després retirem la droga, les cèl·lules són capaces de recuperar-se i

tornar-se a dividir tot i que ho fan mes lentament. D'altra banda, si doblem la dosi d'Adr (0,3 µg/ml) observem no només una aturada en el cicle cel·lular sinó també una disminució en el número de cèl·lules, indicant que a dosis més elevades de tractament una part de la població cel·lular entra en apoptosi igual que havíem pogut observar en l'anàlisi de FACS.

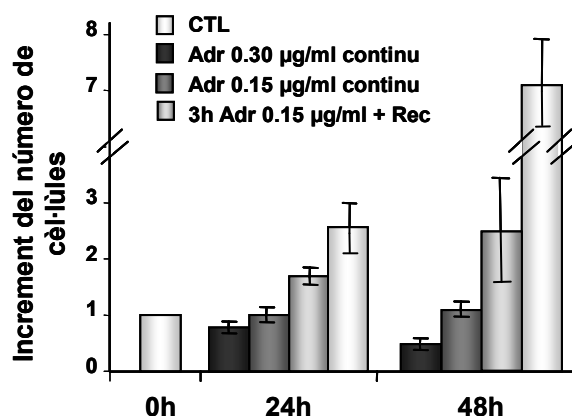


Figura II.2: Estudi de la viabilitat cel·lular en resposta al tractament amb Adr. Vam sembrar el mateix número de cèl·lules HCT116 per a cada condició, 24 hores després les cèl·lules van ser tractades amb Adr durant tot el temps o només durant 3 hores seguides de recuperació (Rec) com s'indica a la llegenda de la gràfica. Seguidament, es van recollir les cèl·lules per a cada condició i es van tenyir amb blau de tripà i es va contar el número de cèl·lules viues mitjançant una cambra de Neubauer. La gràfica mostra l'increment normalitzat en el número de cèl·lules viables després de cada un dels tractaments respecte el nombre de cèl·lules inicial. Les barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3)

Un cop analitzat l'efecte d'una dosi de 0,15 µg/ml d'Adr sobre el cicle cel·lular i la viabilitat de les cèl·lules HCT116, vam voler estudiar la variació dels nivells de p21^{Cip1} en les mateixes condicions. De fet, com ja havíem pogut observar en la figura I.17 el tractament amb Adr induïa un increment dels nivells de p21^{Cip1} en les cèl·lules HCT116. L'anàlisi mitjançant Western blot de lisats de cèl·lules HCT116 tractades durant diferents temps amb Adr mostra com els nivells de p21^{Cip1} endògens comencen a incrementar a partir de tres hores de tractament continuat i com en els tractaments només de 3 hores seguits de recuperació també s'observa un increment els nivells de p21^{Cip1} tot i no tenir presència constant de dany al DNA. En els dos casos s'obté un màxim d'expressió de p21^{Cip1} sobre les 16 hores després d'haver afegit Adr (Figura. II.3).

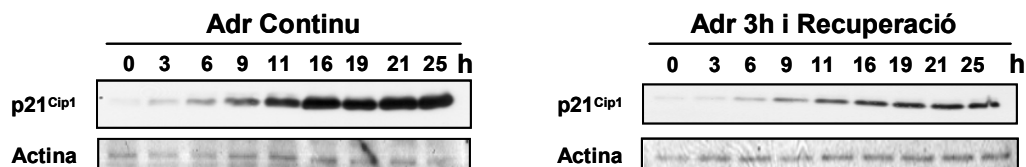


Figura II.3: Augment dels nivells de p21^{Cip1} després del tractament amb Adr. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb 0,15 µg/ml durant els temps indicats en la figura de manera contínua (Adr Continu) o només durant 3h seguides de recuperació (Adr 3H i Recuperació). Passat el temps corresponent, es van recollir les cèl·lules, es van lisar i la mateixa quantitat de proteïna va ser sotmesa a electroforesi seguida de detecció mitjançant un Western blot amb un anticòs anti-p21 policlonal.

II.2 El dany al DNA indueix la localització de p21^{Cip1} al nuclèol

Després d’haver observat l’augment de p21^{Cip1} en les cèl·lules HCT116 com a resposta al dany al DNA i analitzat les conseqüències d’aquest dany, vam voler estudiar la localització de la p21^{Cip1} dins de la cèl·lula en resposta al tractament amb Adr. Vam realitzar immunocitoquímiques de cèl·lules fixades i vam detectar la p21^{Cip1} endògena utilitzant diferents anticossos comercials específics per a p21^{Cip1} (Figura II.4).

En primer lloc vam poder observar un increment en els nivells de p21^{Cip1} en les cèl·lules tractades amb Adr, igual que en el cas del Western blot. Aquest increment de p21^{Cip1} es localitza principalment en el nucli de les cèl·lules i dins del nucli, també vam poder observar la presència de p21^{Cip1} en els nuclèols (Figura II.4.A). Després de tractar les cèl·lules durant 48 hores amb Adr (0,15 µg/ml), més del 80% de les cèl·lules presenten p21^{Cip1} en el nucli i d’aquestes un 50% presenten també p21^{Cip1} en el nuclèol. La localització de p21^{Cip1} en el nuclèol també s’observa en les cèl·lules tractades amb Adr només durant 3 hores i analitzades al cap de 24 o 48 hores. Pel contrari, si fem servir una dosi d’Adr suficientment elevada com per a induir mort cel·lular (0,3 µg/ml) (Fig. II.2), la presència de p21^{Cip1} en els nuclèols pràcticament desapareix i els nuclèols es fan més petits i densos i apareixen amb una morfologia més compacte (Figura. II.4.B).

Per tal de comprovar el resultat observat en les immunocitoquímiques, vam posar a punt un mètode de fraccionament cel·lular en les cèl·lules HCT116, adaptant altres mètodes de purificació de nuclèols (Andersen *et al.*, 2002) tal i com s’explica més detalladament en l’apartat dels materials i mètodes. Aquest fraccionament va permetre obtenir una fracció rica en nuclèols que va ser analitzada posteriorment. La

figura II.5.A, mostra imatges de DIC obtingues amb un microscopi d'epifluorescència d'algunes de les etapes de la purificació dels nuclèols. Com es pot observar en la segona imatge, la fracció final està enriquida amb nuclèols i no presenta cèl·lules senceres.

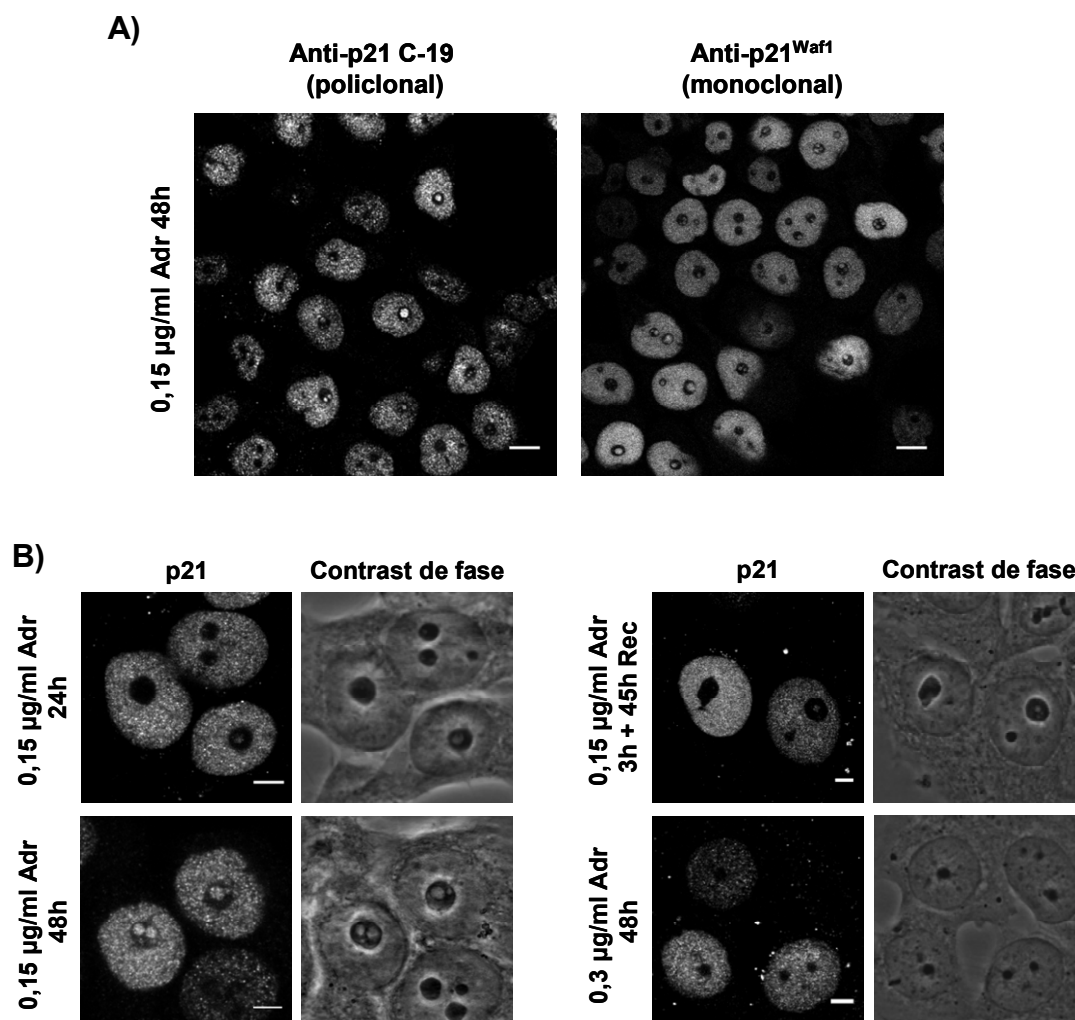


Figura II.4: La p21^{Cip1} endògena es localitza en el nuclèol després del tractament amb ADR. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb ADR durant el temps i la dosi que s'indica a cada imatge. **(A)** Immunocitoquímica anti-p21 de cèl·lules tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR durant 48h. Les dues imatges corresponen a dos anticossos anti-p21 diferents, tal i com s'indica sobre de cada imatge. Barra, 10 µm. **(B)** Immunocitoquímica anti-p21^{Waf1} (monoclonal) de cèl·lules tractades amb ADR. També es mostra una imatge en contrast de fase corresponent a cada immunocitoquímica. Barra, 5 µm

Les diferents fraccions cel·lulars obtingudes, van ser analitzades mitjançant Western blot amb anticossos específics per a la detecció dels nivells de p21^{Cip1} endògens. Les mateixes fraccions cel·lulars van ser analitzades amb anticossos marcadors d'estructures nucleolars (fibril·larina i nucleolina) o nuclears (lamina B) que

RESULTATS II

ens indicaven la correcta obtenció de les diferents fraccions cel·lulars durant el procés de fraccionament. Com es pot observar en el Western blot de la figura II.5.B, el fraccionament cel·lular confirma la localització nucleolar de p21^{Cip1} després de fer dany al DNA.

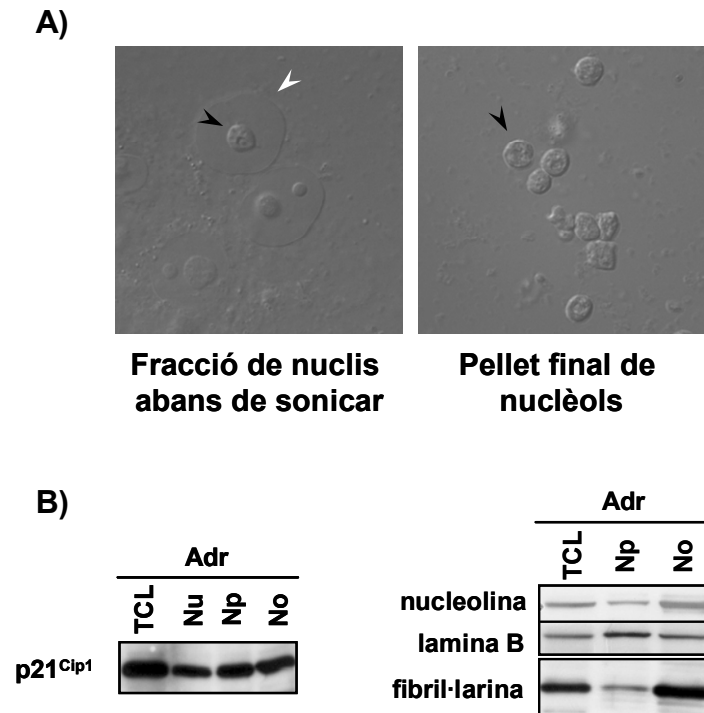


Figura II.5: Estudi de la localització de p21^{Cip1} mitjançant fraccionament cel·lular. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h i passat aquest temps van ser sotmeses a un fraccionament cel·lular per tal d'obtenir fraccions nucleolars tal i com s'explica més detalladament a l'apartat de materials i mètodes. **(A)** Imatges representatives obtingudes amb un microscopi d'epifluorescència de diferents etapes del fraccionament cel·lular. Els caps de fletxa negra senyalen alguns dels nuclèols i el cap de fletxa blanca senyala l'embolcall nuclear. **(B)** Western blot de les diferents fraccions obtingudes amb el fraccionament cel·lular. La mateixa quantitat de proteïna va ser carregada per a cada una de les fraccions cel·lulars: nucli (Nu), nucleoplasma (Np), nuclèol (No) i fracció lisada total (TCL) i van ser sotmeses a electroforesi seguida de detecció mitjançant un Western blot amb un anticòs anti-p21 per a detectar la p21^{Cip1} endògena. La nucleolina i la fibril·larina van ser analitzades com a control de proteïnes nucleolars i la lamina B com a control de proteïna nuclear.

II.3 GFP-p21 també es localitza als nuclèols en resposta al dany al DNA

Després d'haver observat la presència de p21^{Cip1} en el nuclèol mitjançant immunocitoquímica i Western blot, ens vam preguntar si la localització nucleolar de p21^{Cip1} era només conseqüència de l'augment dels nivells de p21^{Cip1} o si era realment deguda a la presència de dany al DNA en aquestes cèl·lules.

Per tal de respondre a aquesta qüestió, vam transfectar cèl·lules HCT116 amb GFP-p21WT i les vam sotmetre a dany al DNA igual que havíem fet anteriorment amb les cèl·lules no transfectades. Després de 24h de transfecció vam sotmetre les cèl·lules a diferents temps de tractament amb ADR (0,15 µg/ml), seguidament vam fixar les cèl·lules tractades i també cèl·lules no tractades que vam fer servir com a control. Vam processar les mostres per tal de poder-les observar al microscopi de fluorescència i vam comptar el percentatge de cèl·lules transfectades que tenien p21^{Cip1} al nuclèol respecte el número total de cèl·lules transfectades per a cada un dels temps analitzats (Figura II.6). En les cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT, p21^{Cip1} es localitza preferentment al nucli, com s'observa en la imatge representativa d'una cèl·lula control (Figura II.6.B). En la gràfica de la figura II.6.A, s'observa com en les cèl·lules no tractades, només 11-12% de les cèl·lules presenten GFP-p21WT al nuclèol; en canvi, al tractar de manera constant les cèl·lules amb ADR el percentatge de cèl·lules que presenten GFP-p21WT al nuclèol augmenta, arribant fins a un 57% després de 48 hores de tractament, la figura II.6.B mostra una cèl·lula representativa transfectada amb GFP-p21WT i tractada amb ADR. D'altra banda, si en comptes de sotmetre les cèl·lules a dany constant, les sotmetem a temps de dany més curts (3 hores o 24 hores) seguits de recuperació, podem observar com el percentatge de cèl·lules que presenten GFP-p21WT al nuclèol es manté tot i no estar en contacte amb la droga, i disminueix a mesura que s'allarga el temps de recuperació (Figura II.6.C).

Un altre fet molt interessant que vam poder observar va ser que al tractar les cèl·lules amb el doble de dosi d'ADR (0,3 µg/ml) durant 48h, el percentatge de cèl·lules que presentaven GFP-p21 al nuclèol disminuïa dràsticament (Figura II.6.A). Com es mostrava en la figura II.1.B i II.2, tractaments amb aquesta dosi feien augmentar la població sub-G₁ i disminuïen la viabilitat de les cèl·lules, indicant que davant d'un excés de dany, les cèl·lules ja no responen localitzant la proteïna p21^{Cip1} al nuclèol.

RESULTATS II

Així doncs, l'anàlisi de la localització de GFP-p21WT com a resposta al dany al DNA demostra que la localització de p21^{Cip1} al nuclèol no és deguda a l'augment dels nivells de p21^{Cip1}, sinó que és conseqüència d'una resposta de la cèl·lula al dany al DNA.

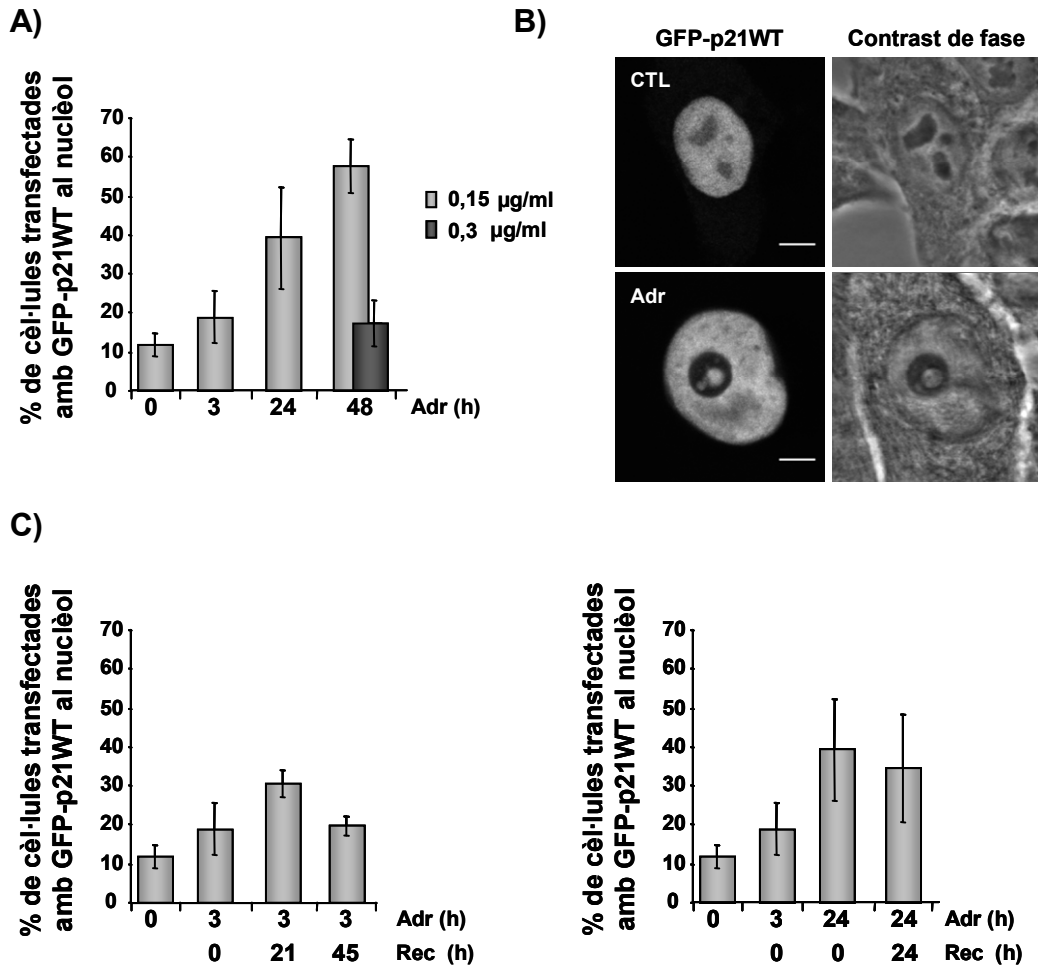


Figura II.6: Localització nucleolar de GFP-p21WT després del dany amb Adr. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb GFP-p21WT i 24h després de la transfecció van ser sotmeses a tractament amb ADR. **(A)** Les cèl·lules transfectades van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR o 0,3 µg/ml d'ADR durant 3h, 24h o 48h, com s'indica a la figura, seguidament van ser fixades i processades per a la observació amb al microscopi de fluorescència. La gràfica mostra el percentatge de cèl·lules transfectades amb presència de GFP-p21WT en el nuclèol respecte el total de cèl·lules transfectades per a cada condició. Les barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3) **(B)** Imatges representatives obtingudes amb un microscopi confocal d'una cèl·lula control (CTL) transfectada amb GFP-p21WT i d'una cèl·lula transfectada amb GFP-p21WT tractada amb 0,15 µg/ml d'ADR durant 48h on s'observa localització nucleolar de GFP-p21WT. Barra, 5µm **(C)** Les cèl·lules transfectades van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR durant els temps que s'indica a la figura seguit de diferents temps de recuperació (Rec). La gràfica mostra el percentatge de cèl·lules transfectades amb presència de GFP-p21WT en el nuclèol respecte el total de cèl·lules transfectades per a cada condició. Les barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3).

A més, per tal de confirmar aquest resultat vam tractar les cèl·lules amb un inhibidor de proteasoma (MG132) que inhibeix la degradació de p21^{Cip1} via proteasoma i com a conseqüència d'aquest tractament augmenten els nivells de p21^{Cip1} cel·lulars (Figura II.7.A). Per tal de detectar la localització de la p21^{Cip1} endògena, vam fixar les cèl·lules tractades amb MG132 (10µM) i vam realitzar una immunocitoquímica amb un anticòs anti-p21. La immunocitoquímica mostra com la p21^{Cip1} no es localitza de manera específica al nuclèol sinó que es localitza principalment en el nucleoplasma com a conseqüència del tractament amb MG132 (Figura II.7.B). Aquest resultat confirma doncs els obtinguts anteriorment amb l'estudi de la localització de GFP-p21.

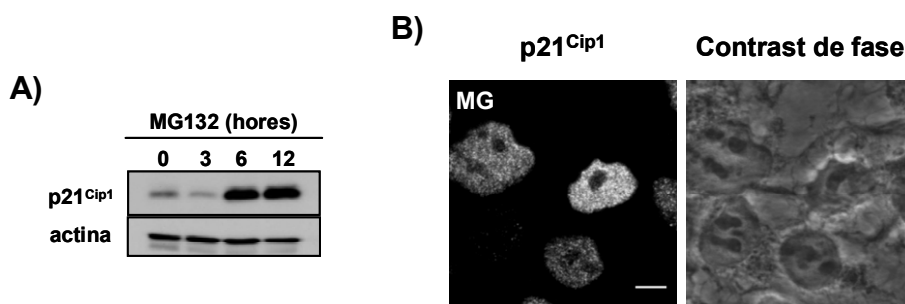


Figura II.7: p21^{Cip1} no es localitza en els nuclèols després del tractament amb MG132. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb 10 µM de MG132 durant els temps que s'indica a la figura. **(A)** Lisats cel·lulars de cèl·lules tractades amb MG132 van ser sotmesos a electroforesi seguida de detecció mitjançant un Western blot amb un anticòs anti-p21 per a detectar els nivells de p21^{Cip1} endògena. **(B)** Imatge representativa de cèl·lules tractades amb MG132 durant 12 h. Les cèl·lules van ser tractades, fixades i processades per a realitzar una immunocitoquímica amb l'anticòs anti-p21^{Waf1}. Barra, 5 µM.

II.4 Estudi en detall de l'estructura nucleolar formada per p21^{Cip1}

A continuació, vam voler descartar que l'estructura formada per p21^{Cip1} dins del nuclèol fos com un "dit", com una projecció del nucleoplasma cap a l'interior del nuclèol. Amb aquest objectiu, vam realitzar un estudi detallat d'aquesta estructura amb tècniques de microscòpia confocal. Després de transfectar cèl·lules HCT116 amb GFP-p21WT i de tractar-les amb Adr durant 48 hores, vam seleccionar una cèl·lula amb presència de GFP-p21WT al nuclèol (Figura II.8.A). Com s'observa en la imatge, la fluorescència del GFP-p21WT en el nucleoplasma és manté constant i, tal i com s'indica en el gràfic d'intensitat (Figura II.8.B), la presència de GFP-p21WT disminueix dràsticament en el nuclèol creant un pic dins del nuclèol de la mateixa intensitat que en el nucleoplasma. Aquest pic correspon a l'estructura nucleolar on es localitza la p21^{Cip1}.

Seguidament, vam estudiar en profunditat la regió nucleolar seleccionada en la figura II.8.A per un quadrat discontinu blanc. Mitjançant l'obtenció de fines seccions en z de l'àrea del nuclèol vam poder fer una reconstrucció del nuclèol i vam visualitzar l'organització nucleolar en els eixos: xz i yz, així vam poder analitzar aquesta estructura en tres dimensions (Figura II.8.C). A partir d'aquesta reconstrucció del nuclèol vam observar com l'estructura que conté p21^{Cip1}, es aproximadament una esfera que no manté una connexió física amb el nucleoplasma. Per tant, aquesta estructura no es una projecció del nucleoplasma si no que és un cos o una inclusió intranucleolar independent. Així doncs, en resposta al dany al DNA, p21^{Cip1} es localitza en uns cossos intranucleolars que anomenem en aquesta tesi com a INoBs (*IntraNucleolar Bodies*), aquests cossos esfèrics situats dins del nuclèol tenen un diàmetre aproximat de 1,5 µm, i apareixen envoltats d'un halos sense fluorescència (també s'observa en les Figures II.4 i II.6.B). A més, com hem pogut veure en altres imatges, els INoBs també apareixen amb una refringència diferent quan s'observen amb contrast de fase.

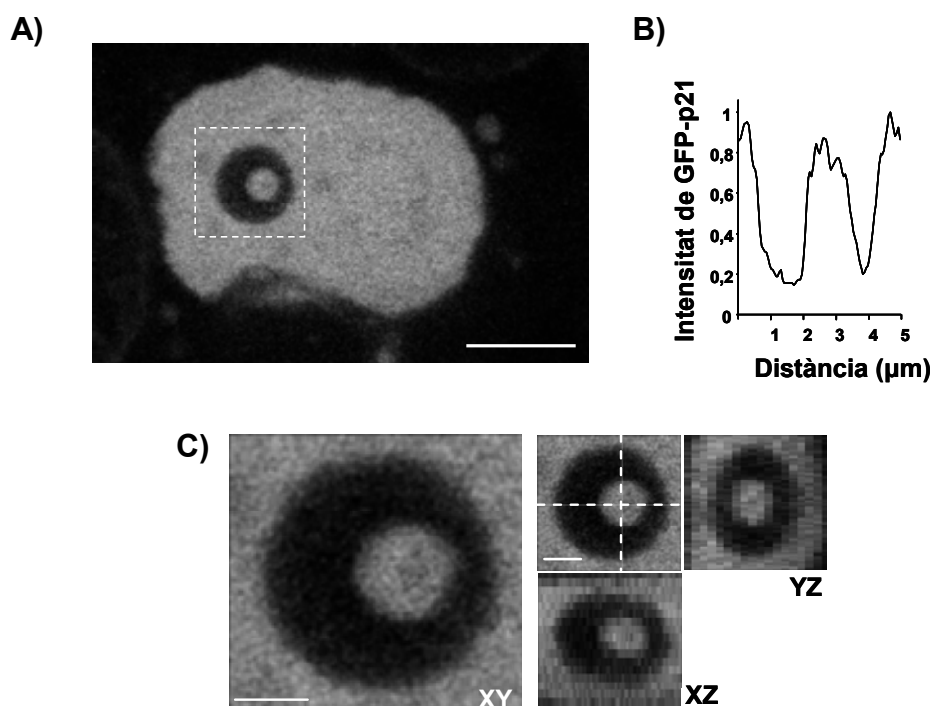


Figura II.8: Estudi detallat de la localització de p21^{Cip1} dins el nuclèol d'una cèl·lula viva. Cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 h. **(A)** Imatge representativa d'una cèl·lula viva amb presència de GFP-p21 en el nuclèol obtinguda amb microscopi confocal (LEICA TCS SP5). Barra, 5 µm. **(B)** Histograma d'intensitat de fluorescència de la cèl·lula representada en la imatge (A) corresponent a una línia traçada a la meitat del requadre discontinu blanc. **(C)** Imatge detallada del nuclèol de la cèl·lula de la imatge (A). En la imatge més gran es representa el pla mig (XY) de les diferents seccions obtingues en Z. En les imatges més petites es representen les projeccions en els eixos XZ i YZ. Barra, 1,5 µm.

Per acabar de confirmar que el INoB representa una estructura independent diferenciada del nucleoplasma, vam seguir la formació dels INoBs en cèl·lules HCT116 tractades amb Adr. Vam afegir 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'Adr a les cèl·lules vives i vam agafar imatges de contrast de fase cada 10 minuts fins a un total de 24 hores (Figura II.9 i Annex I vídeo1). Vam observar com entre les 2 hores i mitja i les 7 hores després d'haver afegit l'Adr, els nuclèols s'arrodonien i perdien el contacte amb l'embolcall nuclear. Més tard, cap a les 15 hores, els INoBs es començaven a formar dins del nuclèol, no com a una invaginació del nucleoplasma sinó que apareixien com a condensació del material present en el nuclèol. A la figura II.9 s'observa la pèrdua de contacte del nuclèol entre les 5 i les 10 hores i a les 20 hores s'observa un petit INoB dins del nuclèol.

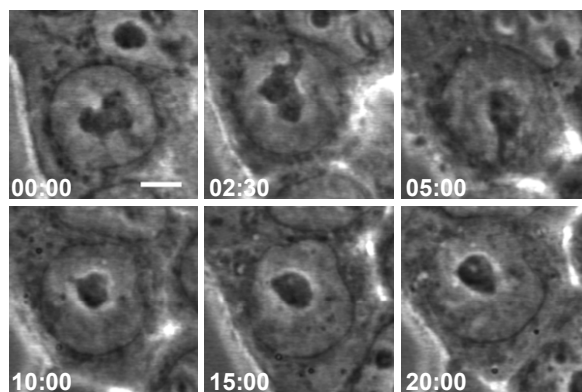


Figura II.9: Estudi de la formació dels INoBs. Imatges de contrast de fase de cèl·lules HCT116 vives tractades amb 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'Adr. En cada imatge s'indica el temps (hores:minuts) després d'afegir Adr, sent el temps 00:00 el moment en que s'afegeix l'Adr a les cèl·lules. Barra, 5 μm .

A més, amb el mateix procediment d'obtenir una imatge de contrast de fase cada 10 minuts, vam observar com les cèl·lules tractades durant 24 hores amb Adr i amb presència de INoB, podien recuperar una estructura nucleolar normal després de treure l'Adr del medi. A més, el INoB va resultar ser una estructura molt dinàmica ja que és capaç de fragmentar-se, desfer-se i tornar-se a formar. També, cal destacar que no vam observar mort d'aquestes cèl·lules durant el període de 60 hores que vam analitzar (Figura II.10 i Annex I vídeo 2).

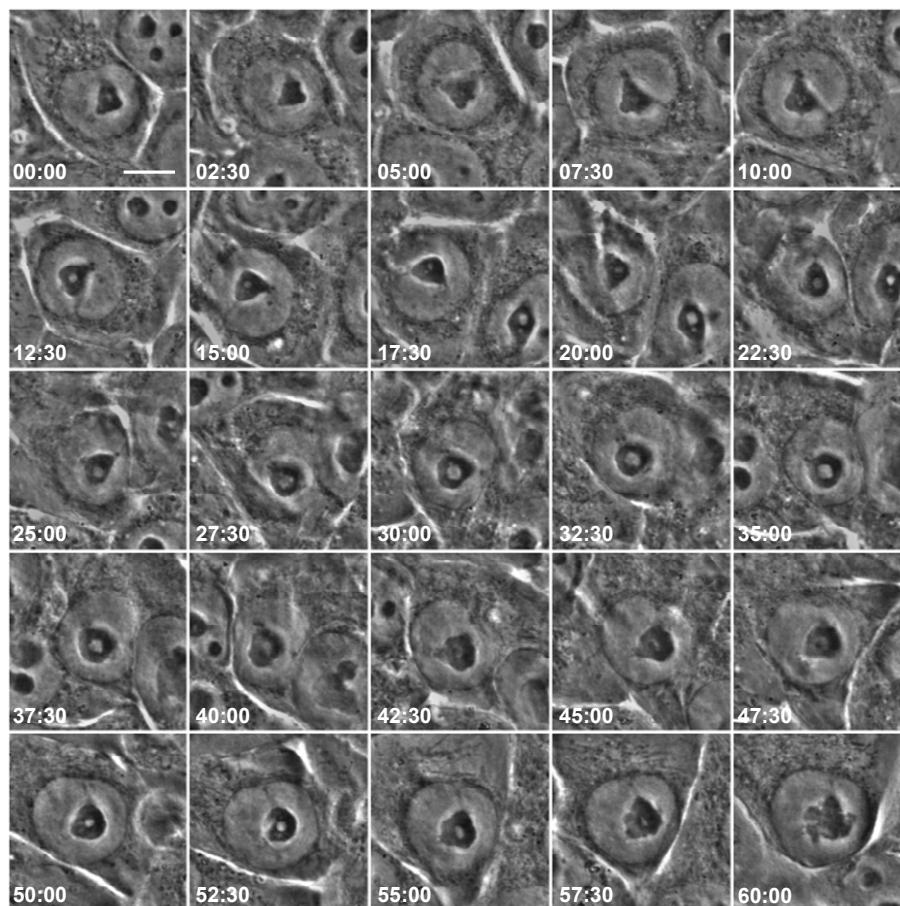


Figura II.10: Estudi de la recuperació dels INoBs. Imatges de contrast de fase de cèl·lules HCT116 vives tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24h i després deixades recuperar. En cada imatge s'indica el temps (hores:minuts) després de treure l'Adr del medi, sent el temps 00:00 el moment en que es treu l'Adr a les cèl·lules i s'afegeix medi nou. Barra, 5 µm.

Per tal de confirmar que les cèl·lules amb localització de p21^{Cip1} en el nuclèol no presentaven major dany al DNA que les altres cèl·lules, vam analitzar els nivells de fosfo-H2Ax (P-H2Ax) i caspasa 3 en la població cel·lular tractada amb Adr. Com s'observa en la figura II.11.A, les cèl·lules p21^{Cip1} positives presenten un menor marcatge per a P-H2Ax; a més, no s'observen diferències significatives en el marcatge de P-H2Ax en les cèl·lules que presenten localització de p21^{Cip1} en el INoB respecte les que només expressen p21^{Cip1} en el nucleoplasma. Com es mostra a les immunocitoquímiques de la figura II.11.B, també vam analitzar els nivells de caspasa 3 activa en les cèl·lules HCT116 tractades amb Adr. En aquest cas, tampoc vam observar diferències significatives entre els diferents patrons d'expressió de p21^{Cip1}; a més, el percentatge de cèl·lules caspasa 3 activa positives és molt baix dins la població de cèl·lules HCT116 tractades amb Adr. Aquestes dades, juntament amb la gravació de les cèl·lules durant més de 60 hores, confirma que les cèl·lules amb

localització de p21^{Cip1} en el INoB no són cèl·lules amb major dany al DNA ni amb major tendència cap a l'apoptosi.

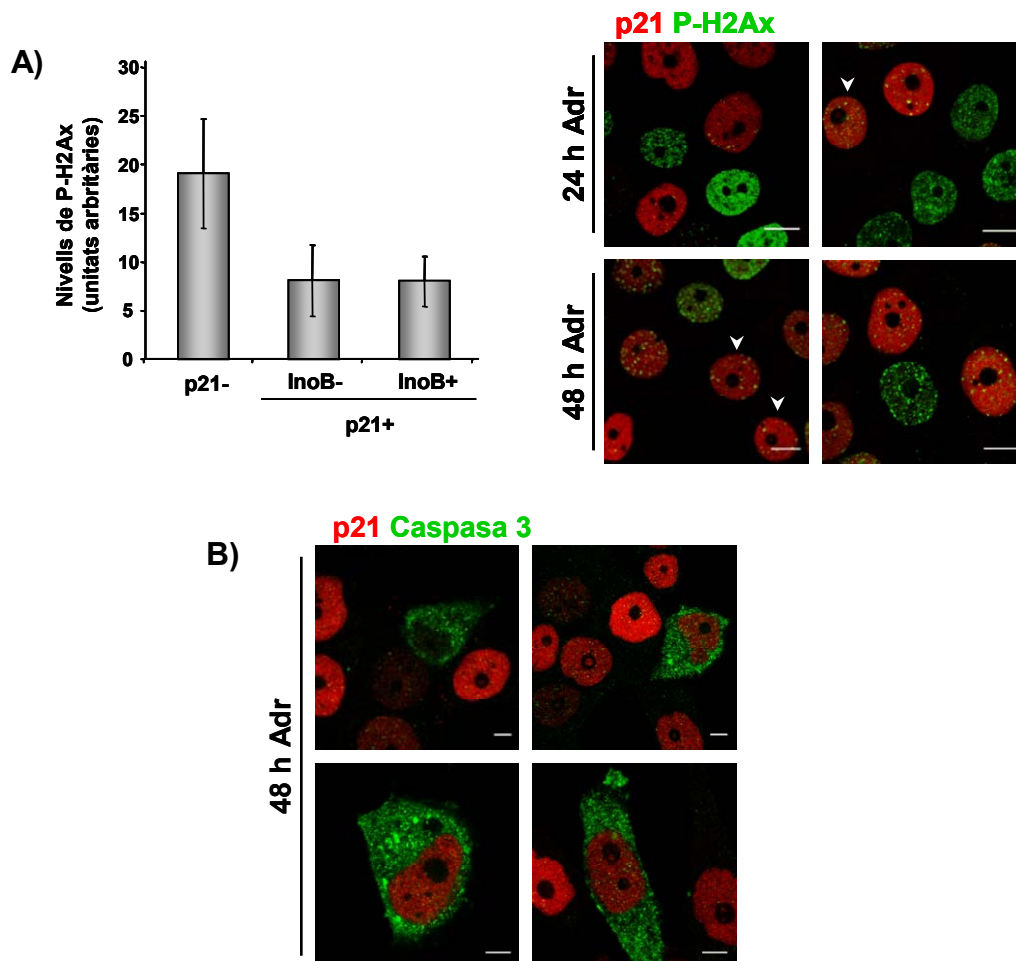


Figura II.11: Anàlisi dels nivells de dany de les cèl·lules amb localització nucleolar de p21^{Cip1}. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb ADR durant el temps que s'indica a cada imatge. **(A)** Immunocitoquímica anti-p21 i anti-P-H2Ax de cèl·lules tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR durant 24h o 48h. Els caps de fletxa indiquen cèl·lules positives per a p21^{Cip1} i amb presència de p21^{Cip1} en el INoB. Barra, 10 µm. La gràfica mostra l'anàlisi de la intensitat del marcatge de P-H2Ax en cèl·lules que no expressen o expressen nivells molt baixos de p21^{Cip1} (p21-) i en cèl·lules que expressen nivells moderats o alts de p21^{Cip1} (p21+). També s'indica la presència (INoB+) o absència (INoB-) de p21^{Cip1} en el INoB. Les barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3), com a mínim 50 cèl·lules van ser contades per condició i per experiment. **(B)** Immunocitoquímica anti-p21 i anti-caspasa3 de cèl·lules tractades amb ADR durant 48h. Barra, 5 µm

II.5 Anàlisi dels dominis de p21^{Cip1} importants per a la localització de p21^{Cip1} al nuclèol

Com ja hem comentat en diferents apartats d'aquesta tesi, p21^{Cip1} pot interaccionar amb un gran nombre de proteïnes i això li dona un gran ventall de

possibilitats i de funcions. Algunes d'aquestes interaccions tenen lloc a la regió amino terminal de p21^{Cip1} mentre que altres proteïnes interaccionen per la regió carboxi terminal (revisat a (Dotto, 2000)). A més, p21^{Cip1} conté la senyal NLS en el seu extrem carboxi terminal (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002). Després d'haver observat la localització en el nuclèol de GFP-p21WT, vam voler analitzar quina part de la proteïna era important per a la seva localització nucleolar.

Amb aquesta finalitat, vam utilitzar diferents mutants de p21^{Cip1} fusionats a GFP: GFP-p21NT, GFP-p21CT i GFP-p21NLS i els vam transfectar en cèl·lules HCT116, 24 h després de la transfecció vam tractar les cèl·lules amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h. Passat aquest temps vam analitzar la localització nucleolar de cada un dels mutants de la mateixa manera que ho havíem fet amb la proteïna sencera. A més, per tal d'assegurar-nos que els canvis en l'acumulació de GFP-p21 en el INoB no eren conseqüència de la disminució en la localització nuclear d'algun dels mutants, només vam comptar les cèl·lules que presentaven expressió de GFP-p21 en el nucli.

Com es pot observar a la figura II.12.A, després de 48 hores de tractament amb Adr, el percentatge de cèl·lules que presenten GFP-p21CT al nuclèol és molt similar al percentatge de cèl·lules que presenten GFP-p21WT en el nuclèol. En canvi, el número de cèl·lules transfectades amb GFP-p21NT que presenten GFP-p21 en el nuclèol és molt inferior al de les cèl·lules que expressen GFP-p21WT. Aquests resultats indiquen que la regió carboxi terminal de p21^{Cip1} és important per a la translocació de p21^{Cip1} al nuclèol com a resposta al dany al DNA.

A més, també vam analitzar si la senyal NLS també era important per a la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol. Vam transfectar el mutant que no conté la senyal NLS (GFP-p21NLS) i vam quantificar el percentatge de cèl·lules amb presència d'aquest mutant en el nuclèol. En aquest cas, vam poder observar un augment de la localització citoplasmàtica de GFP-p21NLS com ja ha estat descrita anteriorment (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002); però el fet que el propi GFP té afinitat per localitzar-se en el nucli, ens va permetre observar cèl·lules amb la presència de GFP-p21NLS en el nucli. Eren aquests darreres cèl·lules les que vam comptabilitzar en el nostre estudi. Com es pot observar en la figura II.12, el percentatge de cèl·lules GFP-p21NLS que presenten p21^{Cip1} al nuclèol (dins de les nuclears) es veu reduït en un 45% en comparació amb GFP-p21WT. A més, la figura II.12.B mostra com algunes de les cèl·lules que presenten INoB observat en contrast de fase no presenten localització de GFP-p21NLS en el nuclèol. Aquests resultats indiquen que dins de

l'extrem carboxi terminal, la seqüència NLS conté també informació per a la localització de p21^{Cip1} al nuclèol després del dany al DNA.

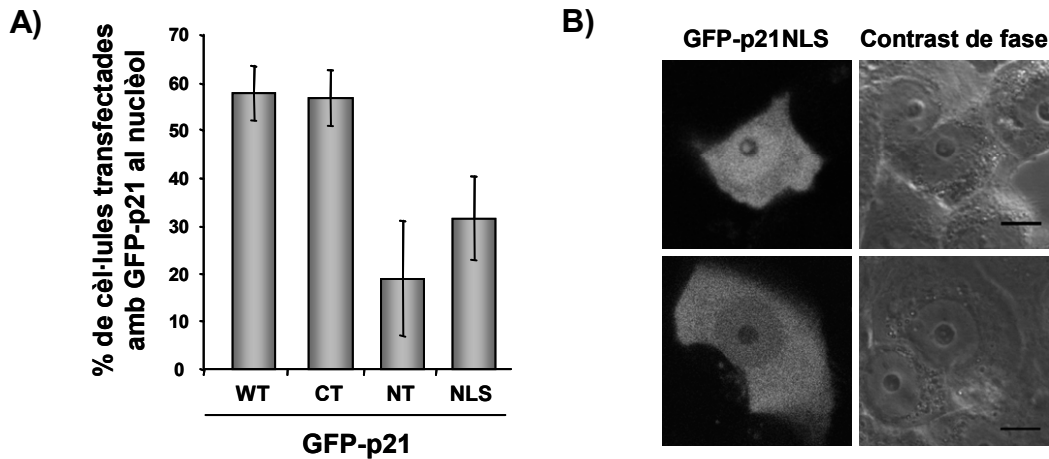


Figura II.12: L'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} és important per a la localització nucleolar de la proteïna. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb els mutants de GFP-p21 que s'indiquen a la figura i 24 h després de la transfecció van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 h. **(A)** Percentatge de cèl·lules transfectades que contenen GFP-p21 en el nuclèol respecte el total de cèl·lules transfectades per a cada un dels mutants. Les barres d'error representen la desviació estàndard (n=3). Com a mínim es van analitzar 100 cèl·lules transfectades per a cada mutant en cada experiment. **(B)** Imatges representatives de cèl·lules transfectades amb GFP-p21NLS i tractades amb Adr. Totes dues cèl·lules presenten estructura nucleolar visible en contrast de fase, la cèl·lula de la imatge superior presenta també GFP-p21NLS en aquesta estructura nucleolar; en canvi, la cèl·lula de la imatge inferior no presenta GFP-p21NLS en el nuclèol. Barra, 5 µM.

II.6 La localització de p21^{Cip1} al nuclèol és el resultat d'un equilibri dinàmic entre el nuclèol i el nucleoplasma

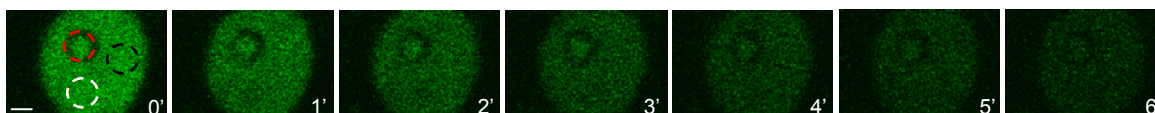
Després d'haver observat la localització nucleolar de p21^{Cip1} endògena i de GFP-p21, ens vam preguntar si p21^{Cip1} restava unida o segrestada en alguna estructura nucleolar. Per tal d'estudiar la mobilitat de la p21^{Cip1} nucleolar vam posar a punt experiments de microscòpia confocal *in vivo* en cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT i tractades amb Adr.

En primer lloc vam fer servir tècniques de fotoextinció on analitzàvem la pèrdua de la fluorescència: *Fluorescence loss in photobleaching* (FLIP) en aquelles cèl·lules transfectades amb GFP-p21WT i tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 h que presentaven GFP-p21WT en el nuclèol. En els experiments de FLIP, l'àrea a fotoextingir (*photobleach*) va ser una àrea definida en el nucleoplasma i aquesta va

RESULTATS II

ser repetidament fotoapagada. Vam obtenir una imatge de les cèl·lules abans i després de cada fotoextinció que ens permetia observar i quantificar la seva fluorescència. Com es pot observar en la cèl·lula de la figura II.13.A, la fotoextinció repetida en l'àrea seleccionada del nucleoplasma (cercle blanc discontinu), provocava una disminució de la fluorescència total de la cèl·lula. L'anàlisi detallat dels experiments de FLIP ens va mostrar com al fotoextingir una àrea del nucleoplasma disminuïa la fluorescència d'una àrea veïna al nucleoplasma (cercle negre discontinu) i com disminuïa també la fluorescència del nuclèol (cercle vermell discontinu) amb una tendència similar a la caiguda de fluorescència del nucleoplasma (Figura II.13.B). Amb les dades dels experiments de FLIP vam poder calcular la fracció mòbil de sortida del nuclèol de les molècules de GFP-p21WT que era de $82,4 \pm 3,9\%$, ja que a l'acabar l'experiment només es manté en els nuclèols menys d'un 20% aproximadament de la fluorescència inicial. Aquestes dades indiquen l'existència d'un equilibri dinàmic de p21^{Cip1} entre els dos compartiments.

A)



B)

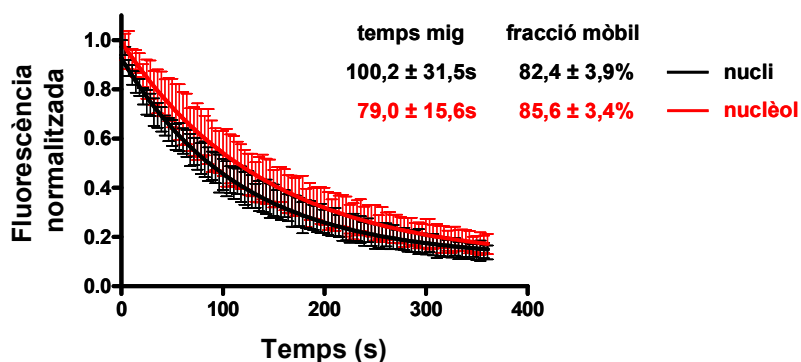


Figura II.13: Estudi de la mobilitat de GFP-p21WT en el nuclèol mitjançant experiment de FLIP. Cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT van ser tractades amb 0,15 $\mu\text{g/ml}$ d'Adr durant 48 h. Es van seleccionar les cèl·lules que presentaven localització de GFP-p21WT en el nuclèol i es van sotmetre a experiments de FLIP ($n=6$) com s'indica en els materials i mètodes. **(A)** Imatges seleccionades d'un experiment representatiu de FLIP. L'àrea repetidament fotoextingida es representa amb un cercle blanc discontinu. Els cercles discontinus vermell i negre representen les àrees del nuclèol i nucleoplasma, respectivament, on es mesura la pèrdua de fluorescència després de cada fotoextinció. Barra, $3\mu\text{m}$. **(B)** Gràfica de la cinètica de pèrdua de fluorescència de GFP-p21WT en el nuclèol (vermell) i en el nucleoplasma (negre) durant el fotoapagat d'una àrea del nucleoplasma (blanca). Les corbes representen la mitja de cada un dels temps en les 6 cèl·lules analitzades de 2 experiments independents. Les barres indiquen la desviació estàndard d'un punt en el temps de cada deu punts analitzats. També s'indica el temps mig i la fracció mòbil per a cada una de les corbes (mitja \pm desviació estàndard). (Annex II vídeo 3).

Seguidament, vam analitzar si podíem observar diferències entre el temps mig de residència de GFP-p21WT en el nuclèol o en una àrea concreta del nucleoplasma. Per a poder estudiar aquesta objectiu vam fer servir tècniques de recuperació de la fluorescència: *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) i vam fer servir unes condicions que ens permetessin obtenir una resolució temporal molt alta. Per a la realització dels experiments vam triar cèl·lules tractades amb ADR amb localització nucleolar de GFP-p21WT i vam fotoextingir la fluorescència dels nuclèols positius per GFP-p21WT per tal que la fluorescència en l'àrea de fotoextinció desaparegués totalment. Després de fotoapagar el nuclèol (cercle discontinu vermell) i una regió del nucleoplasma (cercle discontinu blanc) es van prendre imatges de manera seqüencial per tal de poder estudiar la recuperació de la fluorescència en les dues àrees blanquejades (Figura II.14.A). La fluorescència en els nuclèols fotoapagats es recuperava amb un temps mig de $3,66 \pm 1,39$ segons i 25 segons després de la fotoextinció la recuperació de la fluorescència era del $85,9 \pm 10$ % (Figura II.14.B). Si en la mateixa cèl·lula fotoapagàvem una àrea del nucleoplasma el temps mig de recuperació era 10 vegades més baix, aquest fet indicava que la recuperació de la fluorescència dins del propi nucleoplasma era més ràpida. En aquest cas s'aconseguia recuperar el 100% de la fluorescència inicial de l'àrea blanquejada del nucleoplasma en menys de 5 segons.

Aquests resultats indiquen que la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol no es deu a un segrest i immobilització total de la proteïna, sinó que la major part de p21^{Cip1} es mou ràpidament entre el nucleoplasma i el nuclèol i que la seva localització en el nuclèol és fruit d'aquest equilibri dinàmic. A més, la diferència existent entre temps mig de recuperació de la fluorescència del nuclèol i del nucleoplasma indica que la composició del nuclèol és diferent de la composició del nucleoplasma ja que els nuclèols tenen una major retenció de p21^{Cip1}.

A)

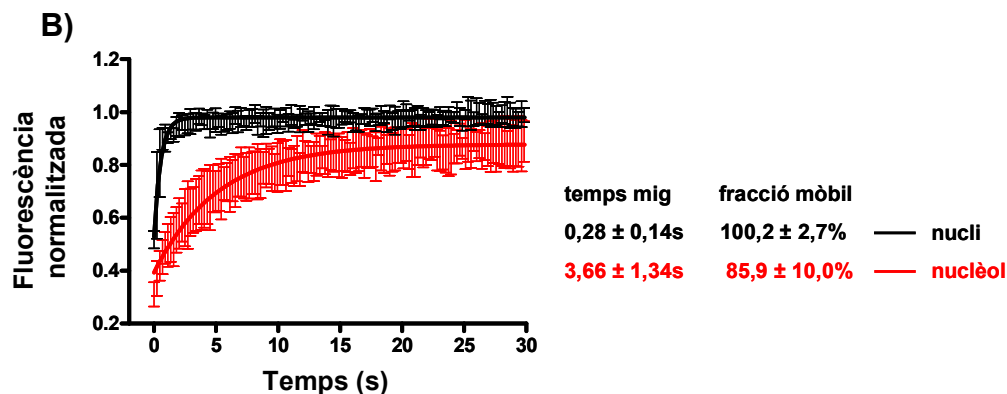
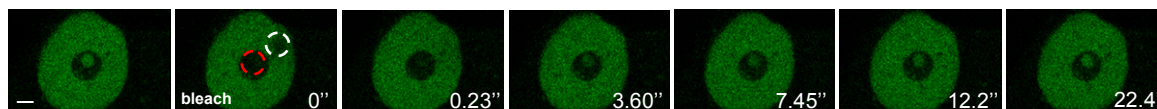


Figura II.14: Estudi de la mobilitat de GFP-p21WT en el nuclèol mitjançant experiment de FRAP. Cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 h. Es van seleccionar les cèl·lules que presentaven localització de GFP-p21WT en el nuclèol i es van sotmetre a experiments de FRAP (n=6) com s'indica en els materials i mètodes. **(A)** Imatges seleccionades d'un experiment representatiu de FRAP. Les àrees fotoapagades del nuclèol i del nucleoplasma es representen amb un cercle vermell i un cercle blanc discontinu respectivament. En les mateixes àrees fotoapagades és on es mesura la recuperació de fluorescència després de la fotoextinció. Barra, 3µm. **(B)** Gràfica de la cinètica de recuperació de fluorescència de GFP-p21WT en el nuclèol (vermell) i en el nucleoplasma (negre) durant la fotoextinció de les àrees corresponents indicades en la figura (A). Les corbes representen la mitja de cada un dels temps en les 6 cèl·lules analitzades de 2 experiments independents. Les barres indiquen la desviació estàndard de cada punt. També s'indica el temps mig i la fracció mòbil per a cada una de les corbes (mitja ± desviació estàndard). (Annex II vídeo 4)

II.7 El dany al DNA provoca la desorganització del nuclèol

Diferents treballs descriuen la desorganització del nuclèol després de fer dany al DNA (Zatsepina *et al.*, 1989;Pena *et al.*, 2000) i proposen el nuclèol com a centre sensor de l'estrès cel·lular (revisat a (Olson, 2004;Mayer and Grummt, 2005;Boisvert *et al.*, 2007;Sirri *et al.*, 2008)); per aquest motiu vam voler estudiar mitjançant l'ús de marcadors nucleolars quin era l'estat del nuclèol en les cèl·lules HCT116 tractades amb Adr.

Com es mostra en la immunocitoquímica de la figura II.15.A dos dels components estructurals del nuclèol: UBF i fibril·larina, marcadors del centre fibril·lar i del component dens fibril·lar, respectivament, es troben dispersos dintre dels nuclèols en les cèl·lules control, senyalant els llocs on es troba la maquinària de transcripció dels rRNAs i on té lloc la transcripció d'aquests rRNAs. En canvi, com s'observa les

cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h, la localització d'aquests dos components: UBF i fibril·larina varia respecte a les cèl·lules control. Després del dany al DNA els dos components es distribueixen cap a una regió perifèrica del nuclèol deixant una regió central lliure de marcatge. A l'observar la imatge de contrast de fase, podem veure com aquesta regió central del nuclèol adopta una refringència diferent a la resta del nuclèol quan s'ha fet tractament amb Adr (Figura II.15.B). Així doncs, vam poder observar que la segregació perifèrica dels components nucleolars és característica d'una desorganització del nuclèol com a conseqüència del tractament de les cèl·lules amb Adr.

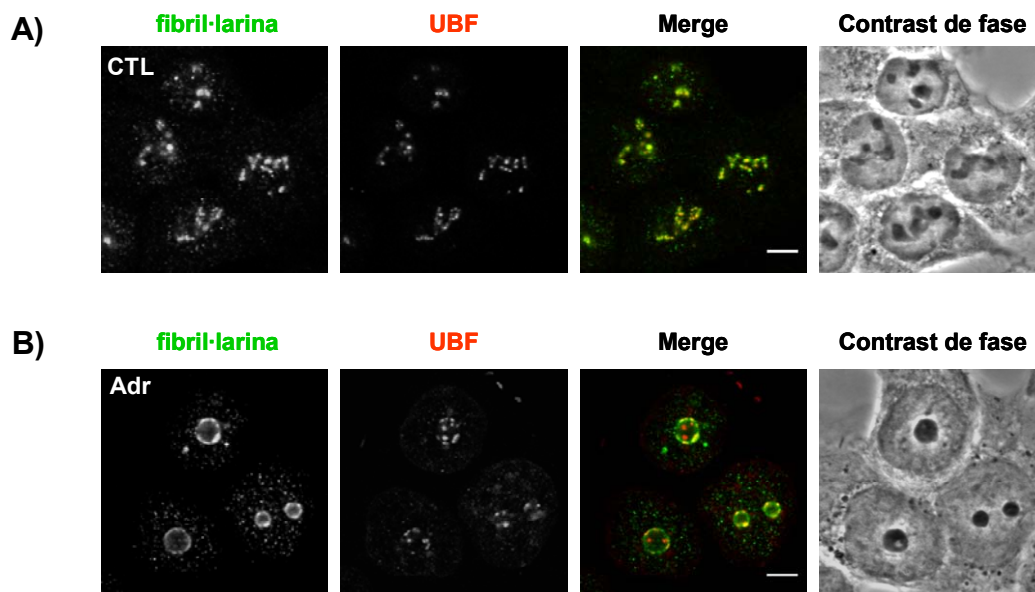


Figura II.15: El tractament amb Adr provoca la desorganització dels components nucleolars. (A) Detecció de l'UBF (vermell) i la fibril·larina (verd) mitjançant immunocitoquímica de cèl·lules HCT116 control (CTL). (B) Detecció de l'UBF (vermell) i la fibril·larina (verd) mitjançant immunocitoquímica de cèl·lules HCT116 control tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h. Barra, 5 µM.

II.8 p21^{Cip1} es localitza en un compartiment nucleolar que no conté UBF ni fibril·larina

Per tal d'analitzar quina era l'estructura que p21^{Cip1} ocupava dintre del nuclèol, vam repetir les immunocitoquímiques de l'apartat anterior detectant els components estructurals i marcant també la p21^{Cip1} endògena. Vam poder observar que en les cèl·lules control, tot i haver molt poques cèl·lules que expressaven p21^{Cip1} en nivells baixos, aquesta es localitza en el nucleoplasma mentre que tant UBF com fibril·larina es troben dispersos en els nuclèols relaxats com hem vist anteriorment en la figura

II.15.A. En canvi, si tractem les cèl·lules amb Adr, els dos components estructurals adopten una posició perifèrica deixant una regió central que es ocupada per la p21^{Cip1} nucleolar (Figura II.16).

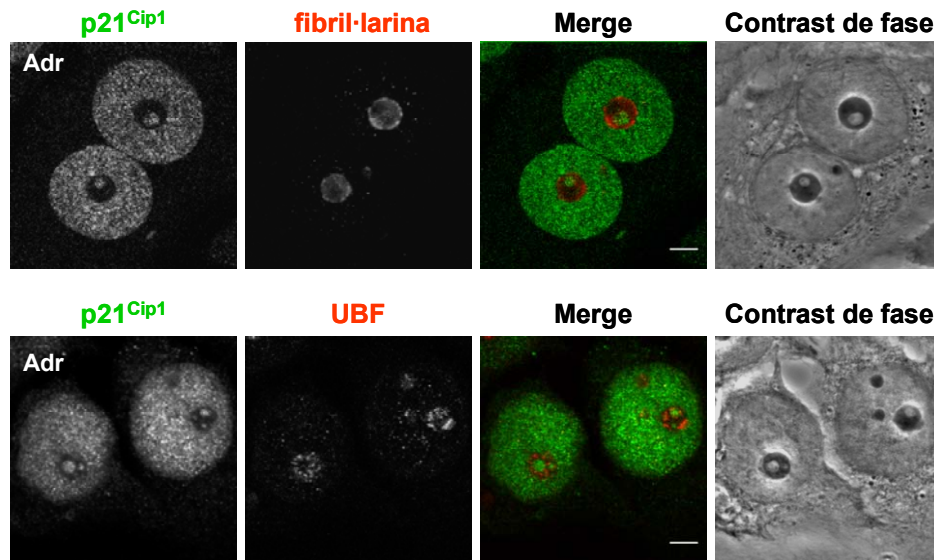


Figura II.16: p21^{Cip1} no colocalitza ni amb la fibril·larina ni amb l'UBF després del dany al DNA. Immunocitoquímica de cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 μg/ml d'Adr durant 48h. Panell superior: detecció de la fibril·larina (vermell) i de la p21^{Cip1} (verd) mitjançant un anticòs anti-p21 monoclonal. Panell inferior: detecció d'UBF (vermell) i de p21^{Cip1} (verd) mitjançant un anticòs anti-p21 policlonal. En tots dos casos es mostra les imatges de contrast de fase corresponents. Barra, 5 μm.

Així doncs, aquestes immunocitoquímiques mostren que p21^{Cip1} no colocalitza amb les proteïnes nucleolars estudiades després de fer dany al DNA; ja que en aquestes condicions de dany, p21^{Cip1} es concentra en el INoB situat al centre del nuclèol mentre que fibril·larina i UBF es redistribueixen a la perifèria nucleolar. A més, aquest INoB positiu per a p21^{Cip1}, queda ben definit en les imatges de contrast de fase ja que té una refringència diferent a la resta del nuclèol.

II.9 Estudi de la desorganització del nuclèol i de la localització de p21^{Cip1} mitjançant microscòpia electrònica

Per tal d'analitzar amb més detall el canvi estructural del nuclèol com a resposta al dany al DNA vam fer servir tècniques de microscòpia electrònica. En primer lloc vam estudiar l'estructura del nuclèol amb i sense dany al DNA com es mostren en les imatges de la figura II.17. En la fotografia II.17.A, s'observa l'estructura relaxada del nuclèol d'una cèl·lula HCT116 control, el qual conté dos centres fibril·lars (asterisc) envoltats per el component dens fibril·lar. També s'observa una abundància del

component granular amb alguns espais intersticials. És interessant ressaltar el contacte del nuclèol amb l'embolcall nuclear (cap de fletxa). Després del tractament amb Adr (fotografies II.17.B, C i D) el nuclèol es compacta i adopta una forma arrodonida en contraposició a la seva forma relaxada quan no hi ha presència de dany. Els components nucleolars com el centre fibril·lar (FC) i el component dens fibril·lar (DFC) també es compacten i es segreguen cap a la perifèria, mentre que el component granular (GC) ocupa la major part del nuclèol i queda compactat en el centre tot deixant uns espais intersticials; és dins d'aquests espais intersticials on apareixen uns cossos més electrodensos que ja hem definit anteriorment com a cossos intranucleolars o INoBs.

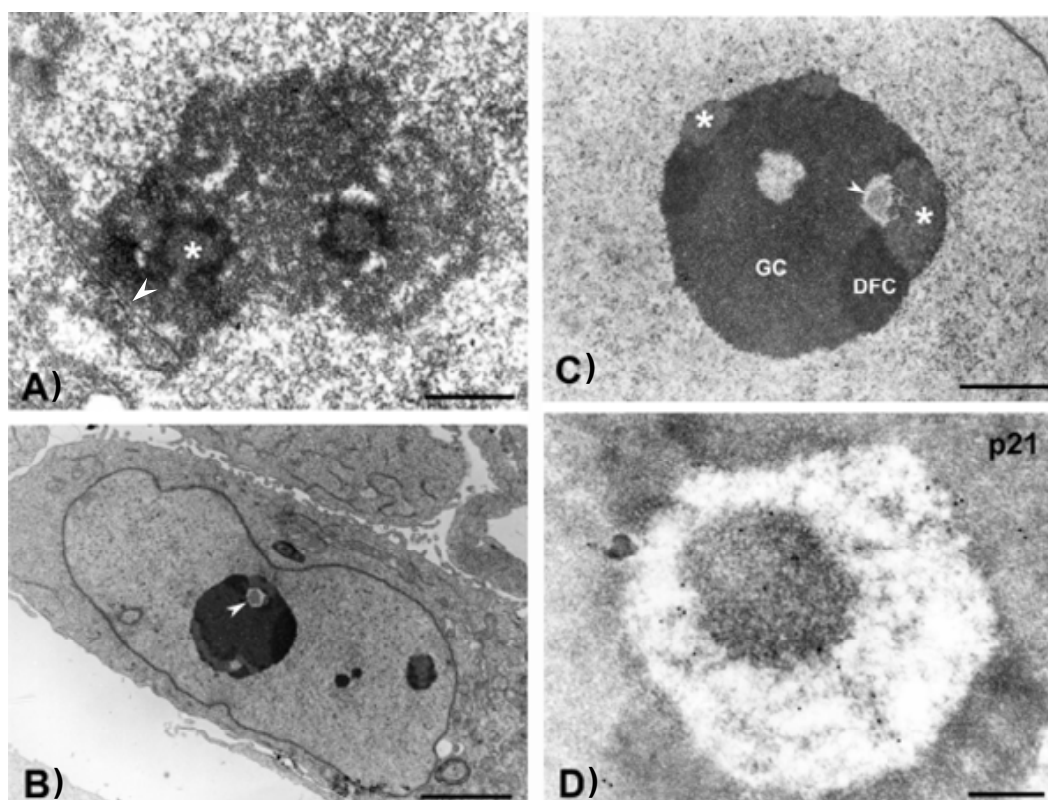


Figura II.17: Estudi amb microscòpia electrònica de la desorganització nucleolar induïda per Adr. (A) Nuclèol d'una cèl·lula HCT116 control on s'observen dos centres fibril·lars (asterisc) envoltats del component dens fibril·lar. El cap de fletxa indica el contacte del nuclèol amb l'embolcall nuclear. Barra, 1 µm (B) Imatge representativa del nucli d'una cèl·lula HCT116 tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24h. El cap de fletxa indica un INoB. Barra, 3 µm (C) Detall del nuclèol d'una cèl·lula tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24h. En la imatge s'indica el component granular (GC), component dens fibril·lar (DFC), els centres fibril·lars (asteriscs) i un INoB dins d'un interstici nucleolar (cap de fletxa). Barra, 1 µm (D) Microscòpia electrònica de partícules d'or (*immunogold*) per a detectar la presència de p21^{Cip1} dins d'un INoB d'una cèl·lula tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24h. Barra, 350 nm.

Seguidament, vam realitzar experiments d'*immunogold* per a detectar la localització de la p21^{Cip1} endògena en el nuclèol de les cèl·lules HCT116 tractades amb Adr durant 24 hores. La fotografia II.17.D mostra un interstici nucleolar que conté un INoB prominent, i com es pot observar, existeix marcatge d'or en el INoB, indicat la presència de p21^{Cip1} en aquesta estructura nucleolar.

II.10 Altres estímuls com la llum UV també indueixen la desorganització del nuclèol i la presència de p21^{Cip1} en el INoB

Un cop analitzada detalladament la desorganització del nuclèol com a resposta al dany al DNA causat per Adr, vam voler estudiar si hi havia algun altre agent causant de dany que també induís la desorganització del nuclèol i la presència de p21^{Cip1} en aquest.

Vam realitzar experiments de dosi resposta irradiant les cèl·lules HCT116 amb diferents intensitats de llum UV i recollint-les 24 hores després de la irradiació. Vam recollir lisats cel·lulars i vam analitzar mitjançant un Western blot l'augment dels nivells de p21^{Cip1} endògena. Com es mostra en la figura II.18, els nivells de p21^{Cip1} també augmenten com a resposta al dany causat per la radiació UV. També vam realitzar immunocitoquímiques de les cèl·lules tractades i vam poder observar un increment dels nivells de p21^{Cip1} igual que amb la tècnica de Western blot i a més, aquest increment de p21^{Cip1} no només tenia lloc en el nucleoplasma sinó que la p21^{Cip1} també es localitzava en el nuclèol com a resposta a la irradiació amb llum UV. De manera interessant vam poder observar per contrast de fase que alguns dels nuclèols de les cèl·lules irradiades tenien presència de l'estructura refringent dins del nuclèol definida anteriorment com a INoB i que eren aquestes cèl·lules les que tenien presència de p21^{Cip1} en aquesta estructura. A més, moltes de les cèl·lules irradiades presentaven una distribució perifèrica de la fibril·larina i de l'UBF al voltant del nuclèol indicant una correlació entre la presència de p21^{Cip1} en el INoB i la desorganització del nuclèol com ja havíem pogut observar amb el tractament amb Adr.

D'altra banda, ja havíem observat com l'inhibidor de proteasoma MG132 provocava un augment dels nivells de p21^{Cip1} sense induir la localització d'aquesta proteïna al nuclèol (Figura II.7). Ens faltava analitzar si el tractament amb MG132 provocava una desestructuració del nuclèol igual que el tractament amb Adr o amb UV. Vam repetir les immunocitoquímiques de cèl·lules tractades amb MG132 per tal d'observar si es produïa una desorganització del nuclèol (Figura II.19). Com es pot observar en la immunocitoquímica, el nuclèol no presenta marcatge per a p21^{Cip1}; a

més, el marcatge amb fibril·larina indica que el nuclèol no es desorganitza com a resposta al tractament amb MG132, ja que la fibril·larina segueix el mateix patró que en les cèl·lules control. Així doncs, novament vam poder comprovar com la desorganització del nuclèol és una resposta al dany al DNA i no una conseqüència de l'increment dels nivells de p21^{Cip1}.

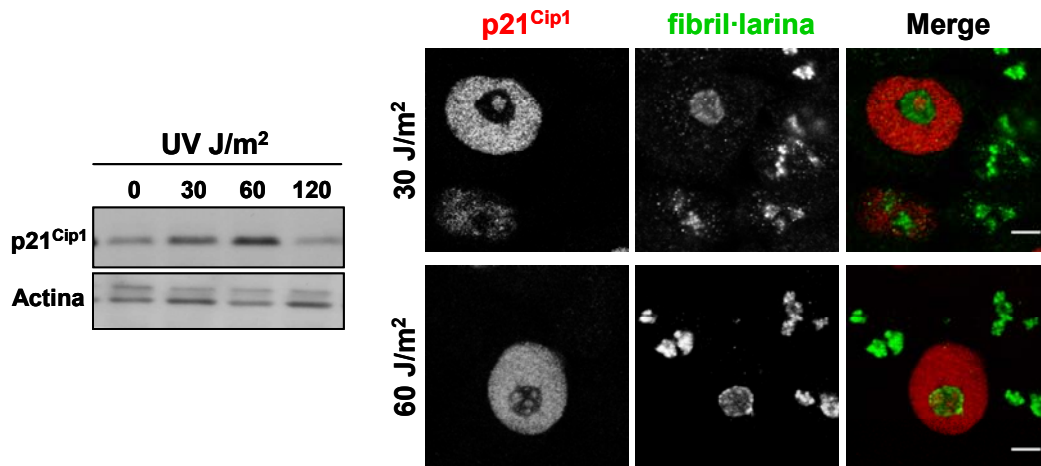


Figura II.18: La p21^{Cip1} endògena es localitza en el nuclèol després de la irradiació amb llum UV. Les cèl·lules HCT116 van ser irradiades amb diferents dosis de llum UV i 24 hores després de la radiació les cèl·lules van ser processades per a obtenir lisats cel·lulars i poder analitzar els nivells de p21^{Cip1} endògena mitjançant Western blot o van ser fixades i sotmeses a immunocitoquímica amb un anticòs anti-p21 i un anticòs anti-fibril·larina. Barra, 5 µM.

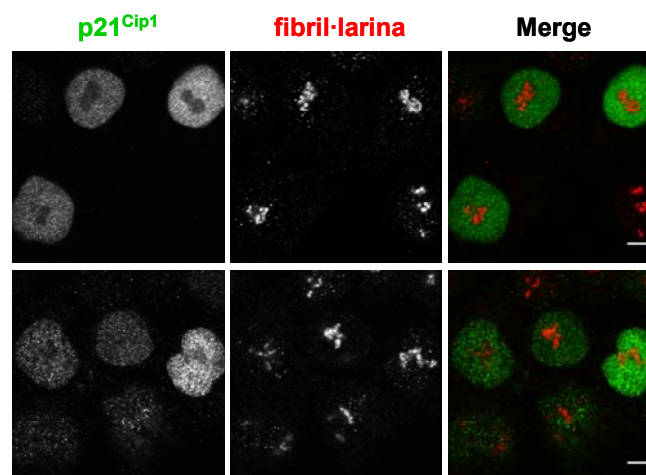


Figura II.19: Els nuclèols no es desorganitzen després del tractament amb MG132. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb 10 µM de MG132 durant 6 hores i seguidament es van sotmetre a una immunocitoquímica amb un anticòs anti-p21 i un anticòs anti-fibril·larina. Barra, 5 µM.

II.11 p21^{Cip1} es localitza en un compartiment nucleolar que no conté RNA ni DNA

Com s'ha mencionat en la introducció, la primera funció descrita del nuclèol va ser la transcripció i el processament dels rRNAs, seguit del seu posterior assemblatge per a formar els ribosomes (revisat a (Boisvert *et al.*, 2007; Cmarko *et al.*, 2008)). A més, el nuclèol va ser descrit com a un agregat de rDNAs, de la maquinària per a poder-los transcriure i de rRNAs, ja que el nuclèol no està separat mitjançant cap membrana de la resta del nucli.

Per aquest motiu, ens vam preguntar si hi havia presència de RNA o DNA en el INoB. Vam realitzar una immunocitoquímica de p21^{Cip1} endògena en cèl·lules HCT116 control i cèl·lules tractades amb Adr, i vam marcar els àcids nucleics amb iodur de propidi. El marcatge amb iodur de propidi a temps curts i sense RNAsa fa més visible el RNA. En les imatges de la figura II.20.A s'observa com en absència de dany al DNA, la p21^{Cip1} es localitza en el nucleoplasma de les poques cèl·lules que l'expressen i en aquestes cèl·lules els nuclèols adquireixen formes amorfes i relaxades que molt freqüentment apareixen en contacte amb l'embolcall nuclear i tot el contingut nucleolar queda tenyit de vermell pel iodur de propidi. En canvi, en les cèl·lules tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores, la p21^{Cip1} es localitza en el nucleoplasma i també en el nuclèol que en aquestes condicions adopta una forma més esfèrica i allunyat de l'embolcall nuclear. Com es pot observar, el marcatge de iodur de propidi queda segregat a la perifèria del nuclèol com ho feien la fibril·larina i l'UBF, tot envoltant el INoB positiu per a p21^{Cip1}.

Paral·lelament, vam repetir les mateixes immunocitoquímiques anti-p21 tenyint el DNA amb To-pro3 Iodide ja que és un marcador amb molta afinitat per marcar el DNA i que té molt baixa afinitat per al RNA (Suzuki *et al.*, 1997). La figura II.20.B mostra com el marcatge de To-pro3 Iodide segueix el mateix patró que el marcatge amb iodur de propidi, ja que en cèl·lules control To-pro3 Iodide marca tot el nuclèol i en cèl·lules tractades amb Adr el marcatge queda segregat a la perifèria nucleolar; en tots dos casos, també s'observa tinció del DNA nuclear sobretot al voltant de l'embolcall nuclear. A més, immunocitoquímies anti-fibril·larina seguides d'un marcatge amb To-pro3 Iodide confirmen que en el INoB no hi ha presència de DNA ja que, a diferència de les cèl·lules control, en els nuclèols de les cèl·lules tractades amb Adr la fibril·larina segrega a la perifèria nucleolar, de la mateixa manera que ho fa el marcatge amb To-pro3 Iodide.

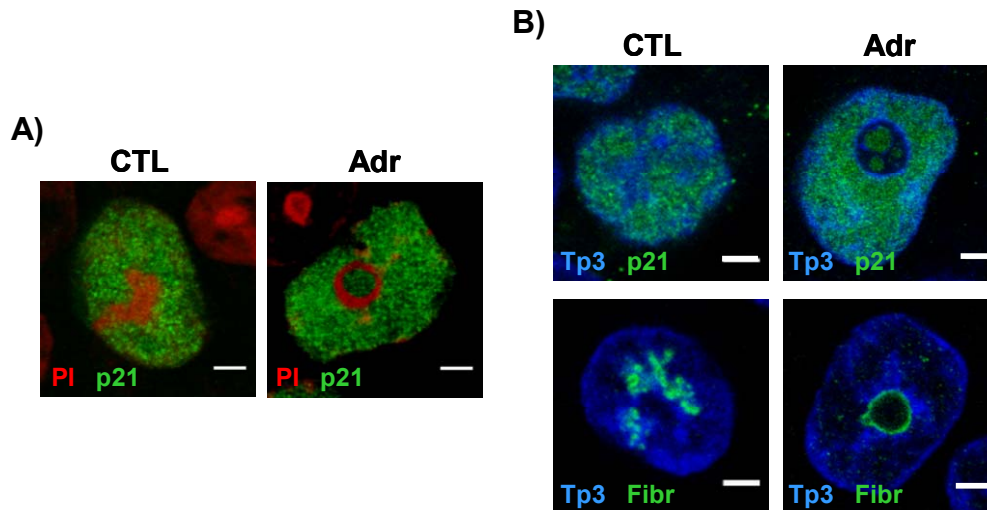


Figura II.20: Els nuclèols desestructurats exclouen el RNA i el DNA dels INoBs. Cèl·lules HCT116 control (CTL) o tractades amb 0,15 $\mu\text{g/ml}$ d'Adr durant 48h hores (Adr) van ser sotmeses a immunodetecció de la p21^{Cip1} endògena (p21) o de la fibril·larina (Fibr), com s'indica a la figura, i tinció amb iodur de propidi (PI) (A) o amb To-pro3 iodide (Tp3) (B). Barra, 3 μM .

Aquests resultats indiquen que el INoB positiu per a p21^{Cip1} no conté RNA ni DNA i que tant el RNA com el DNA es localitzen a la perifèria del nuclèol desorganitzat, seguint el mateix patró que l'UBF i la fibril·larina.

II.12 Els nuclèols positius per a p21^{Cip1} no són transcripcionalment actius

Com acabem de mencionar en l'apartat anterior, en el nuclèol hi té lloc la transcripció dels rDNAs. Diversos estudis descriuen la inhibició de l'activitat transcripcional del nuclèol com a resposta a l'estrès cel·lular (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1991; Mayer *et al.*, 2005; Casafont *et al.*, 2006).

En aquesta tesi, vam voler estudiar si l'activitat transcripcional del nuclèol de les cèl·lules HCT116 es veia afectada pel tractament amb ADR i per la presència de p21^{Cip1} en els nuclèols. Per a analitzar l'activitat transcripcional del nuclèol de les cèl·lules control i de les cèl·lules tractades amb ADR, vam fer servir un assaig de transcripció *in situ* basat en la incorporació de 5'-fluorouridina (5'-FU) en els RNA naixents i per tant indica els llocs actius de transcripció (Boisvert *et al.*, 2000). Abans de fixar les cèl·lules, vam fer una incubació amb 5'-FU de 15 minuts per a poder observar i diferenciar més fàcilment la transcripció nucleolar respecte a la transcripció total de la cèl·lula,

seguidament vam realitzar una immunocitoquímica doble per tal de visualitzar la incorporació de 5'-FU i la presència de p21^{Cip1} endògena.

En la figura II.21.A podem observar incorporació de 5'-FU en el nucleoplasma de les cèl·lules control i sobretot un marcatge més intens en els nuclèols, indicant que en aquestes condicions els nuclèols són transcripcionalment actius. En canvi, en les cèl·lules sotmeses a dany amb Adr la incorporació de 5'-FU en els nuclèols està totalment inhibida i per tant els nuclèols de les cèl·lules tractades amb Adr no són transcripcionalment actius. És interessant ressaltar que aquest fet tenia lloc a les poques hores de tractament amb Adr (3 hores) com es mostra en la figura. Segurament, la inhibició de la transcripció coincideix amb la desorganització del nuclèol com veurem més endavant. El fet que com a resposta al tractament d'Adr s'inhibeixi la incorporació de 5'-FU al nuclèol però no al nucleoplasma, ens indica que la transcripció nucleolar és més sensible al dany al DNA que la transcripció extranucleolar. Com s'observa, la inhibició de la transcripció nucleolar té lloc independentment de l'expressió de p21^{Cip1} en el nucleoplasma o en el nuclèol; per tant, la inhibició de la transcripció és conseqüència del dany al DNA i no d'un augment de l'expressió de p21^{Cip1}.

Sorprenentment, al deixar recuperar les cèl·lules durant 24 o 48 hores després d'un tractament amb Adr de 3 hores, vam observar com la incorporació de 5'-FU es començava a recuperar en els nuclèols indicant que aquests tornaven a ser transcripcionalment actius, però en aquestes condicions de recuperació, la incorporació de 5'-FU no era homogènia en totes les cèl·lules, si no que en les cèl·lules on hi havia presència de p21^{Cip1} en el nuclèol, no es podia restablir l'activitat transcripcional ja que no presentaven marcatge de 5'-FU en el nuclèol (Figura II.21.A).

Vam observar aquests mateixos resultats a l'analitzar la incorporació de 5'-FU seguida d'un marcatge amb iodur de propidi. Com hem explicat en l'apartat anterior, els nuclèols desestructurats amb localització de p21^{Cip1} en el INoB coincideixen amb aquells nuclèols que tenen un marcatge de iodur de propidi a la perifèria deixant un espai central del nuclèol sense marcatge. Són aquests nuclèols amb marcatge perifèric de iodur de propidi els que tampoc tenen incorporació de 5'-FU en el nuclèol i per tant són transcripcionalment inactius en comparació als nuclèols de les cèl·lules control o les cèl·lules recuperades que tenen marcatge de iodur de propidi en tot el nuclèol i també tenen punts transcripcionalment actius marcats amb 5'-FU dins del nuclèol (Figura II.21.B).

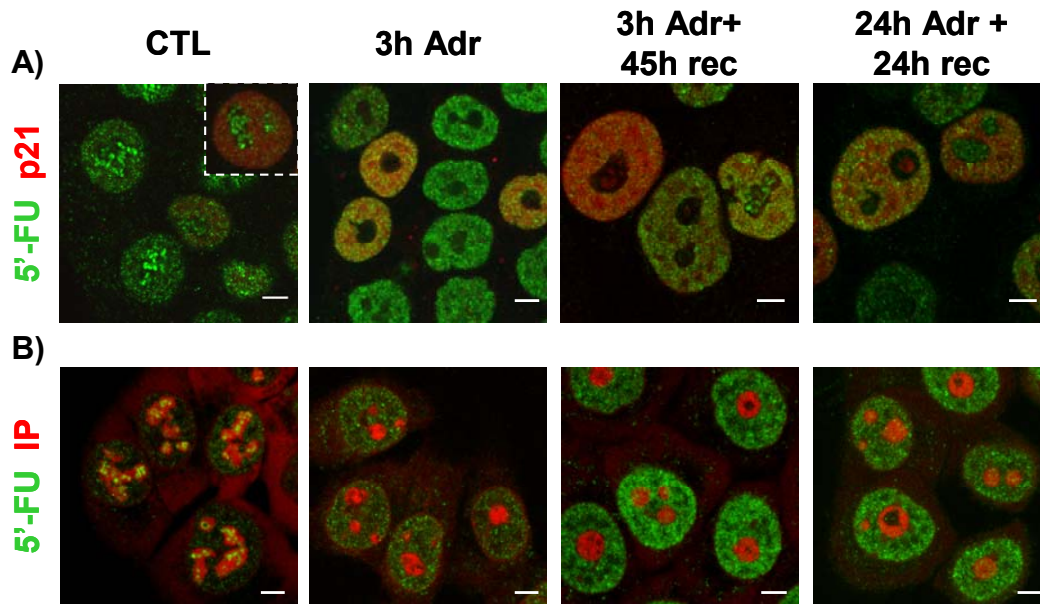


Figura II.21: Els nuclèols desestructurats no són transcripcionalment actius. Cèl·lules HCT116 control (CTL) o tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant diferents temps de tractament i de tractament seguit de recuperació (Rec) van ser incubades amb 5'-fluorouridina (5'-FU) durant 15 minuts abans de ser fixades. La incorporació de 5'-FU va ser revelada mitjançant una immunocitoquímica amb un anticòs anti-BrdU i un anticòs secundari conjugat amb FITC (verd). La immunodetecció de la p21^{Cip1} endògena (vermell) **(A)** o una tinció amb iodur de propidi (PI) **(B)** van realitzades per a estudiar la desorganització del nuclèol i la formació del INoB. En la imatge corresponent a les cèl·lules control s'ha afegit un insert (requadre blanc puntejat) d'una cèl·lula que expressa p21^{Cip1} en el nucleoplasma i és transcripcionalment activa. Barra, 5 µM.

II.13 Els INoBs induïts per Adr també contenen proteïnes del *checkpoint* del dany al DNA i proteïnes reguladores del cicle cel·lular

II.13.1 p53 i mdm2 es localitzen en el nuclèol en resposta al dany al DNA

Com ja s'ha comentat en diferents punts de la introducció, en resposta al dany cel·lular augmenten els nivells de p53 i també del seu inhibidor, mdm2. Diferents treballs insinuen una localització transitòria d'aquestes proteïnes en el nuclèol tot i que no ha estat fermament demostrada (Sherr and Weber, 2000; Olson, 2004). És per aquest motiu que ens vam interessar en l'estudi del comportament d'aquestes dues proteïnes en el nostre model experimental.

En primer lloc, vam analitzar la localització cel·lular de p53 i mdm2 mitjançant immunocitoquímiques. D'una banda, vam observar que en presència de dany al DNA augmenta el nombre de cèl·lules que expressen mdm2 en el nucli i a més, mdm2 també es localitza en el nuclèol, com ja s'havia descrit anteriorment. En la figura II.22, podem observar la colocalització de p21^{Cip1} i mdm2 en el INoB de cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. A més, aquestes dues proteïnes segueixen el mateix patró de localització cel·lular tal i com es mostra en el perfil d'intensitat. Vam realitzar també immunocitoquímiques de mdm2 i fibril·larina i com es pot observar, mdm2 es localitza també en l'espai que deixa la fibril·larina quan aquesta es distribueix a la perifèria nucleolar, imitant el patró de p21^{Cip1}. Aquesta observació també queda reflectida en el perfil d'intensitat entre mdm2 i fibril·larina.

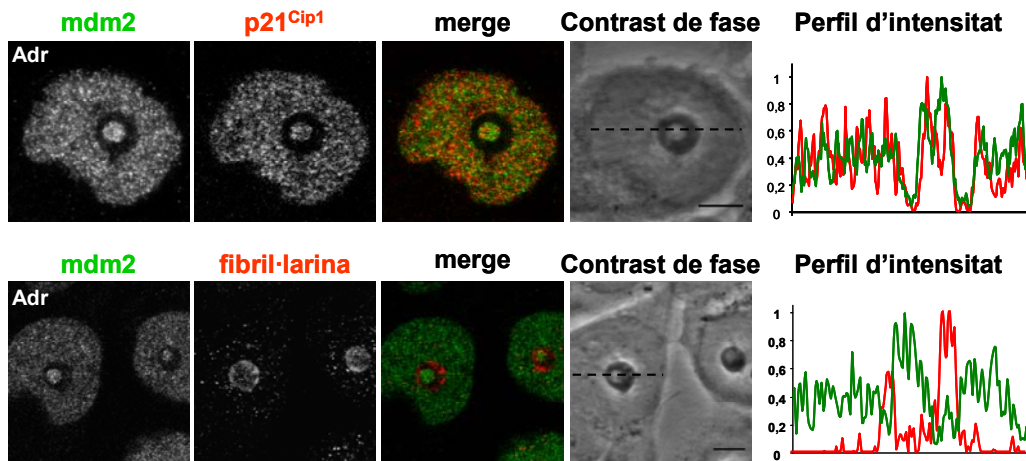


Figura II.22: p21^{Cip1} colocalitza amb mdm2 en el INoB. Immunocitoquímica de cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h. Panell superior: detecció de mdm2 (verd) i p21^{Cip1} (vermell) mitjançant un anticòs anti-p21 policlona. Panell inferior: detecció mdm2 (verd) i fibril·larina (vermell). En tots dos casos es mostren les imatges de la superposició dels dos marcatges i les imatges de contrast de fase corresponents. Barra, 5 µM.

De manera semblant a mdm2, els nivells de p53 també augmenten en les cèl·lules tractades amb Adr, i p53 es detecta no només en el nucleoplasma sinó també en els INoBs de les cèl·lules tractades juntament amb la p21^{Cip1} (Figura II.23). Tal i com esperàvem, l'estructura on es localitza p53 queda envoltada per la fibril·larina desorganitzada en les cèl·lules tractades amb Adr tal i com es mostra en la imatge de la figura II.23 i en el perfil d'intensitat.

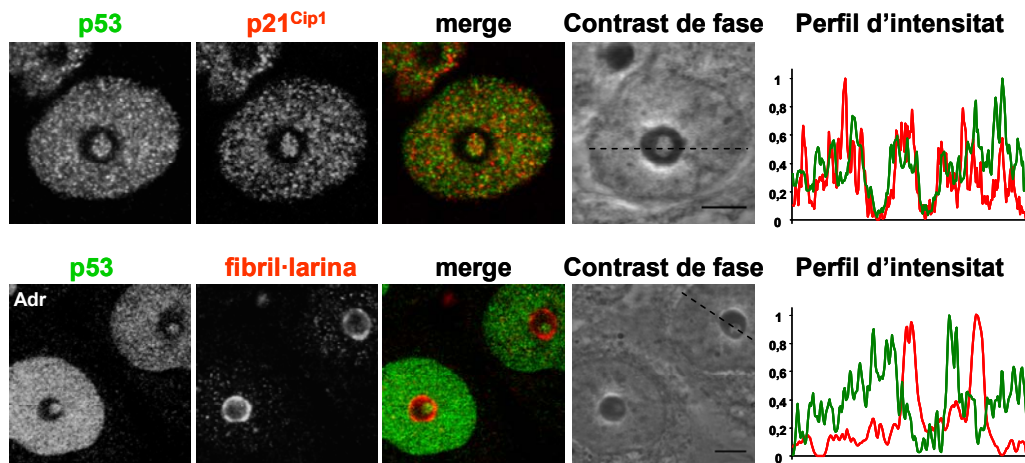


Figura II.23: p21^{Cip1} colocalitza amb p53 en el INoB. Immunocitoquímica de cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 μg/ml d'Adr durant 48h. Panell superior: detecció de p53 (verd) i p21^{Cip1} (vermell) mitjançant un anticòs anti-p21 policlonal. Panell inferior: detecció p53 (verd) i fibril·larina (vermell). En tots dos casos es mostren les imatges de la superposició dels dos marcatges i les imatges de contrast de fase corresponents. Barra, 5 μM.

II.13.2 La localització de p21^{Cip1} en el INoB és independent de p53

El fet de trobar localització de p53 en el nuclèol de les cèl·lules tractades amb Adr ens va fer plantejar, si la localització de p21^{Cip1} en el INoB era dependent de p53. Per tal d'analitzar i descartar aquesta possibilitat vam estudiar la localització de GFP-p21WT en cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb Adr. Com s'observa en la figura II.24.A, la localització de GFP-p21WT en el nuclèol de les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} (60,8±4,2%) tractades amb Adr és similar a la localització de GFP-p21WT en les cèl·lules HCT116 sotmeses al mateix tractament.

La major part de la resposta cel·lular desencadenada pel *checkpoint* de dany al DNA, com per exemple l'increment de p53 i de p21^{Cip1}, depèn de l'activació de les cinases ATM i ATR. A continuació, vam analitzar si era imprescindible l'activació d'aquestes cinases per a la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol. Vam transfectar cèl·lules HCT116 amb GFP-p21WT i les vam tractar durant diferents temps amb Adr i/o amb Cafeïna, ja que la cafeïna actua com a inhibidor de les cinases ATM i ATR. Com s'indica a la figura II.24.B, vam quantificar el percentatge de cèl·lules que presentaven localització de GFP-p21WT en el nuclèol respecte el total de cèl·lules transfectades per a cada condició. Com s'observa en el gràfic, el tractament amb cafeïna, i per tant la inhibició de ATM i ATR, no afecta al percentatge de cèl·lules que presenten GFP-p21WT en el INoB. A més el Western blot anti-p53 dels corresponents lisats de cèl·lules tractades, indica el correcte funcionament de l'Adr i la cafeïna, ja que

com s'observa el tractament amb Adr provoca un increment dels nivells de p53 i en canvi, el tractament amb cafeïna provoca una disminució d'aquests nivells.

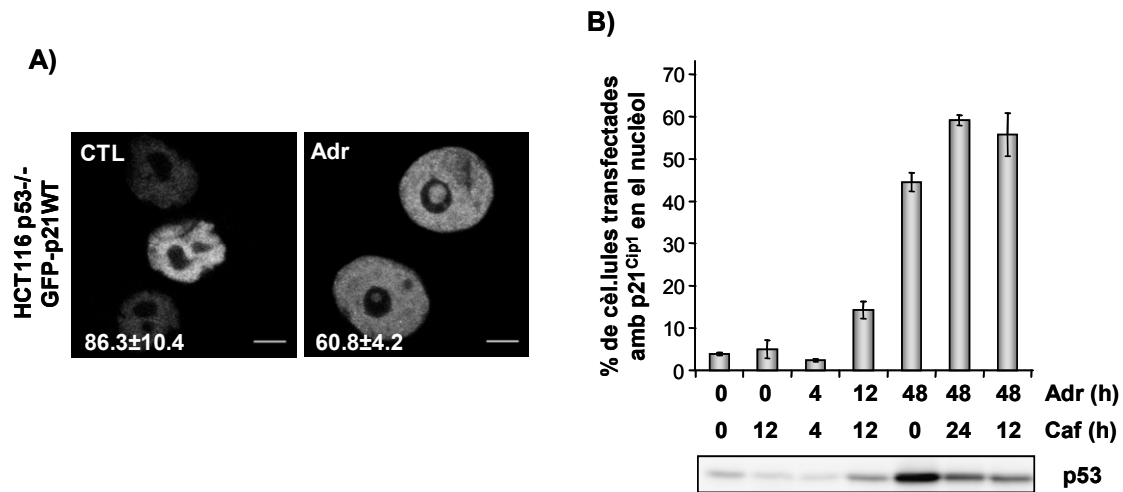


Figura 11.24: La formació dels INoBs i l'acumulació de GFP-p21WT en els INoBs és independent de la presència de p53 i de l'activitat de les cinases ATM/ATR. (A) Les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} van ser transfectades amb GFP-p21WT i tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores (Adr) o es van analitzar sense tractar (CTL). Imatges representatives de la localització intracel·lular de GFP-p21WT en les dues condicions. En cada imatge s'indica el percentatge del patró mostrat en la cèl·lula representativa dins de la població de cèl·lules transfectades (promig ± desviació estàndard; n=3 experiments independents). Barra, 5 µM. (B) Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb GFP-p21WT i tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr i/o tractades amb 5 mM Cafeïna (Caf) durant els temps que s'indiquen a la figura. La cafeïna va ser afegida durant les últimes hores abans de la fixació o lisi de les cèl·lules. El gràfic mostra el percentatge de cèl·lules amb GFP-p21WT al nuclèol respecte el total de les cèl·lules transfectades. Les barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3). El Western blot mostra els nivells d'expressió de p53 després dels diferents tractaments.

11.13.3 Ciclina E i PCNA també es localitzen en el nuclèol en resposta al dany al DNA

Alguns treballs descriuen la localització de la ciclina E en el nuclèol i proposen que l'activitat cinasa del complex Cdk2-ciclina E participa en el correcte manteniment de les funcions nucleolars (Juan and Cordon-Cardo, 2001; David-Pfeuty *et al.*, 2001). Com que ciclina E és una proteïna d'unió a p21^{Cip1} ens vam interessar per si aquestes dues proteïnes colocalitzaven en el nuclèol en resposta al dany al DNA. Immunocitoquímiques de cèl·lules HCT116 tractades amb Adr mostren com la ciclina E colocalitza amb p21^{Cip1} en el INoB després del tractament amb Adr. El perfil d'intensitat de fluorescència també mostra la colocalització d'aquestes dues proteïnes en el INoB (Figura 11.25).

Finalment, vam analitzar la localització del PCNA en les cèl·lules HCT116 tractades amb Adr, ja que el PCNA és també una proteïna d'unió a p21^{Cip1} i a més està relacionada amb la replicació i la reparació del DNA. En cèl·lules control, el PCNA es localitza homogèniament en el nucleoplasma i no hi ha presència de PCNA en el nuclèol. En canvi, en les cèl·lules tractades amb Adr, el PCNA es troba juntament amb p21^{Cip1} en el nuclèol tot i que la colocalització dins el INoB no és total (Figura II.25)

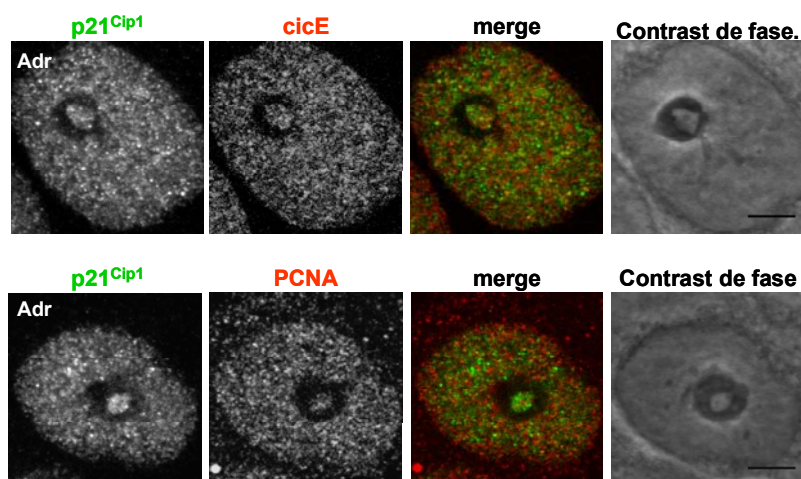


Figura II.25: p21^{Cip1} colocalitza amb PCNA i ciclina E en el INoB. Immunocitoquímica de cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h. Panell superior: detecció de p21^{Cip1} (verd) mitjançant un anticòs anti-p21 policlonal i ciclina E (vermell). Panell inferior: detecció de p21^{Cip1} (verd) mitjançant un anticòs anti-p21 policlonal i PCNA (vermell). En tots dos casos es mostren les imatges de la superposició dels dos marcatges i les imatges de contrast de fase corresponents. Barra, 5 µM.

II.13.4 Després del dany al DNA, GFP-SET, CFP-cdk2 i CFP-p27 també es localitzen en els nuclèols

Seguidament, vam voler analitzar si altres proteïnes d'unió a p21^{Cip1} també es localitzaven en el INoB en resposta al dany al DNA i si la p27^{Kip1}, una altra proteïna de la família de les Cip/Kip, tenia el mateix comportament davant el dany al DNA que p21^{Cip1}. Vam transfectar les cèl·lules HCT116 amb GFP-SET, CFP-cdk2 i CFP-p27 i vam analitzar la localització d'aquestes proteïnes en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48h. Com s'observa en les imatges representatives de la figura II.26, totes tres proteïnes es localitzen en el nuclèol després del tractament amb Adr.

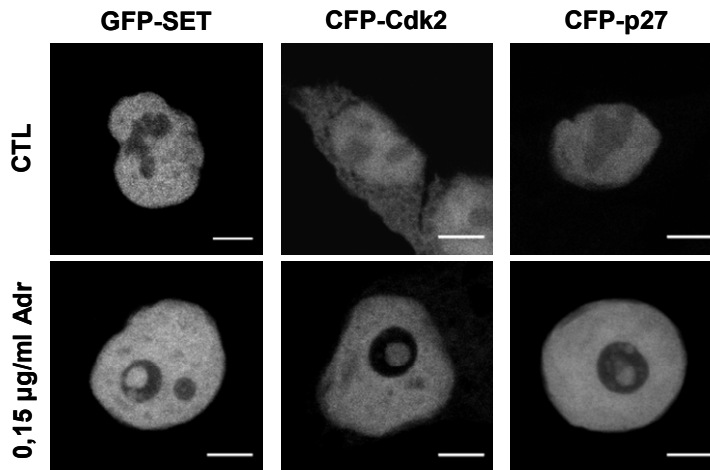


Figura II.26: GFP-SET, CFP-Cdk2 i CFP-p21 també es localitzen en el INoB després del tractament amb Adr. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb GFP-SET, CFP-Cdk2 o CFP-p27 i van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. Les imatges mostren els patrons d'expressió d'aquestes proteïnes en cèl·lules no tractades (CTL) i en cèl·lules tractades amb Adr. Barra, 5 µm.

II.13.5 Altres proteïnes nuclears no es localitzen en el nuclèol com a resposta al dany al DNA

Vam analitzar si altres proteïnes presents en el nucleoplasma també es localitzaven en el nuclèol. En primer lloc vam estudiar la localització de hnRNPA2 (una proteïna d'unió al hnRNA i que també és capaç d'unir-se a SET) (Vera *et al.*, 2005) i de U2AF65 (una subunitat del complex U2AF encarregat de l'*splicing* dels pre-mRNAs) (Chusainow *et al.*, 2005) en cèl·lules HCT116 control i en cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. La figura II.27.A mostra com cap de les dues proteïnes es localitzen en el nuclèol de les cèl·lules tractades amb Adr tot i que si que s'observa INoB en la imatge del contrast de fase.

També vam analitzar la localització de la topoisomerasa I, ja que tot i que es tracta d'un enzim distribuït homogèniament per tot el nucli, s'ha descrit la seva participació en la replicació i transcripció del rDNA que resulta en una acumulació de la topoisomerasa I en el nuclèol (Leppard and Champoux, 2005). Vam poder observar com en cèl·lules control, la topoisomerasa I presenta un marcatge per tot el nucleoplasma i també pel nuclèol, en canvi, en presència de dany al DNA només es

localitza en el nucleoplasma, deixant els nuclèols completament buits (Figura II.27.B). Aquesta localització excloent de la topoisomerasa en les cèl·lules tractades amb Adr era la esperada ja que com hem vist anteriorment, aquestes cèl·lules no presenten activitat transcripcional al nuclèol, ni presència de DNA ni RNA.

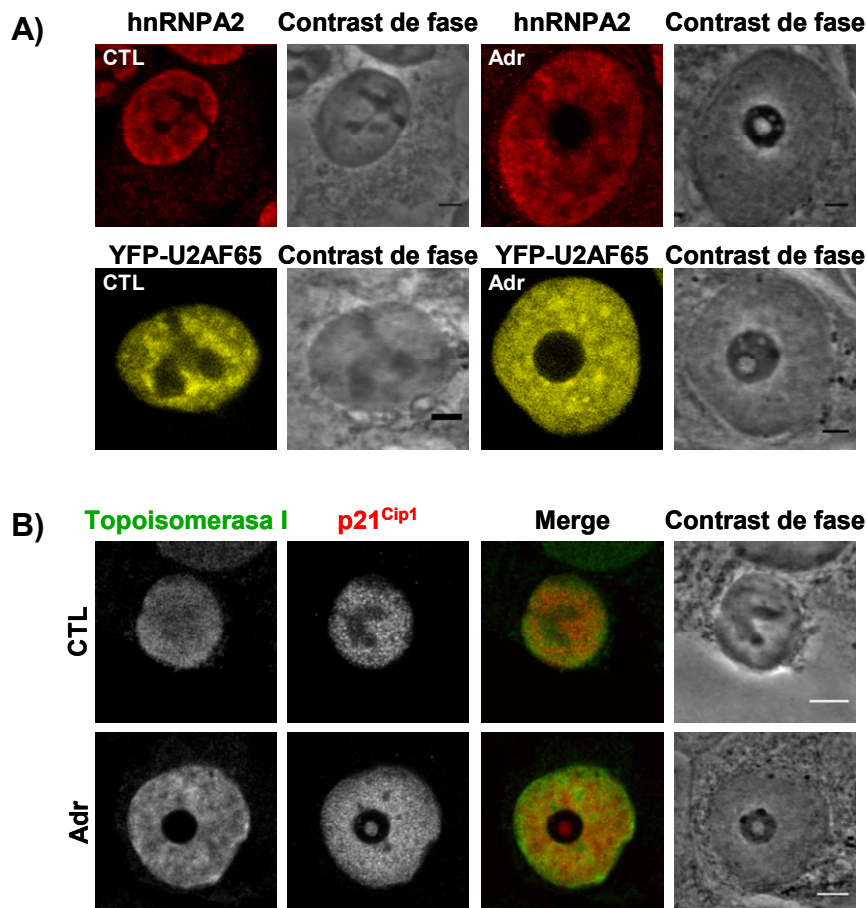


Figura II.27: Altres proteïnes nuclears no es localitzen en els INoBs. (A) Immunodetecció de hnRNPA2 (vermell) i anàlisi de la localització de YFP-U2AF65 (groc) en cèl·lules HCT116 control o tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. El plàsmid YFP-U2AF65 va ser transfectat a les cèl·lules i 24 hores després de la transfecció les cèl·lules es van sotmetre al tractament amb Adr. Barra, 3 µm. **(B)** Immunodetecció de la topoisomerasa I (verd) i p21^{Cip1} (vermell) en cèl·lules HCT116 control o tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. Barra, 5 µm. En tots dos casos es mostren també les imatges corresponents amb contrast de fase.

Així doncs, la localització al nuclèol després del dany al DNA no és característica de totes les proteïnes nuclears; a més, aquests resultats també indiquen que el nucleoplasma i el nuclèol tenen una composició proteica diferent.

II.14 La formació dels INoBs i la localització en el nuclèol de les proteïnes del *checkpoint* de dany al DNA i reguladores del cycle cel·lular després del dany al DNA és dependent de p21^{Cip1}

La següent qüestió que ens vam plantejar va ser analitzar si era necessària la presència de p21^{Cip1} per tal que tingués lloc la segregació dels components nucleolars, la formació del INoB i la localització de les proteïnes del *checkpoint* de dany al DNA i reguladores del cycle cel·lular.

II.14.1 La desorganització del nuclèol és independent de p21^{Cip1}

L'anàlisi d'immunocitoquímiques anti-fibril·larina i anti-UBF en cèl·lules HCT116 tractades durant diferents temps amb Adr ens va permetre observar que la desorganització del nuclèol després del dany al DNA no era dependent de p21^{Cip1}. És cert que p21^{Cip1} sempre està present en els nuclèols que tenen la fibril·larina i UBF localitzats a la perifèria nucleolar, i que per tant cal una prèvia desorganització nucleolar abans que p21^{Cip1} es localitzi en el INoB; però d'altra banda, si que podem observar cèl·lules amb el nuclèol desorganitzat després de tractaments amb Adr i sense presència de p21^{Cip1} en el nuclèol, aquest fet ens indica que la desorganització del nuclèol és independent de p21^{Cip1}.

A més, immunocitoquímiques de cèl·lules sotmeses a tractaments curts amb Adr mostren que només amb 3 hores de tractament ja hi ha indicis de desorganització nucleolar i localització perifèrica de la fibril·larina i de l'UBF, i en canvi, a 3 hores de tractament amb Adr pràcticament no s'observa increment dels nivells de p21^{Cip1} tal i com es pot veure en les immunocitoquímiques de la figura II.28 o en el Western blot de la figura II.3.

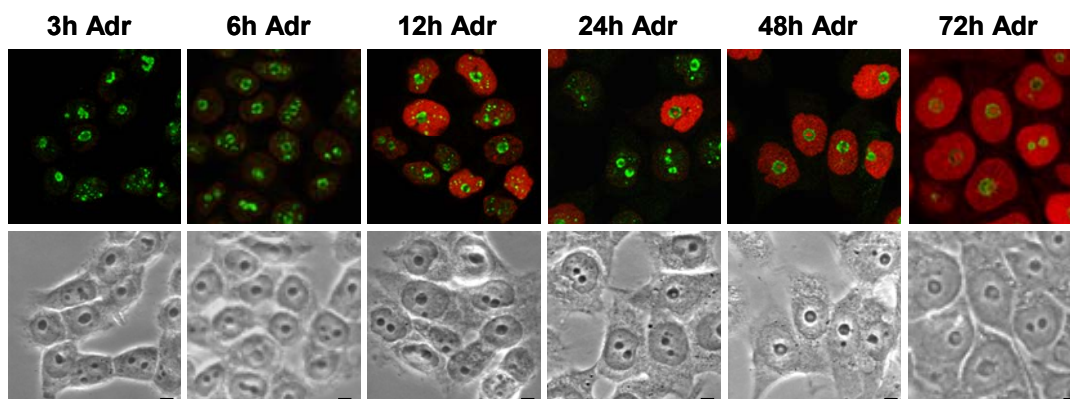


Figura II.28: La desorganització del nuclèol induïda per Adr és independent de la presència de p21^{Cip1}. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant diferents temps, com s'indica a la figura. Imatges sobreposades de la immunodetecció de fibril·larina (verd) i de p21^{Cip1} (vermell). També es mostren les imatges corresponents obtingudes amb el contrast de fase. Barra, 5 µm.

Aquests resultats van ser confirmats en experiments realitzats en les cèl·lules HCT116 deficientes en $p21^{Cip1}$ (HCT116 $p21^{-/-}$). Les immunocitoquímiques de les cèl·lules HCT116 $p21^{-/-}$ tractades amb Adr, indiquen que el comportament de la fibril·larina i de l'UBF era similar al de les cèl·lules HCT116 en resposta al dany al DNA, ja que aquests dos components també segregaven cap a la perifèria nucleolar (Figura II.29).

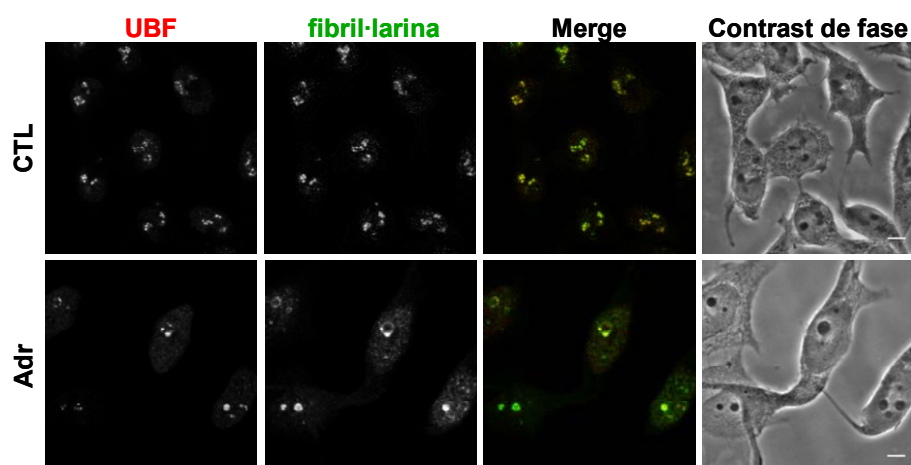


Figura II.29: La desorganització del nuclèol induïda per Adr és independent de la presència de $p21^{Cip1}$. Immunocitoquímica anti-UBF (vermell) i anti-fibril·larina (verd) de cèl·lules HCT116 $p21^{-/-}$ control i cèl·lules HCT116 $p21^{-/-}$ tractades amb 0,15 $\mu\text{g/ml}$ d'Adr durant 48 hores. També es mostren les imatges corresponents obtingudes amb el contrast de fase. Barra, 5 μm .

II.14.2 $p21^{Cip1}$ participa en la formació del INoB

Tot i que la presència de $p21^{Cip1}$ no sigui necessària per a la desorganització nucleolar, sembla que $p21^{Cip1}$ sí que tindria un paper important en la formació i engrandiment del INoB, ja que la formació de l'estructura intranucleolar visible en contrast de fase apareix disminuïda en les cèl·lules HCT116 $p21^{-/-}$, indicant que $p21^{Cip1}$ participa de manera positiva en la formació i engrandiment del INoB (Figura II.30). A més, el nombre de INoBs observats en les cèl·lules HCT116 $p21^{-/-}$ (17%) tractades amb Adr es veu clarament disminuït en comparació amb les cèl·lules HCT116 (62%). D'altra banda, en les imatges de contrast de fase, també s'observa una clara disminució de la mida dels INoBs en les cèl·lules HCT116 $p21^{-/-}$. Totes aquestes observacions indiquen que $p21^{Cip1}$ participa positivament en la formació i en l'engrandiment dels INoBs.

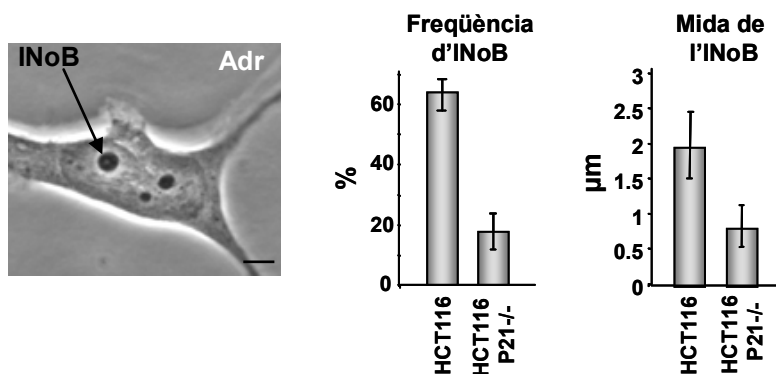


Figura II.30: La p21^{Cip1} afavoreix la formació i l'engrandiment del INoB. Detall d'una cèl·lula HCT116p21^{-/-} tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores on es mostra mitjançant contrast de fase la formació reduïda d'un INoB. Barra, 5 µm. Quantificació de la freqüència (%) i de la mida (µm) dels INoBs de les cèl·lules HCT116 i HCT116 p21^{-/-} tractades amb Adr. Les cèl·lules van ser observades amb contrast de fase i la mida dels INoBs es va calcular com l'amplada a la meitat de la intensitat màxima (*Full Width at Half Maximum*, FWHM). Les barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3). Es van analitzar més de 100 cèl·lules per condició i per experiment.

Immunocitoquímiques en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb Adr, mostren com aquestes cèl·lules també són deficientes en la localització nucleolar de les proteïnes del *checkpoint* de dany al DNA (p53 i mdm2) i reguladores del cicle cel·lular (PCNA) (Figura II.31).

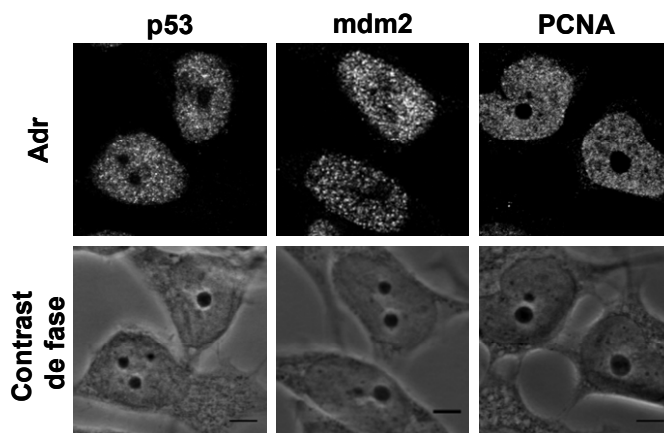


Figura II.31: Les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} no presenten localització de p53, mdm2 i PCNA en el nuclèol. Immunocitoquímiques de p53, mdm2 i PCNA de cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores on es mostra mitjançant contrast de fase la formació reduïda d'un INoB. Barra, 5 µm.

Vam voler analitzar si la reintroducció de p21^{Cip1} podia recuperar parcialment la formació dels INoBs en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}. Vam transfectar aquestes cèl·lules amb GFP-p21WT i les vam tractar amb Adr, seguidament vam calcular el percentatge de cèl·lules que presentaven una mida dels INoBs comparables a les

cèl·lules HCT116, aproximadament de 2µm de diàmetre. La formació dels INoBs en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} transfectades amb GFP-p21^{WT} es va recuperar parcialment ja que un 24±5% de les cèl·lules transfectades presentaven un INoB de tamany similar a les cèl·lules HCT116; en canvi, com acabem de veure en la figura II.30, en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} no transfectades només un 17% de les cèl·lules presenta INoB d'un diàmetre inferior a 1µm.

II.14.3 La presència de p21^{Cip1} en el INoB dificulta la recuperació de l'estructura nucleolar

A continuació vam voler analitzar com afectava a l'estructura nucleolar tractaments curts amb ADR seguits d'un temps de recuperació. D'una banda, ja havíem observat com només amb 3 hores de tractament alguns dels nuclèols ja estaven desorganitzats i presentaven segregació perifèrica de la fibril·larina i de l'UBF; d'altra banda, els resultats obtinguts en el Western blot de la figura II.3 indicaven que a 3 hores de tractament els nivells de p21^{Cip1} no havien augmentat gaire respecte els nivells de les cèl·lules no tractades però sí que augmentaven després de retirar l'ADR i afegir medi nou a les cèl·lules.

Aquests resultats es van confirmar amb immunocitoquímies de p21^{Cip1} i fibril·larina de cèl·lules tractades durant 3 hores i deixades a recuperar. Igual que en el Western blot, a les 3 hores de tractament observem poques cèl·lules que tinguin expressió elevada de p21^{Cip1}; però després de tractar les cèl·lules durant 3 hores, retirar l'ADR i deixar que les cèl·lules continuïn creixent en medi fresc, vam poder observar un augment dels nivells de p21^{Cip1} i vam poder observar com aquesta p21^{Cip1} també es localitzava en els nuclèols d'alguna de les cèl·lules. (Figura II.32). Una dada interessant d'aquestes immunocitoquímies va ser l'observació que tant la fibril·larina com l'UBF es recuperaven després del tractament amb ADR i es relocalitzaven seguint el mateix patró que en les cèl·lules no tractades tot formant punts dispersos dins del nuclèol, però sorprenentment aquesta recuperació només era possible si la p21^{Cip1} no estava present en el nuclèol. Per tant, vam poder concloure que la presència de p21^{Cip1} en el nuclèol correlacionava amb un retard en la reorganització nucleolar com indiquen les fletxes de la figura II.32.

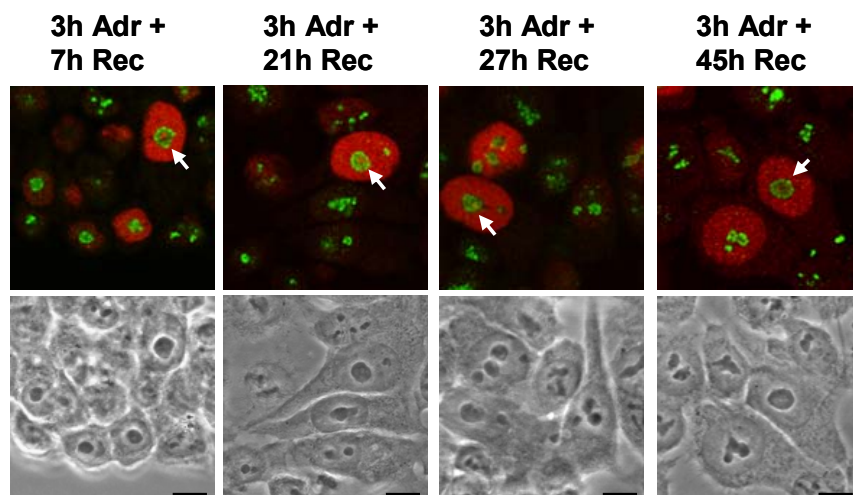


Figura II.32: La presència de p21^{Cip1} en els INoBs dificulta la recuperació de l'estructura nucleolar després d'eliminar l'Adr del medi. Cèl·lules HCT116 van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 3 hores i passat aquest temps es va retirar l'Adr del medi i es va afegir medi fresc a les cèl·lules. Després de diferents temps de recuperació (Rec) vam fixar les cèl·lules. Imatges sobreposades de la immunodetecció de fibril·larina (verd) i de p21^{Cip1} (vermell). També es mostren les imatges corresponents obtingudes amb el contrast de fase. Les fletxes indiquen cèl·lules amb localització nucleolar de p21^{Cip1} que encara no han recuperat l'organització normal de la fibril·larina. Barra, 5 µm.

II.15 SUMO-1 i p21^{Cip1} colocalitzen en el mateix compartiment nucleolar després del tractament amb ADR

S'ha descrit que la sumoïlació de proteïnes és important per al manteniment de l'estructura nuclear i nucleolar (Heun, 2007), és per aquest motiu que ens vam interessar en l'estudi de SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier-1*) en el nostre model de dany al DNA.

II.15.1 Colocalització de SUMO-1 i p21^{Cip1} en el INoB

En primer lloc vam analitzar si SUMO-1 colocalitzava amb p21^{Cip1} en el nuclèol en resposta a ADR. Vam realitzar immunocitoquímiques de SUMO-1 i p21^{Cip1} en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR fent servir dos anticossos diferents de SUMO-1. En les cèl·lules no tractades, s'observa localització de SUMO-1 en el nucleoplasma i el marcatge que s'observa és tènue; en les cèl·lules tractades també s'observa un marcatge tènue en el nucleoplasma i a més apareix un marcatge molt fort en el INoB en un elevat percentatge de les cèl·lules on colocalitza amb p21^{Cip1}.

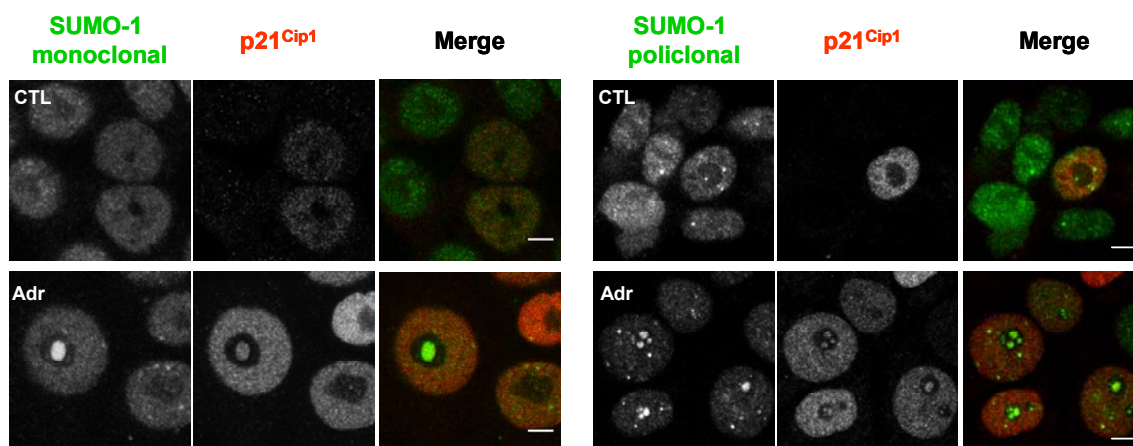


Figura II.33: SUMO-1 colocalitza amb p21^{Cip1} en els INoBs de les cèl·lules tractades amb Adr. Immunocitoquímica anti-SUMO-1 (monoclonal) i anti-p21 (policlonal) o anti-SUMO-1 (policlonal) i anti-p21 (monoclonal) de cèl·lules HCT116 control (CTL) o tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores (Adr). Barra, 5 µm.

L'observació de la localització de SUMO-1 amb experiments d'*immunogold* i microscòpia electrònica, van confirmar els resultats obtinguts per immunocitoquímica ja que indiquen que els INoBs formats després del dany al DNA i situats en l'interior d'un interstici nucleolar contenen SUMO-1 (Figura II.34).

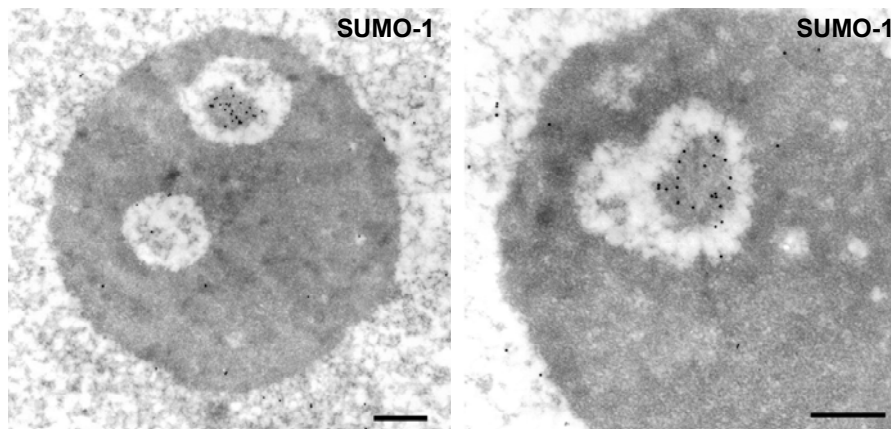


Figura II.34: Concentració de SUMO-1 en els INoBs de les cèl·lules tractades amb Adr. Microscòpia electrònica de partícules d'or (immunogold) per a detectar la presència de SUMO-1 en el INoB d'una cèl·lula tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24h. Les fotografies mostren un típic nuclèol compactat amb intersticis en el nuclèol on hi trobem els INoBs i el marcatge amb partícules d'or corresponent a SUMO-1. Barra, 0,5 µm.

II.15.2 GFP-SUMO-1 també es localitza en el INoB

A continuació, vam transfectar les cèl·lules HCT116 amb GFP-SUMO-1 i vam observar el comportament de GFP-SUMO-1 en resposta al tractament amb Adr. En les cèl·lules control, GFP-SUMO-1 mostrava un patró difús pel nucleoplasma; en canvi, després del tractament amb Adr, GFP-SUMO-1 es localitzava preferentment en

RESULTATS II

el INoB on colocalitzava amb p21^{Cip1}. A més, com era d'esperar, GFP-SUMO-1 també es localitza en l'embolcall nuclear ja que com s'ha descrit anteriorment, diferents enzims sumoïladors i desumoïladors cicle a través dels complexos del porus nuclears on podrien estar sumoïlant les pròpies proteïnes dels complexos dels porus nuclears (revisat a (Palancade and Doye, 2008)) (Figura II.35).

Aquest canvi de localització de GFP-SUMO-1 en resposta al dany al DNA, no s'observa si transfectàvem les cèl·lules amb GFP-SUMO-1 Δ Gly-Gly, un mutant de SUMO-1 que no es pot unir covalentment a les proteïnes. Aquest fet indica que el SUMO-1 localitzat en el INoB després del dany al DNA es tracta de SUMO-1 conjugat a proteïna (Figura II.35). Així doncs, aquests resultats van confirmar els obtinguts per immunocitoquímica i *immunogold*.

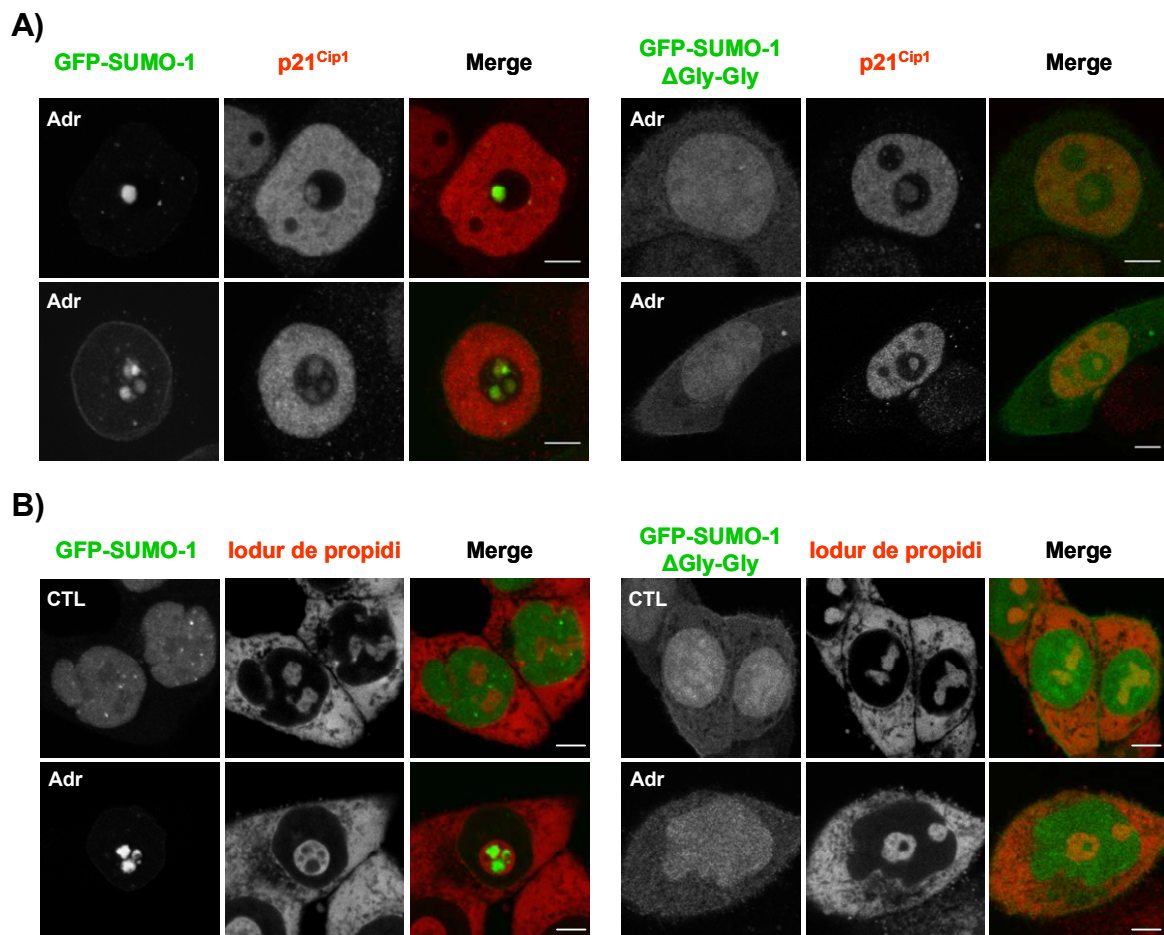


Figura II.35: GFP-SUMO1 es localitza en el INoB després del tractament amb Adr. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb GFP-SUMO-1 o GFP-SUMO-1 Δ Gly-Gly i 24 hores després de la transfecció van ser tractades amb 0,15 μ g/ml Adr durant 24 hores. (A) Immunodetecció de p21^{Cip1} amb un anticòs anti-p21 policlonal i (B) tinció amb Iodur de propidi. Les imatges mostren com només GFP-SUMO-1 colocalitza amb la p21^{Cip1} endògena i es localitza en els INoBs. Barra, 5 μ m.

II.15.3 UBC9 es localitza en el INoB en resposta al dany al DNA

Finalment, vam voler analitzar si UBC9, l'únic enzim E2-conjugador descrit essencial per a la sumoïlació, també es localitzava en el nuclèol després del tractament amb Adr. La immunocitoquímica doble amb un anticòs anti-UBC9 i un anticòs anti-p21 mostra com UBC9 també està present en el nuclèol de les cèl·lules tractades amb Adr i dins el nuclèol s'observa una mica més d'intensitat de marcatge en el INoB (Figura II.36). Aquests resultats indiquen que en les cèl·lules tractades hi ha activitat sumoïladora i a més, sembla que en presència de dany al DNA es produeix un increment d'aquesta activitat.

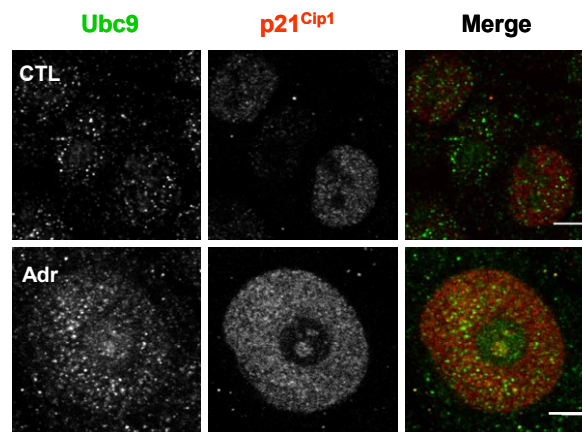


Figura II.36: Ubc9 també es localitza en el INoB després del tractament amb Adr. Immunocitoquímica anti-Ubc9 (verd) i anti-p21 (vermell) de cèl·lules HCT116 control i cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml Adr durant 48h. Barra, 5 µm.

En resum, després de la inducció de dany al DNA, p21^{Cip1} s'acumula en els INoBs els quals també contenen proteïnes sumoïlades. Entre les proteïnes que també hem observat en el INoB, PCNA i p53, s'han descrit que són sumoïlades en resposta al dany al DNA (Papouli *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2007). Tot i que p21^{Cip1} no conté una seqüència consens de sumoïlació, serà interessant analitzar si p21^{Cip1} es sumoïlita en resposta al tractament amb Adr.

II.16 L'acumulació de p21^{Cip1} en el nuclèol correlaciona amb una disminució del seu transport entre el nucli i el citoplasma

La següent qüestió que vam analitzar va ser si la desorganització nucleolar després del dany al DNA podria estar afectant a l'export actiu de p21^{Cip1} a fora del nucli. Aquest transport de p21^{Cip1} del nucli al citoplasma estaria present en condicions

RESULTATS II

normals i implicaria un pas de la proteïna a través del nuclèol, tal i com ja s'havia suggerit que passava per a la proteïna p53 (Sherr and Weber, 2000).

En primer lloc, vam transfectar les cèl·lules HCT116 amb HA-p21WT en lloc de GFP-p21WT, per tal d'evitar la gran afinitat de GFP per a localitzar-se en el nucli. Vam quantificar el percentatge de cèl·lules que expressaven HA-p21WT en el citoplasma en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb Adr. Com s'observa en la figura II.37, en condicions control, el 77% de les cèl·lules transfectades expressen p21^{Cip1} en el nucli i en el citoplasma, en canvi, després de 48 h de tractament amb Adr el percentatge de cèl·lules que expressen p21^{Cip1} en els dos compartiments cel·lulars disminueix fins a un 10%, indicant que el tractament amb Adr afavoreix la localització nuclear de p21^{Cip1}.

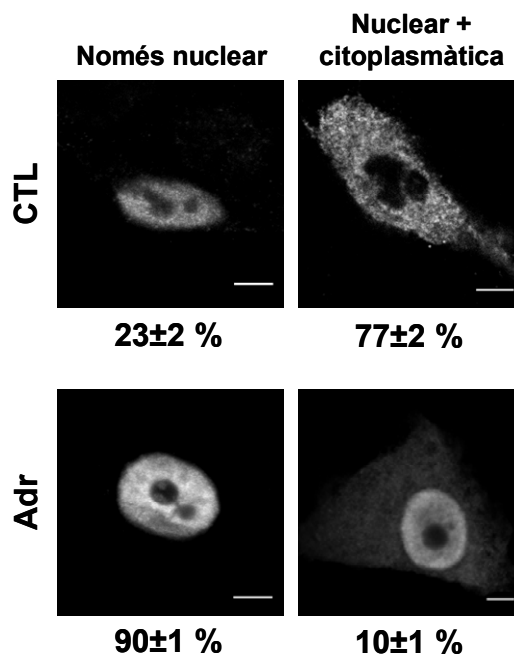


Figura II.37: El tractament amb Adr disminueix la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}. Immunodetecció anti-HA de cèl·lules HCT116 transfectades amb HA-p21WT i tractades o no amb 0,15 µg/ml Adr durant 24h. Imatges de cèl·lules representatives amb expressió d'HA-p21WT només en el nucli o en el nucli i en el citoplasma. En cada imatge s'indica el percentatge de cèl·lules que presenten el patró determinat d'expressió d'HA-p21WT en relació al total de cèl·lules transfectades per a cada condició experimental (promig ± desviació estàndard). (n=3). Barra, 5 µm.

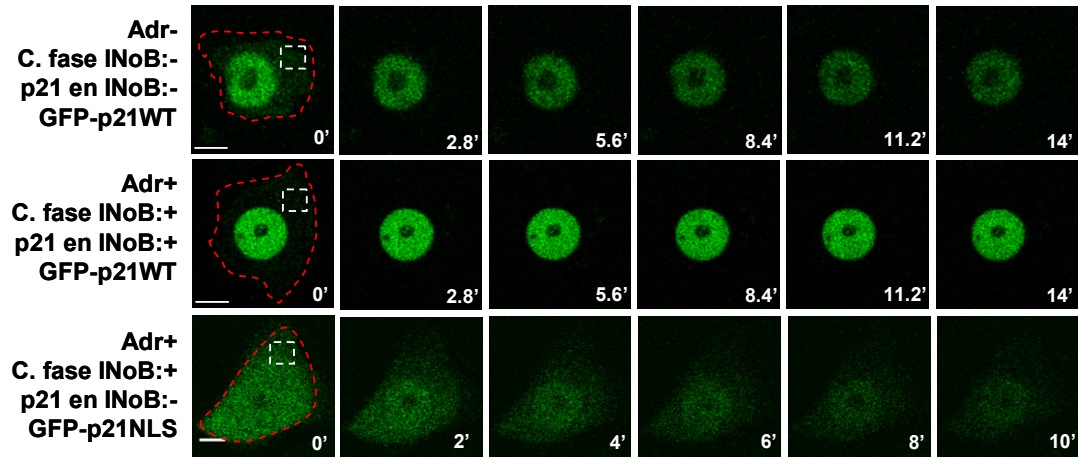
Per tal d'analitzar el transport de p21^{Cip1} entre el nucli i el citoplasma vam fer servir tècniques de FLIP. El nostre objectiu va ser analitzar si l'acumulació nuclear de p21^{Cip1} que observàvem amb el tractament amb Adr era resultat d'una reducció en l'export nuclear de p21^{Cip1} i si correlacionava amb la presència de p21^{Cip1} en el INoB. Vam transfectar cèl·lules HCT116 amb GFP-p21WT i vam fotoextingir repetidament una àrea del citoplasma de les cèl·lules transfectades, vam realitzar l'experiment en

cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb Adr i en tots dos casos vam analitzar cèl·lules amb INoB positiu per a p21^{Cip1} i sense INoB. Vam capturar una imatge de la fluorescència corresponent abans de la fotoextinció i després de cada pols de fotoextinció. Per tal de calcular la mobilitat de p21^{Cip1} cap a fora del nucli en cada una de les condicions, vam analitzar la baixada d'intensitat fluorescent del nucli al llarg de tot l'experiment.

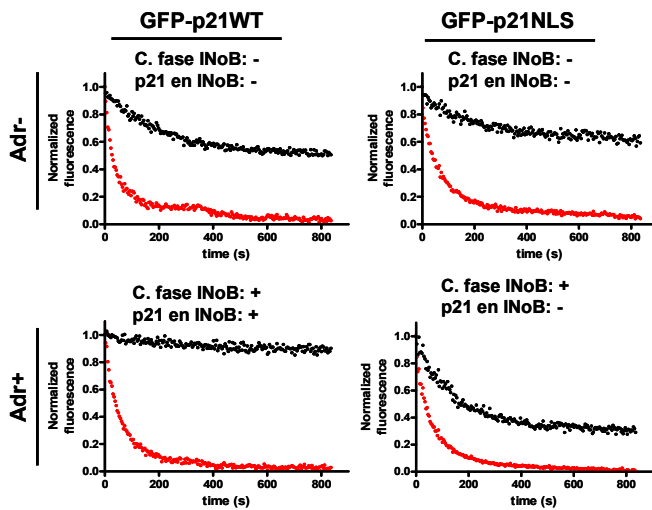
Com s'observa en la figura II.38 la fracció mòbil de sortida de p21^{Cip1} cap a fora del nucli en les cèl·lules que tenen p21^{Cip1} en el nuclèol disminueix significativament respecte a les cèl·lules que no tenen p21^{Cip1} en el nuclèol. A més, aquesta disminució de la fracció mòbil nuclear té lloc independentment del tractament amb Adr ja que s'observa tant en cèl·lules tractades com en cèl·lules no tractades. D'una banda observem com l'export nuclear de p21^{Cip1} en cèl·lules tractades amb Adr i que presenten p21^{Cip1} en el nuclèol és inferior que l'export de les cèl·lules tractades sense p21^{Cip1} en el nuclèol i d'altra banda, l'export nuclear de p21^{Cip1} també es veu reduït en aquelles poques cèl·lules no tractades que presenten INoBs positius per a p21^{Cip1}. Aquests resultats suggereixen que la reducció de l'export nuclear de p21^{Cip1} observat en resposta al tractament amb Adr és una conseqüència de la desorganització del nuclèol i no és un efecte general del tractament amb Adr.

Finalment, vam analitzar si l'export nuclear de proteïnes que no es localitzaven en el INoB també es veia afectat pel tractament amb Adr. Vam repetir els experiments de FLIP però en aquest cas vam blanquejar repetidament una àrea del citoplasma de les cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21NLS, que com ja hem vist en la figura II.12 té menor capacitat de localitzar-se en el INoB. Vam realitzar els experiments en les cèl·lules que expressaven GFP-p21NLS control i tractades amb Adr. En el cas de les cèl·lules tractades amb Adr vam analitzar aquelles que presentaven INoB visible en contrast de fase però que, en canvi, no tenien localització de GFP-p21NLS en el INoB. Com mostra la figura II.38, l'export nuclear de GFP-p21NLS no es veia reduït en aquelles cèl·lules tractades que presentaven INoB però que no acumulaven GFP-p21NLS en el nuclèol, a diferència del que havíem observat en les cèl·lules que expressaven GFP-p21WT. En les cèl·lules control, la fracció mòbil nuclear de GFP-p21NLS era similar a la de GFP-p21WT.

A)



B)



C)

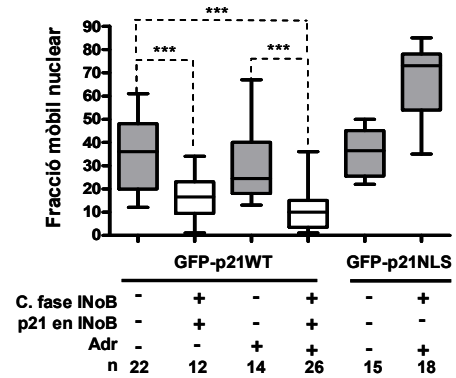


Figura II.38: La localització nucleolar de p21^{Cip1} correlaciona amb una disminució del seu export cap al citoplasma. Experiments de FLIP en cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT o GFP-p21NLS. Adr+/- indica 48 hores de tractament amb 0,15 µg/ml d'Adr o no tractament; C. Fase INoB +/- indica presència o absència de INoB observat per contrast de fase; p21 en INoB +/- indica la presència o absència de GFP-p21 en el INoB. **(A)** Imatges seleccionades de tres experiments de FLIP representatius per a les condicions analitzades. L'àrea de blanqueig es representa amb un quadrat blanc puntejat en el citoplasma. Barra, 10 µm. **(B)** Cinètica de la pèrdua de fluorescència de GFP-p21WT o GFP-p21NLS en les diferents condicions. Les gràfiques mostren les corbes d'un experiment representatiu on s'analitza la pèrdua de fluorescència del nucli (negre) i del citoplasma (vermell) al llarg de l'experiment. **(C)** Box plot i anàlisi estadístic (Test de Mann-Whitney) de les fraccions mòbils nuclears de GFP-p21WT i de GFP-p21NLS mesurades als 12 minuts després d'haver començat l'experiment per a cada una de les condicions analitzades. Les capses grises corresponen a cèl·lules sense GFP-p21 en el INoB; n= nombre de cèl·lules analitzades per a cada condició; *** = p<0,001. (Annex II vídeos 5, 6 i 7).

Així doncs, aquests resultats indiquen que la presència de INoB en el nuclèol de les cèl·lules HCT116 correlaciona amb una reducció de l'export nuclear de GFP-p21^{WT} quan està present en el nuclèol, però d'altra banda indiquen que l'export nuclear d'una proteïna que no s'acumula en el INoB no es veu afectat i per tant, indiquen que el transport general de proteïnes del nucli cap al citoplasma no es veu inhibit.

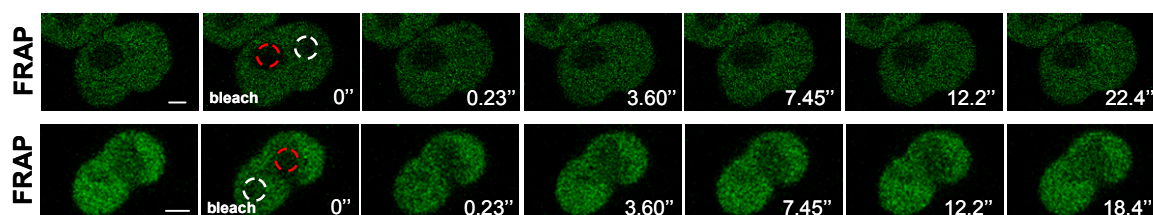
II.17 El nuclèol de les cèl·lules control està en contacte directe amb l'embolcall nuclear i és un lloc de pas per a p21^{Cip1}

II.17.1 p21^{Cip1} transita a través del nuclèol en absència de dany al DNA

Després d'haver observat una reducció de l'export de p21^{Cip1} en presència de dany, vam voler observar si p21^{Cip1} travessa els nuclèols quan aquests no estan desestructurats.

Vam repetir els anàlisis de FRAP que havíem fet anteriorment en presència de dany al DNA on analitzàvem la mobilitat de p21^{Cip1} entre el nuclèol i el nucleoplasma (Figura II.14). Vam realitzar els mateixos experiments en situació control, és a dir, en cèl·lules transfectades amb GFP-p21^{WT} en absència de dany al DNA. Tal i com era d'esperar, els nivells de GFP-p21^{WT} en el nuclèol eren molt baixos, però tot i així els experiments de FRAP mostren com en absència de dany al DNA p21^{Cip1} transita a través del nuclèol (Figura II.39).

A)



B)

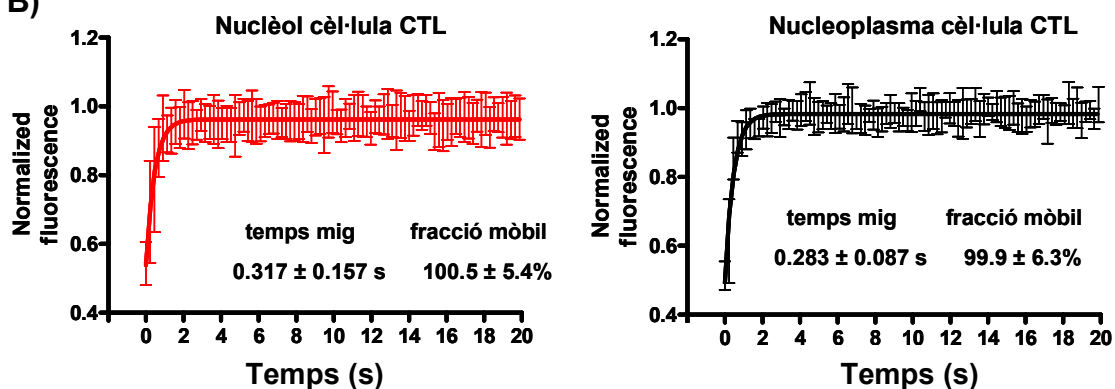


Figura II.39: GFP-p21WT transita a través del nuclèol i del nucleoplasma en cèl·lules control. Experiments de FRAP en cèl·lules HCT116 control transfectades amb GFP-p21WT. En cada una de les cèl·lules analitzades, vam blanquejar una àrea definida en el nuclèol i en el nucleoplasma. (A) Imatges de dues cèl·lules representatives que expressen GFP-p21WT i que no presenten INoB, sotmeses a anàlisi de FRAP. Barra, 3µm (B) Cinètica de la recuperació de la fluorescència en les àrees blanquejades del nuclèol (vermell) i del nucleoplasma (negre). Les corbes representen la mitja de tots els temps de 6 cèl·lules diferents de 2 experiments independents. Les barres d'error indiquen desviació estàndard. També s'indica el temps mig de recuperació de la fluorescència i la fracció mòbil (promig ± desviació estàndard). (Annex II vídeo 8)

II.17.2 Anàlisi del contacte entre els nuclèols i l'embolcall nuclear de les cèl·lules control

Com hem pogut observar en diferents imatges de cèl·lules control presentades fins al moment (figura II.17, II.20, II.27, entre d'altres), els nuclèols de les cèl·lules control tenen tendència a estar en contacte amb l'embolcall nuclear. A més, en les imatges de la figura II.9 i en la pel·lícula 1 de l'annex 1 s'observa clarament el contacte dels nuclèols amb l'embolcall nuclear i com quan les cèl·lules es tracten amb ADR, el contacte es perd i els nuclèols adopten una estructura més arrodonada. Aquestes observacions donen suport a la hipòtesi que els nuclèols podrien participar en l'export de proteïnes del nucli cap al citoplasma tal i com s'ha proposat per a l'export de les subunitats ribosòmiques.

La gràfica i les imatges de la figura II.40 mostren com al llarg del temps de tractament amb Adr, el percentatge de cèl·lules que tenen nuclèols en contacte amb l'embolcall nuclear disminueix, sent aproximadament d'un 68% en cèl·lules no tractades i al voltant del 5% en cèl·lules tractades durant 24 hores amb Adr. En canvi, el percentatge de cèl·lules que presenten INoB és inversament proporcional al percentatge de cèl·lules que presenten contacte entre els nuclèols i l'embolcall nuclear.

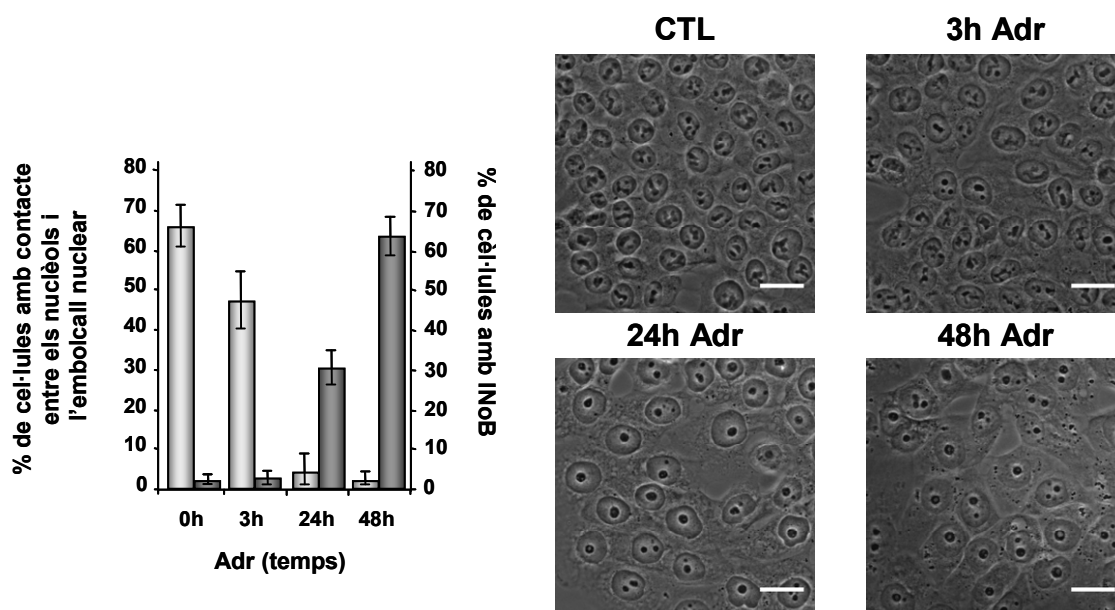


Figura II.40: El tractament amb Adr provoca la pèrdua progressiva de contacte entre nuclèol i embolcall nuclear i provoca una augment progressiu de la formació de INoBs en els nuclèols. Quantificació del percentatge de cèl·lules tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant diferents temps que tenen al menys un contacte entre el nuclèol i l'embolcall nuclear (eix de l'esquerra i barres gris fluix) i percentatge de les cèl·lules que tenen INoB en els nuclèols (eix de la dreta i barres fosques). Totes dues característiques van ser determinades amb l'observació de les cèl·lules amb el contrast de fase. Imatges representatives de contrast de fase de cada un dels temps analitzats. Barra, 5 µm. Barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3), com a mínim s'han analitzat 300 cèl·lules per experiment i per condició.

És interessant ressaltar que aquesta quantificació dels diferents tipus d'estructura nucleolar s'ha realitzar en imatges de dues dimensions (XY), ja que segurament, si s'hagués analitzat el percentatge de cèl·lules que presenten contacte entre els seus nuclèols i l'embolcall nuclear en les tres dimensions de l'espai, el percentatge hauria estat superior a l'obtingut. La figura II.41 mostra com la major part de les cèl·lules control i les cèl·lules recuperades després d'un tractament amb Adr presenten nuclèols relaxats, allargats i irregulars. Com s'observa a les imatges de les cèl·lules control i de les cèl·lules recuperades, aquests nuclèols estan en contacte amb l'embolcall nuclear i els porus nuclears, a més les projeccions en els eixos xz i yz

indiquen que en determinats moments els nuclèols també estan en contacte amb la part superior o inferior del nucli. Aquestes imatges contrasten amb les obtingudes en les cèl·lules tractades amb Adr ja que la majoria d'aquestes cèl·lules presenten nuclèols arrodonits i separats de l'embolcall nuclear, sense contacte amb els porus nuclears.

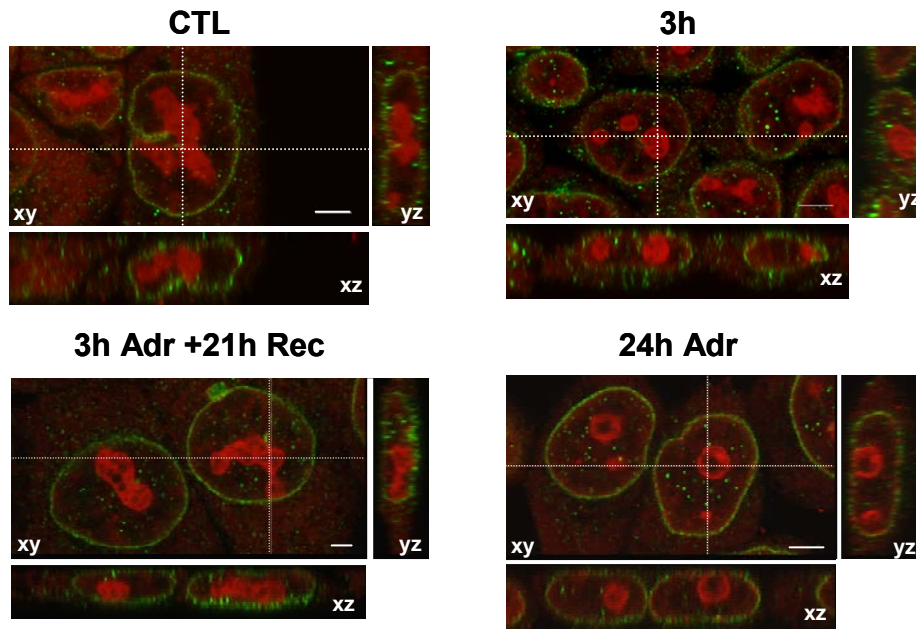


Figura II.41: El tractament amb ADR provoca la pèrdua progressiva del contacte entre el nuclèol i l'embolcall nuclear. Immunocitoquímica del complex del porus nuclear (verd) i tinció amb iodur de Propidi (vermell) de cèl·lules HCT116 control (CTL), tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR durant 3 hores o 34 hores, o bé tractades amb ADR durant 3 hores i deixades recuperar amb medi fresc durant 21 hores (3h ADR + 21h Rec). xy representació del pla mig de diferents seccions del nucli de les cèl·lules. També es mostra en cada cas la projecció en els eixos xz i yz obtingues a partir d'un conjunt d'imatges en el pla xy al llarg de tot el gruix del nucli. Barra, 5 µm.

Així doncs, aquests resultats donen suport a la hipòtesi que quan el nuclèol no està desestructurat, p21^{Cip1} podria estar transitant a través del nuclèol per tal de ser exportada cap al citoplasma. En canvi, aquesta via de pas de p21^{Cip1} sembla que es veurà afectada en el cas dels nuclèols desestructurats.

II.18 La inhibició de l'export de ribosomes indueix l'acumulació nucleolar de p21^{Cip1}

Existeix una via important de sortida de ribosomes des del nucli cap al citoplasma que transita a través del nuclèol (revisat en (Tschochner and Hurt, 2003)). D'altra banda, es creu que algunes proteïnes nuclears podrien estar fent servir

aquesta via d'export cap al citoplasma (Sherr and Weber, 2000). Per tal de provar si la $p21^{Cip1}$ podria fer servir la via d'export de ribosomes com a via de sortida del nucli i localitzar-se en el citoplasma, vam fer servir dues estratègies diferents que provocaven la inhibició de l'export de ribosomes cap al citoplasma.

En primer lloc, vam tractar les cèl·lules HCT116 amb Actinomicina D (ActD) a unes dosis que provoquen la inhibició de la transcripció dels rRNA i com a conseqüència el transport de les subunitats ribosòmiques del nucli al citoplasma queda inhibit (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1991). La quantificació de les cèl·lules HCT116 que expressen GFP-p21WT en el nuclèol respecte el total de cèl·lules transfectades indica que en resposta al tractament amb ActD, el percentatge de cèl·lules amb GFP-p21WT en els INoBs assoleix els mateixos nivells que després del tractament durant 24 hores amb Adr (Figura II.42). Paral·lelament, vam comprovar que aquesta acumulació de GFP-p21WT en resposta al tractament amb ActD no era resultat de que aquest tractament estigués induint dany cel·lular ja que el tractament amb ActD no provocava un augment dels nivells de fosforilació de H2AX. Així doncs, l'acumulació de GFP-p21WT en el nuclèol de les cèl·lules tractades amb ActD és resultat de la inhibició de la transcripció dels rRNAs.

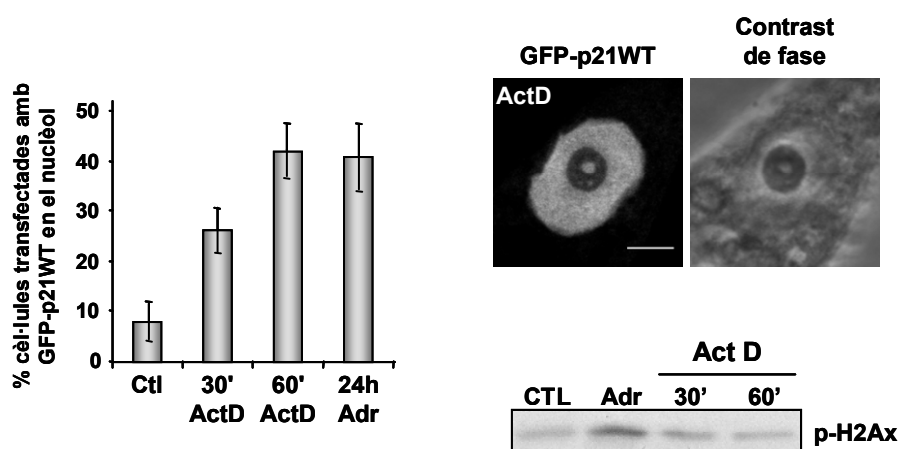


Figura II.42: Efecte de la inhibició de l'export de ribosomes sobre la distribució de $p21^{Cip1}$. Cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT van ser tractades amb actinomicina D (ActD), amb Adr o no es van tractar (Ctl). La gràfica mostra el percentatge de cèl·lules transfectades que presenten GFP-p21WT en els nuclèols respecte el total de cèl·lules transfectades per a cada una de les condicions experimentals. La imatge correspon a una cèl·lula representativa transfectada amb GFP-p21WT i tractada amb ActD, també es mostra la imatge corresponent amb contrast de fase on s'observa el INoB amb refringència diferent. Barra, 5 μ m. Western blot amb els nivells de P-H2AX per a cada una de les condicions, la mateixa quantitat de proteïna va ser carregada per a cada un dels carrils. Barres d'error indiquen desviació estàndard ($n=3$), com a mínim s'han analitzat 100 cèl·lules transfectades per experiment i per condició.

En segon lloc vam analitzar l'efecte de la transfecció de la proteïna nucleolar majoritària en el component granular, nucleofosmina (NPM), i d'un mutant d'aquesta (NPMdL) en les cèl·lules HCT116. D'una banda, s'ha descrit a la NPM com a una proteïna capaç de ciclar constantment entre el nucli, el nuclèol i el citoplasma i s'ha proposat com a responsable de la localització nucleolar de proteïnes que no contenen NoLS en la seva seqüència. D'altra banda, s'ha descrit que la NPM dirigeix l'esport del nucli al citoplasma de les subunitats ribosòmiques 40S i 60S i s'ha observat com el mutant dominant negatiu NPMdL inhibeix l'export nuclear d'aquestes dues subunitats ribosòmiques (Borer *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 2006; Maggi, Jr. *et al.*, 2008). Aquestes observacions ens van fer pensar que la transfecció del mutant NPMdL podria estar afectant a l'export de les altres proteïnes que facin servir la mateixa via d'export que les subunitats ribosòmiques.

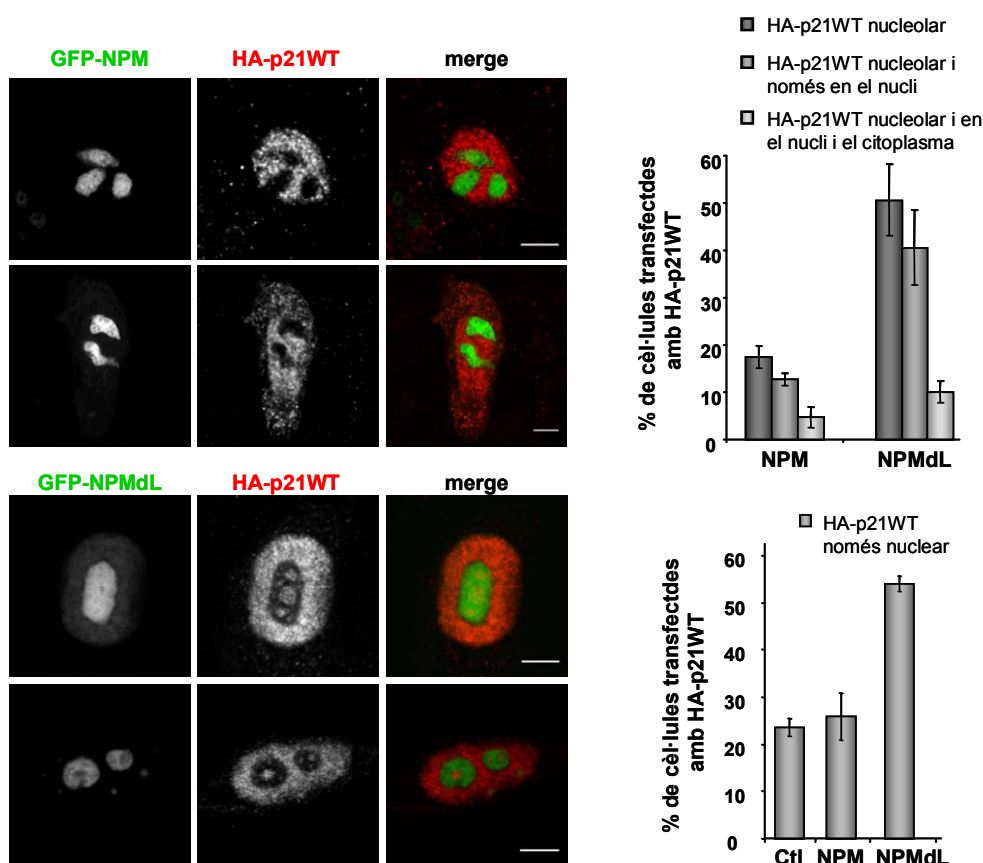


Figura II.43: La inhibició de l'export de ribosomes afecta a la distribució cel·lular de p21^{Cip1}. Cèl·lules HCT116 van ser transfectades amb HA-p21WT i amb GFP-NPM o GFP-NPMdL, 24 hores després de la transfecció es van fixar les cèl·lules i es va realitzar una immunocitoquímica anti-HA per a detectar la localització de HA-p21WT. Imatges representatives de la diferent localització de HA-p21WT. Barra, 5 µm. Els gràfics mostren la quantificació del percentatge de cèl·lules cotransfectades amb la localització de HA-p21WT que s'indica a la llegenda. Barres d'error indiquen desviació estàndard (n=3), com a mínim s'han analitzat 100 cèl·lules transfectades per experiment i per condició.

Vam transfectar les cèl·lules HCT116 amb HA-p21WT i GFP-NPM o GFP-NPMdL i vam observar els diferents patrons de localització de HA-p21WT. En les gràfiques de la figura II.43 s'observa com la cotransfecció de GFP-NPMdL indueix la localització nucleolar de HA-p21WT (51%) respecte a la cotransfecció amb GFP-NPM (18%); a més, la major part de les cèl·lules cotransfectades amb GFP-NPMdL i que presenten HA-p21WT en el nuclèol, tenen expressió de HA-p21WT majoritàriament nuclear (Figura II.43.B). D'altra banda, la cotransfecció de GFP-NPMdL augmenta la localització de HA-p21 en el nucli (Figura II.43.C).

II.19 Altres proteïnes que participen en diferents vies de modificació post-traducciona l de proteïnes també es localitzen en els nuclèols després del dany al DNA

II.19.1 INoB i PMLs

Treballs anteriors havien descrit la localització nucleolar de la proteïna PML (*promyelocytic leukemia*) en resposta al dany al DNA (Bernardi *et al.*, 2004; Condemine *et al.*, 2007), per aquest motiu, vam voler analitzar si PML també és localitzava en el nuclèol en el nostre model experimental. Immunocitoquímiques de cèl·lules HCT116 tractades amb ADR mostren com en resposta al dany al DNA augmenta la presència de PML dins del nucleoplasma i també s'observa la presència de PML dins del INoB (Figura II.44). Aquesta observació ens va semblar molt interessant ja que PML pot ser sumoïlada i al mateix temps s'ha descrit que presenta dominis d'interacció amb altres proteïnes sumoïlades anomenats SIM (*SUMO-interaction motif*) que li permeten interaccionar amb la pròpia PML i amb altres proteïnes i formar una xarxa de proteïnes sumoïlades (revisat a (Heun, 2007)).

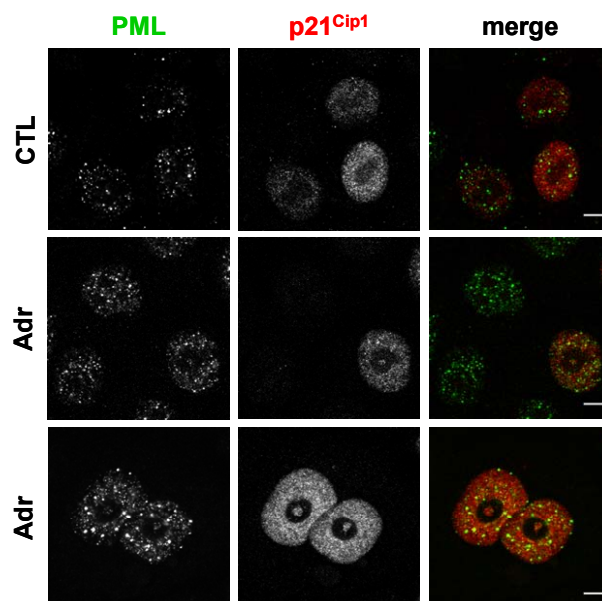


Figura II.44: PML es localitza en el nuclèol en resposta al tractament amb ADR.

Immunocitoquímica anti-PML i anti-p21 de cèl·lules HCT116 control i cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'ADR durant 24 hores. Barra, 5 µm. (A l'annex III, es mostren més imatges corresponents a immunocitoquímiques d'aquestes proteïnes).

II.19.2 INoB i degradació de proteïnes dependent i independent d'ubiquïtina

Seguidament, vam analitzar si observàvem presència de proteïnes relacionades amb altres vies de modificació post-traducciona en el INoB després del dany al DNA.

En primer lloc ens vam fixar amb la via de degradació de proteïnes, ja que d'una banda, la majoria de les proteïnes que hem observat en el INoB han de ser ubiquïtilades per tal de ser degradades; a més, en el cas de p53 i PCNA existeix un *cross-talk* entre Ub i SUMO, ja que totes dues modificacions es poden donar en el mateix residu (Papouli *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2007). Immunocitoquímiques de cèl·lules control i cèl·lules tractades amb ADR van posar de manifest que en el INoB també hi ha presència de ubiquïtina conjugada a proteïna (Ub-proteïna) i també de la maquinària de degradació proteica ja que observem presència de la subunitat 20S del proteasoma (Figura II.45.A i B).

És interessant recordar que p21^{Cip1} pot unir-se directament a la subunitat 20S del proteasoma, aquesta unió li permet a p21^{Cip1} degradar-se de manera independent d'ubiquïtina (Touitou *et al.*, 2001). Treballs posteriors postulen que per tal que tingui lloc la degradació independent d'ubiquïtina és necessària la unió de PA28γ a la subunitat 20S del proteasoma. La subunitat PA28γ o també anomenada REGγ, pertany a la família REG o 11S d'activadors del proteasoma que s'uneixen i activen a la subunitat 20S del proteasoma. S'ha descrit que PA28γ indueix la degradació de proteïnes de manera independent d'ubiquïtina i d'ATP (Zhou, 2006; Chen *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2008). A més, dos treballs de l'any 2007 demostren que PA28γ s'uneix p21^{Cip1} i promou la seva degradació de manera independent d'ubiquïtina i ATP (Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Curiosament, la unió entre p21^{Cip1} i PA28γ té lloc a través dels mateixos aminoàcids que els necessaris per a la interacció entre p21^{Cip1} i la subunitat 20S del proteasoma. Mitjançant immunocitoquímiques de cèl·lules tractades amb ADR, vam poder observar com la subunitat PA28γ colocalitza amb p21^{Cip1} en el INoB després del dany al DNA (Figura II.45.C).

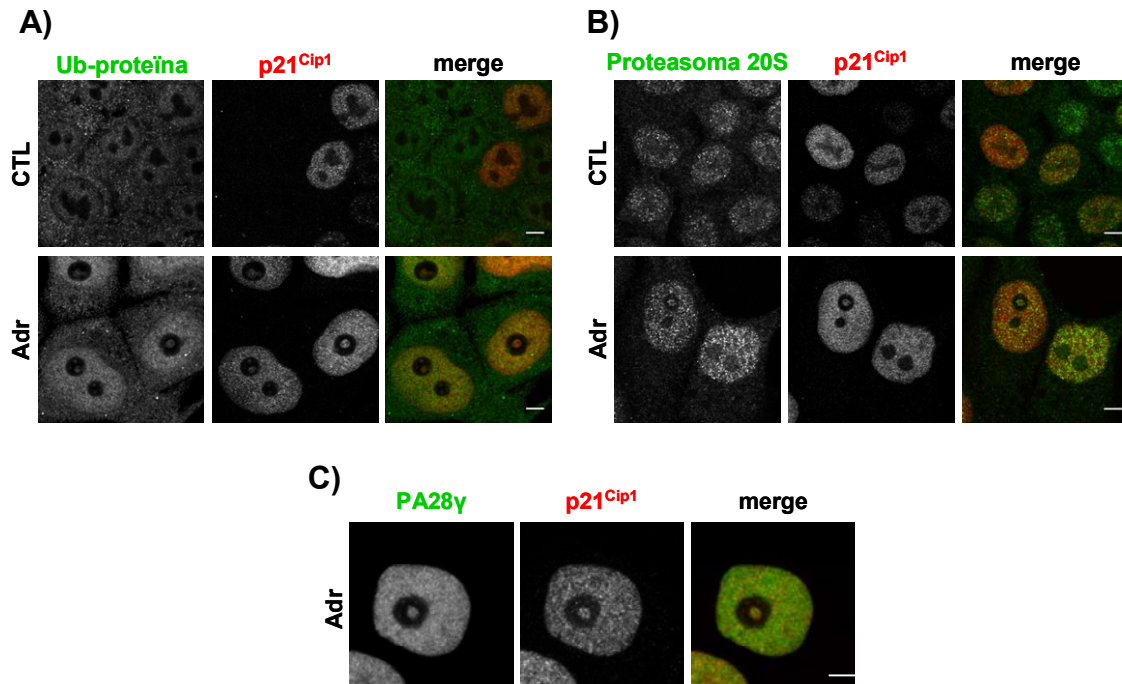


Figura II.45: El INoB conté proteïnes de la via de degradació proteica. Immunocitoquímica anti-Ub-proteïna conjugada (A), anti-proteasoma 20S (B) i anti-PA28γ (C) combinades amb immunocitoquímica anti-p21 de cèl·lules HCT116 control i cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. Barra, 5 µm. (A l'annex III, es mostren més imatges corresponents a immunocitoquímiques d'aquestes proteïnes)

II.19.3 INoB i acetilació de proteïnes

Finalment, vam analitzar la presència de l'acetilasa CBP en el INoB, ja que algunes de les proteïnes presents en el INoB, com per exemple p53, estan sotmeses a acetilació. Nombrosos estudis indiquen que l'activitat de l'acetil transferasa CBP/p300 és crítica en l'acetilació de p53 i en l'activació de p53 durant la resposta a estrès (revisat a (Gu *et al.*, 2004; Grossman, 2001)). Mitjançant immunocitoquímiques anti-CBP, vam poder observar com també hi ha presència d'aquesta acetilasa en el INoB després del tractament amb ADR (Figura II.46).

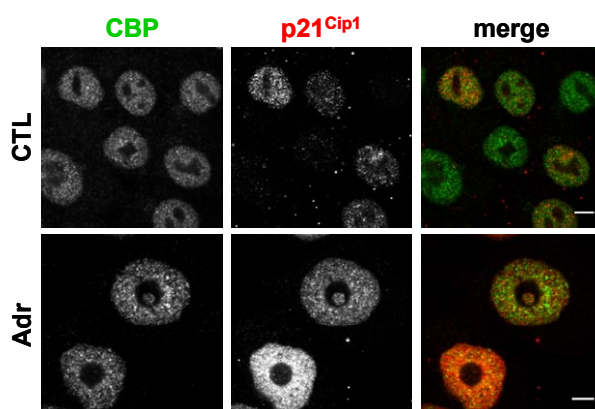


Figura II.46: L'acetilasa CBP es localitza en el nuclèol en resposta al tractament amb ADR. Immunocitoquímica anti-CBP i anti-p21 de cèl·lules HCT116 control i cèl·lules HCT116 tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. Barra, 5 µm. (A l'annex III, es mostren més imatges corresponents a immunocitoquímiques d'aquestes proteïnes)

RESULTATS II

Tots aquests resultats indiquen que en el INoB poden tenir lloc diferents mecanismes de modificació de proteïnes en resposta al dany al DNA. Aquests resultats només obren una nova d'hipòtesi de la funcionalitat del INoB, però caldria realitzar més aproximacions experimentals per tal de saber quines proteïnes són realment les modificades i quins canvis en la seva funcionalitat impliquen.

Annex I

Vídeos de la formació i la recuperació de l'INoB.

Vídeo 1: Estudi de la formació dels INoBs

Imatges de contrast de fase de cèl·lules HCT116 vives tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr. En cada imatge s'indica el temps (hores:minuts) després d'afegir Adr, sent el temps 00:00 el moment en que s'afegeix l'Adr a les cèl·lules. Barra, 5 µm.

Vídeo 2: Estudi de la recuperació dels INoBs

Imatges de contrast de fase de cèl·lules HCT116 vives en recuperació, després de ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 24h. En cada imatge s'indica el temps (hores:minuts) després de treure l'Adr del medi, sent el temps 00:00 el moment en que es treu l'Adr a les cèl·lules i s'afegeix medi nou. Barra, 5 µm.

Tots els vídeos es troben en el CD que acompanya aquesta tesi.

Annex II

Vídeos dels experiments de fotoextinció: FLIP i FRAP.

Vídeo 3: Estudi de la mobilitat de GFP-p21WT en el nuclèol de cèl·lules tractades amb Adr mitjançant experiments de FLIP

Cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. Vídeo representatiu d'un experiment de FLIP on es va seleccionar una cèl·lula amb localització nucleolar de GFP-p21WT. S'indica amb un cercle blanc l'àrea repetidament fotoapagada. El temps s'indica en segons. Barra, 5 µm.

Vídeo 4: Estudi de la mobilitat de GFP-p21WT en el nuclèol de cèl·lules tractades amb Adr mitjançant experiments de FRAP

Cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT van ser tractades amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. Vídeo representatiu d'un experiment de FRAP on es va seleccionar una cèl·lula amb localització nucleolar de GFP-p21WT. S'indica amb un cercle blanc l'àrea fotoextingida en el nucleoplasma i amb un cercle vermell l'àrea fotoextingida en el nuclèol. El temps s'indica en segons. Barra, 5 µm.

Vídeo 5, 6 i 7: Estudi de la mobilitat de GFP-p21WT entre el nucli i el citoplasma en cèl·lules control i en cèl·lules tractades amb Adr mitjançant experiments de FLIP

Experiments de FLIP en cèl·lules HCT116 transfectades amb GFP-p21WT o amb GFP-p21NLS i tractades o no amb Adr. (Vídeo 5) Cèl·lula representativa control transfectada amb GFP-p21WT. (Vídeo 6) Cèl·lula representativa transfectada amb GFP-p21WT i tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. (Vídeo 7) Cèl·lula representativa transfectada amb GFP-p21NLS i tractada amb 0,15 µg/ml d'Adr durant 48 hores. En tots els vídeos s'indica amb un quadrat blanc l'àrea repetidament fotoapagada. El temps s'indica en minuts:segons. Barra, 10 µm.

Vídeo 8: Estudi del trànsit de GFP-p21WT a través del nuclèol en cèl·lules control mitjançant experiments de FRAP

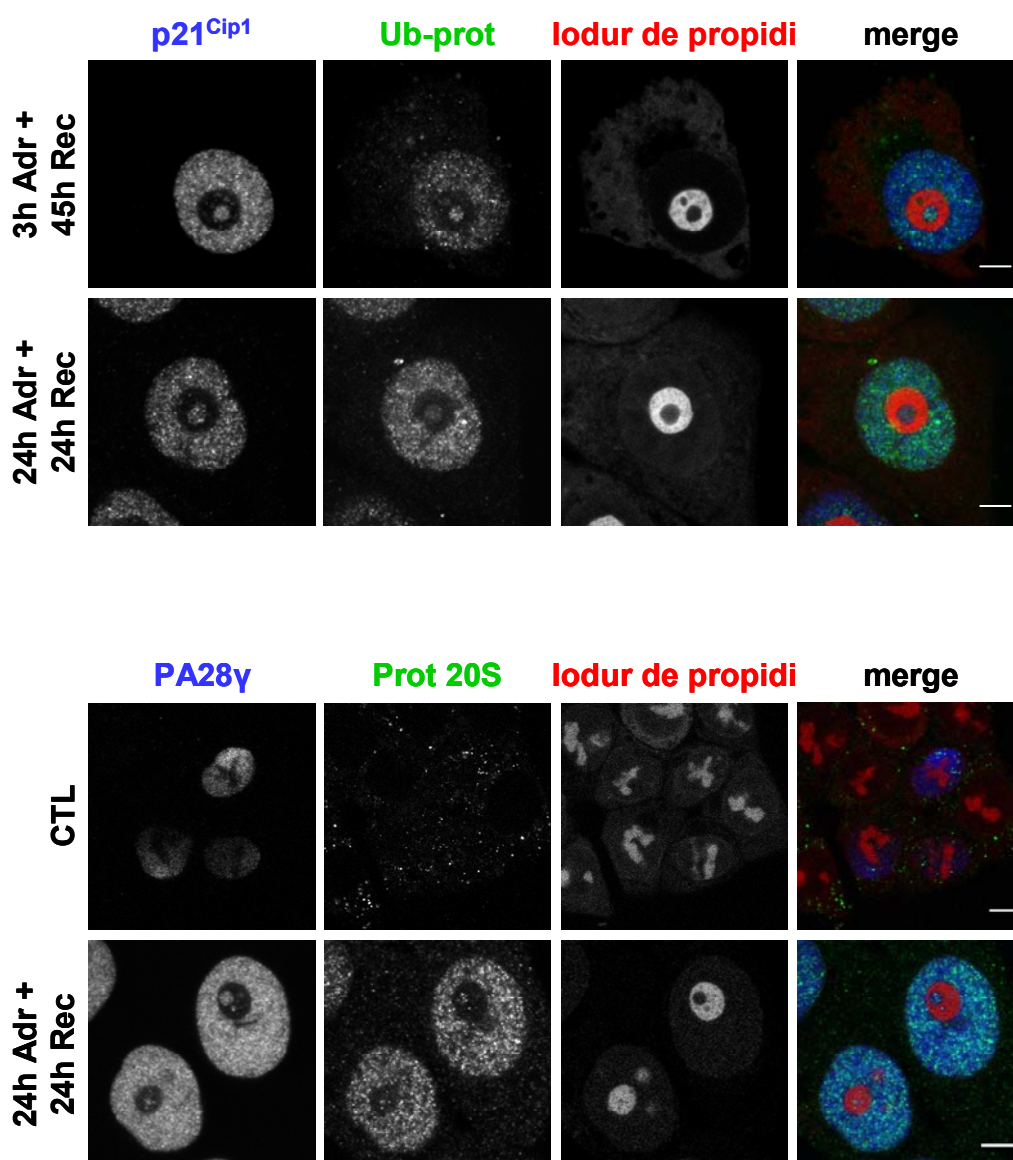
Cèl·lules HCT116 control transfectades amb GFP-p21WT. Vídeo representatiu d'un experiment de FRAP on es va seleccionar una cèl·lula control sense localització nucleolar de GFP-p21WT. S'indica amb un cercle blanc l'àrea fotoextingida en el nucleoplasma i en un cercle vermell l'àrea fotoextingida en el nuclèol. El temps s'indica en segons. Barra, 5 µm.

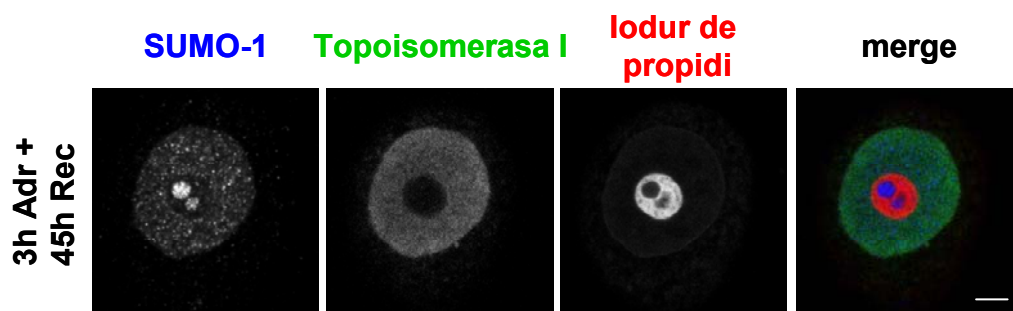
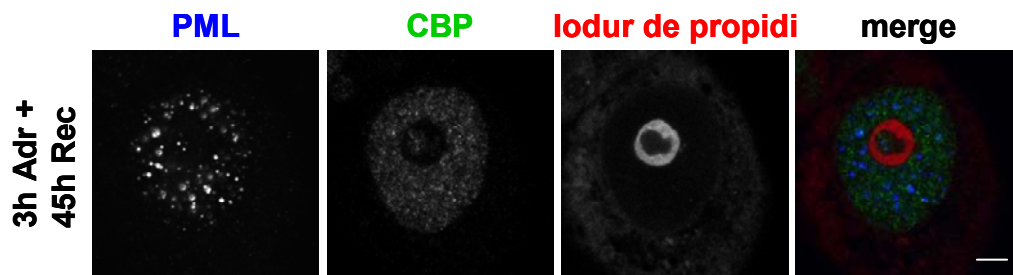
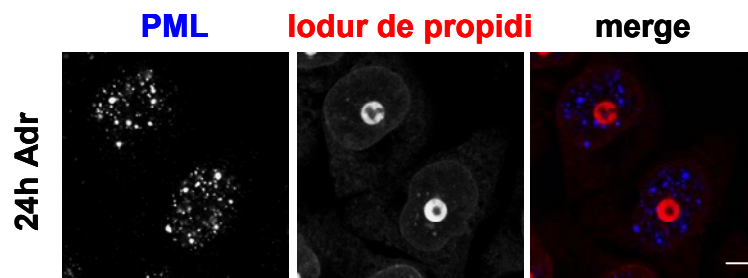
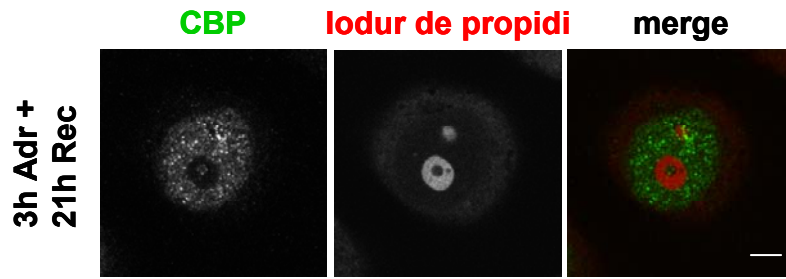
Tots els vídeos es troben en el CD que acompanya aquesta tesi.

Annex III

Immunocitoquímiques de proteïnes localitzades en el INoB en resposta al tractament amb Adr.

Immunocitoquímiques extres de les proteïnes observades en el nuclèol en resposta al dany al DNA. En cada imatge s'indica l'anticòs utilitzat i el temps de tractament amb Adr. S'ha seguit el mateix procediment que en les altres immunocitoquímiques. En totes les imatges: barra, 5 µm.





DISCUSSIÓ

Existeixen diverses evidències que indiquen que les diferents funcions descrites de p21^{Cip1} es deuen, en certa part, a la seva localització intracel·lular. Mentre que la p21^{Cip1} nuclear inhibeix la proliferació cel·lular, la p21^{Cip1} citoplasmàtica és capaç de regular la supervivència i la mobilitat cel·lular. El fet que les funcions de p21^{Cip1} en cada un dels compartiments cel·lulars tinguin papers oposats fa que sigui d'un gran interès l'estudi dels canvis de localització de p21^{Cip1} i els mecanismes que regulen aquesta translocació, així com les possibles vies que p21^{Cip1} pugui fer servir per a localitzar-se en els diferents compartiments cel·lulars.

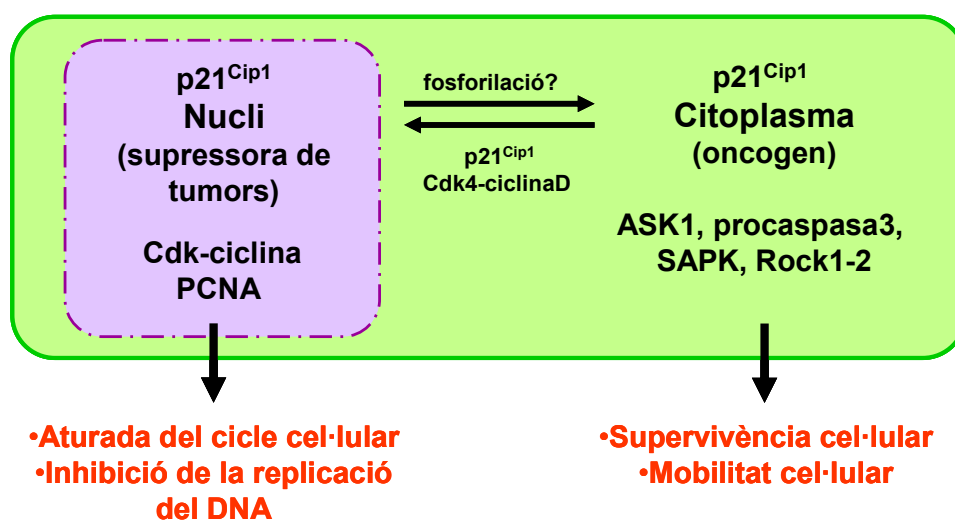


Figura 1: Esquema dels diferents papers p21^{Cip1} segons la seva localització cel·lular. Les funcions nuclears de p21^{Cip1} estan principalment relacionades amb la supressió de tumors ja que mitjançant la unió als complexos Cdk-ciclina i PCNA, p21^{Cip1} atura el cycle cel·lular i inhibeix la replicació del DNA, respectivament. En canvi, quan p21^{Cip1} es localitza en el citoplasma s'ha relacionat amb un paper com a oncogen ja que pot unir-se i inhibir les proteïnes pro-apoptòtiques ASK1, procaspasa 3 i SAPK i inhibir l'apoptosi; a més, la p21^{Cip1} citoplasmàtica també inhibeix la formació de les fibres d'estrès via inhibició de Rock1-2. També s'ha descrit que p21^{Cip1} en el citoplasma facilita l'assemblatge dels complexos formats per la ciclina D (Cdk4/6-ciclina D) i la seva translocació cap al nucli; a més, la unió de p21^{Cip1} preveu també l'export d'aquests complexos a fora del nucli. Segons els resultats d'aquesta tesi i altres treballs que discutirem tot seguit, la sortida de p21^{Cip1} del nucli cap al citoplasma podria estar regulada per diferents mecanismes, com per exemple la fosforilació.

1. Regulació de la localització nucli-citoplasma de p21^{Cip1} per la fosforilació per PKC en el residu Ser153

Treballs anteriors realitzats al nostre laboratori van descriure la unió entre la CaM i l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} i com, en fibroblasts, la inhibició de la CaM evitava la translocació del p21^{Cip1} cap al nucli (Taulés *et al.*, 1999). Posteriorment, treballs precedents a aquesta tesi van permetre la identificació del domini d'unió de

p21^{Cip1} amb la CaM, situat entre els aminoàcids 145-164 de la p21^{Cip1}, i van descriure a la p21^{Cip1} com a substrat de la cinasa PKC. Seguidament, es va observar com la presència de la CaM era capaç d'inhibir específicament la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC de manera dependent de Ca²⁺. És interessant recordar que altres proteïnes d'unió a CaM (CaMBPs), com per exemple la neurogranina, neuromodulina, MARKS o K-Ras, també contenen un residu dins el domini d'unió a la CaM que està sotmès a fosforilació. La unió de la CaM a aquestes proteïnes inhibeix la seva fosforilació, mentre que la fosforilació del residu situat dins el domini d'unió a CaM impedeix la unió d'aquesta. El fet que la CaM inhibeixi la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC és un nou exemple d'una CaMBP sotmesa a aquest tipus de regulació.

S'han descrit diverses fosforilacions de la proteïna p21^{Cip1} en els seus residus serina i treonina situats dins del domini d'unió a CaM (revisat a (Child and Mann, 2006)) i, almenys una d'aquestes fosforilacions s'ha vist implicada en la inhibició de la localització nuclear de p21^{Cip1} (Zhou *et al.*, 2001). A més, les isoformes de PKC, descrites fins al moment, encarregades de fosforilar a p21^{Cip1} (PKC η i PKC ζ) són independents de Ca²⁺ (Kashiwagi *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2002) i, per tant, són actives en moments en que la CaM no té la conformació adient per a unir-se a les CaMBPs. Així doncs, PKC η i PKC ζ podrien estar fosforilant a p21^{Cip1} en presència de baixes concentracions de Ca²⁺ en la cèl·lula, quan la CaM no s'hi pot unir.

Un dels primers objectius d'aquesta tesi va ser identificar el residu de p21^{Cip1} fosforilat per PKC i analitzar les implicacions d'aquesta fosforilació en la localització intracel·lular de p21^{Cip1}. Amb aquest objectiu vam analitzar, en primer lloc, la localització dels diferents mutants puntuals de p21^{Cip1} amb les serines i treonines presents en el domini d'unió a CaM substituïdes per un àcid aspàrtic amb la intenció d'imitar la fosforilació del residu. En les cèl·lules COS, la substitució de la Thr145, la Ser146 o la Ser160 a un àcid aspàrtic no tenia un efecte significatiu sobre la localització nuclear de GFP-p21; en canvi, quan el residu Ser153 era canviat a àcid aspàrtic vam poder observar una disminució significativa en el percentatge de cèl·lules amb p21^{Cip1} localitzada exclusivament en el nucli. Aquests resultats van ser confirmats amb l'anàlisi mitjançant *Western blot* de les diferents fraccions cel·lulars obtingues amb un mètode de fraccionament cel·lular posat a punt durant aquesta tesi. L'anàlisi de la localització dels dobles mutants ens indica que la mutació simultània dels residus Thr145 i Ser153 a àcid aspàrtic provoca un efecte additiu ja que observem encara un menor percentatge de cèl·lules que expressen el mutant únicament en el nucli, senyalant la tendència d'aquest mutant a localitzar-se en el citoplasma de les cèl·lules COS. La repetició dels experiments en cèl·lules NIH3T3 indica, que en aquest tipus

cel·lular, el mutant T145D també és important en la regulació de la localització de GFP-p21 ja que la mutació en aquest residu provoca una disminució de la localització nuclear de p21^{Cip1}. Tot i així, podríem dir que la fosforilació del residu Ser153 té un efecte més general, ja que la seva mutació (S153D) té efectes similars en els dos tipus cel·lulars analitzats, COS i NIH3T3. Probablement, les fosforilacions dels residus Thr145 i Ser153 col·laboren en la inhibició de la localització nuclear de p21^{Cip1}.

Seguidament, ens vam centrar en l'anàlisi de la fosforilació del residu Ser153 ja que fins al moment no s'havia descrit cap cinasa que fosforilés aquest residu, i per tant era un nou residu de p21^{Cip1} sotmès a fosforilació. La fosforilació del residu Thr145 ja havia estat descrita principalment per la cinasa Akt (Zhou *et al.*, 2001) tot i que altres cinases també poden fosforilar aquest residu. El paper de la fosforilació del residu Ser153 en la regulació de la localització nuclear de p21^{Cip1} va ser confirmat per l'anàlisi dels mutants fusionats a HA. Electroforesis de dues dimensions van posar de manifest la importància de la fosforilació en el residu Ser153, ja que quan HA-p21WT s'expressava en cèl·lules COS apareixen diferents *spots* que indicaven diferents estats de fosforilació de la proteïna. En canvi, els *spots* de fosforilació disminuïen dràsticament quan repetíem l'anàlisi amb el mutant HA-p21S153A, indicant que la Ser153 és un residu preferent de fosforilació. A més, els resultats obtinguts suggereixen que la fosforilació d'aquest residu afavoreix la fosforilació d'altres residus de p21^{Cip1}.

L'anàlisi mitjançant Western blot amb un anticòs anti-fosfoSer153 específic ens va indicar definitivament que p21^{Cip1} es fosforilada *in vivo* en aquest residu, també vam poder observar com aquesta fosforilació augmentava davant de l'activació de la PKC i la inhibició de la CaM. Seguidament, vam observar com en les cèl·lules COS, el tractament amb TPA (activador de PKC) i W13 (inhibidor de la CaM) provocava una disminució en la localització exclusivament nuclear de p21^{Cip1}, a favor de la seva localització nuclear i citoplasmàtica. Tal i com esperàvem, aquest canvi en la localització cel·lular en resposta al tractament amb TPA i W13 no el vam poder observar al analitzar el mutant de p21^{Cip1} que no es pot fosforilar en el residu Ser153 (p21S153A). Aquest resultat donava novament importància a la fosforilació del residu Ser153 com a responsable de la regulació de la localització cel·lular de p21^{Cip1}. Tenint en compte aquests resultats juntament amb els obtinguts anteriorment, on la mutació S135D és la única mutació que provoca una inhibició significativa de la localització exclusivament nuclear de p21^{Cip1} en aquest model cel·lular, vam poder afirmar que la CaM actuava impedit la fosforilació per PKC del residu Ser153 de p21^{Cip1}, i com a conseqüència d'aquesta acció de la CaM s'incrementava la localització nuclear de

p21^{Cip1}. De manera interessant, vam poder observar com la p21^{Cip1} pseudo-fosforilada en la Ser153 (p21S153D) no és capaç d'unir CaM i per tant, les accions de la CaM i la PKC sobre la p21^{Cip1} són excloents.

La reducció de la localització nuclear de p21S153D no era deguda a la incapacitat d'unir-se a la CaM d'aquest mutant, ja que altres mutants de p21^{Cip1} que no podien unir-se a CaM i que tampoc podien ser fosforilats per PKC, com per exemple el mutant p21^{157DID159} (Rodríguez-Vilarrupla, 2003), si que podien translocar al nucli amb la mateixa eficiència que p21WT. A més, la menor localització nuclear de p21S153D no es devia a una menor afinitat d'aquest mutant per a unir-se al PCNA ja que hem comprovat mitjançant assaigs *in vitro* de BIAcore com la fosforilació de la Ser153 no provoca cap canvi en l'afinitat entre p21^{Cip1} i PCNA.

Aquestes observacions ens indiquen que segurament el mecanisme responsable de la retenció de p21^{Cip1} en el citoplasma no és la capacitat o no d'unir CaM, sinó que la importància radica en la fosforilació de la proteïna. Probablement, la càrrega negativa en la posició Ser153 de la p21^{Cip1} donada per la fosforilació per part de PKC en aquest residu interfereix en la unió de la p21^{Cip1} amb la maquinària d'entrada al nucli, ja que aquest residu és pròxim a la seqüència NLS de p21^{Cip1}. D'altra banda, ja ha estat descrita una reducció en l'afinitat de la importina α en el reconeixement de les seqüències NLS deguda a canvis de fosforilació situats al voltant d'aquestes seqüències (Harreman *et al.*, 2004). A més, tenint en compte els resultats obtinguts per Zhou i col·laboradors (Zhou *et al.*, 2001), proposem un model on totes dues cinases, PKC fosforilant el residu Ser153 i Akt fosforilant la Thr145, col·laborarien en la inhibició de l'acumulació nuclear de p21^{Cip1}.

Durant l'elaboració d'aquesta tesi doctoral, just després d'haver descrit la fosforilació del residu Ser153 per PKC, va aparèixer un treball on s'analitzava la fosforilació de la Ser153 de p21^{Cip1} per part de la cinasa nuclear Mirk/Dyrk1B (Mercer *et al.*, 2005). Mercer i col·laboradors demostren que la fosforilació d'aquest residu per la cinasa Mirk/Dyrk1B provoca la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} durant la diferenciació dels mioblasts C2C12 i observen com la translocació de p21^{Cip1} al citoplasma afavoreix a la inhibició de l'apoptosi. Així doncs juntament amb aquests últims resultats, ja s'han descrit tres cinases diferents: Akt, PKC i Mirk/Dyrk1B implicades en la regulació de la localització intracel·lular de p21^{Cip1}. Seria interessant analitzar si la CaM també és capaç d'inhibir la fosforilació de p21^{Cip1} per part de Mirk/Dyrk1B i si aquesta cinasa i la PKC fosforilen a p21^{Cip1} en diferents compartiments cel·lulars.

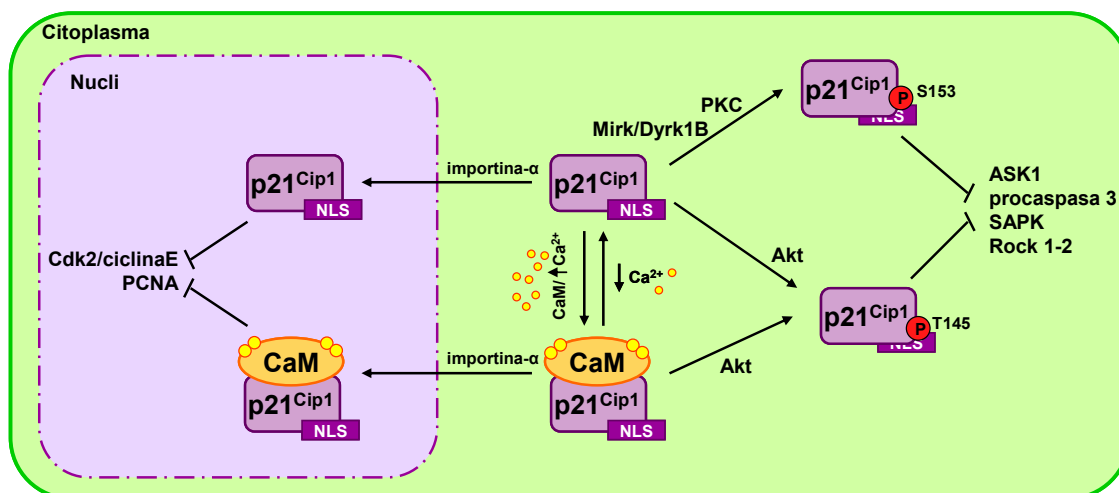


Figura 2: Model del paper de la CaM i de les cinases PKC, Akt i Mirk/Dyrk1B en la regulació de la localització cel·lular de p21^{Cip1}. Les cinases PKC, Mirk/Dyrk1B i Akt fosforilen a p21^{Cip1} en residus propers a la senyal de localització nuclear (NLS) de p21^{Cip1}, aquestes fosforilacions disminueixen l'afinitat de la importina-α per a la p21^{Cip1} i com a conseqüència provocarien una menor translocació de p21^{Cip1} cap al nucli, induint un augment dels nivells citoplasmàtics de p21^{Cip1}. La fosforilació per Akt té lloc en el residu Thr145 i no és inhibida per la unió de la CaM a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, en canvi la unió de la CaM si que inhibeix la fosforilació en la Ser153 per PKC. D'altra banda, la fosforilació de la Ser153 també ha estat descrita per a la cinasa Mirk/Dyrk1B, tot i que en aquest cas no s'ha analitzat si aquesta fosforilació és dependent o independent de CaM.

Amb aquest model, proposem que la CaM/Ca²⁺ i la PKC tenen papers oposats en la regulació de la translocació nuclear de la p21^{Cip1}, ja que proposem com la CaM evita la fosforilació de p21^{Cip1} per part de la PKC i afavoreix d'aquesta manera el paper de p21^{Cip1} en el nucli com a supressora de tumors. Per tant, davant d'una situació cel·lular determinada on la funcionalitat de la CaM estigués inhibida, com per exemple uns nivells baixos de Ca²⁺ dins la cèl·lula, juntament amb una activació de la PKC afavoriria la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} i per tant les seves funcions oncogèniques.

En la fase G₁ del cicle cel·lular, la major part de la p21^{Cip1} es localitza en el nucli, i si s'inhibeix la CaM, es provoca un augment de la localització de p21^{Cip1} en el citoplasma (Taules *et al.*, 1998; Taules *et al.*, 1999). Aquests resultats suggereixen que la presència de CaM activa durant la fase G₁ podria tenir un paper important en la prevenció de la fosforilació de p21^{Cip1} per PKC, d'aquesta manera es permetria la formació de complexos Cdk4/6-ciclinaD actius en el nucli associats a p21^{Cip1} i la cèl·lula aconseguiria progressar a través del cicle cel·lular. Tot i així, la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} sembla ser rellevant en alguns models de diferenciació, com és el cas de la diferenciació de monòcits (Asada *et al.*, 1999), neuronal (Tanaka *et al.*, 2002), miofibroblasts induïts per trombina (Bogatkevich *et al.*, 2005) i la diferenciació

dels mioblasts C2C12 (Mercer *et al.*, 2005). Entre tots aquests models, la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} en correlació amb l'activació de la PKC ha estat descrita només en el cas de la diferenciació de monòcits (Asada *et al.*, 1999) i en miofibroblasts induïts per trombina (Bogatkevich *et al.*, 2005). Seria interessant analitzar si en aquests models, hi té lloc la fosforilació de la Ser153 i si aquesta fosforilació correlaciona amb una disminució de la concentració intracel·lular de Ca²⁺ lliure. Val la pena mencionar que durant aquesta tesi hem estudiat la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} en diferents models cel·lulars entre els quals destaquem diferents línies cel·lulars de càncer de mama i el model de diferenciació de les cèl·lules de leucèmia humanes totipotents (Munoz-Alonso *et al.*, 2005). Tot i tenir alguns indicis de la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} sobretot en el model de diferenciació de les cèl·lules de leucèmia humanes totipotents, no vam poder corroborar que la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1} fos conseqüència de la fosforilació del residu Ser153 per part de la PKC. Així doncs, caldria fer un anàlisi amb més profunditat per tal de trobar un model cel·lular que ens permetés observar en condicions fisiològiques la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}.

2. Anàlisi de la funcionalitat de p21^{Cip1} fosforilada en el residu Ser153

Com ja hem comentat àmpliament en altres apartats d'aquesta tesi, la proteïna p21^{Cip1} porta a terme funcions diferents segons quina sigui la seva localització intracel·lular. D'una banda, la p21^{Cip1} nuclear inhibeix el cicle cel·lular i la síntesi del DNA ja sigui unint-se als complexos Cdk-ciclina o al PCNA, respectivament, i per tant quan està localitzada en aquest compartiment cel·lular p21^{Cip1} actua com a una proteïna supressora de tumors. D'altra banda, les funcions descrites per a la p21^{Cip1} citoplasmàtica són de tipus oncogènic ja que se li atribueix un paper com a inhibidora de l'apoptosi i com a reguladora de la mobilitat cel·lular.

Després d'observar que la fosforilació del residu Ser153 induïa un canvi en la localització de p21^{Cip1}, vam voler analitzar si la fosforilació en aquest residu modificava la funcionalitat de p21^{Cip1} en els diferents compartiments cel·lulars. L'anàlisi de la formació de fibres d'estrès ens mostra com la fosforilació de la Ser153 no interfereix en la capacitat de la p21^{Cip1} citoplasmàtica d'inhibir la formació de les fibres d'estrès, ja que totes dues proteïnes, quan es localitzen en el citoplasma, són igual d'eficients en evitar la formació d'aquest tipus de fibres. Vam observar com en aquelles cèl·lules on el mutant de fosforilació S153D es localitzava en el nucli, la fosforilació del residu Ser153 no provocava cap canvi en el paper de p21^{Cip1} com a inhibidora de la síntesi

del DNA ja que l'expressió del mutant p21S153D inhibia la síntesi de DNA amb la mateixa eficiència que la proteïna p21^{Cip1} no fosforilada. Aquest resultat correlaciona amb el fet que hem comentat anteriorment, ja que la fosforilació del residu Ser153 no afecta a la unió amb el PCNA. No hem d'oblidar que l'experiment on s'analitza el paper de p21^{Cip1} sobre la inhibició de la síntesi del DNA, es va realitzar amb la sobreexpressió de GFP-p21S135D. D'una banda, GFP té tendència a localitzar-se en el nucli per si sola i, d'altra banda, el número de proteïnes amb qui p21^{Cip1} pot interaccionar en el citoplasma pot ser limitant i davant de l'excés degut a la sobreexpressió de GFP-p21S153D, probablement no totes les molècules podran formar complexos d'elevat pes molecular amb altres proteïnes del citoplasma, aquest fet permetrà que GFP-p21 per si sola pugui moure's lliurement i travessar els porus de l'embolcall nuclear.

Així doncs, sembla que la fosforilació de p21^{Cip1} en la Ser153 no afecta a cap de les funcions que hem analitzat, sinó que principalment la fosforilació en aquest residu indueix un canvi en la localització cel·lular de la proteïna i és aquest canvi de localització el principal responsable de la diferent funcionalitat de p21^{Cip1}. Tot i així, l'anàlisi d'altres funcions de p21^{Cip1} podria aportar nova informació sobre les conseqüències d'aquesta fosforilació.

3. Paper de la p21^{Cip1} en l'apoptosi

Un dels principals mecanismes mitjançant el qual s'augmenten els nivells de p21^{Cip1} cel·lulars és la via de p53 en resposta al dany al DNA el qual acabarà induint una parada del cicle cel·lular gràcies a l'augment de la transcripció de p21^{Cip1}. Tot i així, existeixen altres mecanismes reguladors dels nivells cel·lulars de p21^{Cip1} a nivell de transcripció i de degradació de la proteïna (revisat a (Gartel and Tyner, 2002; Liu *et al.*, 2003)). Tot i que s'han descrit diversos exemples del paper de p21^{Cip1} com a inductor de l'apoptosi, la major part de models cel·lulars suggereixen que p21^{Cip1} té un efecte protector davant de l'apoptosi (revisat a (Gartel and Tyner, 2002; Liu *et al.*, 2003)). Aquest panorama tan divers i en alguns casos confús, deixa entreveure que la funció anti-apoptòtica de p21^{Cip1} en resposta al dany al DNA i a l'activació de p53 no està encara del tot definida.

Aquesta diversitat d'opinions sobre la regulació de l'apoptosi per part de p21^{Cip1} va ser el motiu pel qual vam voler analitzar si la fosforilació de p21^{Cip1} podria ser la responsable d'aquesta regulació. En primer lloc vam escollir el model de cèl·lules de

càncer de colon, HCT116, i les vam sotmetre a dany al DNA mitjançant un tractament amb Adriamicina (Adr), un agent intercalant del DNA i inhibidor de la topoisomerasa II. Les primeres aproximacions amb assaigs de viabilitat cel·lular, MTS, i formació de focus, van posar de manifest que la proteïna p21^{Cip1} tenia un paper protector davant de l'apoptosi ja que les cèl·lules deficientes en p21^{Cip1} (HCT116 p21^{-/-}) eren més sensibles al tractament amb Adr i presentaven menys capacitat de proliferació quan havien estat tractades amb la droga. El model de les cèl·lules HCT116 p21^{-/-}, generades per disrupció dels dos al·lels de p21^{Cip1} mitjançant recombinació homòloga (Waldman *et al.*, 1995), no està lliure de controvèrsia. D'una banda, un treball recent proposa que la major susceptibilitat a l'apoptosi observada en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} és deguda a una sobreexpressió de p53 en aquestes cèl·lules i que per tant és un mecanisme independent de la manca de p21^{Cip1} en aquest model cel·lular (Ferrandiz *et al.*, 2009). Javelaud i col·laboradors ja havien observat els efectes d'una major expressió de p53 en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} en resposta al tractament amb diferents drogues inductores d'apoptosi, tot i que proposen que la major sensibilitat d'aquestes cèl·lules a l'apoptosi és deguda principalment a una alteració de la homeòstasi mitocondrial (Javelaud and Besancon, 2002). D'altra banda, treballs anteriors amb el mateix model cel·lular mostren com les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} no presenten una hiperactivació de p53 davant el dany al DNA, tot i que aquestes cèl·lules si que presenten un major alliberació de citocrom C, despolarització de la membrana mitocondrial i activació de les caspases; possiblement, la manca de p21^{Cip1} no permet aturar correctament el cicle cel·lular aberrant i afavoreix la via apoptòtica (Le *et al.*, 2005). Tot i que els nostres resultats també estan a favor del paper protector de p21^{Cip1} en aquest model cel·lular, és cert que caldria tornar a avaluar aquesta funcionalitat degut a la gran diversitat de treballs que en moltes ocasions són contradictoris.

Deixant de banda la controvèrsia de l'apoptosi en model cel·lular HCT116 p21^{-/-}, vam voler analitzar si la fosforilació en el residu Ser153 afectava a la capacitat de p21^{Cip1} en la regulació de l'apoptosi. Anteriorment ja havíem analitzat com la fosforilació en aquest residu no afecta a algunes de les funcions descrites per a p21^{Cip1} en el nucli i en el citoplasma.

L'anàlisi de la capacitat de reversió de l'apoptosi dels diferents mutants de p21^{Cip1}, va posar de manifest que en les cèl·lules COS el mutant S153D presenta la mateixa capacitat d'inhibir la formació de cossos apoptòtics que la p21^{WT}. A més, també vam poder observar com l'altre mutant de fosforilació T145D i el mutant de p21^{Cip1} que no presenta senyal NLS també inhibeixen eficientment la formació de cossos apoptòtics en les cèl·lules tractades amb Adr. Per tant, aquests resultats

indiquen que la fosforilació de p21^{Cip1} no afecta a la funció antiapoptòtica de la proteïna en aquest model cel·lular.

Segons els defensors de p21^{Cip1} com a proteïna protectora de l'apoptosi, existeixen dos mecanismes principals mitjançant els quals p21^{Cip1} estaria inhibint l'apoptosi. En primer lloc, s'ha descrit que la p21^{Cip1} citoplasmàtica pot unir-se i inhibir diferents proteïnes relacionades amb les vies d'activació de l'apoptosi: procaspasa 3, ASK1 i SAPK, i que la unió d'aquestes tres proteïnes té lloc per l'extrem amino terminal de p21^{Cip1}. En segon lloc, s'ha relacionat la funció anti-apoptòtica de p21^{Cip1} amb la seva capacitat d'inhibir l'activitat dels complexos Cdk-ciclina en el nucli (revisat a (Dotto, 2000)). Per aquest motiu vam analitzar la capacitat d'inhibir l'apoptosi dels diferents fragments de la proteïna p21^{Cip1}. L'anàlisi de les cèl·lules COS transfectades amb els diferents fragments de p21^{Cip1} ens va permetre observar com el fragment carboxi terminal de p21^{Cip1} no era capaç d'inhibir la formació de cossos apoptòtics de manera eficient tal i com ho feien la proteïna p21^{Cip1} sencera o l'extrem amino terminal. Sorprenentment, el fragment carboxi terminal de p21^{Cip1} sense la senyal NLS (p21CTNLS) és capaç d'inhibir l'apoptosi a diferència del fragment carboxi terminal no mutat. Aquests resultats ens indiquen que quan aquest fragment es localitza en el nucli no és capaç d'inhibir l'apoptosi, tot i que si que pot inhibir el cicle cel·lular perquè encara que no conté el lloc d'unió a les Cdks, conserva el segon lloc d'unió a ciclina (Cy2) i el domini d'unió al PCNA (Rodríguez-Vilarrupla *et al.*, 2002). En canvi, quan el fragment carboxi terminal es localitza en el citoplasma si que la inhibeix. Aquestes dades indiquen que pot haver alguna altra proteïna reguladora de l'apoptosi que es pugui unir a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} quan es localitza en el citoplasma i que la unió amb la p21^{Cip1} pot provocar la inhibició d'aquesta proteïna. Caldria aprofundir en l'estudi i analitzar si algunes de les proteïnes ja descrites que s'uneixen a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} tenen alguna relació amb la regulació de l'apoptosi o si és alguna altra proteïna d'unió a p21^{Cip1} encara no descrita, la que porta a terme aquesta regulació. Una altra explicació de la capacitat d'inhibir l'apoptosi del fragment p21CTNLS (aminoàcids 90-164) a diferència del fragment no mutat, seria que aquest fragment amb localització citoplasmàtica interacciona amb ASK1 i la inhibeix, ja que el domini d'interacció entre aquestes dues proteïnes no ha estat acotat fins al moment i es creu que es situa entre els aminoàcids 1-140 de la p21^{Cip1}.

En resum i com es mostra en la figura 3, p21WT estaria inhibint l'apoptosi mitjançant els dos mecanismes descrits: inhibició del cicle cel·lular en el nucli i inhibició de les proteïnes pro-apoptòtiques en el citoplasma. La proteïna sencera mutada en la senyal NLS (p21NLS) es localitza principalment en el citoplasma i pot inhibir l'apoptosi

DISCUSSIÓ

gràcies a la inhibició de les proteïnes pro-apoptòtiques citoplasmàtiques. Pel que fa al fragment amino terminal de la proteïna (p21NT) també és capaç d'inhibir l'apoptosi en el citoplasma ja que és en aquest fragment on s'hi uneixen les proteïnes ASK1, procaspasa 3 i SAPK; a més, p21NT entra en el nucli per difusió, ja que no conté el senyal NLS, també pot inhibir l'apoptosi pel mecanisme d'inhibició dels complexos Cdk-ciclina. D'altra banda, el fragment carboxi terminal (p21CT) localitzat en el nucli, no és capaç d'inhibir l'apoptosi tot i que si que inhibeix el cycle cel·lular, mentre que el mateix fragment localitzat en el citoplasma (p21CTNLS) si que inhibeix eficientment l'apoptosi, potser per algun dels mecanismes que acabem de discutir. Per tant, les diferències entre p21^{Cip1} nuclear i p21^{Cip1} citoplasmàtica de protecció de l'apoptosi, tan sols les veiem quan treballem amb el fragment carboxi terimal de la proteïna.

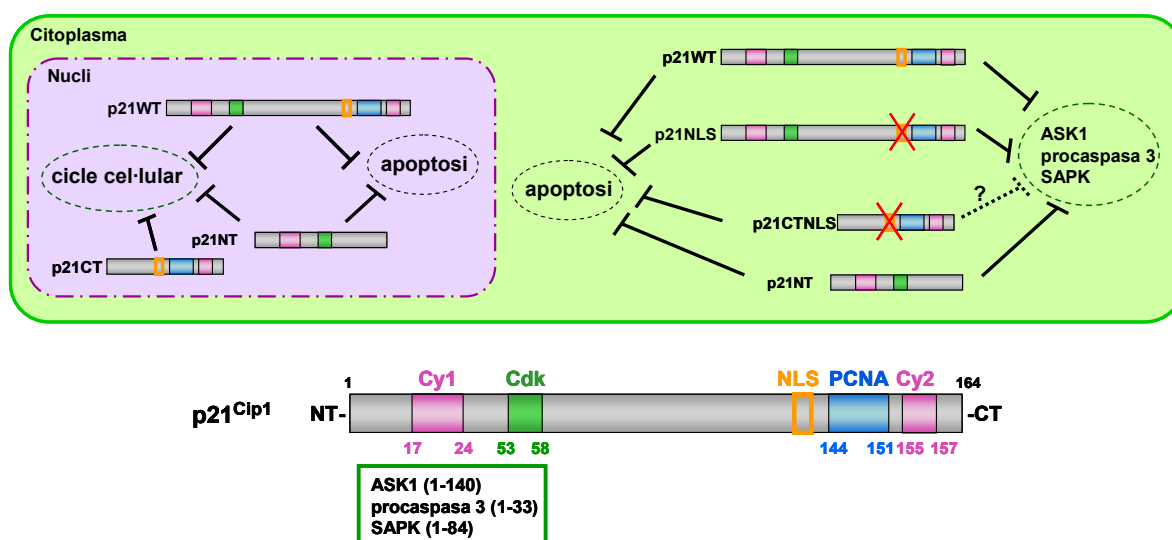


Figura 3: Localització cel·lular dels diferents fragments de p21^{Cip1} i la seva capacitat per inhibir l'apoptosi. L'esquema mostra la localització nuclear o citoplasmàtica dels fragments de p21^{Cip1} analitzats i la seva capacitat per inhibir el cycle cel·lular o les proteïnes pro-apoptòtiques localitzades en el citoplasma, dos dels mecanismes proposats mitjançant els quals p21^{Cip1} podria inhibir l'apoptosi. També es mostra la proteïna p21^{Cip1} sencera amb la localització dels dominis d'unió a Cdk i ciclins (Cy1 i Cy2), la senyal NLS i els dominis d'unió descrits per a ASK1, procaspasa 3 i SAPK.

4. Localització nucleolar de p21^{Cip1} en resposta al dany al DNA

La segona part d'aquesta tesi es centra en l'estudi de la localització de p21^{Cip1} en les cèl·lules HCT116 com a resposta del dany al DNA provocat per l'Adriamicina. Hem pogut observar com el dany al DNA indueix un augment dels nivells de p21^{Cip1} no només en el nucli, sinó que sorprenentment també al nuclèol. La localització de p21^{Cip1} en el nuclèol té lloc en unes estructures definides de forma esfèrica d'unes 2 µm de

diàmetre aproximadament, que quan s'observen en contrast de fase presenten una refringència diferent de la refringència del nuclèol. Aquestes estructures esfèriques es localitzen dins dels intersticis del nuclèol i per aquest motiu els anomenem en aquesta tesi com a cossos intranucleolars o inclusions intranucleolars, INoBs (*IntraNucleolar Bodies*). La importància d'aquest treball radica en que es tracta de la primera observació de la localització de p21^{Cip1} endògena en el nuclèol. Existeix un treball de l'any 2004 on observen la localització de GFP-p21 en el nuclèol de les cèl·lules HeLa aturades en fase G₁; a més, en aquest treball també observen colocalització de GFP-p21 amb la ciclina E en el nuclèol. Tot i així, el patró d'expressió de GFP-p21 i de ciclina E és una mica diferent al que nosaltres observem ja que sorprenentment, en les imatges on mostren localització d'aquestes proteïnes en el nuclèol, el nucleoplasma està lliure de marcatge (Cazzalini *et al.*, 2004).

Tal i com ja ha estat descrit en altres treballs (Rubbi and Milner, 2003; Mayer and Grummt, 2005), els nostres resultats mostren una desestructuració del nuclèol després del dany al DNA. Aquesta desestructuració del nuclèol probablement és reflex d'una de les nombroses estratègies que la cèl·lula ha desenvolupat per tal de protegir la integritat del rDNA. La desestructuració dels components nucleolars es posa de manifest quan analitzem la morfologia del nuclèol amb contrast de fase, amb microscòpia electrònica i mitjançant immunocitoquímica d'algun dels components nucleolars com la fibril·larina i l'UBF.

Tot i així, diferents evidències indiquen que p21^{Cip1} no participa en la desestructuració inicial del nuclèol ja que d'una banda, podem observar la desestructuració dels diferents components nucleolars quan encara no han augmentat els nivells de p21^{Cip1} endògena. D'altra banda, la desestructuració del nuclèol també té lloc en cèl·lules HCT116 p21^{-/-} sotmeses al tractament amb Adr. Aquests fets indiquen que p21^{Cip1} no és necessària per a que aquesta resposta davant el dany al DNA tingui lloc. De tota manera, si que podem observar com un cop els nivells de p21^{Cip1} han augmentat en resposta al tractament amb Adr, p21^{Cip1} s'acumula no només en el nucli, sinó que també ho fa en el nuclèols desestructurats. De manera interessant, el seguiment de cèl·lules en recuperació després d'haver estat sotmeses a un tractament amb Adr, ens va permetre observar com aquelles cèl·lules on es mantenia l'expressió de p21^{Cip1} en el INoB no eren capaces de recuperar l'estructura del nuclèol i dels components nucleolars.

L'acumulació de p21^{Cip1} en el nuclèol que observen en aquesta tesi és conseqüència del dany al DNA i no a un efecte inespecífic del tractament amb Adr, ja

que també hem pogut observar el mateix patró de localització de p21^{Cip1} en cèl·lules sotmeses a radiació UV. A més, la localització nucleolar de p21^{Cip1} no és conseqüència de l'augment dels nivells de p21^{Cip1} com ho demostren també tractaments amb l'inhibidor de proteasoma MG132, el qual provoca un augment dels nivells de p21^{Cip1} i en canvi no indueix la localització d'aquesta proteïna en el nuclèol. Aquest fet diferencia el comportament de p21^{Cip1} al que s'ha descrit recentment per a p53, la qual s'ha observat que es localitza en el nuclèol, concretament en el centre fibril·lar, en resposta a la inhibició del proteasoma en les cèl·lules H1299 (Karni-Schmidt *et al.*, 2008). Tot i així, també cal destacar que en aquest mateix treball no observen localització de p53 en el nuclèol de les cèl·lules HCT116 tractades amb MG132.

Una altra aproximació a l'estudi de la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol va ser l'anàlisi del comportament de les cèl·lules transfectades amb GFP-p21WT. L'expressió exògena de p21^{Cip1} en les cèl·lules HCT116 mostra com GFP-p21WT només es localitza en el nuclèol després del tractament amb ADR, ja que en absència de dany al DNA, tot i tenir uns nivells cel·lulars de p21^{Cip1} elevats, GFP-p21WT no es localitza en el nuclèol. Així doncs, aquests experiments porten a la mateixa conclusió que els obtinguts amb MG132, ja que en el nostre model experimental, l'augment dels nivells de p21^{Cip1} no és el causant de la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol, sinó que per a que tingui lloc aquesta localització es necessària la presència de dany al DNA.

Dins del nuclèol, p21^{Cip1} es localitza en un compartiment que quan és observat amb contrast de fase presenta una refringència diferent. A més, mitjançant immunocitoquímiques i microscòpia electrònica vam poder observar també com el INoB no conté components nucleolars com la fibril·larina ni l'UBF, els quals pateixen un canvi de localització dins del nuclèol quan aquest es desestructura. Tincions amb iodur de propidi i To-pro3 mostren com el INoB tampoc conté RNA ni DNA, i tal i com és d'esperar, els nuclèols desestructurats tampoc són transcripcionalment actius ja que no són capaços d'incorporar 5'FU i tampoc observem presència de l'enzim topoisomerasa I. La inhibició de la transcripció dels rDNAs, no és conseqüència de la formació del INoB, ja que els nuclèols deixen de ser transcripcionalment actius a les poques hores de tractament amb ADR quan encara no hi ha INoB. Segurament, els nuclèols perden la seva funció de transcripció quan es desestructuren i els components nucleolars canvien la seva localització. D'altra banda, hem pogut observar com unes hores després de treure l'ADR del medi, alguns dels nuclèols tornaven a ser transcripcionalment actius, però aquells que passat aquest temps presentaven INoB positiu per a p21^{Cip1} en el nuclèol, no eren capaços de recuperar la seva funcionalitat transcripcional. Aquesta observació correlaciona amb el fet que la presència de INoB

en les cèl·lules dificulta la recuperació de l'estructura del nuclèol com ja hem comentat anteriorment.

Per tal d'assegurar-nos que el INoB positiu per a p21^{Cip1} no es tracta d'una projecció del nucleoplasma dins del nuclèol vam realitzar dues aproximacions diferents. En primer lloc, la reconstrucció en tres dimensions del nuclèol de cèl·lules transfectades amb GFP-p21WT i tractades amb ADR mitjançant imatges seqüencials amb microscòpia confocal ens va permetre observar que el INoB apareix com a una estructura esfèrica independent dins del nuclèol que no manté contacte directe amb el nucleoplasma. En segon lloc, la filmació (*time-lapse*) de les cèl·lules durant 24 hores a partir del moment en que vam afegir l'ADR ens va permetre seguir el procés de formació del INoB i observar com no es tractava d'una part del nucleoplasma sinó que el INoB es forma com a un agregat a partir del material present en el nuclèol. A més, la filmació de cèl·lules que havien estat tractades amb ADR durant 24 hores a les quals els hi canviàvem el medi per tal de poder observar la seva recuperació, ens va aportar informació molt interessant ja que vam veure com el INoB present en el nuclèol d'una cèl·lula tractada, era capaç de dissociar-se, normalment en INoBs més petits que podrien arribar a desaparèixer i fins i tot, passat unes hores, podíem detectar la formació d'un nou INoB dins del nuclèol que es tornava a desfer fins a observar finalment la presència de cèl·lules vives amb els nuclèols recuperats. Mitjançant aquestes pel·lícules vam poder determinar com el INoB era una estructura altament dinàmica dins del nuclèol. El seguiment durant 60 hores de la recuperació de les cèl·lules tractades va posar de manifest que les cèl·lules que presentaven INoB no eren cèl·lules més danyades que les altres o més properes a l'apoptosi, ja que durant aquest temps no vam observar mort en aquestes cèl·lules. D'altra banda, l'anàlisi dels nivells de fosforilació de la H2AX o dels nivells d'activació de la caspasa 3 no mostraven diferències significatives entre les cèl·lules que expressaven p21^{Cip1} en el nucli o en el nucli i el nuclèol. En tot cas, els nivells de P-H2AX eren superiors en cèl·lules que no expressaven p21^{Cip1}, indicant un cop més l'efecte protector d'aquesta proteïna davant de l'apoptosi.

De manera complementària a les pel·lícules de contrast de fase on analitzàvem la formació de el INoB, els experiments de FLIP i FRAP en cèl·lules tractades que expressaven GFP-p21WT demostren un cop més el gran dinamisme d'aquesta estructura nucleolar i els alts nivells de mobilitat de p21^{Cip1} entre el nuclèol i el nucleoplasma i també dins del propi nucleoplasma. Observem en els experiments de FRAP com únicament una petita proporció de p21^{Cip1} queda segrestada en el nuclèol com a fracció immòbil. Aquests experiments, realitzats en les cèl·lules vives, ens van

permetre descartar la possibilitat que la localització nucleolar de p21^{Cip1} fos un reflex d'un agregat irreversible o d'un segrest de la proteïna per part d'algun component nucleolar

Els nostres resultats també mostren com proteïnes clau en la resposta activada a partir del dany al DNA com és el cas de p53 també es localitza juntament amb p21^{Cip1} en el INoB. La mateixa localització després del dany al DNA vam poder observar-la per a mdm2, una altra proteïna clau en el *checkpoint* de dany al DNA ja que és l'encarregada de regular els nivells de p53. A més, un altre fet rellevant és que mdm2 és una proteïna d'unió a p21^{Cip1}, que s'uneix a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}. Vam comprovar com altres proteïnes d'unió a p21^{Cip1} també es localitzen en el INoB després del tractament amb Adr, és el cas de la ciclina E i del PCNA, dues proteïnes reguladores del cycle cel·lular. A més, gràcies a les transfeccions d'altres proteïnes d'unió a p21^{Cip1} com SET i Cdk2 i la transfecció de p27^{Kip1}, una proteïna de la mateixa família que p21^{Cip1}, vam poder observar com aquestes tres proteïnes també es localitzen en el nuclèol en resposta al dany al DNA. Tal i com ja hem comentat anteriorment, la formació del INoB es veia reduïda en cèl·lules p21^{-/-} i en aquest tipus cel·lular també vam poder observar una reducció de la localització d'aquestes proteïnes en el INoB, com es el cas de p53, mdm2 i PCNA. Aquest fet ens indica que tot i que la presència de p21^{Cip1} no és estrictament necessària per a la formació de el INoB, si que pot jugar un paper important en el manteniment i en l'engrandiment dels INoBs induïts pel dany al DNA.

Podríem pensar que la senyal que indueix a p21^{Cip1} a localitzar-se al nuclèol hauria d'estar situada a l'extrem amino terminal, ja que és aquest extrem el que comparteix una major homologia de seqüència amb l'altra proteïna de la família Cip/Kip, p27^{Kip1}, que també es localitza en el INoB. Tot i així, l'anàlisi de la localització al nuclèol dels diferents mutants de p21^{Cip1} indiquen que els elements que dirigeixen p21^{Cip1} al nuclèol es localitzen en l'extrem carboxi terminal de la molècula, ja que l'extrem amino terminal de p21^{Cip1} (GFP-p21NT) presenta una menor eficiència de localització en el nuclèol que la proteïna sencera. Vam poder observar com el mutant de p21^{Cip1} sense senyal NLS (GFP-p21NLS) també presenta una menor afinitat per a localitzar-se al nuclèol. Es probable doncs, que dins de l'extrem carboxi terminal, la seqüència NLS tingui un paper rellevant en la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol. D'altra banda, p21^{Cip1} no presenta una seqüència NoLS i com ja s'ha descrit per a altres proteïnes que es localitzen en el nuclèol, p21^{Cip1} podria fer servir a la proteïna nucleolar nucleofosmina, NPM, com a proteïna llançadora per a dirigir-se al nuclèol. Aquest fet no seria d'estranyar ja que recentment s'ha demostrat que p21^{Cip1} pot unir-

se directament a NPM, una proteïna amb propietat xaperona i que cicla constantment entre el nucli i el citoplasma (Xiao *et al.*, 2009). A més, el fet que la NPM es trobi ciclant constantment entre el nucli i el citoplasma afavoreix la participació de la NPM en el transport de les proteïnes ribosomals, com veurem amb detall més endavant. Xiao i col·laboradors proposen que la NPM s'estaria unint a l'extrem amino terminal de p21^{Cip1} ja que la NPM contribueix a l'estabilitat de p21^{Cip1} dificultant la ubiquïtinització de les lisines amino terminals de p21^{Cip1} i inhibint la seva degradació. Així doncs, podria ser que els mecanismes responsables de la localització nucleolar de p21^{Cip1} fossin la unió d'aquesta amb la NPM (Xiao *et al.*, 2009) o la interacció de p21^{Cip1} amb les subunitats ribosòmiques (Carrascal *et al.*, 2002).

Tot i així, també podríem pensar que algunes de les proteïnes que interaccionen amb l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1} podrien ser les responsables de la seva localització nucleolar, ja que com hem comentat els resultats obtinguts amb l'anàlisi de mutants indiquen que en aquest extrem es localitzen elements necessaris per a la localització de p21^{Cip1} al nuclèol. Per exemple, entre les proteïnes que van al nuclèol en resposta al dany al DNA, mdm2, PCNA i SET s'uneixen a l'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}. A més, encara es complica més la situació ja que NPM és capaç de trencar el complex mdm2-p53 i també competeix amb mdm2 per a unir-se a ARF. Això fa pensar que totes aquestes proteïnes capaces d'interaccionar entre elles mateixes formen una xarxa complexa d'interaccions i que la regulació dels nivells d'alguna d'elles a l'alça o un canvi de localització pot afectar a la localització o als nivells de les altres proteïnes.

Fa molt de temps que s'ha descrit que en el nuclèol de les cèl·lules eucariotes hi té lloc la síntesi de les subunitats ribosòmiques. A més d'aquesta funció s'han atribuït recentment altres funcions cel·lulars al nuclèol algunes d'elles implicades en la regulació del cicle cel·lular i de la resposta a estrès (revisat en (Boisvert *et al.*, 2007)). El segrest de proteïnes específiques per part d'alguns dels components del nuclèol és un mecanisme que fa servir la cèl·lula per tal de regular el cicle cel·lular i la transformació cel·lular. Per exemple, la NPM regula la localització nucleolar de Fbw7 γ , un component del complex E3 lligasa encarregat de la ubiquïtinització i degradació via proteasoma de c-Myc. El segrest nucleolar de Fbw7 γ , estabilitza a Fbw7 γ i afavoreix la degradació de l'oncoproteïna c-Myc. Com a conseqüència d'aquesta regulació dels nivells de c-Myc s'aconsegueix frenar la transformació cel·lular (Bonetti *et al.*, 2008). Bonetti i col·laboradors observen com mutacions en la NPM pot portar conseqüències dràstiques per a la cèl·lula, com és el cas de pacients de leucèmia aguda mieloide (AML) els quals freqüentment tenen alterada la localització de la NPM. Anteriorment, ja

s'havia descrit la localització nucleolar de c-Myc i la importància d'aquesta regulació en el manteniment dels nivells correctes de l'oncoproteïna c-Myc (Arabi *et al.*, 2003). A més, s'ha descrit un paper funcional per a la localització de c-Myc en el nuclèol ja que és necessari per a la activació de la transcripció dels rDNAs en resposta a senyals mitogèniques. Així doncs, es creu que c-Myc tindria un paper en la regulació de la biogènesi de ribosomes i del creixement cel·lular (Arabi *et al.*, 2005). Aquesta funcionalitat de c-Myc obre la possibilitat que p21^{Cip1} també tingui un paper funcional en el nuclèol, ja que p21^{Cip1} s'uneix a c-Myc i inhibeix la transcripció dependent de c-Myc (Kitaura *et al.*, 2000).

En relació al paper del nuclèol en la resposta a estrès cel·lular, s'ha demostrat que un gran nombre d'agents causants d'estrès cel·lular indueixen la desorganització del nuclèol i inhibeixen la seva funció transcripcional (Mayer and Grummt, 2005; Tembe and Henderson, 2007). A més, s'ha demostrat que la desestructuració del nuclèol provoca l'estabilització de p53 i l'activació de la resposta del *checkpoint*, fins i tot en absència de dany al DNA (Rubbi and Milner, 2003). Per tant, és probable que existeixi un mecanisme encarregat de controlar l'activitat nucleolar i que al mateix temps és també important per a l'activació de la resposta cel·lular davant de l'estrès.

S'ha descrit com diferents proteïnes nucleolars són alliberades al nucleoplasma quan l'estructura nucleolar es veu desorganitzada a causa del dany al DNA. En canvi, el procés invers s'ha descrit per a molt poques proteïnes, és el cas de PML i mdm2, les quals es localitzen al nuclèol després del dany al DNA (Tembe and Henderson, 2007). Els resultats d'aquesta tesi mostren com p21^{Cip1}, p53, ciclina E, PCNA, SET, Cdk2 i p27^{Kip1} transloquen al nuclèol després del tractament amb ADR. Per tant, aquestes proteïnes s'haurien d'afegir a la llista de proteïnes que pateixen aquest canvi en la localització després del dany al DNA, tot i que la funció d'aquest canvi de localització encara és incert. Un dels motius pels quals l'acumulació d'aquestes proteïnes encara no hagi estat descrita és el fet que a dosis més elevades d'ADR no es pot observar formació de l'INOB ni localització de p21^{Cip1} en el nuclèol, i que ha estat gràcies a treballar amb una dosi d'ADR que permet l'activació de la resposta a dany, però que en canvi no provoca mort elevada en la població, la que ens ha permès observar una nova localització per a aquestes proteïnes.

5. INoB i modificació post-traducciona de proteïnes

Un resultat molt interessant obtingut en aquesta tesi va ser l'observació de la localització nucleolar de SUMO-1 en resposta al tractament amb Adr. Mitjançant immunocitoquímiques anti-SUMO-1 vam poder observar un marcatge molt fort de SUMO-1 en el INoB. Els mateixos resultats també es van obtenir amb experiments d'*immunogold* amb microscòpia electrònica. A més, la localització en el nuclèol de GFP-SUMO-1 i la no localització nucleolar del mutant GFP-SUMO-1- Δ Gly-Gly, indicava la possible presència de proteïnes sumoïlades en el INoB després del dany al DNA. D'altra banda, la presència de Ubc-9 en els nuclèols desestructurats, dins i fora del INoB indicava que la sumoïlació de proteïnes es podia portar a terme allà. S'ha descrit que la sumoïlació té una gran varietat d'efectes sobre les proteïnes diana ja que la incorporació d'una molècula de SUMO pot comportar canvis en la localització, en l'activitat o en la estabilitat de la proteïna. A més, SUMO té un paper important en algunes de les funcions nuclears com la transcripció, la reparació del DNA, l'assemblatge de cossos nuclears i del transport de proteïnes entre el nucli i el citoplasma (revisat en (Jürgen Dohmen, 2004; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Heun, 2007)). A més, la sumoïlació en els nuclèols d'algunes proteïnes pre-ribosomals i la seva subseqüent desumoïlació en els complexos del porus nuclear, és necessària per a una eficient síntesi de ribosomes i per al seu export (Panse *et al.*, 2006; Meulmeester and Melchior, 2008)

Una altra proteïna que vam observar puntualment en el nuclèol de les cèl·lules tractades amb Adr és la PML. Ja ha estat descrita la translocació de PML cap al nuclèol en presència de dany al DNA (Bernardi *et al.*, 2004; Condemine *et al.*, 2007). A més de ser la proteïna organitzadora dels cossos PML nuclears (*PML nuclear bodies*), també se li ha atribuït la propietat de ser un centre formador de xarxes de proteïnes sumoïlades ja que PML es sumoïlita i al mateix temps conté dominis d'interacció amb proteïnes sumoïlades (*SIM, SUMO-interaction motif*) (revisat a (Heun, 2007)). Així doncs existeix la possibilitat que en resposta al dany al DNA, PML es sumoïliti i transloqui cap al nuclèol on podria estar actuant de com a nucli formador d'una xarxa de proteïnes sumoïlades com per exemple p53 i mdm2. A més, per acabar de complicar una mica més la situació, s'ha descrit com en resposta al dany al DNA, PML s'uneix a mdm2 i segresta a mdm2 en el nuclèol (Condemine *et al.*, 2007).

Aquests resultats obren un camí interessant d'investigació ja que possiblement el INoB format en resposta al dany al DNA podria estar implicat en la modificació post-traducciona de proteïnes les quals podrien estar realitzant funcions que diferenciarien

a la proteïna sumoïlada de les funcions atribuïdes a aquesta proteïna en absència de la modificació en qüestió. Per exemple, s'ha vist que la sumoïlació de PCNA promou la replicació del DNA fins i tot en presència de dany al DNA (Papouli *et al.*, 2005). A més, algunes d'aquestes vies de modificació post-traduccionals de proteïnes estan entrecruades, com succeeix en el cas de la ubiquïtinització i sumoïlació de PCNA i de p53. En el cas del PCNA, totes dues modificacions tenen lloc en el mateix residu i s'ha proposat que la ubiquïtinització i la sumoïlació del PCNA cooperen durant la replicació del DNA en el control de les diferents vies de reparació de les lesions en el DNA (Papouli *et al.*, 2005). La sumoïlació de p53 afecta a la regulació dels nivells de la proteïna, ja que regula la interacció de p53 amb mdm2 i afavoreix el seu export nuclear (Carter *et al.*, 2007). Segons el model que proposen en aquest treball, la sumoïlació de p53 té lloc després de que la pròpia p53 hagi estat monoubiquïtillada i un cop sumoïlada perd la interacció amb mdm2 evitant així la poliubiquïtinització i la seva degradació.

Aquests dos treballs recents sobre el *cross-talk* entre Ub i SUMO ens van fer plantejar si en el INoB hi havia també localització de proteïnes ubiquïtillades. Mitjançant immunocitoquímica, vam observar la presència d'ubiquïtina conjugada a proteïna (Ub-proteïna) en el INoB en resposta al dany al DNA. A més, després del tractament amb ADR també vam observar la presència en el INoB de proteïnes de la maquinària de degradació proteica com és el cas de la subunitat 20S del proteasoma i la subunitat PA28 γ o també anomenada REG γ . D'una banda, s'ha descrit que p21^{Cip1} pot unir-se a la subunitat C8- α del proteasoma 20S i que d'aquesta manera pot degradar-se independentment d'ubiquïtina (Touitou *et al.*, 2001). Treballs posteriors mostren com per tal que aquest tipus de degradació sigui possible, cal l'acoblament de PA28 γ a la subunitat 20S del proteasoma la qual permet la degradació de proteïnes independentment d'ubiquïtina i independentment d'ATP (Mao *et al.*, 2008). Dos treballs de l'any 2007 mostren com PA28 γ promou la degradació de p21^{Cip1} lliure de manera independent d'ubiquïtina i ATP (Li *et al.*, 2007) i com p21^{Cip1} s'uneix a PA28 γ *in vivo* (Chen *et al.*, 2007). El fet que totes elles es localitzin en el nuclèol obre la possibilitat que s'hi estigui degradant l'excés de proteïna lliure. Tot i així caldria fer un anàlisi més exhaustiu per tal d'analitzar si realment p21^{Cip1} s'està degradant en el INoB.

Finalment, per tal d'endinsar-nos encara més en la hipòtesi de la importància del nuclèol en la modificació post-traduccionals de proteïnes, vam analitzar si després del dany al DNA també observàvem presència de la via d'acetilació de proteïnes en el INoB ja que s'ha descrit que p53 pot ser acetilada per p300/CBP en resposta al dany

al DNA (revisat en (Grossman, 2001)). Immunocitoquímiques de cèl·lules HCT116 tractades amb ADR mostren com l'acetilasa CBP també es localitza en el INoB.

Cal un major anàlisi de totes aquestes modificacions post-traduccionals, així com també analitzar si tots aquests processos o localització de proteïnes succeeixen seqüencialment en el temps, ja que podríem pensar que en primer lloc PML es localitza en el INoB i seguidament augmenta l'activitat de sumoïlació i la concentració de proteïnes sumoïlades com per exemple p53 i PCNA. A més, també caldria analitzar si p21^{Cip1} es sumoïlita, tot i que no presenta una seqüència consens acceptora de SUMO.

6. Canvis en el transport nucli-citoplasma de p21^{Cip1} induït per dany al DNA

Els nostres resultats mostren com en condicions control, GFP-p21WT transita a través del nuclèol i com després del dany al DNA, l'acumulació de p21^{Cip1} en el INoB correlaciona amb una inhibició de la sortida de p21^{Cip1} del nucli cap al citoplasma, és a dir, amb una inhibició de l'export nuclear.

Aquests resultats ens fan plantejar una altra possible hipòtesi sobre la localització de p21^{Cip1} en el nuclèol. Ja ha estat proposada l'existència d'una ruta d'export de proteïnes des del nucli cap al citoplasma que faria servir al nuclèol com nexa de connexió entre aquests dos compartiments, la qual s'inhibiria en presència de dany al DNA. També es creu que aquesta via de sortida del nucli a través del nuclèol, és la via majoritària d'export de ribosomes els quals es sintetitzen en el nuclèol i s'assemblen completament en el citoplasma (Yu *et al.*, 2006). El terme "*riding the ribosome*" es va proposar per a proteïnes que podrien estar fent servir aquesta via *transnucleolar* d'export de ribosomes per a sortir elles mateixes del nucli cap al citoplasma, com podria ser el cas dels complexos p53-mdm2 (Sherr and Weber, 2000).

D'una banda, un alt percentatge de cèl·lules control presenten localització de HA-p21WT en el nucli i el citoplasma, mentre que aquest percentatge disminueix dràsticament en les cèl·lules tractades amb ADR, on predominen majoritàriament les cèl·lules amb localització de HA-p21WT únicament nuclear. D'altra banda, tal i com es mostren en els experiments de FLIP on es blanqueja una àrea del citoplasma, les cèl·lules que presenten localització de GFP-p21WT en el INoB, presenten una fracció immòbil de GFP-p21WT en el nucli molt superior a les cèl·lules que no presenten localització de p21^{Cip1} en el INoB. Sorprenentment, els mateixos resultats s'observaven

en les cèl·lules amb presència de INoB, independentment de la presència o absència de dany al DNA. Aquests resultats reflexen que la disminució del transport de p21^{Cip1} entre el nucli i el citoplasma no es deu al dany al DNA ni al tractament amb Adr, sinó a la presència de INoB en el nuclèol. A més, els mateixos experiments realitzats amb GFP-p21NLS, un mutant de p21^{Cip1} amb poca afinitat per a localitzar-se en el nucli, posen de manifest que l'export de les proteïnes que no s'acumulen en el INoB no està inhibit pel tractament amb Adr.

Una possible explicació de la gran disminució del trànsit de proteïnes del nucli cap al citoplasma en les cèl·lules que presenten INoB, és el fet que aquestes proteïnes facin servir la via de sortida a través del nuclèol, ja que les cèl·lules que presenten INoB han patit prèviament un canvi en la morfologia nucleolar. Observem com en resposta al tractament amb Adr els nuclèols s'arrodoneixen progressivament i perden el contacte amb l'embolcall nuclear, fins a tal punt que la superfície de contacte entre els nuclèols i les proteïnes dels porus nuclears és inexistent.

Per tal de provar si la p21^{Cip1} podria estar fent servir la via d'export dels ribosomes com a via de sortida del nucli al citoplasma en condicions control vam analitzar si p21^{Cip1} també s'acumulava en el nuclèol en condicions on el transport de ribosomes estigués inhibit per mecanismes que no impliquessin dany al DNA. Amb aquest objectiu, vam fer servir dues estratègies d'aproximació diferents, d'una banda vam tractar les cèl·lules amb Actinomicina D, un inhibidor de la transcripció del rDNA; d'altra banda vam sobreexpressar un mutant negatiu de la NPM, NPMdL, que presenta una mutació en la seqüència NES d'export nuclear. Com ja hem comentat anteriorment la NPM es tracta d'una proteïna amb acció xaperona que permet i ajuda a la sortida de ribosomes del nucli de les cèl·lules de mamífer. En totes dues aproximacions, vam observar com la formació del INoB i la localització nucleolar de p21^{Cip1} augmentaven notablement fins a nivells similars als obtinguts amb el tractament causant de dany al DNA. De manera interessant, l'expressió del mutant NPMdL, incapaç de participar en l'export de ribosomes ja que no pot ciclar entre el nucli i el citoplasma com ho faria NPM no mutada, induïa no només la localització de p21^{Cip1} en el INoB, sinó que també incrementava l'acumulació nuclear de p21^{Cip1}.

En resum, totes aquestes dades donen un gran suport a l'existència, almenys per a p21^{Cip1}, d'una via de transport nucleolar que permet la seva sortida des del nucli cap al citoplasma. La desorganització nucleolar induïda pel dany al DNA seria la responsable de bloquejar aquesta via de sortida provocant una acumulació de p21^{Cip1} en el nucli i en el nuclèol. Cal recordar que si bé l'increment d'expressió de p21^{Cip1} és

depenent de l'activitat de les cinases ATR/ATM, nosaltres hem demostrat que la desorganització del nuclèol no és depenent d'aquestes cinases ni de la presència de p53. Podria ser que un cop en el nuclèol, p21^{Cip1} estigués sotmesa a diferents mecanismes de modificació post-traduccionals que podrien modular la funcionalitat de la pròpia p21^{Cip1}. Així doncs, com a conseqüència, els resultats presentats en aquesta tesi reforcen un paper important del nuclèol i dels seus components en la localització intracel·lular de p21^{Cip1}, en la resposta al dany al DNA i en l'oncogènesi.

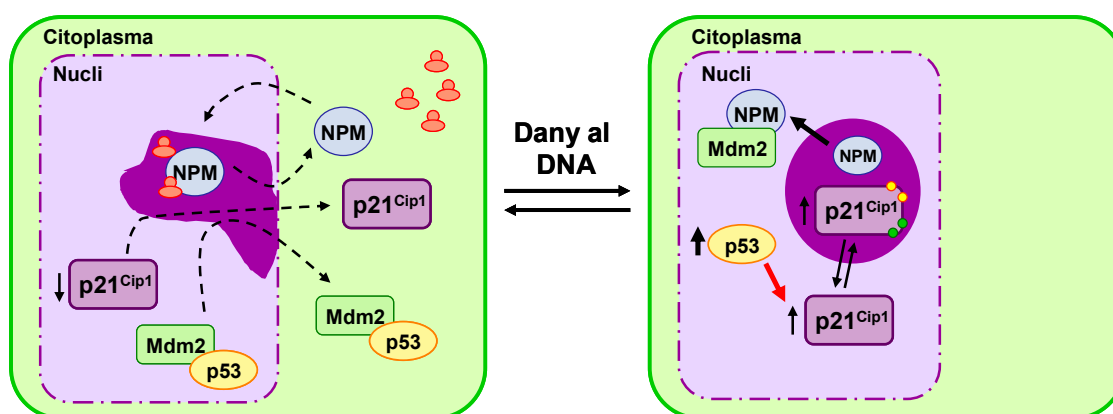


Figura 4: Model de la via d'export nuclear de p21^{Cip1}. En cèl·lules control, els nivells de p21^{Cip1} són baixos. En aquestes cèl·lules, el nuclèol presenta una estructura relaxada i està en contacte amb l'embolcall nuclear. El transport de ribosomes facilitat per la NPM tindria lloc correctament ja que la NPM cicla constantment entre el nuclí i el citoplasma, i altres proteïnes nuclears com la p21^{Cip1} o el complex p53-mdm2 podrien fer servir aquesta via d'export per a sortir cap al citoplasma on serien degradades i d'aquesta manera es mantindrien baixos els seus nivells. En resposta al dany al DNA s'indueix una desorganització del nuclèol el qual s'allunya de l'embolcall nuclear. A més, la NPM es relocalitza en el nucleoplasma on segresta a mdm2 i d'aquesta manera s'aconsegueix augmentar els nivells de p53 en el nuclí. En aquest moment, p53 activarà la transcripció de diferents gens, entre ells el gen de p21^{Cip1}. Així doncs augmentaran els nivells de p21^{Cip1} en el nuclí gràcies a l'activació de p53 i a la inhibició del transport de p21^{Cip1} cap al citoplasma. També hem observat com en presència de dany al DNA p21^{Cip1} es localitza en el nuclèol on pot estar patint alguna modificació post-traduccional.

7. En resum

En aquesta tesi s'han realitzat dos estudis diferenciats però amb un objectiu comú ja que tots dos es centren en l'anàlisi dels mecanismes reguladors de la localització cel·lular de p21^{Cip1}. D'una banda, en el primer bloc de resultats observem la importància de la fosforilació per part de PKC en la regulació de la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}. A més, els nostres resultats juntament amb altres treballs,

DISCUSSIÓ

demostren que la fosforilació de p21^{Cip1} afavoreix la localització de p21^{Cip1} en el citoplasma (veure figura 2 d'aquesta discussió). Degut a que aquesta fosforilació regulada per CaM té lloc a prop del senyal NLS, proposem que inhibeix l'entrada de p21^{Cip1} al nucli. En el segon bloc de resultats, observem com la sortida de p21^{Cip1} del nucli cap al citoplasma està regulada pel seu pas a través del nuclèol, ja que la desorganització d'aquest resulta en un increment de la localització de p21^{Cip1} en el nucli i també en el nuclèol (veure figura 4 d'aquesta discussió). A més, no descartem la possibilitat de que p21^{Cip1} pugui ser modificada en el nuclèol ja que en resposta al dany al DNA també s'hi localitzen altres proteïnes implicades en diferents vies de modificació post-traduccionals.

Així doncs, tant l'entrada com la sortida de la p21^{Cip1} del nucli és un mecanisme altament regulat que farà que la localització de p21^{Cip1} pugui variar en diferents situacions fisiològiques de la cèl·lula. Això és de gran importància ja que com hem descrit anteriorment, p21^{Cip1} és una proteïna amb funcions oposades depenent de la seva localització intracel·lular: oncogènica al citoplasma i supressora de tumors al nucli. Per tant, el coneixement dels mecanismes implicats en el control de la localització de p21^{Cip1} és de gran importància per al correcte funcionament cel·lular.

CONCLUSIONS

1. PKC fosforila a p21^{Cip1} en el residu Ser153
2. La fosforilació del residu Ser153 afavoreix la localització citoplasmàtica de p21^{Cip1}
3. La CaM impedeix la fosforilació per PKC de la Ser153 de p21^{Cip1} i d'aquesta manera afavoreix la localització nuclear de p21^{Cip1}
4. p21^{Cip1} fosforilada en la Ser153 manté les mateixes funcions analitzades que p21^{Cip1}: unió a PCNA, inhibició de la síntesi de DNA, inhibició de la formació de les fibres d'estrès i inhibició de l'apoptosi
5. L'extrem carboxi terminal de p21^{Cip1}, tan sols inhibeix eficientment l'apoptosi quan es troba localitzat en el citoplasma
6. El dany al DNA (Adr i UV) provoca un augment dels nivells de p21^{Cip1} en el nucli i una localització de p21^{Cip1} en el nuclèol
7. La localització de p21^{Cip1} en el nuclèol té lloc en una estructura formada dins de l'espai intersticial del nuclèol que anomenem cos o inclusió intranucleolar (INoB)
8. El INoB és una estructura altament dinàmica que no té connexió física amb el nucleoplasma, tot i que si existeix una connexió entre les molècules de p21^{Cip1} del nuclèol i del nucleoplasma com es reflexa en els experiments de FRAP i FLIP
9. La desestructuració del nuclèol, en resposta al dany al DNA, és prèvia i independent de la localització de p21^{Cip1} en aquest
10. El INoB no conté components estructurals del nuclèol (UBF i Fibril·larina) ni tampoc RNA i DNA
11. Proteïnes clau en la resposta al dany al DNA i en la regulació del cicle cel·lular també és localitzen en el INoB
12. SUMO-1 colocalitza amb p21^{Cip1} en el INoB en resposta al dany al DNA
13. La desestructuració del nuclèol, la inhibició de la seva activitat transcripcional i la inhibició de la sortida de ribosomes afavoreix l'acumulació de p21^{Cip1} en el nucli. Per tant, existeix una via de sortida del nucli al citoplasma per a la p21^{Cip1} que passa a través del nuclèol
14. El dany al DNA provoca una acumulació de p21^{Cip1} en el INoB degut a la inhibició de la via d'export d'aquesta proteïna

BIBLIOGRAFIA

- Abbas,T., Sivaprasad,U., Terai,K., Amador,V., Pagano,M., Dutta,A. (2008). PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes and Development* 22, 2496-2506.
- Adams,P.D., Sellers,W.R., Sharma,S.K., Wu,A.D., Nalin,C.M., Kaelin,W.G., Jr. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol.* 16, 6623-6633.
- Adkins,J.N., Lumb,K.J. (2000). Stoichiometry of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 inhibition by p21Cip1/Waf1. *Biochemistry* 39, 13925-13930.
- Agarwal,M.L., Taylor,W.R., Chernov,M.V., Chernova,O.B., Stark,G.R. (1998). The p53 network. *J Biol.Chem.* 273, 1-4.
- Alt,J.R., Gladden,A.B., Diehl,J.A. (2002). p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *Journal of Biological Chemistry* 277, 8517-8523.
- Andersen,J.S., Lam,Y.W., Leung,A.K., Ong,S.E., Lyon,C.E., Lamond,A.I., Mann,M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77-83.
- Andersen,J.S., Lyon,C.E., Fox,A.H., Leung,A.K., Lam,Y.W., Steen,H., Mann,M., Lamond,A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr.Biol.* 12, 1-11.
- Arabi,A., Rustum,C., Hallberg,E., Wright,A.P. (2003). Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *J Cell Sci.* 116, 1707-1717.
- Arabi,A., Wu,S., Ridderstrale,K., Bierhoff,H., Shiue,C., Fatyol,K., Fahlen,S., Hydring,P., Soderberg,O., Grummt,I., Larsson,L.G., Wright,A.P. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat.Cell Biol.* 7, 303-310.
- Arellano,M., Moreno,S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 559-573.
- Asada,M., Yamada,T., Ichijo,H., Delia,D., Miyazono,K., Fukumuro,K., Mizutani,S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO Journal* 18, 1223-1234.
- Assoian,R.K., Zhu,X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr.Opin.Cell Biol* 9, 93-98.
- Babu,Y.S., Sack,J.S., Greenhough,T.J., Bugg,C.E., Means,A.R., Cook,W.J. (1985). Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 315, 37-40.
- Bagui,T.K., Mohapatra,S., Haura,E., Pledger,W.J. (2003). p27Kip1 and p21Cip1 Are Not Required for the Formation of Active D Cyclin-cdk4 Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 23, 7285-7290.
- Balbin,M., Hannon,G.J., Pendas,A.M., Ferrando,A.A., Vizoso,F., Fueyo,A., Lopez,O.C. (1996). Functional analysis of a p21WAF1,CIP1,SDI1 mutant (Arg94 --> Trp) identified in a human breast carcinoma. Evidence that the mutation impairs the ability of p21 to inhibit cyclin-dependent kinases. *J.Biol.Chem* 271, 15782-15786.
- Bartek,J., Lukas,J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.
- Bellosta,P., Masramon,L., Mansukhani,A., Basilico,C. (2003). p21(WAF1/CIP1) acts as a brake in osteoblast differentiation. *J Bone Miner.Res* 18, 818-826.

- Bendjennat,M., Boulaire,J., Jascur,T., Brickner,H., Barbier,V., Sarasin,A., Fotedar,A., Fotedar,R. (2003). UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* *114*, 599-610.
- Bernardi,R., Scaglioni,P.P., Bergmann,S., Horn,H.F., Vousden,K.H., Pandolfi,P.P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat.Cell Biol.* *6*, 665-672.
- Berridge,M.J., Lipp,P., Bootman,M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol Cell Biol.* *1*, 11-21.
- Bertwistle,D., Sugimoto,M., Sherr,C.J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol.* *24*, 985-996.
- Besson,A., Assoian,R.K., Roberts,J.M. (2004). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat.Rev Cancer* *4*, 948-955.
- Besson,A., Dowdy,S.F., Roberts,J.M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell* *14*, 159-169.
- Biankin,A.V., Kench,J.G., Morey,A.L., Lee,C.S., Biankin,S.A., Head,D.R., Hugh,T.B., Henshall,S.M., Sutherland,R.L. (2001). Overexpression of p21WAF1/CIP1 is an Early Event in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancer Research* *61*, 8830-8837.
- Bloom,J., Amador,V., Bartolini,F., DeMartino,G., Pagano,M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* *115*, 71-82.
- Bodem,J., Dobрева,G., Hoffmann-Rohrer,U., Iben,S., Zentgraf,H., Delius,H., Vingron,M., Grummt,I. (2000). TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep.* *1*, 171-175.
- Bogatkevich,G.S., Gustilo,E., Oates,J.C., Feghali-Bostwick,C., Harley,R.A., Silver,R.M., Ludwicka-Bradley,A. (2005). Distinct PKC isoforms mediate cell survival and DNA synthesis in thrombin-induced myofibroblasts. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* *288*, L190-L201.
- Boisvert,F.M., Hendzel,M.J., Bazett-Jones,D.P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol* *148*, 283-292.
- Boisvert,F.M., van Koningsbruggen,S., Navascues,J., Lamond,A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 574-585.
- Bonetti,P., Davoli,T., Sironi,C., Amati,B., Pelicci,P.G., Colombo,E. (2008). Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol.* *182*, 19-26.
- Borer,R.A., Lehner,C.F., Eppenberger,H.M., Nigg,E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* *56*, 379-390.
- Bornstein,G., Bloom,J., Sitry-Shevah,D., Nakayama,K., Pagano,M., Hershko,A. (2003). Role of the SCFSkp2 Ubiquitin Ligase in the Degradation of p21Cip1 in S Phase. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 25752.
- Bosser,R., Faura,M., Serratos,J., Renau-Piqueras,J., Pruschy,M., Bachs,O. (1995). Phosphorylation of rat liver heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 and C can be modulated by calmodulin. *Molecular.& Cellular.Biology* *15*, 661-670.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* *72*, 248-254.

- Brehm,A., Miska,E.A., McCance,D.J., Reid,J.L., Bannister,A.J., Kouzarides,T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.
- Brotherton,D.H., Dhanaraj,V., Wick,S., Brizuela,L., Domaille,P.J., Volyanik,E., Xu,X., Parisini,E., Smith,B.O., Archer,S.J., Serrano,M., Brenner,S.L., Blundell,T.L., Laue,E.D. (1998). Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature* 395, 244-250.
- Brown,J.P., Wei,W., Sedivy,J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.
- Brugarolas,J., Chandrasekaran,C., Gordon,J.I., Beach,D., Jacks,T., Hannon,G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.
- Buchkovich, K., Duffy, L. A., and Harlow, E. (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58, 1097-1105.
- Budihardjo,I., Oliver,H., Lutter,M., Luo,X., Wang,X. (1999). BIOCHEMICAL PATHWAYS OF CASPASE ACTIVATION DURING APOPTOSIS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 269-290.
- Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Burden,D.A., Osheroff,N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim.Biophys.Acta* 1400, 139-154.
- Canela,N., Rodriguez-Vilarrupla,A., Estanyol,J.M., Diaz,C., Pujol,M.J., Agell,N., Bachs,O. (2003). The SET protein regulates G(2)/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *Journal of Biological Chemistry* 278, 1158-1164.
- Carafoli,E. (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 1115-1122.
- Carmo-Fonseca,M., Mendes-Soares,L., Campos,I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat.Cell Biol.* 2, E107-E112.
- Carnero,A., Hannon,G.J. (1998). The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 227, 43-55.
- Carrano,A.C., Eytan,E., Hershko,A., Pagano,M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat.Cell Biol* 1, 193-199.
- Carrascal,M., Carujo,S., Bachs,O., Abian,J. (2002). Identification of p21(Cip1) binding proteins by gel electrophoresis and capillary liquid chromatography microelectrospray tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2, 455-468.
- Carter,S., Bischof,O., Dejean,A., Vousden,K.H. (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 9, 428-435.
- Casafont,I., Bengoechea,R., Navascues,J., Pena,E., Berciano,M.T., Lafarga,M. (2007). The giant fibrillar center: a nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active sensory ganglia neurons. *J Struct.Biol.* 159, 451-461.
- Casafont,I., Navascues,J., Pena,E., Lafarga,M., Berciano,M.T. (2006). Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA. *Neuroscience* 140, 453-462.

- Cayrol,C., Ducommun,B. (1998). Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene* 17, 2437-2444.
- Cayrol,C., Knibiehler,M., Ducommun,B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene*. 16, 311-320.
- Cazzalini,O., Perucca,P., Valsecchi,F., Stivala,L.A., Bianchi,L., Vannini,V., Prosperi,E. (2004). Intracellular localization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CDKN1A-GFP fusion protein during cell cycle arrest. *Histochem.Cell Biol* 121, 377-381.
- Chafouleas, J. G., Bolton, W. E., Hidaka, H., Boyd III, A. E., and Means, A. R. (1982) Calmodulin and the cell cycle: involvement in the regulation of the cell-cycle progression. *Cell* 28, 41-50.
- Chafouleas, J. G., Lagace, L., Bolton, W. E., Boyd III, A. E., and Means, A. R. (1984) Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G0) cells into the cell cycle. *Cell* 36, 73-81.
- Chakravarthy,B., Morley,P., Whitfield,J. (1999). Ca²⁺-calmodulin and protein kinase Cs: a hypothetical synthesis of their conflicting convergences on shared substrate domains. [Review] [38 refs]. *Trends in Neurosciences* 22, 12-16.
- Chan,P.K., Qi,Y., Amley,J., Koller,C.A. (1996). Quantitation of the nucleophosmin/B23-translocation using imaging analysis. *Cancer Lett.* 100, 191-197.
- Chang,B.D., Broude,E.V., Fang,J., Kalinichenko,T.V., Abdryashitov,R., Poole,J.C., Roninson,I.B. (2000a). p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* 19, 2165-2170.
- Chang,B.D., Watanabe,K., Broude,E.V., Fang,J., Poole,J.C., Kalinichenko,T.V., Roninson,I.B. (2000b). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4291-4296.
- Chen,I.T., Akamatsu,M., Smith,M.L., Lung,F.D., Duba,D., Roller,P.P., Fornace,A.J., Jr., O'Connor,P.M. (1996a). Characterization of p21Cip1/Waf1 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction. *Oncogene*. 12, 595-607.
- Chen,I.T., Smith,M.L., O'Connor,P.M., Fornace,A.J., Jr. (1995a). Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene* 11, 1931-1937.
- Chen,J., Jackson,P.K., Kirschner,M.W., Dutta,A. (1995b). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386-388.
- Chen,J., Saha,P., Kornbluth,S., Dynlacht,B.D., Dutta,A. (1996b). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol.Cell Biol.* 16, 4673-4682.
- Chen,X., Barton,L.F., Chi,Y., Clurman,B.E., Roberts,J.M. (2007). Ubiquitin-Independent Degradation of Cell-Cycle Inhibitors by the REG[gamma] Proteasome. *Molecular Cell* 26, 843-852.
- Cheng,M., Olivier,P., Diehl,J.A., Fero,M., Roussel,M.F., Roberts,J.M., Sherr,C.J. (1999a). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18, 1571-1583.
- Cheng,M., Olivier,P., Diehl,J.A., Fero,M., Roussel,M.F., Roberts,J.M., Sherr,C.J. (1999b). The p21cip1 and p27kip1 CDK "inhibitors" are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO journal* 18, 1571-1583.

- Child,E.S., Mann,D.J. (2006). The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 5, 1313-1319.
- Chin,D., Means,A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* 10, 322-328.
- Chuang,L.S., Ian,H.I., Koh,T.W., Ng,H.H., Xu,G., Li,B.F. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000.
- Chusainow,J., Ajuh,P.M., Trinkle-Mulcahy,L., Sleeman,J.E., Ellenberg,J., Lamond,A.I. (2005). FRET analyses of the U2AF complex localize the U2AF35/U2AF65 interaction in vivo and reveal a novel self-interaction of U2AF35. *RNA*. 11, 1201-1214.
- Cmarko,D., Smigova,J., Minichova,L., Popov,A. (2008). Nucleolus: the ribosome factory. *Histol.Histopathol.* 23, 1291-1298.
- Cobrinik,D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
- Coleman,M.L., Marshall,C.J., Olson,M.F. (2003). Ras promotes p21Waf1/Cip1 protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *The EMBO journal* 22, 2036.
- Colombo,E., Marine,J.C., Danovi,D., Falini,B., Pelicci,P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533.
- Condemine,W., Takahashi,Y., Le Bras,M., de The,H. (2007). A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *Journal of Cell Science* 120, 3219-3227.
- Cooper,M.P., Balajee,A.S., Bohr,V.A. (1999). The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol.Cell* 10, 2119-2129.
- Coqueret,O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. [Review] [40 refs]. *Trends in Cell Biology* 13, 65-70.
- Coqueret,O., Gascan,H. (2000). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21(WAF1/CIP1/SD11). *Journal of Biological Chemistry* 275, 18794-18800.
- Dai,M.S., Shi,D., Jin,Y., Sun,X.X., Zhang,Y., Grossman,S.R., Lu,H. (2006). Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J Biol.Chem.* 281, 24304-24313.
- David-Pfeuty,T., Nouvian-Dooghe,Y., Sirri,V., Roussel,P., Hernandez-Verdun,D. (2001). Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* 20, 5951-5963.
- De Bondt,H.L., Rosenblatt,J., Jancarik,J., Jones,H.D., Morgan,D.O., Kim,S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.
- Delavaine,L., La Thangue,N.B. (1999). Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* 18, 5381-5392.
- Dempsey,E.C., Newton,A.C., Mochly-Rosen,D., Fields,A.P., Reyland,M.E., Insel,P.A., Messing,R.O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 279, L429-L438.
- Deng,C., Zhang,P., Wade Harper,J., Elledge,S.J., Leder,P. (1995). Mice Lacking p21 CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.

Devgan,V., Mammucari,C., Millar,S.E., Brisken,C., Dotto,G.P. (2005). p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes and Development* 19, 1485-1495.

Di Cunto,F., Topley,G., Calautti,E., Hsiao,J., Ong,L., Seth,P.K., Dotto,G.P. (1998). Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 280, 1069-1072.

Dotto,G.P. (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1471, M43-M56.

Dulic,V., Drullinger,L.F., Lees,E., Reed,S.I., Stein,G.H. (1993). Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 11034-11038.

Dulic,V., Kaufmann,W.K., Wilson,S.J., Tlsty,T.D., Lees,E., Harper,J.W., Elledge,S.J., Reed,S.I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-1023.

Dulic,V., Stein,G.H., Far,D.F., Reed,S.I. (1998). Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Molecular & Cellular Biology* 18, 546-557.

El Deiry,W.S., Harper,J.W., O'Connor,P.M., Velculescu,V.E., Canman,C.E., Jackman,J., Pietenpol,J.A., Burrell,M., Hill,D.E., Wang,Y., Wiman,K.G., Mercer,W.E., Kastan,M.B., Kohn,K.W., Elledge,S.J., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. (1994). WAF1/CIP1 Is Induced in p53-mediated G1 Arrest and Apoptosis. *Cancer Research* 54, 1169-1174.

El-Deiry,W.S., Tokino,T., Velculescu,V.E., Levy,D.B., Parsons,R., Trent,J.M., Lin,D., Mercer,W.E., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Estanyol,J.M., Jaumot,M., Casanovas,O., Rodriguez-Vilarrupla,A., Agell,N., Bachs,O. (1999). The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *Journal of Biological Chemistry* 274, 33161-33165.

Esteve,V., Canela,N., Rodriguez-Vilarrupla,A., Aligue,R., Agell,N., Mingarro,I., Bachs,O., Perez-Paya,E. (2003). The Structural Plasticity of the C Terminus of p21Cip1 is a Determinant for Target Protein Recognition. *Chembiochem.* 4, 863-869.

Etienne-Manneville,S., Hall,A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.

Evans,T., Rosenthal,E.T., Youngblom,J., Distel,D., Hunt,T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.

Fatica,A., Tollervey,D. (2002). Making ribosomes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14, 313-318.

Ferrandiz,N., Martin-Perez,J., Blanco,R., Donertas,D., Weber,A., Eilers,M., Dotto,P., Delgado,M.D., Leon,J. (2009). HCT116 cells deficient in p21Waf1 are hypersensitive to tyrosine kinase inhibitors and adriamycin through a mechanism unrelated to p21 and dependent on p53. *DNA Repair* 8, 390-399.

Fisher,R.P., Morgan,D.O. (1994). A novel cyclin associates with M015/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.

Flores-Rozas,H., Kelman,Z., Dean,F.B., Pan,Z.Q., Harper,J.W., Elledge,S.J., O'Donnell,M., Hurwitz,J. (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 8655-8659.

- Fontoura,B.M., Sorokina,E.A., David,E., Carroll,R.B. (1992). p53 is covalently linked to 5.8S rRNA. *Mol Cell Biol.* 12, 5145-5151.
- Fotedar,R., Fitzgerald,P., Rousselle,T., Cannella,D., Doree,M., Messier,H., Fotedar,A. (1996). p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene* 12, 2155-2164.
- Frangioni,J.V., Neel,B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal.Biochem.* 210, 179-187.
- Freedman,D.A., Levine,A.J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol.* 18, 7288-7293.
- Fritah,A., Saucier,C., Mester,J., Redeuilh,G., Sabbah,M. (2005). p21WAF1/CIP1 selectively controls the transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol.* 25, 2419-2430.
- Funk,J.O., Waga,S., Harry,J.B., Espling,E., Stillman,B., Galloway,D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes and Development* 11, 2090-2100.
- Gartel,A.L., Goufman,E., Tevosian,S.G., Shih,H., Yee,A.S., Tyner,A.L. (1998). Activation and repression of p21(WAF1/CIP1) transcription by RB binding proteins. *Oncogene* 17, 3463-3469.
- Gartel,A.L., Serfas,M.S., Gartel,M., Goufman,E., Wu,G.S., el Deiry,W.S., Tyner,A.L. (1996a). p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp.Cell Res* 227, 171-181.
- Gartel,A.L., Serfas,M.S., Tyner,A.L. (1996b). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 213, 138-149.
- Gartel,A.L., Tyner,A.L. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp.Cell Res* 246, 280-289.
- Gartel,A.L., Ye,X., Goufman,E., Shianov,P., Hay,N., Najmabadi,F., Tyner,A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 4510-4515.
- Gartel,A.L. (2005). The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leukemia Research* 29, 1237-1238.
- Gartel,A.L. (2006). Inducer and inhibitor: "Antagonistic duality" of p21 in differentiation. *Leukemia Research* 30, 1215-1216.
- Gartel,A.L., Radhakrishnan,S.K. (2005). Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences. *Cancer Research* 65, 3980-3985.
- Gartel,A.L., Tyner,A.L. (2002). The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 639-649.
- Gautier,J., Norbury,C., Lohka,M., Nurse,P., Maller,J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433-439.
- Geiss-Friedlander,R., Melchior,F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 947-956.
- Gervais,J.L., Seth,P., Zhang,H. (1998). Cleavage of CDK inhibitor p21(Cip1/Waf1) by caspases is an early event during DNA damage-induced apoptosis. *J Biol.Chem.* 273, 19207-19212.

BIBLIOGRAFIA

- Ghanem,L., Steinman,R.A. (2006). p21Waf1 inhibits granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells. *Leuk.Res* 30, 1285-1292.
- Girard,F., Strausfeld,U., Fernandez,A., Lamb,N.J.C. (1991). Cyclin a is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179.
- Gjerset,R.A. (2006). DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *J Mol Histol.* 37, 239-251.
- Gotz,C., Wagner,P., Issinger,O.G., Montenarh,M. (1996). p21(WAF1/CIP1) interacts with protein kinase CK2. *Oncogene* 13, 391-398.
- Goubin,F., Ducommun,B. (1995). Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 10, 2281-2287.
- Gregory,D.J., Garcia-Wilson,E., Poole,J.C., Snowden,A.W., Roninson,I.B., Perkins,N.D. (2002). Induction of transcription through the p300 CRD1 motif by p21WAF1/CIP1 is core promoter specific and cyclin dependent kinase independent. *Cell Cycle* 1, 343-350.
- Grossman,S.R. (2001). p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur.J Biochem.* 268, 2773-2778.
- Gu,W., Luo,J., Brooks,C.L., Nikolaev,A.Y., Li,M. (2004). Dynamics of the p53 acetylation pathway. *Novartis.Found.Symp.* 259, 197-205.
- Gu,Y., Turck,C.W., Morgan,D.O. (1993). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710.
- Guadagno,T.M., Newport,J.W. (1996). Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* 84, 73-82.
- Gulbis,J.M., Kelman,Z., Hurwitz,J., O'Donnell,M., Kuriyan,J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21-WAF1/CIP1 complexed with human PCNA. *Cell* 87.(2.): 297.306. 297.
- Halevy,O., Novitch,B.G., Spicer,D.B., Skapek,S.X., Rhee,J., Hannon,G.J., Beach,D., Lassar,A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021.
- Harbour,J.W., Dean,D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes and Development* 14, 2393-2409.
- Harper, J. W., Adami, G., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993a) The 21 kd Cdk interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harper,J.W., Adami,G.R., Wei,N., Keyomarsi,K., Elledge,S.J. (1993b). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* %19;75, 805-816.
- Harper,J.W., Elledge,S.J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 6, 56-64.
- Harper,J.W., Elledge,S.J., Keyomarsi,K., Dynlacht,B., Tsai,L.H., Zhang,P., Dobrowolski,S., Bai,C., Connell-Crowley,L., Swindell,E., . (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol.Biol.Cell.* 6, 387-400.
- Harreman,M.T., Kline,T.M., Milford,H.G., Harben,M.B., Hodel,A.E., Corbett,A.H. (2004). Regulation of Nuclear Import by Phosphorylation Adjacent to Nuclear Localization Signals. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20613-20621.
- Hartwell,L.H., Weinert,T.A. (1989). Checkpoints - Controls That Ensure the Order of Cell-Cycle Events. *Science* 246, 629-634.

- Harvey,K.J., Lukovic,D., Ucker,D.S. (2000). Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol.* 148, 59-72.
- Henderson,B.R., Eleftheriou,A. (2000). A Comparison of the Activity, Sequence Specificity, and CRM1-Dependence of Different Nuclear Export Signals. *Experimental Cell Research* 256, 213-224.
- Hengst,L., Gopfert,U., Lashuel,H.A., Reed,S.I. (1998). Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). *Genes and Development* 12, 3882-3888.
- Hengst,L., Reed,S.I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 227, 25-41.
- Hermeking,H., Lengauer,C., Polyak,K., He,T.C., Zhang,L., Thiagalingam,S., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.
- Hernandez-Verdun,D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem.Cell Biol.* 126, 135-148.
- Heun,P. (2007). SUMO Organization of the nucleus. *Curr.Opin.Cell Biol* 19, 350-355.
- Hidaka, H., Sasaki, Y., Tanaka, T., and et al. (1981) N-(6-aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78, 4354-4357.
- Hitomi,M., Shu,J., Agarwal,M., Agarwal,A., Stacey,D.W. (1998). p21Waf1 inhibits the activity of cyclin dependent kinase 2 by preventing its activating phosphorylation. *Oncogene* 17, 959-969.
- Hoeflich,K.P., Ikura,M. (2002). Calmodulin in Action: Diversity in Target Recognition and Activation Mechanisms. *Cell* 108, 739-742.
- Huang,D.Y., Chang,Z.F. (2001). Interaction of human thymidine kinase 1 with p21(Waf1). *Biochem.J* 356, 829-834.
- Huppi,K., Siwarski,D., Dosik,J., Michieli,P., Chedid,M., Reed,S., Mock,B., Givol,D., Mushinski,J.F. (1994). Molecular cloning, sequencing, chromosomal localization and expression of mouse p21 (Waf1). *Oncogene* 9, 3017-3020.
- Hwang,C.Y., Kim,I.Y., Kwon,K.S. (2007). Cytoplasmic localization and ubiquitination of p21Cip1 by reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 219-225.
- Jaken,S., Parker,P.J. (2000). Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22, 245-254.
- James,M.K., Ray,A., Leznova,D., Blain,S.W. (2008). Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Mol Cell Biol.* 28, 498-510.
- James,P., Vorherr,T., Carafoli,E. (1995). Calmodulin-binding domains: Just two faced or multi-faceted? *Trends.in Biochemical.Sciences.*20.(1.): 38.42. 38.
- Jarviluoma,A., Child,E.S., Sarek,G., Sirimongkolkasem,P., Peters,G., Ojala,P.M., Mann,D.J. (2006). Phosphorylation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 on serine 130 is essential for viral cyclin-mediated bypass of a p21Cip1-imposed G1 arrest. *Mol Cell Biol.* 26, 2430-2440.
- Jascur,T., Brickner,H., Salles-Passador,I., Barbier,V., El Khissiin,A., Smith,B., Fotedar,R., Fotedar,A. (2005). Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISP39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell* 17, 237-249.

Jaumot,M., Estanol,J.M., Casanovas,O., Grana,X., Agell,N., Bachs,O. (1997). The cell cycle inhibitor p21(CIP) is phosphorylated by cyclin A-CDK2 complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241, 434-438.

Javelaud,D., Besancon,F. (2002). Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol.Chem.* 277, 37949-37954.

Jeffrey,P.D., Russo,A.A., Polyak,K., Gibbs,E., Hurwitz,J., Massague,J., Pavletich,N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.

Jiang,H., Lin,J., Su,Z.Z., Collart,F.R., Huberman,E., Fisher,P.B. (1994). Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene*. 9, 3397-3406.

Jin,Y., Lee,H., Zeng,S.X., Dai,M.S., Lu,H. (2003). MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *The EMBO journal* 22, 6365-6377.

Jones,D.L., Alani,R.M., Munger,K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes and Development* 11, 2101-2111.

Juan,G., Cordon-Cardo,C. (2001). Intranuclear compartmentalization of cyclin E during the cell cycle: disruption of the nucleoplasm-nucleolar shuttling of cyclin E in bladder cancer. *Cancer Research* 61, 1220-1226.

Jürgen Dohmen,R. (2004). SUMO protein modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1695, 113-131.

Kahl,C.R., Means,A.R. (2003). Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. *Endocrine Reviews* 24, 719-736.

Karni-Schmidt,O., Zupnick,A., Castillo,M., Ahmed,A., Matos,T., Bouvet,P., Cordon-Cardo,C., Prives,C. (2008). p53 is localized to a sub-nucleolar compartment after proteasomal inhibition in an energy-dependent manner. *J Cell Sci.* 121, 4098-4105.

Kashiwagi,M., Ohba,M., Watanabe,H., Ishino,K., Kasahara,K., Sanai,Y., Taya,Y., Kuroki,T. (2000). PKC eta associates with cyclin E/cdk2/p21 complex, phosphorylates p21 and inhibits cdk2 kinase in keratinocytes. *Oncogene* 19, 6334-6341.

Kato,J., Matsushime,H., Hiebert,S.W., Ewen,M.E., Sherr,C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes and Development* 7, 331-342.

Kearsey,J.M., Coates,P.J., Prescott,A.R., Warbrick,E., Hall,P.A. (1995). Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* 11, 1675-1683.

Kelman,Z., Hurwitz,J. (1998). Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem.Sci.* 23, 236-238.

Kim,G.Y., Mercer,S.E., Ewton,D.Z., Yan,Z., Jin,K., Friedman,E. (2002). The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol.Chem.* 277, 29792-29802.

King,R.W., Deshaies,R.J., Peters,J.M., Kirschner,M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659.

King,R.W., Jackson,P.K., Kirschner,M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.

- Kitaura,H., Shinshi,M., Uchikoshi,Y., Ono,T., Iguchi-Arigo,S.M., Ariga,H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. [erratum appears in J Biol Chem 2000 May 26;275(21):16400.]. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10477-10483.
- Kivinen,L., Tsubari,M., Haapajarvi,T., Datto,M.B., Wang,X.F., Laiho,M. (1999). Ras induces p21Cip1/Waf1 cyclin kinase inhibitor transcriptionally through Sp1-binding sites. *Oncogene* 18, 6252-6261.
- Klibanov,S.A., O'Hagan,H.M., Ljungman,M. (2001). Accumulation of soluble and nucleolar-associated p53 proteins following cellular stress. *J Cell Sci.* 114, 1867-1873.
- Ko,L.J., Prives,C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes and Development* 10, 1054-1072.
- Korgaonkar,C., Hagen,J., Tompkins,V., Frazier,A.A., Allamargot,C., Quelle,F.W., Quelle,D.E. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol.* 25, 1258-1271.
- Koundrioukoff,S., Jonsson,Z.O., Hasan,S., de Jong,R.N., van der Vliet,P.C., Hottiger,M.O., Hubscher,U. (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol.Chem.* 275, 22882-22887.
- Kurki,S., Peltonen,K., Laiho,M. (2004). Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response. *Cell Cycle* 3, 976-979.
- Kwak,H.B., Jin,H.M., Ha,H., Kang,M.J., Lee,S.B., Kim,H.H., Lee,Z.H. (2005). Tumor necrosis factor-[alpha] induces differentiation of human peripheral blood mononuclear cells into osteoclasts through the induction of p21(WAF1/Cip1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330, 1080-1086.
- La Baer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, Ch., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & Development* 11, 847-862.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Le,H.V., Minn,A.J., Massague,J. (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. *J.Biol.Chem.* 280, 32018-32025.
- Leary,D.J., Huang,S. (2001). Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Letters* 509, 145-150.
- Lee,C., Smith,B.A., Bandyopadhyay,K., Gjerset,R.A. (2005). DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF. *Cancer Research* 65, 9834-9842.
- Lee,H., Zeng,S.X., Lu,H. (2006). UV Induces p21 rapid turnover independently of ubiquitin and Skp2. *J Biol.Chem.* 281, 26876-26883.
- Lee,J.Y., Yu,S.J., Park,Y.G., Kim,J., Sohn,J. (2007). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates p21WAF1/CIP1 for proteasomal degradation after UV irradiation. *Mol Cell Biol.* 27, 3187-3198.
- Lee,M.H., Reynisdottir,I., Massague,J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes and Development* 9, 639-649.

- Lee,S., Helfman,D.M. (2004). Cytoplasmic p21Cip1 Is Involved in Ras-induced Inhibition of the ROCK/LIMK/Cofilin Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279, 1885-1891.
- Leppard,J.B., Champoux,J.J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*. 114, 75-85.
- Leung,A.K., Andersen,J.S., Mann,M., Lamond,A.I. (2003). Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem.J* 376, 553-569.
- Leung,A.K., Trinkle-Mulcahy,L., Lam,Y.W., Andersen,J.S., Mann,M., Lamond,A.I. (2006). NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res* 34, D218-D220.
- Levine, A. J. (1997) P53, the cellura gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Levkau,B., Koyama,H., Raines,E.W., Clurman,B.E., Herren,B., Orth,K., Roberts,J.M., Ross,R. (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1, 553-563.
- Lew,D.J., Kornbluth,S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8, 795-804.
- Li,R., Waga,S., Hannon,G.J., Beach,D., Stillman,B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534-537.
- Li,X., Li,J., Harrington,J., Lieber,M.R., Burgers,P.M. (1995). Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. *J Biol.Chem.* 270, 22109-22112.
- Li,X., Amazit,L., Long,W., Lonard,D.M., Monaco,J.J., O'Malley,B.W. (2007). Ubiquitin- and ATP-Independent Proteolytic Turnover of p21 by the REG[gamma]-Proteasome Pathway. *Molecular Cell* 26, 831-842.
- Li,Y., Dowbenko,D., Lasky,L.A. (2002). AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 277, 11352-11361.
- Lin,J., Reichner,C., Wu,X., Levine,A.J. (1996). Analysis of wild-type and mutant p21-WAF-1 gene activities. *Molecular.and.Cellular.Biology*.16.(4.): 1786.1793. 1786.
- Lindstrom,M.S., Zhang,Y. (2006). B23 and ARF: friends or foes? *Cell Biochem.Biophys.* 46, 79-90.
- Liu,S.X., Bishop,W.R., Liu,M. (2003). Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 6, 183-195.
- Liu,W.S., Heckman,C.A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal.* 10, 529-542.
- Lohka,M.J., Hayes,M.K., Maller,J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3009-3013.
- Louvet,E., Junera,H.R., Berthuy,I., Hernandez-Verdun,D. (2006). Compartmentation of the nucleolar processing proteins in the granular component is a CK2-driven process. *Mol Biol.Cell* 17, 2537-2546.
- Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol.Chem.* 193, 265-275.

- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M., DeCarprio, J.A. (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 13, 367-372.
- Luo, Y., Hurwitz, J., Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159-161.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes and Development* 9, 935-944.
- Maggi, L.B., Jr., Kuchenruether, M., Dadey, D.Y.A., Schwoppe, R.M., Grisendi, S., Townsend, R.R., Pandolfi, P.P., Weber, J.D. (2008). Nucleophosmin Serves as a Rate-Limiting Nuclear Export Chaperone for the Mammalian Ribosome. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7050-7065.
- Malumbres, M. (2005). Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 4, 206-210.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat.Rev.Cancer* 1, 222-231.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 630-641.
- Manapov, F., Muller, P., Rychly, J. (2005). Translocation of p21(Cip1/WAF1) from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. *Gut* 54, 814-822.
- Mao, I., Liu, J., Li, X., Luo, H. (2008). REGgamma, a proteasome activator and beyond? *Cell Mol Life Sci.* 65, 3971-3980.
- Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.C., Levine, A.J. (1994). The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol.* 14, 7414-7420.
- Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P., Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Research* 61, 6234-6238.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Canela, N., Busino, L., Martinez-Balbas, M., Pagano, M., Agell, N., Bachs, O. (2009). Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogen* (in press).
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., Elledge, S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes and Development* 9, 650-662.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E., Oren, M. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes and Development* 15, 1067-1077.
- Mayer, C., Bierhoff, H., Grummt, I. (2005). The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes and Development* 19, 933-941.
- Mayer, C., Grummt, I. (2005). Cellular stress and nucleolar function. *Cell Cycle* 4, 1036-1038.
- McDonald, E.R., III, el Deiry, W.S. (2000). Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int.J Oncol.* 16, 871-886.
- McShea, A., Samuel, T., Eppel, J.T., Galloway, D.A., Funk, J.O. (2000). Identification of CIP-1-associated regulator of cyclin B (CARB), a novel p21-binding protein acting in the G2 phase of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23181-23186.

- Meador,W.E., Means,A.R., Quioco,F.A. (1993). Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* 262, 1718-1721.
- Medema,R.H., Klompmaker,R., Smits,V.A., Rijksen,G. (1998). p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene* 16, 431-441.
- Meggio,F., Pinna,L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17, 349-368.
- Meikrantz,W., Schlegel,R. (1996). Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J Biol.Chem.* 271, 10205-10209.
- Mercer,S.E., Ewton,D.Z., Deng,X., Lim,S., Mazur,T.R., Friedman,E. (2005). Mirk/dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25788-25801.
- Meulmeester,E., Melchior,F. (2008). Cell biology: SUMO. *Nature* 452, 709-711.
- Missero,C., Di Cunto,F., Kiyokawa,H., Koff,A., Dotto,G.P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes and Development* 10, 3065-3075.
- Mitsui,K., Matsumoto,A., Ohtsuka,S., Ohtsubo,M., Yoshimura,A. (1999). Cloning and characterization of a novel p21(Cip1/Waf1)-interacting zinc finger protein, ciz1. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 264, 457-464.
- Montagnoli,A., Fiore,F., Eytan,E., Carrano,A.C., Draetta,G.F., Hershko,A., Pagano,M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes and Development* 13, 1181-1189.
- Morgan,D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Ann.Rev.Cell Dev.Biol.* 13, 261-291.
- Munoz-Alonso,M.J., Acosta,J.C., Richard,C., Delgado,M.D., Sedivy,J., Leon,J. (2005). p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J Biol.Chem.* 280, 18120-18129.
- Nakanishi,M., Robetorye,R.S., Adami,G.R., Pereira-Smith,O.M., Smith,J.R. (1995). Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *EMBO Journal* 14, 555-563.
- Nakano,K., Vousden,K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.
- Nakayama,K., Nakayama,K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays.* 20, 1020-1029.
- Ng,C.C., Arakawa,H., Fukuda,S., Kondoh,H., Nakamura,Y. (2003). p53RFP, a p53-inducible RING-finger protein, regulates the stability of p21WAF1. *Oncogene* 22, 4449-4458.
- Nichols,A.F., Sancar,A. (1992). Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res* 20, 2441-2446.
- Noda,A., Ning,Y., Venable,S.F., Pereira-Smith,O.M., Smith,J.R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Experimental Cell Research* 211, 90-98.
- Norbury,C., Nurse,P. (1992). Animal Cell Cycles and Their Control. *Annual Review of Biochemistry* 61, 441-468.

- Nurse,P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 256, 547-551.
- Oda,E., Ohki,R., Murasawa,H., Nemoto,J., Shibue,T., Yamashita,T., Tokino,T., Taniguchi,T., Tanaka,N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oh,H., Mammucari,C., Nenci,A., Cabodi,S., Cohen,S.N., Dotto,G.P. (2002). Negative regulation of cell growth and differentiation by TSG101 through association with p21(Cip1/WAF1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 5430-5435.
- Ohtsubo,M., Theodoras,A.M., Schumacher,J., Roberts,J.M., Pagano,M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol.Cell Biol.* 15, 2612-2624.
- Olson,M.O. (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci.STKE*. 2004, e10.
- Olson,M.O., Hingorani,K., Szebeni,A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int.Rev Cytol.* 219:199-266., 199-266.
- Ono,T., Kitaura,H., Ugai,H., Murata,T., Yokoyama,K.K., Iguchi-Ariga,S.M.M., Ariga,H. (2000). TOK-1, a novel p21(Cip1)-binding protein that cooperatively enhances p21-dependent inhibitory activity toward CDK2 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 31145-31154.
- Oren,M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol.Chem.* 274, 36031-36034.
- Palancade,B., Doye,V. (2008). Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? *Trends in Cell Biology* 18, 174-183.
- Pan,Z.Q., Reardon,J.T., Li,L., Flores-Rozas,H., Legerski,R., Sancar,A., Hurwitz,J. (1995). Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J.Biol.Chem.* 270, 22008-22016.
- Panse,V.G., Kressler,D., Pauli,A., Petfalski,E., Gnadig,M., Tollervey,D., Hurt,E. (2006). Formation and nuclear export of preribosomes are functionally linked to the small-ubiquitin-related modifier pathway. *Traffic.* 7, 1311-1321.
- Papouli,E., Chen,S., Davies,A.A., Huttner,D., Krejci,L., Sung,P., Ulrich,H.D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19, 123-133.
- Pardee,A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 71, 1286-1290.
- Parker,P.J., Murray-Rust,J. (2004). PKC at a glance. *J Cell Sci.* 117, 131-132.
- Parker,S.B., Eichele,G., Zhang,P., Rawls,A., Sands,A.T., Bradley,A., Olson,E.N., Harper,J.W., Elledge,S.J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027.
- Pavletich,N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 287, 821-828.
- Pena,E., Berciano,M.T., Fernandez,R., Crespo,P., Lafarga,M. (2000). Stress-induced activation of c-Jun N-terminal kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibrils. *Exp.Cell Res* 256, 179-191.
- Perez-Roger,I., Kim,S.H., Griffiths,B., Sewing,A., Land,H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J* 18, 5310-5320.

- Perkins,N.D. (2002). Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* 1, 39-41.
- Phair,R.D., Misteli,T. (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404, 604-609.
- Phair,R.D., Misteli,T. (2001). Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 898-907.
- Pines,J. (1991). Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differentiation* 2, 305-310.
- Pinol-Roma,S., Dreyfuss,G. (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science* 253, 312-314.
- Podust,V.N., Podust,L.M., Goubin,F., Ducommun,B., Hubscher,U. (1995). Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry* 34, 8869-8875.
- Polyak,K., Kato,J.Y., Solomon,M.J., Sherr,C.J., Massague,J., Roberts,J.M., Koff,A. (1994a). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes and Development* 8, 9-22.
- Polyak, K., Lee, M.-H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Massagué, J. (1994b). Cloning of p27KIP1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.
- Poole,A.W., Pula,G., Hers,I., Crosby,D., Jones,M.L. (2004). PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 25, 528-535.
- Rabut G, Ellenberg J (2005). Photobleaching Techniques to Study Mobility and Molecular Dynamics of Proteins in Live Cells: FRAP, IFRAP and FLIP. In: *Live Imaging: A Laboratory Manual*, ed. Goldman RD, Spector DLCold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.
- Radhakrishnan,S.K., Gierut,J., Gartel,A.L. (2005). Multiple alternate p21 transcripts are regulated by p53 in human cells. *Oncogene* 25, 1812-1815.
- Raska,I., Shaw,P.J., Cmarko,D. (2006). New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. In: *International Review of Cytology. A Survey of Cell Biology*, ed. W.J.Kwang Academic Press, 177-235.
- Ray,A., James,M.K., Larochelle,S., Fisher,R.P., Blain,S.W. (2009). p27Kip1 Inhibits Cyclin D-Cyclin-Dependent Kinase 4 by Two Independent Modes. *Molecular and Cellular Biology* 29, 986-999.
- Ren,S., Rollins,B.J. (2004). Cyclin C/Cdk3 Promotes Rb-Dependent G0 Exit. *Cell* 117, 239-251.
- Rodriguez-Vilarrupla, A. (2003). Funcionalitat de la unió de la Calmodulina a la p21Cip1: Implicació en la localització cel.lular. Thesis/Dissertation
- Rodriguez-Vilarrupla,A., Diaz,C., Canela,N., Rahn,H.P., Bachs,O., Agell,N. (2002). Identification of the nuclear localization signal of p21(cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Letters* 531, 319-323.
- Rodriguez-Vilarrupla,A., Jaumot,M., Abella,N., Canela,N., Brun,S., Diaz,C., Estanyol,J.M., Bachs,O., Agell,N. (2005). Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153. *Mol Cell Biol* 25, 7364-7374.

- Romero-Oliva,F., Allende,J.E. (2001). Protein p21(WAF1/CIP1) is phosphorylated by protein kinase CK2 in vitro and interacts with the amino terminal end of the CK2 beta subunit. *J Cell Biochem.* 81, 445-452.
- Roninson,I.B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Letters* 179, 1-14.
- Rossig,L., Badorff,C., Holzmann,Y., Zeiher,A.M., Dimmeler,S. (2002). Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 9684-9689.
- Rossig,L., Jadidi,A.S., Urbich,C., Badorff,C., Zeiher,A.M., Dimmeler,S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular & Cellular Biology* 21, 5644-5657.
- Rousseau,D., Cannella,D., Boulaire,J., Fitzgerald,P., Fotedar,A., Fotedar,R. (1999). Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 18, 3290-3302.
- Rubbi,C.P., Milner,J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 22, 6068-6077.
- Russo,A.A., Jeffrey,P.D., Patten,A.K., Massague,J., Pavletich,N.P. (1996). Crystal structure of the p27-Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature (London.)* 382.(8589.): 325.331. 325.
- Russo,A.A., Tong,L., Lee,J.O., Jeffrey,P.D., Pavletich,N.P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 395, 237-243.
- Ryan,K.M., Phillips,A.C., Vousden,K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13, 332-337.
- Saha,P., Eichbaum,Q., Silberman,E.D., Mayer,B.J., Dutta,A. (1997). p21CIP1 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 17, 4338-4345.
- Sanchez,I., Dynlacht,B.D. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin.Cell Dev.Biol.* 16, 311-321.
- Sanchez,Y., Wong,C., Thoma,R.S., Richman,R., Wu,Z., Piwnica,W.H., Elledge,S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25 [see comments]. *Science* 277, 1497-1501.
- Santamaria,D., Barriere,C., Cerqueira,A., Hunt,S., Tardy,C., Newton,K., Caceres,J.F., Dubus,P., Malumbres,M., Barbacid,M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448, 811-815.
- Sasaki, Y. and Hidaka, H. (1982) Calmodulin and cell proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 104, 451-456.
- Scheer,U., Hock,R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 385-390.
- Scherl,A., Coute,Y., Deon,C., Calle,A., Kindbeiter,K., Sanchez,J.C., Greco,A., Hochstrasser,D., Diaz,J.J. (2002). Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol.Cell* 13, 4100-4109.
- Scott,M.T., Ingram,A., Ball,K.L. (2002). PDK1-dependent activation of atypical PKC leads to degradation of the p21 tumour modifier protein. *The EMBO journal* 21, 6771-6780.

BIBLIOGRAFIA

- Scott,M.T., Morrice,N., Ball,K.L. (2000). Reversible Phosphorylation at the C-terminal Regulatory Domain of p21Waf1/Cip1 Modulates Proliferating Cell Nuclear Antigen Binding. *Journal of Biological Chemistry* 275, 11529-11537.
- Serrano,M., Lin,A.W., McCurrach,M.E., Beach,D., Lowe,S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sheaff,R.J., Groudine,M., Gordon,M., Roberts,J.M., Clurman,B.E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes and Development* 11, 1464-1478.
- Sheaff,R.J., Singer,J.D., Swanger,J., Smitherman,M., Roberts,J.M., Clurman,B.E. (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Molecular Cell* 5, 403-410.
- Sherr,C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555.
- Sherr,C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Sherr,C.J., Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* 13, 1501-1512.
- Sherr,C.J., Roberts,J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes and Development* 18, 2699-2711.
- Sherr,C.J., Weber,J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 10, 94-99.
- Sherr, Ch and Roberts, Jm. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. (1995) *Genes & Development* 9, 1149-1163.
- Sherr,C.J. (2000). The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Research* 60, 3689-3695.
- Shim,J., Lee,H., Park,J., Kim,H., Choi,E.J. (1996). A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 381, 804-806.
- Shiohara,M., Koike,K., Komiyama,A., Koeffler,H.P. (1997). p21WAF1 mutations and human malignancies. *Leuk.Lymphoma* 26, 35-41.
- Shivji,K.K., Kenny,M.K., Wood,R.D. (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69, 367-374.
- Shivji,M.K., Grey,S.J., Strausfeld,U.P., Wood,R.D., Blow,J.J. (1994). Cip1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr.Biol.* 4, 1062-1068.
- Siliciano,J.D., Canman,C.E., Taya,Y., Sakaguchi,K., Appella,E., Kastan,M.B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes and Development* 11, 3471-3481.
- Sirri,V., Hernandez-Verdun,D., Roussel,P. (2002). Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *The Journal of Cell Biology* 156, 969-981.
- Sirri,V., Urcuqui-Inc, Roussel,P., Hernandez-Verdun,D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem.Cell Biol.* 129, 13-31.
- Smits,V.A., Klompmaker,R., Vallenius,T., Rijksen,G., Makela,T.P., Medema,R.H. (2000). p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol.Chem.* 275, 30638-30643.

- Snowden,A.W., Anderson,L.A., Webster,G.A., Perkins,N.D. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol.* 20, 2676-2686.
- Steinman,R.A., Hoffman,B., Iro,A., Guillouf,C., Liebermann,D.A., el Houseini,M.E. (1994). Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9, 3389-3396.
- Stillman,B. (1994). Smart machines at the DNA replication fork. *Cell* 78, 725-728.
- Sugimoto,M., Martin,N., Wilks,D.P., Tamai,K., Huot,T.J., Pantoja,C., Okumura,K., Serrano,M., Hara,E. (2002). Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). *Oncogene.* 21, 8067-8074.
- Suzuki,A., Kawano,H., Hayashida,M., Hayasaki,Y., Tsutomi,Y., Akahane,K. (2000). Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death & Differentiation* 7, 721-728.
- Suzuki,A., Tsutomi,Y., Akahane,K., Araki,T., Miura,M. (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17, 931-939.
- Suzuki,A., Tsutomi,Y., Miura,M., Akahane,K. (1999a). Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* 18, 1239-1244.
- Suzuki,A., Tsutomi,Y., Yamamoto,N., Shibutani,T., Akahane,K. (1999b). Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Molecular & Cellular Biology* 19, 3842-3847.
- Suzuki,T., Fujikura,K., Higashiyama,T., Takata,K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem.Cytochem.* 45, 49-53.
- Tanaka,H., Yamashita,T., Asada,M., Mizutani,S., Yoshikawa,H., Tohyama,M. (2002). Cytoplasmic p21Cip1/WAF1 regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *The Journal of Cell Biology* 158, 321-329.
- Tao,W., Levine,A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 6937-6941.
- Taules,M., Rius,E., Talaya,D., Lopez,G.A., Bachs,O., Agell,N. (1998). Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-Cdk4 during G(1). *JOURNAL.OF.BIOLOGICAL.CHEMISTRY.* 273, 33279-33286.
- Taules,M., Rodriguez,V.A., Rius,E., Estanyol,J.M., Casanovas,O., Sacks,D.B., Perez,P.E., Bachs,O., Agell,N. (1999). Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J.Biol Chem* 274, 24445-24448.
- Taylor,W.R., Stark,G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Taylor,W.R., DePrimo,S.E., Agarwal,A., Agarwal,M.L., Schonthal,A.H., Katula,K.S., Stark,G.R. (1999). Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53. *Molecular Biology of the Cell* 10, 3607-3622.
- Tembe,V., Henderson,B.R. (2007). Protein trafficking in response to DNA damage. *Cell Signal.* 19, 1113-1120.
- Timchenko,N.A., Harris,T.E., Wilde,M., Bilyeu,T.A., Burgess-Beusse,B.L., Finegold,M.J., Darlington,G.J. (1997). CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Molecular & Cellular Biology* 17, 7353-7361.

- Timchenko,N.A., Wilde,M., Nakanishi,M., Smith,J.R., Darlington,G.J. (1996). CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes and Development* 10, 804-815.
- Torrano,V., Navascues,J., Docquier,F., Zhang,R., Burke,L.J., Chernukhin,I., Farrar,D., Leon,J., Berciano,M.T., Renkawitz,R., Klenova,E., Lafarga,M., Delgado,M.D. (2006). Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. *J Cell Sci.* 119, 1746-1759.
- Touitou,R., Richardson,J., Bose,S., Nakanishi,M., Rivett,J., Allday,M.J. (2001). A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO Journal* 20, 2367-2375.
- Toutenhoofd,S.L., Strehler,E.E. (2000). The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium* 28, 83-96.
- Toyoshima,H., Hunter,T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Tschochner,H., Hurt,E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in Cell Biology* 13, 255-263.
- Vaque,J.P., Navascues,J., Shii,Y., Laiho,M., Ajenjo,N., Mauleon,I., Matallanas,D., Crespo,P., Leon,J. (2005). Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *J Biol.Chem.* 280, 1112-1122.
- Vera,J., Jaumot,M., Estanyol,J.M., Brun,S., Agell,N., Bachs,O. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor. *Oncogene* 25, 260-270.
- Vermeulen,K., Van Bockstaele,D.R., Berneman,Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131-149.
- Vigneron,A., Cherier,J., Barre,B., Gamelin,E., Coqueret,O. (2006). The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol.Chem.* 281, 34742-34750.
- Villalonga,P., Lopez-Alcala,C., Chiloeches,A., Gil,J., Marais,R., Bachs,O., Agell,N. (2002). Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37929-37935.
- Vlach,J., Hennecke,S., Amati,B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* 16, 5334-5344.
- Vogt,M., Haggblom,C., Yeargin,J., Christiansen-Weber,T., Haas,M. (1998). Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differentiation* 9, 139-146.
- Voit,R., Grummt,I. (2001). Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 13631-13636.
- Voit,R., Hoffmann,M., Grummt,I. (1999). Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J.* 18, 1891-1899.
- Waga,S., Hannon,G.J., Beach,D., Stillman,B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.
- Waldman,T., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research* 55, 5187-5190.

- Walker,D.H., Maller,J.L. (1991). Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*. 354, 314-317.
- Wang,W., Nacusi,L., Sheaff,R.J., Liu,X. (2005). Ubiquitination of p21Cip1/WAF1 by SCFSkp2: substrate requirement and ubiquitination site selection. *Biochemistry* 44, 14553-14564.
- Wang,Z., Bhattacharya,N., Mixter,P.F., Wei,W., Sedivy,J., Magnuson,N.S. (2002). Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochimica et Biophysica.Acta (BBA.) - Molecular Cell Research* 1593, 45-55.
- Warbrick,E., Lane,D.P., Glover,D.M., Cox,L.S. (1995). A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr.Biol.* 5, 275-282.
- Watanabe,H., Pan,Z.Q., Schreiber-Agus,N., DePinho,R.A., Hurwitz,J., Xiong,Y. (1998). Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1392-1397.
- Way,K.J., Chou,E., King,G.L. (2000). Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol.Sci.* 21, 181-187.
- Weinberg,R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81.(3): 323-330.
- Wendt,J., Radetzki,S., von Haefen,C., Hemmati,P.G., Guner,D., Schulze-Osthoff,K., Dorken,B., Daniel,P.T. (2005). Induction of p21CIP1/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* 25, 972-980.
- Wu,X., Li,J., Li,X., Hsieh,C.L., Burgers,P.M., Lieber,M.R. (1996). Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. *Nucleic Acids Res* 24, 2036-2043.
- Xiao,J., Zhang,Z., Chen,G.G., Zhang,M., Ding,Y., Fu,J., Li,M., Yun,J.P. (2009). Nucleophosmin/B23 interacts with p21WAF1/CIP1 and contributes to its stability. *Cell Cycle*. 8, 889-895.
- Xiong,Y., Hannon,G.J., Zhang,H., Casso,D., Kobayashi,R., Beach,D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* 366, 701-704.
- Xiong,Y., Zhang,H., Beach,D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 505-514.
- Yu,J., Zhang,L., Hwang,P.M., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7, 673-682.
- Yu,Y., Maggi,L.B., Jr., Brady,S.N., Apicelli,A.J., Dai,M.S., Lu,H., Weber,J.D. (2006). Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Molecular and Cellular Biology* 26, 3798-3809.
- Yuan,X., Zhou,Y., Casanova,E., Chai,M., Kiss,E., Grone,H.J., Schutz,G., Grummt,I. (2005). Genetic inactivation of the transcription factor TIF-1A leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 19, 77-87.
- Zatsepina,O.V., Voronkova,L.N., Sakharov,V.N., Chentsov,Y.S. (1989). Ultrastructural changes in nucleoli and fibrillar centers under the effect of local ultraviolet microbeam irradiation of interphase culture cells. *Exp.Cell Res* 181, 94-104.
- Zeman,S.M., Phillips,D.R., Crothers,D.M. (1998). Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 11561-11565.

BIBLIOGRAFIA

- Zeng,Y., Forbes,K.C., Wu,Z.Q., Moreno,S., PiwnicaWorms,H., Enoch,T. (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507-510.
- Zhang,H., Hannon,G.J., Beach,D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes and Development* 8, 1750-1758.
- Zhang,H., Xiong,Y., Beach,D. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Molecular Biology of the Cell* 4, 897-906.
- Zhang,Y., Fujita,N., Tsuruo,T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18, 1131-1138.
- Zhang,Y., Xiong,Y. (2001). Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differentiation* 12, 175-186.
- Zhou,B.P., Liao,Y., Xia,W., Spohn,B., Lee,M.H., Hung,M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. [see comments.]. *Nature Cell Biology* 3, 245-252.
- Zhou,P. (2006). REG[gamma]: A Shortcut to Destruction. *Cell* 124, 256-257.
- Zhu,H., Nie,L., Maki,C.G. (2005). Cdk2-dependent Inhibition of p21 stability via a C-terminal cyclin-binding motif. *J Biol.Chem.* 280, 29282-29288.