



Programa de Doctorat de Biomedicina
Bienni 2003-2005

Caracterització d'F-box28: una nova E3 ubiquitina lligasa implicada en la regulació del cicle cel·lular

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del
Dr. Francesc Viñals i Canals a la Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques
II de la Universitat de Barcelona.

Cristina Lacasa Salavert

Dr. Francesc Viñals i Canals

Memòria presentada per Cristina Lacasa Salavert
Per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

	pàgina
INTRODUCCIÓ	5
TGF- β 1	7
Via de senyalització de TGF- β 1	7
Algunes de les funcions de TGF- β 1	12
TGF- β i càncer	15
CICLE CEL·LULAR	20
Fase G0/G1	22
Fase S	23
Fase G2/M	24
Cicle cel·lular i via de la ubiquitina/proteasoma	25
SISTEMA UBIQUITINITZACIÓ/PROTEASOMA	27
Via de la ubiquitina/proteasoma	27
Ubiquitinització de proteïnes	33
E3s ubiquitines lligases	38
Les proteïnes F-box	45
Sistema de ubiquitinització i malalties patològiques	52
BASES DE L'ESTUDI I OBJECTIUS	57
RESULTATS	61
Pròleg: comprovació i generació d'eines de treball	63
Capítol I: Caracterització	69

Capítol II: Degradació	77
Capítol III: Funció	86
Capítol IV: Interacció amb substrats	94
DISCUSSIÓ	105
F-box28 com a E3 ubiquitina lligasa	107
Localització subcel·lular de la F-box28	110
F-box28 i implicació del cicle cel·lular	112
CONCLUSIONS	119
MATERIAL I MÈTODES	123
1. Cultius cel·lulars, transfeccions i assajos <i>in vivo</i>	125
2. Cultius procariotes	132
3. Tècniques de biologia molecular	135
4. RNA	146
5. Proteïnes	151
6. Expressió i purificació de proteïnes de fusió en <i>E. Coli</i>	158
7. Detecció de la unió proteïna-proteïna	160
REFERÈNCIES	165

INTRODUCCIÓ

1. TGF- β

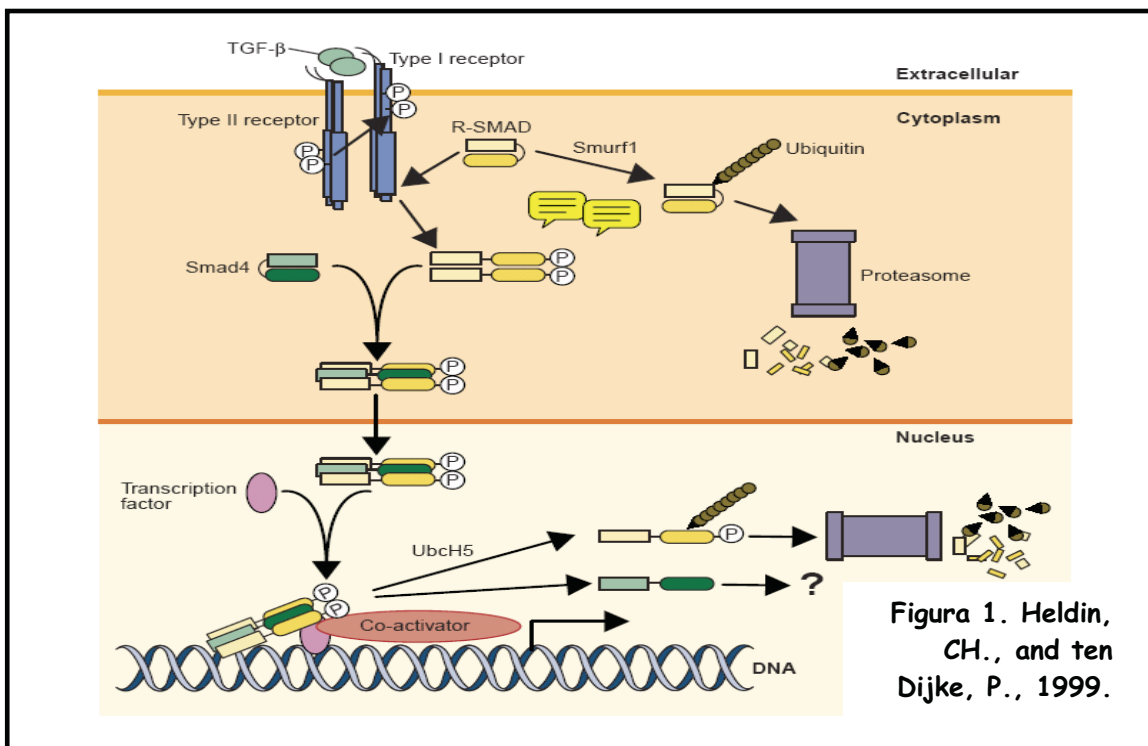
TGF- β 1 pertany a una família de citoquines (que inclou TGF- β s, activines, BMPs i d'altres) que regulen molts processos diferents com proliferació, diferenciació, i mort cel·lular. Presenten un patró d'expressió específic de teixit i tenen una importància crítica durant l'embriogènesi, així com en el manteniment de la homeòstasi durant la vida de l'organisme adult. Entre les seves funcions trobem control de la proliferació cel·lular, diferenciació, apoptosi, mobilitat cel·lular, etc. Una mala regulació de la senyalització per aquestes proteïnes es veu relacionada amb múltiples desordres i malalties, com càncer, fibrosi, angiogènesi i malalties autoimmunes (Massagué, J, 1998; ten Dijke, P. et al, 2000, Bertolino, P., et al., 2005).

Via de senyalització de TGF- β :

TGF- β transmet la seva senyal a través de la membrana cel·lular gràcies a uns receptors serina/treonina quinasa específics. El factor s'uneix a un receptor tipus II que forma un complex heterodimèric amb un receptor tipus I, alhora que el fosforila i l'activa. Això fa que s'iniciï una cascada de senyalització intracel·lular, que es dona principalment a través de l'activació específica de les proteïnes efectores Smads (Derynck, R., et al., 1994; Massagué, J., et al., 2005).

De proteïnes Smads n'hi ha de tres tipus: **1)** Un cop el receptor tipus I de TGF- β és activat, les R-Smads (Smad-2 i Smad-3), que són els transductors intracel·lulars de senyals de TGF- β , són presentades mitjançant la proteïna SARA (proteïna associada a membrana que forma part del complex de receptors de TGF- β) a aquest receptor i són fosforilades. **2)** Aquestes

Smads s'associen a una Co-Smad (Smad-4) formant heterooligòmers i són translocades a nucli. Aquí interaccionaran amb diferents factors de transcripció i cofactors, regulant positiva o negativament les respostes transcripcionals. 3) A més, també existeixen les I-Smads: Smad-6 i Smad-7. Aquestes proteïnes són reguladors negatius de la senyalització per TGF- β . Actuen interaccionant amb el receptor tipus I de TGF- β i bloquejant la unió del receptor amb les R-Smads. També poden disminuir la cascada de senyalització reclutant els receptors de membrana de TGF- β i dirigint-los al proteasoma per a la seva degradació (Kretzschmar, M. and Massagué, J., 1998; Derynck, R., et al., 2003) (Figura 1).



A més de la via clàssica de senyalització intracel·lular del TGF- β a través de les Smads, n'hi ha d'altres independents, com per exemple: activació de l'apoptosi a través de la via de les MAPK que activen la via de JNK o p38; inhibició del cycle cel·lular inactivant la quinasa p70 S6K, relacionada amb proliferació; o induint p21 a través de mecanismes que inclouen a Ras, MEKK1 i ERK (Moustakas, A., and Heldin., CH., 2005).

Regulació de la transcripció per les Smads:

Les Smads són factors de transcripció que es troben a nucli. La majoria de cops, la interacció amb els diferents promotors de DNA es dona a través de seqüències específiques SBEs (*Smad-binding elements*), encara que també s'ha vist certa afinitat per regions riques en GC. Aquestes proteïnes actuen unint-se a aquestes seqüències i regulant els promotors de gens diana. Per altra banda, també s'ha vist que l'afinitat de les Smads per les seqüències SBE de certs promotors sol ser molt baixa, per la qual cosa es pot requerir d'altres factors específics d'unió a SBE (ten Dijke, P., 2000).

La interacció de les Smads amb aquests factors de transcripció pot ser directe o a través de co-activadors (com CBP/p300). Un altre mecanisme que tenen les Smads per induir la transcripció és bloquejant co-repressors de la transcripció del DNA. A més, les Smads també poden actuar inhibint l'activitat transcripcional de certs gens. Això ho pot fer a través del reclutament de co-repressors, com SnoN o TGIF, que inhibeixen la seva activitat o a través de l'associació amb histones deacetilases, la qual cosa causa una repressió directe de la transcripció de gens específics (Itoh, S., et al., 2007).

Finalització de la senyalització:

Per tal d'aconseguir una bona regulació de la via de senyalització de TGF- β , cal que alhora que les Smad són activades, la cèl·lula envii senyals per acabar amb aquesta senyal. Aquesta regulació negativa es dona per diferents mecanismes:

- I-Smads que són induïdes per la unió del lligand TGF- β al receptor i participen en un *feedback* autocrí negatiu. Altres estímuls, com EGF o interferò- γ , també indueixen l'expressió de les I-Smads (Massagué, J., 2000)..
- Degradació del receptor tipus I de TGF- β per l'HECT E3 ubiquitina lligasa Smurf1. Aquest receptor pot internalitzar-se en vesícules de caveolina, ser poliubiquitinat i degradat pel proteasoma. A més, el complex Smad-7/receptor tipus I també pot ser poliubiquitinat per Smurf1 i per Smurf2.
- Degradació de les R-Smads: això permet mantenir nivells basals d'Smads no actives. En aquest procés hi participen tant Smurf1, que degrada Smad-1/Smad-5 de la via de les BMPs, com Smurf2 que té més afinitat per Smad-2/Smad-3. A més també hi participen altres tipus d'E3 ubiquitines lligases, com la proteïna CHIP (tipus U-box) que participa en la degradació d'Smad-4 d'una manera independent d'estimulació per TGF- β , o la proteïna SCF β TrCP1, que també està implicada en la degradació d'Smad-4 a través del complex del proteasoma.
- A part de la degradació de les R-Smads, també s'observa la presència de fosfatases que defosforilen aquestes proteïnes al citoplasma mantenint-les en un estat inactiu.
- Unió de les Smads a co-repressors que segreguen aquestes en diferents compartiments subcel·lulars o que afecten la formació del complex R-Smad/Smad-4.

- Degut a la baixa afinitat de les Smads pel DNA, aquestes requereixen de factors de transcripció i reclutament de co-activadors per unir-s'hi de manera eficient. Per això, la interrupció de la unió de les Smads al DNA o el reclutament de co-activadors té un efecte inhibitori de certes respostes gèniques específiques induïdes per les Smads (Itoh, S., et al., 2007).

Paper del proteasoma en la via de TGF- β :

La via del proteasoma està relacionada amb la regulació de moltes proteïnes del cicle cel·lular controlades per TGF- β , així com transductors de senyals claus en la seva via de senyalització (Zhang, F., et al., 2002) (Figura 2).

Aquesta regulació és tant positiva com negativa: degradació d'Smad-7 i de la proto-oncoproteïna SnoN manté la transducció del senyal activada, mentre que la degradació del complex del receptor de TGF- β així com de les R-Smads l'atura (Zhang, F., et al., 2003).

La potenciació o atenuació de l'activitat del sistema del proteasoma pot afectar la funció de TGF- β i conduir a situacions patològiques. Així, s'ha descrit que des-regulacions en l'expressió o funcions aberrants d'E3 ubiquitines lligases que participen en la via de senyalització de TGF- β (com les Smurfs) poden afectar la transmissió del senyal per TGF- β i afavorir processos de tumorigènesi, ja que moltes d'aquestes proteïnes estan implicades en el recanvi de molts supressors tumorals i oncoproteïnes (Izzi, L., and Attisano, L., 2006). A més, mutacions en les proteïnes Smads també poden afavorir aquest procés, ja que poden afectar l'estabilitat de la proteïna i fer que siguin degradades més ràpidament pel sistema del proteasoma, conduint a una senyalització aberrant per TGF- β (com en el cas d'Smad-4 mutada (Liang, M., et al, 2004)).

Com veurem més endavant, l'activitat del proteasoma és necessària per la transició de la fase S del cicle a G2/M. A més, també controla molts components de la fase G1. És a causa

d'aquesta habilitat per inhibir la proliferació cel·lular, que els inhibidors del proteasoma són considerats com a futurs candidats en la teràpia contra el càncer (Adams, J., 2002). S'ha de considerar però, els efectes negatius de TGF- β en la proliferació cel·lular, ja que la inhibició de la via del proteasoma en cèl·lules sensibles a TGF- β inhibeixen la seva resposta normal causant una entrada de les cèl·lules en la fase S del cicle cel·lular. Aquesta, podria ser una de les explicacions de com els tumors podrien estar escapant-se als efectes terapèutics dels inhibidors del proteasoma.

TGF- β signaling component	E2 conjugating enzyme	E3 ligase	Modification	Ligand-dependent	Adaptor	Effect of modification on signaling
Receptor complex		Smurf2	Ub	-/+	Smad7	inhibition
Receptor type I		Smurf1	Ub	+	Smad7	inhibition
Activated Smad2	UbcH5b/c, UbcH3	Smurf2	Ub	+		inhibition
Activated Smad3	UbcH5b/c	ROCI-SCI ^{FbwA}	Ub	+		inhibition
Smad1, Smad5		Smurf1,2	Ub	-/+		inhibition (BMP) stimulation (activin)
Smad4	Ubc9	PIASy	Sumo	-		increase
		unknown		-	Jab1	inhibition
Smad7		Smurf1	Ub	+		stimulation
		Smurf2		-/+		stimulation
SnoN	UbcH5	APC	Ub	+	Smad3	stimulation
		Smurf2	Ub	+	Smad2	stimulation

Figura 2. E3 Ubiquitines Lligases que participen en la via de senyalització de TGF- β .

Algunes de les funcions de TGF- β :

I) Funció anti-proliferativa.

TGF- β presenta funcions diferents, en relació a la proliferació, segons el tipus cel·lular on ens trobem. En cèl·lules derivades de mesènquima trobem funció mitogènica, mentre que en la

majoria de cèl·lules epitelials, endotelials, hepatòcits, limfòcits i cèl·lules mieloides presenten una inhibició de la proliferació en presència d'aquesta citoquina.

Aquesta funció anti-proliferativa es caracteritza, sobretot, per una aturada en la fase G1 tardana del cicle cel·lular. En la majoria de casos sol ser una aturada irreversible, però a vegades es veu associada a mort cel·lular (el mecanisme específic d'aquesta aturada del cicle és específica de cada tipus cel·lular). En general, TGF- β provoca dos tipus de respostes gèniques:

- a) inactivació de les quinases dependents de ciclins (cdk_s).
- b) disminució de c-myc. (Youl, K., and Bae, S., 2001).

➤ **TGF- β augmenta els inhibidors de cdk_s de la família Cip/Kip i de la família INK4.** Aquest factor indueix transcripcionalment, a través de la via de senyalització de les Smads, un increment ràpid i fort dels nivells d'inhibidor p15^{INK4B} i de p21^{Cip1}. Així, en cèl·lules epitelials de pulmó es va demostrar que aquest increment de l'inhibidor p15 provocava una redistribució de p27 i p21 des de ciclina D-cdk4/cdk6 al complex ciclina E-cdk2 i per tant, inhibia la $cdk2$. Aquesta unió fa que el complex no pugui ser fosforilat per la quinasa activadora de cdk_s (CAK) (Reynistóttir, I., et al., 1997).

A més, també s'ha demostrat que TGF- β pot induir aturada de cicle per una altra via independent de p15^{INK4B} en alguns tipus cel·lulars: incrementant els nivells de $cdk4$ i disminuint els de $cdc25A$, la qual cosa acabarà inactivant les quinases ja que es dona un augment de la fosforilació en residus tirosina de $cdk4/cdk6$ i $cdk2$ (Iavarone, A and Massagué, J., 1997), (Reynisdóttir, I., Polyak, K., et al, 1995).

➤ **C-myc és necessari per la progressió de les cèl·lules a través de la fase G1.** Per aquesta raó s'ha suggerit que aquest gen podria estar actuant com una diana important de les senyals anti-proliferatives de TGF- β . De fet, en línies cel·lulars de queratinòcits i altres tipus cel·lulars s'ha vist que coincidint amb l'aturada de cicle cel·lular en fase G1 causada per TGF- β , es produeix una ràpida davallada dels nivells d'mRNA de c-Myc (Alexandrow, M., et al., 1994). Aquesta disminució és causada per Smad-3 que reprimeix la transcripció de c-Myc juntament amb l'associació de factors de transcripció com E2F4 i E2F5. Aquest complex es forma a citoplasma en resposta a TGF- β i transloca a nucli on juntament amb Smad-4 s'uneix al promotor de c-Myc reprimint la seva expressió (Derynck, R., and Zhang, YE., 2003).

II) Funció pro-apoptòtica.

TGF- β és un important regulador de l'apoptosi en alguns tipus cel·lulars, però els mecanismes moleculars encara es desconeixen. Tot i això, s'han proposat dos mecanismes independents:

➤ A través de la via de les Smads: Smad-4 i Smad-3 poden interaccionar i formar un complex amb c-Jun i c-Fos, activant la via de senyalització de SAPK/JNK, implicada en la inducció de mort programada (Atfi, A., et al., 1997). A més, també s'han descrit altres gens com a dianes pro-apoptòtiques regulats transcripcionalment per les Smads, com TIEG1, factor de transcripció que inhibeix la proliferació i indueix apoptosi en cèl·lules epitelials, o SHIP, que inhibeix la via de senyalització d'AKT (implicada en supervivència) en cèl·lules hematopoiètiques (Siegel, PM., et al., 2003) ; Smad-7, que s'ha descrit com a factor mediador de l'apoptosi però també com a protector de la mort cel·lular. Segons el tipus cel·lular pot induir l'expressió de proteïnes pro-apoptòtiques o anti-apoptòtiques. Així s'ha vist que en cèl·lules de pròstata (Landstrom, M., et al., 2000), línies de queratinòcits i cèl·lules epitelials, Smad-7 promou l'apoptosi inhibint el factor de

supervivència NF- κ B. En altres tipus cel·lulars, però, com M1 i Hep3B (línies de limfòcits B) inhibeix la inducció d'apoptosi.

➤ A través de vies independents d'Smads. TGF- β pot induir apoptosi a través de l'activació de TAK1 (quinasa activadora de TGF- β , de la família de MAPK), que pot activar la via de p38, i a través de Daxx, proteïna d'unió al receptor FAS, que interacciona amb el receptor tipus II de TGF- β i acaba activant la via de p38 i JNK (Dennler, S., et al., 2002).

TGF- β i càncer

TGF- β presenta un doble paper en el procés de tumorigènesi. En les primeres fases, TGF- β inhibeix el creixement i desenvolupament tumoral induint parada del cicle cel·lular i apoptosi

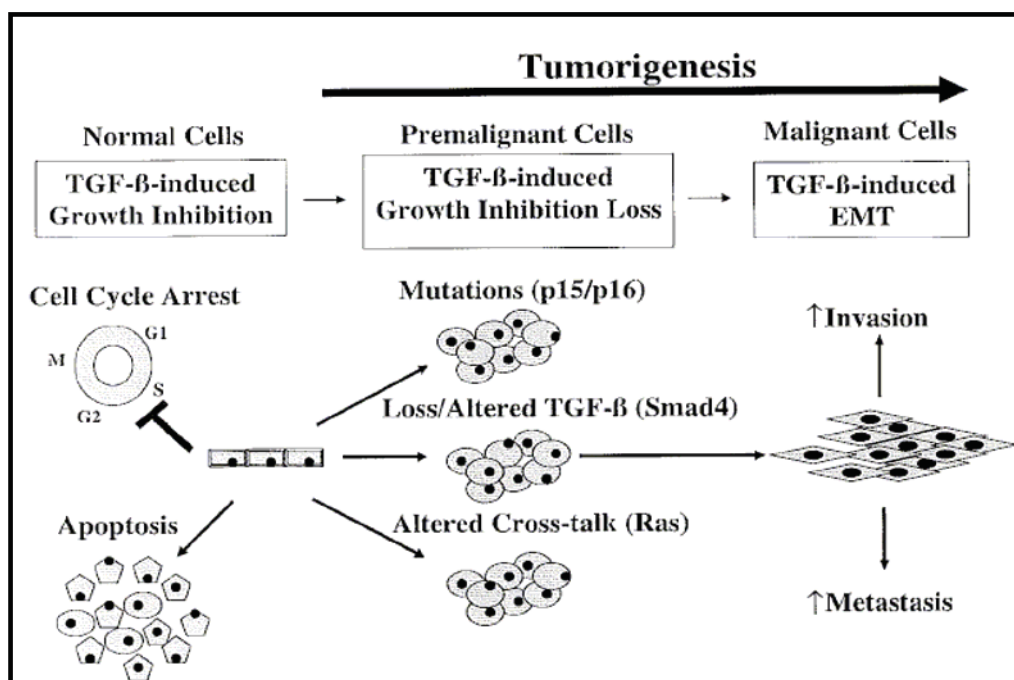


Figura 3. Jakowlew, SB., 2006.

(actua com a supressor tumoral). Però, en fases més tardanes de la progressió tumoral, quan les cèl·lules tumorals ja han escapat selectivament de la inhibició mitogènica per TGF- β , i les cèl·lules tumorals ja comencen a secretar quantitats altes de TGF- β , pot actuar com a promotor tumoral (Dennler, S., et al., 2002) ; **(Figura 3)**.

➤ Via de senyalització de TGF- β com a supressor tumoral:

El paper de TGF- β com a supressor tumoral es va evidenciar per la presència de mutacions inactivants en els gens que codifiquen pels receptors de TGF- β i en les proteïnes Smad.

En estadis primerencs de tumorigènesi, els receptors de TGF- β poden funcionar com a supressors tumorals, ja que s'ha vist que mutacions en aquests receptors (més comuns en el TGF- β RII que en el TGF- β RI) fa que les cèl·lules tumorals puguin escapar a la inhibició de la proliferació per TGF- β i els tumors puguin progressar (Markowitz, SD., et al., 1996). Per altra banda, també s'han descrit diferents mutacions en les proteïnes Smads, destacant la mutació d'Smad-4 en carcinoma de pàncrees (Maitra, A., et al., 2000). A més, també s'han descrit d'altres, com sobreexpressió d'Smad-7 que disminueix la resposta transcripcional de la via de les Smads, o altres mutacions addicionals que disminueixen la seva estabilitat, incrementant a la vegada la seva degradació mitjançant mecanismes de ubiquitinització. L'activitat supressora de TGF- β també s'atribueix en part a la seva participació en la regulació de l'expressió de proteïnes que juguen papers clau en el control de la progressió del cicle cel·lular de la fase G1 a la fase S (és a dir, a la seva funció com a agent anti-proliferatiu) (Jakowlerw, SB., 2006).

➤ Via de senyalització de TGF- β com a promotor tumoral:

Tot i l'activitat supressora tumoral descrita per TGF- β , s'ha vist que en tumors avançats, TGF- β pot tenir una pèrdua d'aquesta funció. En alguns casos, les cèl·lules somàtiques adquireixen mutacions en components de la via de transducció de senyals de TGF- β /Smads (Smads i receptors de TGF- β) per tal d'evitar la funció anti-proliferativa de TGF- β . En molts altres tumors, com glioblastoma, aquesta via no es veu afectada però les cèl·lules es tornen resistents a TGF- β . En aquest cas, TGF- β es considera un factor oncogènic, que indueix la invasió, migració, angiogènesi i metàstasi del tumors (de Csestecker, MP., et al., 2000). S'ha descrit que les cèl·lules del sistema immunitari poden tenir un efecte inhibitori sobre el creixement del tumor. Així, s'ha vist que TGF- β també pot tenir un paper com a promotor tumoral induint un bloqueig de la proliferació i diferenciació de cèl·lules del sistema immunitari, amb un particular efecte en les cèl·lules T. Aquests tumors on TGF- β actua com a factor oncogènic també solen expressar alts nivells de TGF- β , facilitant així un *loop* autocrí (ja que TGF- β es capaç d'induir la seva pròpia expressió) (Seoane, J., 2006).

Paper de TGF- β en l'angiogènesi:

Anomenem angiogènesi al procés de formació de nous vasos sanguinis a partir d'altres preexistents. L'angiogènesi té lloc durant el desenvolupament de l'organisme i es necessita pel manteniment de la integritat funcional i estructural del sistema circulatori en la vida del nou individu. Així, aquest procés té lloc durant processos com la inflamació, curació de ferides, situacions d'isquèmia, i durant el cicle reproductor femení. L'angiogènesi també es pot donar en situacions patològiques, com retinopatia proliferativa, artritis reumatoide i hemangioma juvenil. A més, també s'ha descrit la seva importància en càncer: quan els tumors arriben a una mida crítica,

necessiten atreure noves cèl·lules endotelials de l'estroma que els envolta per tal de formar la seva pròpia microcirculació (Pepper, MS., 1997).

L'angiogènesi pot dividir-se en dues fases: una fase d'activació, en la qual les cèl·lules endotelials comencen a proliferar i migrar per formar un nou vas; i una fase de resolució, on l'endoteli roman quiescent i es recluten cèl·lules musculars llises per formar el nou vas (Carmeliet, P., 2000). S'ha descrit que *in vitro*, TGF- β pot tant estimular com inhibir la proliferació de cèl·lules endotelials i això es degut a la via de senyalització de TGF- β en aquestes cèl·lules, que regula l'angiogènesi. Aquesta és dóna a través de dos receptors tipus I diferents: ALK5 i ALK1. TGF- β primer s'uneix a un receptor tipus II que després recluta al receptor tipus I (ALK1 o ALK5) en un complex comú. Aquests receptors tenen efectes contraris en les cèl·lules endotelials: ALK1 actua a través de Smad1/5 i indueix l'expressió de gens pro-angiogènics; ALK5, en canvi, ho fa a través de Smad2/3 i indueix l'expressió de gens que inhibeixen la proliferació i la migració cel·lular. Per tant, en funció de l'expressió d'un o altre receptor ALK, TGF- β jugarà un paper o un altre (Bertolino, P., et al., 2005).

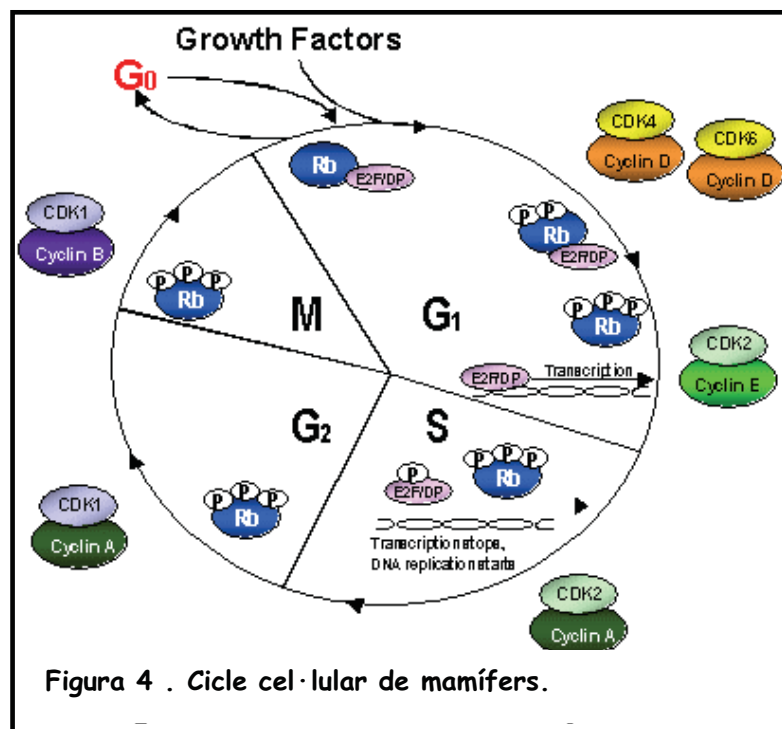
Per altra banda, els mecanismes d'estimulació de l'angiogènesi en la progressió del tumor per TGF- β s'ha descrit que combinen efectes directes i indirectes:

- i. TGF- β augmenta l'expressió de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que actúa directament sobre cèl·lules endotelials, promovent la seva proliferació i migració. A més, també s'ha vist que TGF- β indueix la formació de capil·lars en cèl·lules endotelials cultivades en matrius de col·lagen (Viñals, F., et al., 2001).
- ii. Com a efectes indirectes, TGF- β promou una potent activitat quimioattractant de monòcits, els quals alliberaran citocines angiogèniques.

iii. A més, TGF- β indueix canvis en el microambient afavorint condicions òptimes per la migració i formació de capil·lars. També s'ha vist que indueix l'expressió de metaloproteases com MMP-2 i MMP-9 (Derynck, R., 2001).

2. Cicle cel·lular

El cicle cel·lular és un procés complex relacionat amb el creixement i proliferació de les cèl·lules, amb el desenvolupament de l'organisme, la regulació de la reparació del dany al DNA, la hiperplàsia de teixits com a resposta a dany tissular i amb patologies com el càncer (Shafer, KA., 1998). En aquest procés hi participen moltes proteïnes reguladores que dirigeixen la cèl·lula a través de quatre fases diferents amb un ordre ben



definit i que acabaran desembocant en el fenomen de la mitosi i la producció de dues cèl·lules filles. Aquestes proteïnes reguladores dirigeixen la progressió del cicle cel·lular per les diferents fases, conegudes com G₁, S, G₂ i M. Morfològicament, el cicle cel·lular es subdivideix en la interfase (que inclou G₁, S i G₂) i la mitosi (que inclou profase, metafase, anafase i telofase) (Figura 4).

G₁ significa "pausa 1" i és la fase durant la qual la cèl·lula es prepara pel procés de replicació del DNA. És durant aquesta fase que la cèl·lula integra senyals mitogèniques o d'inhibició de la proliferació cel·lular (com TGF- β) i pren la decisió de continuar dividint-se, parar

o diferenciar-se de forma terminal. La majoria de cèl·lules adultes, ja diferenciades, no es divideixen i es troben en un estat de quiescència anomenat fase G0. Al final de la fase G1 es troba un *checkpoint* o punt de no retorn, per tal d'avaluar si la cèl·lula es troba en condicions de continuar dividint-se. La fase S és defineix com l'estat en que té lloc la síntesi de DNA. G2 és la "pausa 2" del cicle cel·lular en la que la cèl·lula es prepara per la mitosi. Finalment, és durant la fase M que els cromosomes replicats segreguen en dos nuclis i es dona la citoquinesi per donar lloc a dues cèl·lules filles en fase G1 (Jonson, DG., et al., 1999).

Els principals reguladors del cicle cel·lular són uns complexos holoenzimàtics que controlen la successió temporal i la progressió de les diferents fases del cicle. Aquests complexos estan formats per dues subunitats: una subunitat reguladora, ciclins, que oscil·len en quantitat al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular com a resultat d'una proteòlisi i síntesi periòdica, i una subunitat catalítica, quinases dependents de ciclina (CDKs) (Sánchez, I., and Dynlacht, B., 2005). Existeixen diversos membres de la família de ciclins i de CDKs, l'associació dels quals forma complexos específics necessaris per la progressió a través de les diferents fases del cicle cel·lular, així com per la diferenciació en alguns tipus cel·lulars.

A més, existeixen dues famílies d'inhibidors de les CDKs (CKIs) que regulen l'activitat d'aquests complexos: la família INK4, que inhibeix específicament CDK4/6 i que inclou p16^{INK4}, p15^{INK4}, p18^{INK4} i p19^{INK4}; i la família Cip/Kip, que regula l'activitat dels complexos CDKs associats a ciclina D-, E-, i A-. En aquesta família trobem p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, i p52^{Kip2} (Viallard, JF., et al., 2000).

En absència de senyals mitogèniques, presència de senyals anti-proliferatives o danys en el DNA, s'activa el *checkpoint G1/S* per tal de prevenir la progressió del cicle cel·lular. Aquest *checkpoint* és controlat principalment pel gen supressor de tumors p53. A més de p53, el gen ATM també es troba implicat en aquest procés. Així, ATM s'activa a través de la quinasa Chk2 i fosforila i estabilitza la proteïna p53. Aquesta, al seu torn, provoca un increment en la transcripció de p21 que inhibeix el complexos ciclina D-CDK4/6, ciclina E-CDK2 i la hiperfosforilació del retinoblastoma provocant una aturada en la fase G1. En el cas que la cèl·lula hagi detectat dany al DNA, aquesta aturada permet la seva reparació abans que tingui lloc la replicació, i en el cas que les lesions siguin molt severes, el que fa p53 és induir l'apoptosi de la cèl·lula (Kastan, MB., 2001).

Fase S:

En aquesta fase es dona la replicació del DNA i la duplicació dels cromosomes. En aquest punt la cèl·lula ha d'assegurar que la replicació només es doni una vegada abans no s'hagi acabat la divisió cel·lular. Per això té un sistema de "*replication licensing*" que evita la re-replicació i on hi participen les proteïnes Mcm2-7. Quan la cèl·lula surt de metafase, els orígens de replicació del DNA queden units amb aquestes proteïnes. Aquest sistema roman actiu durant la fase G1 però s'inactiva en la fase S, G2 i inici de M, de manera que ja no poden unir-se més proteïnes Mcm. Només els orígens de replicació que tinguin unides aquestes proteïnes podran iniciar la replicació, i quan aquesta ha tingut lloc, les Mcm2-7 s'alliberen de manera que no es pot tornar a donar la replicació del DNA. Les proteïnes Mcm2-7 funcionen com una helicasa que relaxa el DNA de cada forca de replicació (Blow, JJ., and Hodgson, B., 2002).

A més, la progressió de la fase S també està regulada per complexos CDKs-ciclins.

La ciclina A, regulada en part pel factor E2F, s'acumula durant la transició de la fase G1-S i es manté durant tota la fase S. Inicialment, s'associa a CDK2, però al final d'aquesta fase, ho fa amb CDK1 (Johnson, DG., et al., 1999). Abans de metafase és degradada pel sistema de ubiquitina/proteasoma. A més, aquest complex ciclina A-CDK2 participa en un *feedback* negatiu, ja que la seva activació indueix la repressió de l'activitat d'E2F. Una de les funcions d'aquest sistema és fosforilar components del sistema de replicació del DNA per el inici de la síntesi d'aquest.

Fase G2-M :

En la fase G2, la cèl·lula troba un altre *checkpoint* per tal d'avaluar si el material genètic i les estructures cel·lulars, com els centrosomes, s'han duplicat adequadament abans de dividir-se. Si detecta dany al DNA i/o duplicació incompleta s'activen vies que inicien la parada del cicle en la fase G2 (Tessema, M., et al., 2004).

La fase M combina mitosi (segregació de component cel·lulars) i citoquinesi (divisió final en dues cèl·lules filles). L'entrada en mitosi és induïda pel complex ciclina A-CDK1 i un augment de l'activitat del complex ciclina B-CDK1 (complex conegut també com a MPF). La defosforilació i activació de MPF té lloc quan l'activitat de la fosfatasa dual CDC25C és superior a la de les quinases Wee1 i Myt1 (Nigg, EA., 2001). A més, aquests enzims estan controlats per *checkpoints* que retrasen la mitosi, aturant les cèl·lules en G2, en presència de DNA no replicat o danyat. Aquests complexos ciclina A/B-CDK1 fosforilen molts substrats, com proteïnes d'unió a microtúbuls o implicades en la condensació de cromosomes, trencament de l'embolcall nuclear, formació del fus mitòtic i separació de centrosomes. A més, també controlen el complex APC/C (veure pàgina 40), el qual controla la degradació de reguladors mitòtics crítics, d'inhibidors

particulars de l'anafase (securines) i ciclins. Perquè les cèl·lules surtin de la mitosi i es doni la citoquinesi les ciclins A i B han de ser degradades.

Cicle cel·lular i via de la ubiquitina/proteasoma:

La via de la ubiquitina/proteasoma és un important regulador del control del cicle cel·lular. No només estan els nivells de ciclins regulats per ubiquitinització, sinó que també regula els nivells d'altres proteïnes clau del cicle, inclosos els inhibidors dels complexos Cdk-ciclins (Nakayama, KI., et al., 2005).

La funció principal de la divisió del cicle cel·lular és duplicar la informació genètica de forma correcta a través del procés de replicació del DNA i assignar aquesta informació de forma equivalent en dues cèl·lules filles a través de la mitosi. Per complir aquests dos processos la cèl·lula acobla reguladors positius i negatius (que molts cops són la mateixa molècula que té ambdues funcions) per tal d'assegurar el manteniment d'un sol "estat" (que es defineix com la sèrie de processos que tenen lloc en un mateix moment). Un cop aquest "estat" ja ha realitzat la seva funció, s'ha de superar la barrera inhibidora que impedeix la transició cap al següent "estat". La transició entre "estats" està controlada per la proteòlisi via ubiquitinització. Un exemple d'aquests reguladors són les ciclins de la fase S que promouen l'inici de la replicació del DNA però impedeixen la re-replicació, i les ciclins mitòtiques que promouen l'entrada en mitosi però inhibeixen la sortida (Koepp, DM., et al., 1999).

En la regulació del cicle cel·lular, s'ha descrit la participació de dues E3s ubiquitines lligases: el complex APC/C i el complex SCF.

- **SCF**. En cèl·lules de mamífer s'ha descrit que els nivells de p27 i de les ciclines D- i E- de la fase G1 són regulades per fosforilació (per cdks de la fase G1) i degradades per la via de la ubiquitina amb la participació de complexos SCF. A més, també s'ha descrit que el factor E2F1 es pot unir al complex SCF Skp2 per ser posteriorment ubiquitinat (Marti, A., et al., 1999). La majoria de substrats degradats a través de complexos SCF pertanyen a les fases primerenques del cicle cel·lular. Tot i així, també s'ha descrit la implicació d'aquest complex en la degradació de la quinasa Wee1, regulador que controla l'entrada en mitosi, i de Sic1, proteïna que promou la sortida de mitosi a través de la inhibició de l'activitat dels complexos ciclines mitòtiques-cdks.

- **APC/C**. En mitosi hi ha dos events subjectes a control per proteòlisi, la separació de les cromàtides i la sortida de telofase a interfase. Ambdós events depenen del complex APC/C. Per la progressió de metafase a anafase el complex APC/C participa en la degradació d'inhibidors de l'anafase (com Pds1 a llevat), mentre que per la sortida de telofase i entrada en G1 participa en la degradació de les ciclines tipus B (Pagano, M., 1997). A més, l'activació d'APC/C depèn de la unió de co-activadors. Així, quan el co-activador Cdc20 s'uneix a APC/C aquest promou la progressió de metafase a anafase estimulante, per exemple, la degradació de Pds1 a través del proteasoma. El co-activador Cdh1 és qui promou la destrucció de les ciclines mitòtiques i la sortida de mitosi. Així doncs, aquests co-activadors jugarien el mateix paper que les F-box (veure pàgina 38) en els complexos SCF, ja que la seva unió a APC/C, és qui confereix l'especificitat de substrat (Harper, JW., et al., 2002).

3. Sistema ubiquitinització/proteasoma

Via de la ubiquitina-proteasoma:

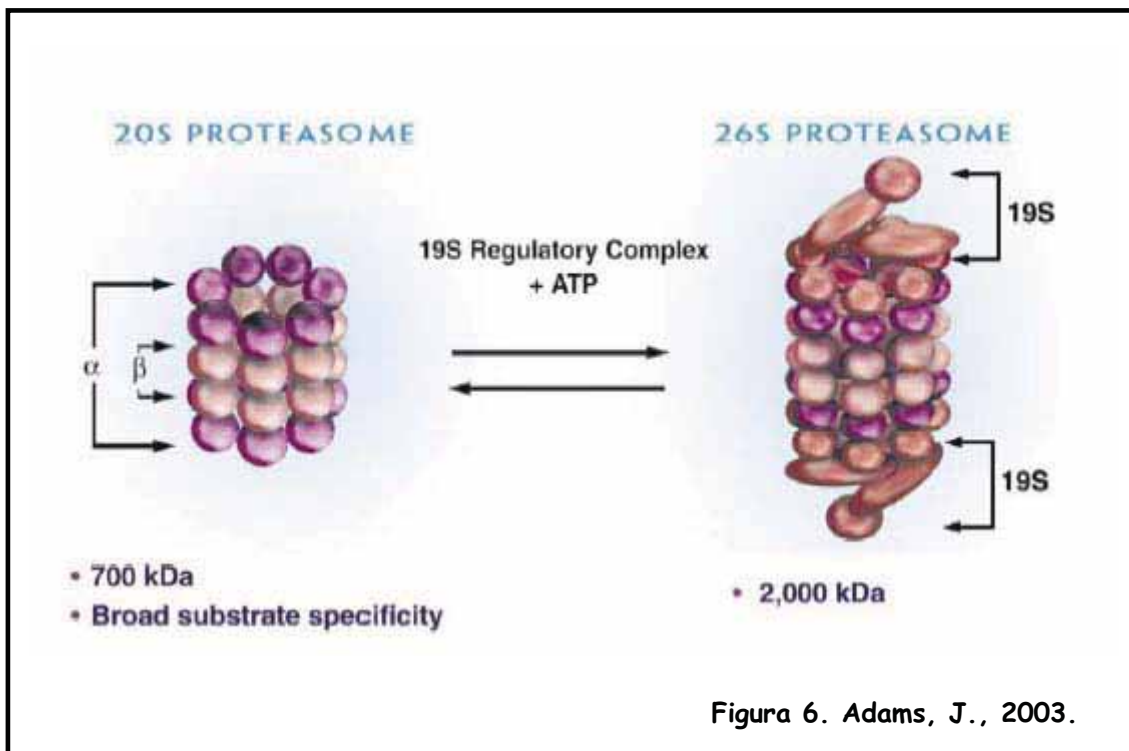
En les cèl·lules eucariotes existeixen dos mecanismes de degradació de proteïnes:

- i. Lisosomes: els lisosomes/vacuoles són els llocs principals per la degradació no específica de proteïnes en les cèl·lules eucariotes. Aquests orgànuls contenen proteases que degraden proteïnes intracel·lulars sota condicions estressants, proteïnes associades a membrana o proteïnes extracel·lulars que entren per endocitosi (Knop, M., 1993).
- ii. Via de la ubiquitina-proteasoma: responsable de la major part del recanvi de proteïnes intracel·lulars, tant en condicions estressants com no estressants (Sha, SA., et al., 2001). Aquesta via és responsable del 80%-90% de la degradació de proteïnes cel·lulars i té com a proteasa principal el proteasoma 26S (Zwickl, P., et al., 1999). Les proteïnes que s'han de degradar són marcades amb una cadena de poliubiquitines i són ràpidament degradades per aquest complex. Depenen de la funció d'aquest complex varis processos cel·lulars com progressió del cicle cel·lular, diferenciació cel·lular, transducció de senyals, respostes a estrès i apoptosi.

El proteasoma:

El proteasoma és un complex multicatalític altament conservat i comú en els tres dominis: *archae*, *bacteria* i eucariotes (Zwickl, P., 1999).

El proteasoma 20S d'eucariotes existeix com un complex proteasa en estat latent amb un coeficient de sedimentació de 20S, d'aquí el seu nom. Aquest proteasoma 20S també pot actuar com un centre catalític formant un gran complex proteolític amb reguladors activadors com els complexos 19S i/o PA28.



Les partícules 19S, d'aproximadament 700kDa, s'uneixen al proteasoma 20S d'una forma ATP depenent per donar lloc al proteasoma 26S (**Figura 6**). Aquests complexos 19S serveixen per reconèixer les proteïnes ubiquitinades, i són capaces d'unir aquestes cadenes de poliubiquitina i

tallar-les de la proteïna substrat (Fujinami, K., et al., 1994). Aquest substrat és llavors desnaturalitzat (o "desplegat") i és introduït en el complex proteolític 20S.

El proteasoma 26S participa en la via de proteòlisi dependent de ubiquitina, però també s'ha vist que pot participar en una via independent. Així, s'ha demostrat que el proteasoma 26S pot degradar proteïnes unides a altres proteïnes, que substituirien la molècula de ubiquitina (com és el cas de l'ornitina descarboxilasa), o bé proteïnes que contenen seqüències reconegudes com a senyals de degradació (Orlowski, M., and Wilk, S., 2003).

El proteasoma 20S es troba localitzat en el nucli i en el citoplasma de cèl·lules eucariotes (Rivett, A.J., et al., 1992). A més, també s'ha observat que un petit percentatge del total de proteasomes (<20%) es troba associat a la superfície citoplasmàtica del reticle endoplasmàtic (Brooks, P., et al., 2000).

Proteasoma 20S :

El complex 20S és un complex en forma de "bota" de 15nm de llargada i 11nm de diàmetre. Està format per dues còpies de 14 subunitats diferents, les quals, basades en la seva similitud de seqüència, es poden classificar en subunitats tipus- α i tipus- β . Aquestes es disposen en anells heterooligomèrics de set subunitats formant dos anells exteriors (les tipus- α) i dos interiors (les tipus- β). Aquesta disposició dona la forma de "bota" al complex (Baumeister, W., et al., 1998). Els dos anells exteriors, juntament amb les partícules reguladores 19S formen un canal estret (d'uns 10Å), a través del qual només podran passar proteïnes que hagin estat desnaturalitzades i linealitzades. Els extrems N-terminal d'aquests anells- α externs poden adoptar conformacions diferents, obstruint o permetent l'entrada del substrat com si fos una porta d'entrada (Smith, DM., et al., 2006). El lloc catalític està format pels dos anells- β interiors, cada un dels quals conté tres llocs actius. Estudis de mutagènesi dirigida van identificar

en les tres subunitats actives un residu conservat de treonina com a nucleòfil, classificant el proteasoma 20S com una treonina-proteasa (Bochtler, M., et al., 1999). Aquests llocs es diferencien per la seva especificitat de substrat i activitat: similar a quimotripsina (talla després de residus hidrofòbics), similar a tripsina (talla després de residus bàsics) i similar a hidrolasa de pèptids post-glutàmics (talla després de residus àcids). A més, aquestes activitats es van anomenar segons enzims que tenien la mateixa activitat i especificitat proteolítica. A més, també s'han identificat dues activitats addicionals que tallen després de cadenes de residus ramificats i entre aminoàcids petits i neutres (Orlowski, M., et al., 1993). Les proteïnes són degradades generant pèptids entre 3 i 25 aminoàcids (Adams, J., 2003). A més, en mamífers, s'ha vist l'estimulació de tres subunitats β addicionals per l'interferò- γ , cada una de les quals substitueix una de les subunitats β específiques. Aquests immunoproteasomes estan implicats en el procés de formació de l'extrem C-terminal dels antígens en la presentació de molècules MHC de classe I (Schwarz, K., et al., 2000).

El proteasoma 20S és responsable de la degradació de proteïnes de vida mitja curta com reguladors transcripcionals, reguladors del cicle cel·lular, oncogens i supressors tumorals. A més, també s'ha vist que pot degradar moltes proteïnes de membrana i secretores, així com que està implicat en la producció d'antígens (Voges, D., et al., 1999).

L'activitat proteolítica del proteasoma 20S està regulada per tal de prevenir la degradació de proteïnes generalitzada en la cèl·lula. Dos fets estructurals eviten aquesta degradació no específica de proteïnes cel·lulars: el fet que el proteasoma té els seus llocs actius en els anells interns tipus- β , i la petita obertura per on entren les proteïnes desnaturalitzades dels anells tipus- α (Coux, O., et al, 1996).

El proteasoma 20S s'uneix reversiblement a dos subcomplexes reguladors terminals, 19S i PA28, que s'uneixen al proteasoma 20S en els seus dos extrems i en orientacions oposades per tal de formar proteasomes enzimàticament actius. També es poden unir a inhibidors com PI31.

a. Complexes 19S :

La recerca de moduladors de l'activitat del proteasoma va dur a identificar un activador del proteasoma d'aproximadament 700kDa, PA700 o complexes 19S (Chu-Ping, M., et al., 1994). Aquests complexos estan formats per unes 20 subunitats de 25 a 110kDa. Entre aquestes, hi ha sis subunitats caracteritzades per un domini d'uns 200 aminoàcids que contenen motius d'unió a ATPases (Rpt1-Rpt6), anomenades família d'ATPases AAA (ATPases associades a varies activitats cel·lulars) i unes altres addicionals que són no ATPases (Rpn) (Ogura, T., and Tanaka, K., 2003). Aquestes ATPases són necessàries en la degradació i la desnaturalització de proteïnes diana. Probablement, també reconeixen i uneixen proteïnes parcialment desplegadas o aberrants, així com també participen en la seva translocació cap al proteasoma 20S (Larsen, CN., and Finley, D., 1997).

El complex 19S es pot dissociar en dos subcomplexes : una " base" i una "tapa", les quals constitueixen la part proximal i la distal, respectivament, de la subunitat catalítica 20S (Glickmann, MH., et al., 1998). La base conté les sis ATPases (S7/Rpt1, S4/Rpt2, S6/Rpt3, S10b/Rpt4, S6'/Rpt5 i S8/Rpt6) que s'uneixen en un anell que formarà la interfase entre el complex 19S i el proteasoma 20S, les dues subunitats més grans (S1/Rpn2 i S2/Rpn1) i la subunitat S5a/Rpn10. La subunitat ATPasa S6'/Rpt5 s'ha vist que pot interaccionar amb cadenes de poliubiquitina i que aquesta interacció és dependent de la hidròlisi d'ATP (Lam, YA., et al., 2002). A més, també s'ha demostrat que la subunitat S5a/Rpn10 és capaç d'unir cadenes de poliubiquitina que continguin com a mínim quatre molècules d'ubiquitina (Deveraux, Q., 1994). El

complex de la base s'uneix als anells- α externs del proteasoma 20S d'una forma dependent d'ATP. Aquesta unió pot obrir la obertura d'aquests anells- α per tal de permetre l'entrada de la proteïna. La tapa conté vuit subunitats no ATPases i és necessària per la degradació de proteïnes ubiquitinades. Aquest complex de la tapa és necessari pel reconeixement de les proteïnes diana.

➤ Enzims de-ubiquitinadors (DUBs):

Els enzims de-ubiquitinadors (DUBs) serveixen per reciclar les molècules de ubiquitina. Aquests enzims són tiol proteases que trenquen específicament l'enllaç peptídic que uneix la molècula de ubiquitina als aminoàcids de les proteïnes (veure pàgina 32) (Wilkinson, KD., 1997). En mamífers s'han trobat tres DUBs associats al complex 19S del proteasoma (Yao, T., et al., 2006). L'activitat d'aquests enzims talla la cadena de poliubiquitina subunitat a subunitat i començant des de la part distal de la cadena.

b. PA28:

PA28 o regulador 11S (REG) va ser purificat per primera vegada de glòbuls vermells en sang (Chu-Ping, M., 1992). PA28 és un regulador del proteasoma 20S format per tres proteïnes, PA28 α , PA28 β i PA28 γ . PA28 α i PA28 β formen un complex en forma d'anell heterohexamèric alternant subunitats α i β . En canvi, PA28 γ apareix com un complex homopolimèric localitzat predominantment a nucli, a diferència del PA28($\alpha\beta$), que presenta una distribució marcadament citoplasmàtica (Tanahashi, N., et al., 1999). PA28($\alpha\beta$) és induït per l'interferò- γ i es diferencia del complex 19S en que no requereix la utilització d'ATP en la seva unió al proteasoma 20S per activar-lo (Dubiel, W., et al., 1992). Majoritàriament estimula la hidròlisi de pèptids petits, però no la degradació de proteïnes ubiquitinades o desnaturalitzades.

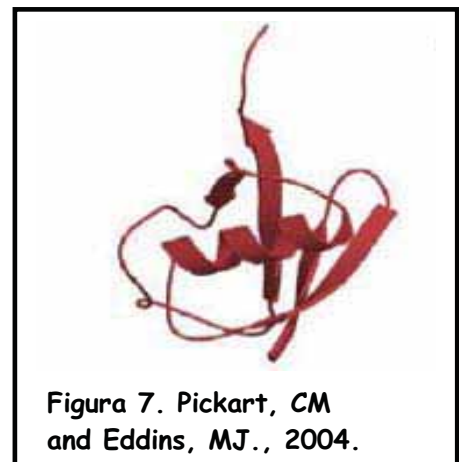
Cal remarcar que degut a que l'interferò- γ també regula l'expressió de tres subunitats del proteasoma (LMP2, LMP7 i MECL-1) relacionades amb el sistema de producció d'antígens, segurament el regulador PA28 juntament amb el complex del proteasoma, serveixin per optimitzar la presentació d'antígens (Realini, C., et al., 1994).

c. PI31:

Proteïna inhibidora del proteasoma 20S que es va purificar de glòbuls vermells en sang bovina. PI31 té aproximadament 30kDa i actua com a inhibidor de la hidròlisi de proteïnes i pèptids del proteasoma 20S per un mecanisme d'unió estricte a aquest complex proteolític (Chu-Ping, M., 1992) però sense arribar a formar un complex estable com en el cas dels activadors PA38 i complexos 19S.

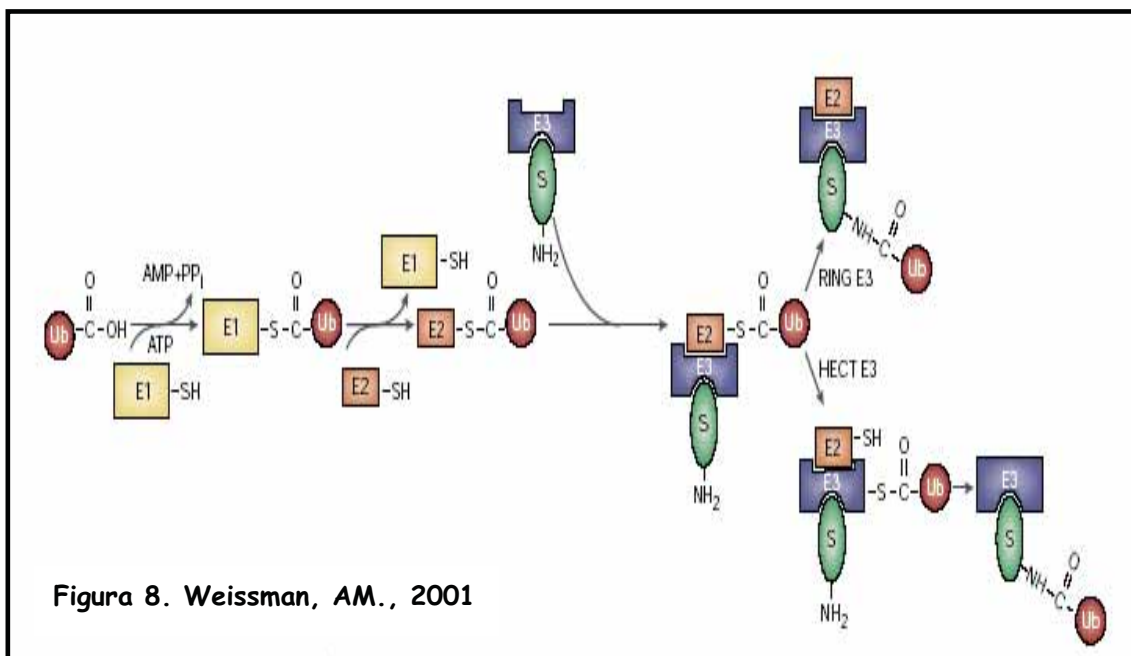
Ubiquitinització de proteïnes:

La ubiquitina (Ub) (**Figura 7**) és una proteïna de 76 aminoàcids que es troba a la cèl·lula de forma lliure o unida covalentment a altres proteïnes (Varshavsky, A., 1997). Va ser descrita per primera vegada l'any 1975 com una proteïna abundant i altament conservada (Schlesinger, DH., 1975). El 1978-1985, Hershko i els seus col·laboradors van identificar la Ub com un component essencial en el sistema proteolític dependent d'ATP en un extracte de reticulòcits de conill. A més, van descriure *in vitro* l'enzimologia E1-E2-E3 que participa en la conjugació de les molècules de ubiquitina (Hershko, A., et al., 1983).



i. **Enzim activador de ubiquitines (E1):** aquest enzim activa el grup C-terminal del residu de glicina 76 (Gly) d'una molècula de Ub en una reacció que requereix ATP, com a pas obligatori en tots els processos dependents de lligació de molècules de Ub. Aquesta activació implica la formació d'un intermediari d'alta energia tiol ester E1-S~Ub. Els E1 comparteixen una cisteïna (Cys) molt conservada a través del qual formen l'enllaç tiol ester amb la ubiquitina. Diferents membres de la família d'E1 poden tenir funcions especialitzades, segurament transferint les molècules d'Ub a E2 particulars o directament a certs substrats (Hochstrasser, M., 1996).

ii. **Enzim conjugador de ubiquitines (E2):** l'enzim E2 accepta la Ub des de d'intermediari d'E1 per una reacció de transtiolació, altra cop gràcies al grup C-terminal de la Ub (Hershko, A., 1988). Com les E1, totes les E2s comparteixen una Cys molt conservada que s'uneix a la ubiquitina i es distingeixen per la presència d'un domini UBC, necessari per la unió de les diferents E3s.



iii. Proteïna lligasa de ubiquitines (E3): l'enzim E3 és responsable del reconeixement específic del substrat del sistema de ubiquitinització (Glickman, MH., and Ciechanover, A., 2002). Catalitza la transferència de la Ub des d'E2 al grup ϵ -amino de la lisina d'una proteïna acceptora (**Figura 8**).

Hi ha més E2s que E1s, i més E3s que E2s. Així doncs, a cada etapa, el nombre de proteïnes que poden participar augmenta, de la mateixa manera que l'especificitat d'unió del següent component. Finalment, és l'E3 qui sol o en combinació amb E2, reconeix específicament el substrat que serà ubiquitinat (Weissman, A., 2001; Pickart, C., et al., 2004).

Les proteïnes ubiquitinades estan en un estat dinàmic, en el qual se li poden afegir més molècules de ubiquitina, es poden treure aquestes per enzims de-ubiquitinadors, o poden ser degradades pel proteasoma 26S. Aquest complex proteolític trenca la proteïna en pèptids petits alhora que les molècules de ubiquitina són reciclades.

Poliubiquitinització versus monoubiquitinització:

Els substrats poden patir diferents modificacions per la unió de molècules de ubiquitina com multiubiquitinització (diferents motius de ubiquitina unides a diferents Lys de la proteïna), monoubiquitinització o poliubiquitinització (llargues cadenes de ubiquitines que s'uneixen per enllaços isopeptídics entre el C-terminal d'una Gly d'una ubiquitina i la Lys d'una altra cadena de ubiquitina) (**Figura 9**).

A més, aquestes modificacions per ubiquitina poden tenir funcions cel·lulars diverses. Així, les cadenes de poliubiquitina que s'uneixen entre elles per la Lys48 representen una senyal per degradar aquests substrats a través del proteasoma. En canvi, les que s'uneixen per Lys63, s'ha vist que participen en vies d'endocitosi, de reparació del DNA i en activació de proteïnes

quinasa (Hoeller, D., et al., 2007). Així, s'ha descrit per exemple, la participació del sistema de la ubiquitina en la via del factor de transcripció NF- κ B. Aquest factor roman inactiu en el citoplasma gràcies a la unió de l'inhibidor I κ B α . La quinasa I κ B (IKK) indueix la fosforilació de l'inhibidor, la qual cosa fa que sigui poliubiquitinat via Lys48 i degradat pel proteasoma. Un cop NF- κ B és alliberat, s'activa i transloca a nucli on activarà diferents gens diana. A més, IKK i la quinasa que activa IKK (TAK1) requereixen ambdues de la unió de poliubiquitines via Lys63 per tal de ser actives (Haglund, K., et al., 2005).

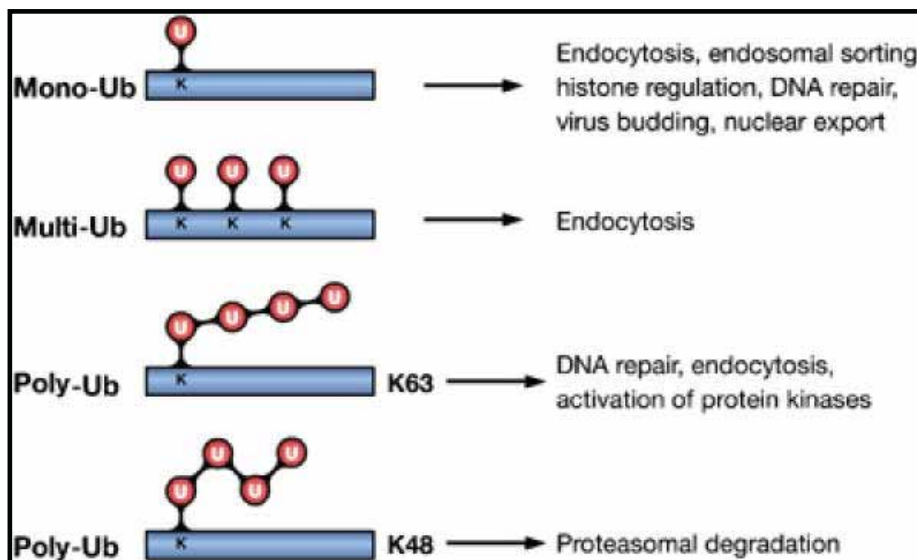


Figura 9. Haglund, K., et al., 2005.

Per altra banda, també s'ha descrit que la monoubiquitinització pot jugar diferents funcions reguladores per diverses proteïnes diana: la monoubiquitinització és una senyal important durant l'endocitosis de receptors de membrana i la seva distribució cap al lisosoma per tal de ser degradats. En aquests processos solen participar proteïnes adaptadores (com Eps15, epsines i Hrs) que contenen en la seva seqüència dominis d'unió a Ub (UBD) i que són capaces de

reconèixer els receptors ubiquitinats i distribuir-los a través de la via endocítica. A més, aquestes proteïnes amb dominis UBD, sovint també participen en la monoubiquitinació de les proteïnes que transporten (Hoeller, D., et al., 2006). La monoubiquitinació també es relaciona amb la localització subcel·lular, com és el cas de la E3 ubiquitina lligasa Nedd4-1, que a través de la monoubiquitinació del supressor tumoral PTEN afavoreix la seva importació a nucli, mentre que la seva poliubiquitinació per la mateixa E3 provoca la seva degradació en el citoplasma a través del proteasoma (Trotman, LC., et al., 2007). Un altre exemple el trobem en la proteïna supressora de tumors, p53: l'E3 ubiquitina lligasa MDM2 s'ha vist que tant pot poliubiquitar com monoubiquitar p53. Ambdues activitats, però, participen en funcions deferents: mentre que la primera provoca una degradació de p53 en el nucli a través de proteasomes nuclears, la segona sembla que estaria relacionada amb la translocació de p53 a citoplasma, proporcionant així un mecanisme ràpid i reversible d'aturada de la funció de p53 (Li, M., et al., 2003). Una altra funció que sembla estar relacionada amb la monoubiquitinació és la regulació transcripcional per modificació d'histones i factors de transcripció, com s'ha vist en el cas de la histona H2B: la seva monoubiquitinació induïx la repressió d'alguns gens com ARG1 (gen arginosuccinat sintasa) i també està implicada en el fenomen de silenciament de gens telomèrics (Masafumi, Muratami., et al., 2003).

Finalment, també s'ha relacionat la via de la ubiquitina amb la reparació del DNA. En la reparació del DNA hi participa l'antigen cel·lular proliferatiu de nucli (PCNA) que encercla el DNA durant la replicació d'aquest. S'ha vist que dos tipus de modificacions de PCNA determinen quin DNA polimerasa s'unirà a PCNA i quin tipus de reparació del DNA tindrà lloc. Així, la monoubiquitinació de PCNA en la Lys164 dirigeix la reparació mutagènica del DNA, mentre que la poliubiquitinació via Lys63 dirigeix la reparació lliure d'error del DNA (Haglund, K., et al., 2005).

E3 Ubiquitines Lligases

Existeixen tres famílies de proteïnes ubiquitines lligases (E3s): proteïnes homòlogues a l'extrem C-terminal de E6AP (HECT), *Really interesting new gene* (RING) i proteïnes homòlogues a UFD2 (U-box) (Figura 10).

E3s HECT:

Les E3s HECT són grans proteïnes que es defineixen per la presència d'una regió d'aproximadament 350 aminoàcids homòloga a la regió C-terminal de la proteïna E6AP (Nuber, U., and Scheffner, M., 1999). Aquest domini uneix el intermediari E2-ubiquitina i transfereix aquesta molècula a un residu de cisteïna conservat de l'E3 formant un altre molècula intermediària mitjançant un enllaç tio-èster (Kumar, S., et al., 1997). Aquesta Ub serà després transferida per l'E3 a un residu Lys del substrat diana. La regió N-terminal és la que determina l'especificitat del substrat.

E3s RING:

El domini RING és un motiu curt i ric en residus conservats de cisteïna i histidina, els quals coordinen dos àtoms de zinc. La unió d'aquests àtoms és necessària pel plegament correcte del domini RING i les seves funcions biològiques (Borden, KLB., 2000). Molts d'aquests dominis RING s'ha vist que tenen una unió directa a E2 i que aquesta interacció podria ser important per les funcions biològiques del domini RING de les E3s. Aquest domini és l'encarregat de transferir la Ub de l'E2 a una proteïna diana en una reacció per proximitat. És a dir, s'ha demostrat que el substrat i el lloc actiu de E2 no estan més a prop de 15Å, per la qual cosa el domini RING

catalitza la reacció mantenint a prop la Lys del substrat i el lloc actiu del intermediari E2-Ub (VanDemark, AP., and Hill, CP., 2002).

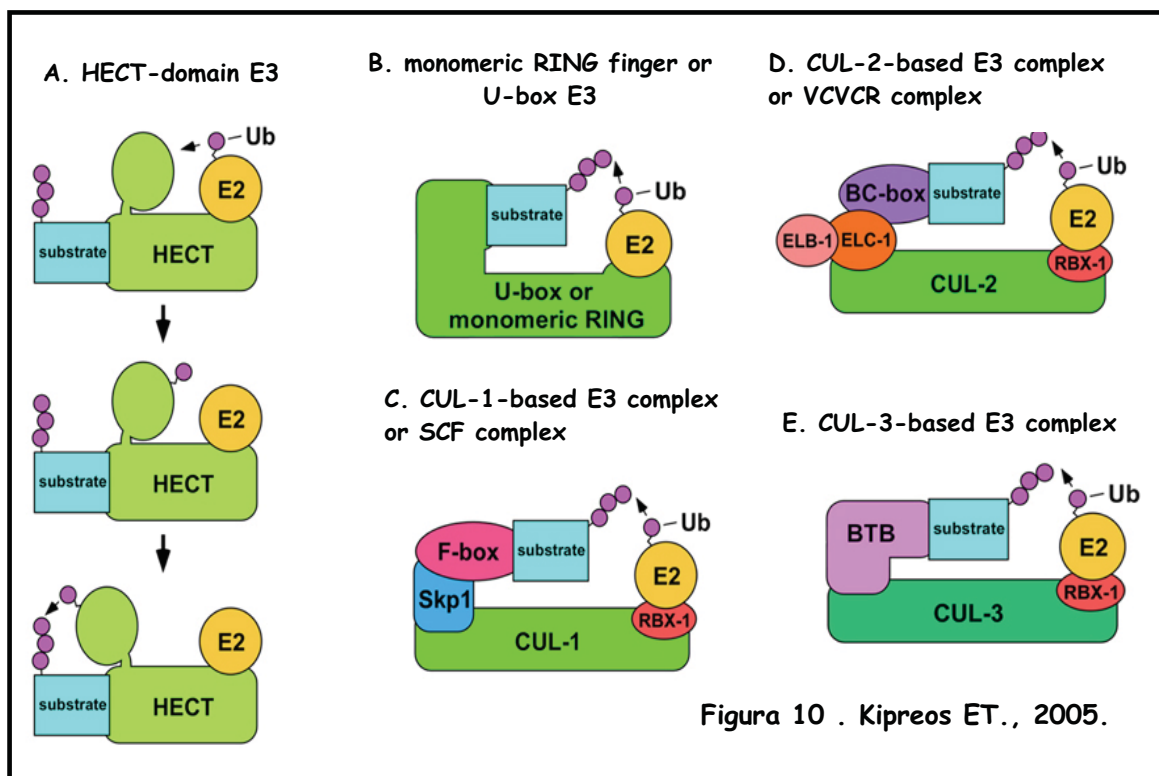


Figura 10 . Kipreos ET., 2005.

E3s U-box:

Un domini d'unió d'E2 anomenat U-box defineix aquesta petita família d'E3s. Les E3s U-box es van identificar per primer cop en la proteïna Udf2 de llevat (Koegl, M., et al., 1999). Aquest domini és una versió derivada del domini RING, en el qual li manquen els residus responsables de la quelació de metalls. A diferència dels clàssics dominis RING estabilitzats per ions zinc coordinats per cisteïnes i histidines, les U-box s'estabilitzen per un sistema de ponts

salins i enllaços d'hidrogen (Aravind, L., et al., 1995). Aquests dominis regulen la interacció de l'E3 amb el intermediari E2-Ub per tal de transmetre la Ub a una Lys diana. A diferència de les E3s HECT i RING que normalment poliubiquïtinen en la Lys 48, les U-box ho poden fer en altres posicions diferents com Lys 29 i 63. També s'ha observat una funció especialitzada de l'activitat E3 que transmet cadenes de poliubiquitina a proteïnes ubiquitinades per altres E3s (Hatakeyama, S., et al., 2001).

Dins la família E3s RING trobem diferents tipus exemples, com:

i. SCF (Skp1/cullin/F-box): aquest tipus de complex està format per quatre subunitats altament conservades en eucariotes : Cul1, Rbx1, Skp1 i un membre de la família de proteïnes F-box. Rbx1 (també conegut com Roc1 o Hrt1), el qual conté un domini RING-H2 (variant del domini RING, que conté una inserció que permet la formació d'un tercer lloc d'unió a zinc), i Cul1 formen un centre catalític que participa en el reclutament d'E2. La proteïna F-box participa en la unió i reconeixement del substrat, i Skp1 actua com un adaptador que uneix la F-box a Cul1 (Zheng, N., et al., 2002). S'ha proposat que la funció de Cul1 és la de crear una separació prou rígida entre l'enllaç de la subunitat F-box i el substrat, i entre el intermediari E2-Ub i Rbx1. Aquesta disposició ajuda a que el residu de Lys del substrat adopti una conformació apropiada per tal que reaccionï amb el intermediari E2-Ub.

Els substrats del complex SCF representen un ampli espectre de proteïnes que participen en una varietat de funcions cel·lulars, incloent regulació de l'activitat de les CDks, activació de la transcripció, transducció de senyals, assemblatge del cinetocor i replicació del DNA (Deshaies, R.J., 1999). Aquestes proteïnes són sovint fosforilades per cascades específiques de transducció de senyals. Aquests substrats fosforilats són reconeguts com a dianes dels

complexes SCF (Laney, JD and Hochstrasser, M., 1999). A més, un altre via opcional de regulació d'aquestes E3s és la modulació dels nivells d'algunes F-box, a través fins i tot, de la seva pròpia degradació d'una manera dependent del complex SCF (Craig, KL., and Tyers, M., 1999).

ii. Complex VCBCR: el gen supressor de tumors de *von Hippel-Lindau* (VHL) es troba mutat en la majoria de càncers de ronyó. La proteïna VHL es troba expressada en molts teixits i tipus cel·lulars i té com a funcions principals: repressió de gens inductors d'hipòxia, regulació de l'estabilitat de p27 i regulació de l'assemblatge de la matriu de fibronectina (Kamura, T., et al., 1999). A més, s'ha vist que VHL és una proteïna que forma part d'un complex que inclou l'Elongina B i C, Cul2 i la proteïna amb motiu RING-H2 Rbx1, el qual comparteix seqüència i similituds estructurals amb el complex SCF. Cul2 i Rbx1 interaccionen per activar i reclutar l'E2, mentre que l'elongina B/C fa de molècula adaptadora entre Cul2 i un motiu BC-box de VHL (d'una manera anàloga a Skp1, en el complex SCF). Finalment, és VHL qui reconeix específicament el substrat (Clifford, SC., et al., 2001).

iii. APC (complex promotor de l'anafase)/ciclosoma: el complex APC/C està regulat per la fosforilació de les diferents subunitats del complex per assegurar la correcta degradació de ciclines i altres reguladors del cicle cel·lular. Aquest complex és necessari per la degradació de substrats que controlen la transició de metafase a anafase i la destrucció de la ciclina B per permetre la sortida de mitosis (Jackson, PK., et al., 2000). APC/C conté múltiples subunitats, moltes de les quals encara es desconeix la funció. Una excepció, però, són les subunitats Apc2 i Apc11, les quals presenten una similitud de seqüència amb components del complex SCF. Així, Apc2 comparteix un domini homòleg de les cullines (domini CHD) i Apc11 conté un domini RING-H2, necessari per l'activitat del complex APC/C. A més, s'ha demostrat que Apc2 i Apc11 formen

un complex ubiquitina lligasa anàleg al complex Cul1/Rbx1 i que aquest complex pot unir E2s i estimular la ubiquitinització (Harper, JW., et al., 2002).

L'especificitat del substrat a degradar per APC/C ve donada a través de la unió de dos co-activadors: Cdc20 i Cdh1. La seva unió a APC/C durant la mitosi permet aconseguir un ordre temporal en la degradació dels substrats. El complex Cdc20-APC reconeix principalment el domini D-Box (*the destruction box*), present a la majoria de ciclines mitòtiques en l'extrem N-terminal, mentre que el complex Cdh1-APC reconeix tant el domini D-Box com el *KEN box*, present en Cdc20, substrat a la vegada d'aquest complex Cdh1-APC (Pfleger, CM., and Kirschner. MW., 2000).

iv. Complex Cul3-BTB :

Aquest complex està format per les subunitats Cul3, Rbx1 i proteïnes amb domini BTB, responsables del reconeixement del substrat. L'homologia estructural entre les proteïnes BTB i Skp1 o elongina C han hipotetitzat que les proteïnes BTB poden interaccionar de manera directa amb Cul3, de manera que mantindrien les propietats de Skp1 i F-Box (del complex SCF) en un únic polipèptid. A més del domini BTB, aquestes proteïnes poden tenir altres com dominis d'homologia a TRAF (MATH), repeticions WD40, repeticions de dits de zinc o *repeticions Kelch*, que serveixen com a lloc d'unió pels substrats (Xu, Lai., et al., 2003). La funció d'aquests complexos BTB-Cul3 està relacionada amb regulació d'assemblatge de microtúbuls i microfilaments, transcripció i apoptosi. També participen en vies de degradació dependents de ubiquitina, però segons dades publicades, de moment només algunes d'aquestes proteïnes BTB estarien implicades en aquestes vies de proteòlisi (Pintard, L., et al., 2004).

Senyals de degradació del sistema de ubiquitinització:

i. Reconeixement via el residu N-terminal: en aquest sistema de reconeixement, la ubiquitinització i degradació de proteïnes ve determinada per la naturalesa de l'aminoàcid N-terminal (Varshavsky, A., 1996). Aquests substrats s'uneixen directament a la E3 per aquest extrem N-terminal. Una funció important d'aquesta via és degradar proteïnes del citosol que han estat transportades erròniament o proteïnes compartimentades, les quals tenen un aminoàcid N-terminal "desestabilitzant" degut al tall per una peptidasa senyal (Hershko, A., et al., 1998).

ii. Fosforilació de substrats: s'ha descrit que moltes proteïnes de la via de la ubiquitina són dirigides per proteòlisi a través de la seva modificació per fosforilació. Aquesta modificació és en alguns casos necessària per un reconeixement directe del substrat per part de la E3. A més, també s'ha vist que moltes d'aquestes proteïnes tenen seqüències riques en prolina (Pro), àcid glutàmic (Glu), serina (Ser) i treonina (Thr) (seqüència PEST) que està implicada en la desestabilització d'aquestes proteïnes. Encara que es desconeix el paper d'aquesta regió, sembla que actuaria en la degradació de proteïnes via fosforilació dels seus residus Ser/Thr. Així, trobem seqüències PEST en ciclines G1 de llevat que són necessàries per la seva ubiquitinització i degradació. En canvi, altres substrats de mamífer com les ciclines D i E, l'inhibidor de CDK p27^{kip1}, i els reguladors transcripcionals I κ B β i β -catenina entre d'altres, són dirigides al sistema de ubiquitinització a través de la fosforilació de lloc específics i únics (Glickman, MH., et al., 2002).

iii. Reconeixement en *trans*: en alguns casos, el substrat diana no és reconegut directament per la E3 lligasa, sinó que ho fa a través de la formació d'un complex amb una altra proteïna (en

trans). L'exemple prototip d'aquest mecanisme és el papil·lomavirus humà (HPV) tipus 16/18 que participa en la degradació del supressor tumoral p53. L'oncoproteïna HPV E6 interacciona amb p53 dirigint-la cap a la E3 ubiquitina lligasa E6-AP (de la família HECT) per tal de ubiquitinar-la i degradar-la (Scheffner, M., et al., 1993). Altres vegades, també s'han descrit xaperones moleculars, com Hsc70, com a proteïnes necessàries en la conjugació de la cadena de ubiquitina i en la degradació de substrats proteolítics (Bercovich, B., et al., 1997).

iv. Reconeixement via seqüències específiques: en la ubiquitinització de les ciclines mitòtiques hi participa el complex APC/C que reconeix una seqüència que es troba a N-terminal d'aquestes proteïnes, el domini D-Box (*the destruction box*). A més, aquest complex també pot reconèixer un altre domini present en altres proteïnes, el *KEN box*. El reconeixement d'un o altre domini sembla que ve condicionat per la unió de diferents co-activadors al complex APC/C (Pfleger, CM., and Kirschner. MW., 2000).

v. Proteïnes malmeses/mutades/desplegades: les proteïnes parcialment/no plegades són proteïnes inestables que agreguen i precipiten interferint amb les funcions vitals de la cèl·lula. Per evitar això, aquestes proteïnes són reconegudes i degradades. La via de la ubiquitina/proteasoma s'ha implicat en la degradació selectiva d'aquestes proteïnes malmeses o desplegadas. La naturalesa de les senyals reconegudes per les E3s encara es desconeix, però és possible que l'exposició de dominis hidrofòbics que normalment es troben al interior de la proteïna quan aquesta està plegada serveixi com a senyal de reconeixement. A més, s'han implicat les xaperones en el reconeixement i degradació d'aquestes proteïnes en col·laboració amb la via de la ubiquitina/proteasoma (Marques, C., et al., 2006).

Les proteïnes F-box:

Domini F-box

Com ja hem esmentat anteriorment, les proteïnes F-box formen part del complex SCF i són les responsables del reconeixement del substrat a degradar. El primer gen F-box que es va identificar va ser el *CCNF*, el qual conté un domini de ciclina i es va veure que codificava per una ciclina F (Kraus, B., et al., 1994). La ciclina F, com la A i la B, oscil·la durant el cicle cel·lular, però amb un pic diferent en la fase G2. A més, es va demostrar que Skp1 era capaç d'unir la ciclina F a Cdc4 (proteïna F-box de llevat) (Bai, C. et al., 1996) i a altres proteïnes a través d'un domini conservat de 40 aminoàcids. Per això, aquest domini es va acabar anomenant F-box i així va néixer una nova família de proteïnes.

Les proteïnes F-box es defineixen per la presència en la seva seqüència d'un domini F-box d'unió a Skp1. Aquest domini té una seqüència consens d'aproximadament 50 residus (**Figura 11**).

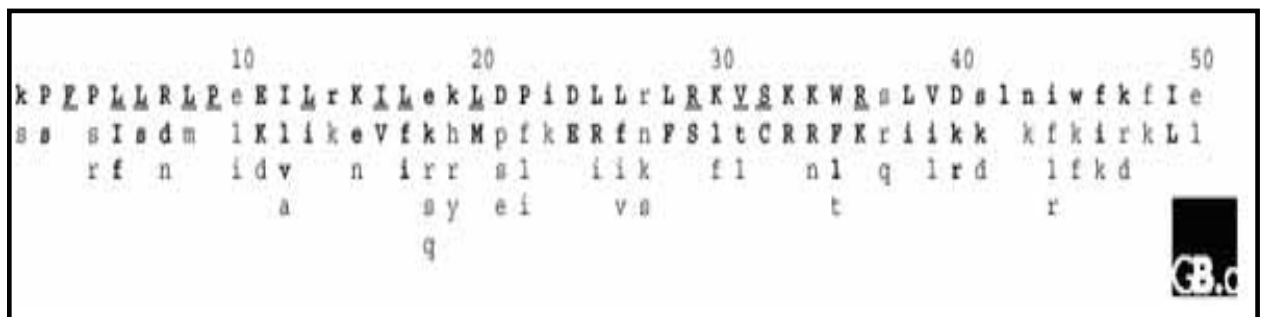


Figura 11 . Kipreos, ET., and Pagano, M., 2000.

Classificació de les proteïnes F-box

El domini F-box es troba normalment en l'extrem N-terminal de la proteïna. En l'extrem C-terminal es troben, quasi invariablement, els dominis d'interacció proteïna-proteïna, necessaris pel reconeixement de substrats específics. Els dos dominis més comuns en mamífers són els dominis rics en repeticions de leucines i repeticions WD (triptòfan-aspartic). La nomenclatura de les F-box humanes proposada per l'Organització del Genoma Humà va classificar aquestes proteïnes segons aquests dominis (Jianping, J., et al., 2004; Cenciarelli, C., et al., 1999) (**Figura 12**):

i. FBXL ("L" per les repeticions riques en leucina (LRR)): aquests dominis tenen generalment 20-29 residus i presenten forma d'arc amb repeticions α i β connectades per *loops*. A més, també trobem els dominis LRR en molts altres contextos, incloent el domini d'unió extracel·lular d'alguns receptors de membrana. Aquests motius sembla que majoritàriament necessiten de la fosforilació dels seus substrats per reconèixe'ls (Kobe, B., et al., 2001).

ii. FBXW ("W" per les 40 repeticions WD): el domini d'interacció d'aquest tipus és una estructura en hèlix- β de 44-60 residus. Típicament, una repetició conté el dipèptid GH a 11-24 residus des del N-terminal de la repetició i el dipèptid WD al C-terminal. Entre el GH i l'WD trobem un centre de seqüència conservada. En els complexos SCF, aquests dominis sembla que reconeixen seqüències consens específiques, que són fosforilacions en Ser/Thr (com en β -Trcp1, Fbw7 i Cdc4) (Smith, TF., et al., 1999).

iii. FBXO: en aquest tipus s'inclouen aquelles proteïnes que no tenen motius WD40 ni LLR, però que contenen altres tipus de domini d'interacció proteïna-proteïna, com per exemple el domini

CASH (interacció de carbohidrats), caixa de ciclina, CH (domini homòleg a calponina), TDL (domini similar a Traf), *Sec7*, dits de zinc i dominis rics en prolina (Cardozo, T., and Pagano, M., 2004).

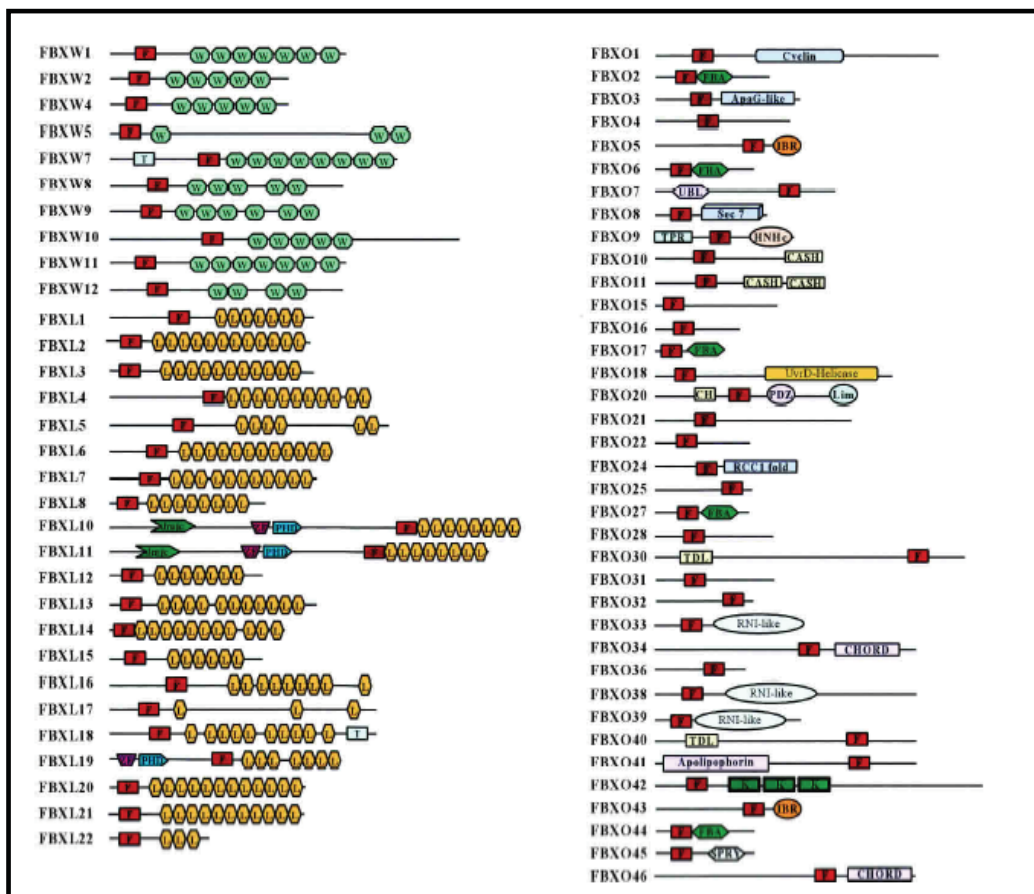


Figura 12. Jianping J., et al., 2004.

Funcions de les F-box :

Les F-box són proteïnes que formen part del complex E3 ubiquitina lligasa SCF i són les encarregades de reconèixer els substrats específics que després seran ubiquitinats. Els

complexes SCF participen en diferents processos. Alguns exemples són: les transicions durant les fases del cicle cel·lular, en les quals els reguladors del cicle cel·lular necessaris per la fase prèvia són degradats en el moment que la cèl·lula entra en la nova fase, i la regulació de la transcripció. Algunes de les dianes d'aquest complex SCF inclouen ciclins de la fase G1, inhibidors de les CDKs, factors que participen en la replicació del DNA, i factors transcripcionals que promouen la progressió del cicle cel·lular. Altres funcions no relacionades amb el cicle cel·lular són: regulació del recanvi del citoesquelet, receptors de membrana, inhibidors de factors de transcripció i factors de transcripció (però no del cicle cel·lular) (Kipreos, ET., and Pagano, M., 2000). Recentment, també s'ha descrit que les F-box FBXL3 i β -TrCP1 estan implicades en una nova funció: regulació del cicle circadià. Ambdues E3s participen en la degradació de reguladors circadians específics perquè el rellotge intern funcioni de forma correcta. Així, FBXL3 participa en la degradació de proteïnes de la família *Cryptochrome* (CRY1 i CRY2) i β -TrCP1 en la de la família *Period* (PER1 i PER2) (Virshup, DM., et al., 2007).

Alguns exemples d'Fbox relacionades amb el cicle cel·lular els trobem en les F-box de mamífers Skp2, Fbw7 i β -TrCP1 (**Figura 13**):

- i. Skp2 uneix i contribueix a la ubiquitinització de p27, afavorint així la seva degradació durant la fase G1-S del cicle cel·lular i activant el complex ciclina E-cdk2. Altres substrats diana de Skp2 són p21, ciclina A, ciclina D1, E2F, c-Myc, etc. (Zhang, L., and Wang, C., 2005).
- ii. Fbw7 reconeix els substrats fosforilats ciclina E, Notch 1/4, c-Myc i c-Jun, i contribueix a la seva ubiquitinització i posterior degradació. S'ha vist que delecions de Fbw7 en ratolí causa

mort embrionària amb defectes en el desenvolupament cardiovascular, així com un increment de la ciclina E i de la proteïna Notch en l'embrió i la placenta (Welcker, M., et al., 2004).

Table 1 Overview of mammalian F-box proteins and their known functions				
Mammalian F-box protein (FBP) name* (number of FBPs)	Aliases	Human approved gene symbol†	Main substrates	Comments
FBWs (17)				
Fbw1	β -Trcp1	<i>BTRC</i>	Emi1, Cdc25a, Wee1, β -catenin, I κ B-family members	Gene-knockout phenotype: defective spermatogenesis, subtle mitotic defects, centrosome overduplication
Fbw4	Dactylin	<i>SHFM3</i>	Unknown	Human split hand-foot malformation (SHFM) gene
Fbw6		<i>FBXW6</i>	Unknown	In addition to being part of an SCF ligase, it also forms a complex with Skp1 and Cul7; the latter interacts with SV-40 large T antigen
Fbw7	Cdc4, Sel10	<i>FBXW7</i>	Cyclin E, Myc, Jun, Notch-1 and -4	Gene-knockout phenotype: embryonic lethal at E11, probably due to morphogenetic cardiovascular defects. Mutations in ovarian and breast cancer cell lines
FBLs (22)				
Fbl1	Skp2	<i>SKP2</i>	p27, p21, p57, p130	Gene-knockout phenotype: hypoplasia in most organs; endoreduplication; centrosome overduplication; defect of mitotic entry. Overexpressed in human tumours
FBXs (39)				
Fbx1	Cyclin F	<i>CCNF</i>	Unknown	Function unknown. First-identified mammalian FBP
Fbx2		<i>FBXO2</i>	Unknown	Recognizes N-glycans. ER-associated degradation
Fbx5	Emi1	<i>FBXO5</i>	Unknown	Inhibitor of APC/C. Overexpressed in breast tumours
Fbx6		<i>FBXO6</i>	Unknown	Recognizes N-glycans
Fbx32	Mafbx, Atrogin1	<i>FBXO32</i>	Unknown	Involved in skeletal muscle atrophy. Higher expression in muscle cells

Figura 13 . Cardozo, T., and Pagano, M., 2004.

- iii. β -TrCP1 contribueix a la ubiquitinització de β -catenina i de I κ B (inhibidor de NF- κ B). Ambdues vies convergeixen per regular l'activitat del promotor de la ciclina D1 i la progressió del cicle cel·lular, però s'ha vist que β -TrCP1 podria també tenir un control directe en la regulació del cicle cel·lular: determinant el moment de la mitosi a través de la regulació d'Emi1 i Wee1A

(inhibidor d'APC en les fases S /G2 i quinasa inhibidora de l'activitat de cdc2, respectivament) i regulant la resposta a dany del DNA a través de la regulació de la quantitat de Cdc25A (Keiichi, I., et al., 2005).

A més, s'han trobat proteïnes F-box no relacionades amb vies de degradació de proteïnes i implicades en altres contextos bioquímics:

I. CBF3, component essencial del complex del cinetocor de llevat, participa en l'assemblatge de microtúbuls durant la condensació dels cromosomes. Una de les proteïnes que el formen, p58 conté un domini F-box. Aquesta proteïna és activada per fosforilació i degradada pel proteasoma a través del complex SCF^{cdc4}. L'activació i destrucció de p58 controla la quantitat de CBF3 i l'assemblatge correcte del cinetocor (Russell, ID., et al., 1999).

II. La proteïna GLD-1 de *C.elegans* regula múltiples aspectes del desenvolupament de cèl·lules germinals, com la determinació del sexe masculí. Juntament amb GLD-1, s'ha vist que FOG-2, proteïna F-box, juga el mateix paper. FOG-2 interacciona amb GLD-1 a través del domini FTH del C-terminal per dur a terme la seva funció en la determinació del sexe masculí (Clifford, R., et al., 2000).

III. En *Xenopus* i humà, s'ha trobat una interacció directe entre la ciclina F (que presenta un domini F-box i s'ha vist que interacciona amb Skp1) i la ciclina B1. A través d'aquesta interacció, la ciclina F és capaç de mediar la localització nuclear de la ciclina B1, gràcies a les dues seqüències NLS que presenta i possiblement a través d'una interacció amb la importina- α i la β . Així, una de

les funcions de la ciclina F és la de regular la translocació de la ciclina B1 durant la fase G2-M del cicle cel·lular (Kong, M., et al., 2000).

IV. La proto-oncoproteïna c-Jun, component del factor de transcripció AP-1, s'activa ràpidament en resposta a diferents estímuls, com la llum UV, per tal d'induir la transcripció de gens diana (inclòs c-Jun). En cèl·lules no estressades l'expressió de c-Jun es manté a nivells baixos gràcies a complexos repressors transcripcionals. Recentment, s'ha descrit que la F-box Fbl10 interacciona i reprimeix la transcripció de c-Jun. S'ha vist que Fbl10 està present en el promotor del gen *c-jun* i que la proteïna c-Jun és necessària pel reclutament de Fbl10 (Koyama-Nasu, R., et al., 2007).

Regulació

Les proteïnes F-box són regulades per diferents mecanismes i a diferents nivells: transcripcionalment, per proteòlisi, i per associació amb components del complex SCF, com Skp1 (Koepp, DM., 1999). Trobem diferents exemples :

➤ Les F-box de llevat Cdc4, Grr1 i Met20 són proteïnes inestables dins del complex SCF que són degradades a través del sistema ubiquitina-proteasoma per un mecanisme autocatalític. A més, Grr1 també presenta una regulació en resposta a senyals extracel·lulars: la seva interacció amb Skp1 es veu incrementada en resposta a alts nivells de glucosa per un mecanisme que acobla la disponibilitat del nutrient més important per llevats, la glucosa, a la progressió del cicle cel·lular. Alts nivells de glucosa disminueixen l'expressió de la ciclina de llevat Cln1, per tal que la cèl·lula avaluï la seva mida i creixement en presència de glucosa abans d'iniciar un nou cicle cel·lular (Li, FN., et al., 1997), (Galan, JM., and Peter M., 1999).

- Trobem també altres exemples de regulació per factors extracel·lulars. **1)** Durant l'atrofia muscular esquelètica s'ha descrit la F-box MAFbx/Atrogin-1 com una E3 ubiquitina lligasa que controla la degradació de proteïna muscular a través de la via de la ubiquitina/proteasoma. Els substrats d'aquesta F-box encara es desconeixen, però degut a que s'ha vist que el gen d'aquesta F-box és induïble per TGF- β , es creu que aquests substrats han d'estar relacionats amb la via de senyalització d'aquesta citoquina (Aoyama, Y., et al., 2004). **2)** YB-1 és un factor de transcripció que regula múltiples processos biològics com una sobre-regulació del cicle cel·lular (gens de la ciclina A i B1) o protecció de l'apoptosi. A més, aquest gen es troba sobreexpressat en molts tumors sòlids incloent el de pit, pulmó, ós, ovari i colorectal. Recentment, s'ha descrit que l'expressió de l'E3 ubiquitina lligasa Fbx33 és induïda en cèl·lules que estan entrant en apoptosi i com l'encarregada de dirigir la ubiquitinització i degradació d'YB-1 a través del complex del proteasoma (Lutz, M., et al., 2006).

- La F-box humana Skp2 s'expressa d'una manera depenent del cicle cel·lular, presentant un pic en la fase S i disminuint a l'entrar en la fase M (Hershko, D., et al., 2000). La seva degradació és a través de la via de la ubiquitina-proteasoma.

- La proteïna F-box β -TrCP1 presenta una regulació per un *feedback* negatiu. És l'expressió d'un dels seus substrats, β -catenina, qui indueix la seva pròpia expressió gràcies a l'estabilització del seu mRNA. Això resulta en una degradació accelerada de β -catenina i una activació de la via de NF- κ B (Spiegelman, VS., et al., 2000).

Sistema de ubiquitinització i malalties patogèniques

Tenint en compte el gran nombre de substrats i processos en els quals està implicat el sistema de ubiquitinització, no és d'estranyar la seva implicació en malalties.

Via de la ubiquitina/proteasoma i càncer:

Moltes malalties s'han relacionat amb alteracions en les vies de ubiquitinització i de-ubiquitinització. En general, càncers específics poden resultar de l'estabilització d'oncoproteïnes o desestabilització de gens supressors tumorals. Així trobem diferents exemples de proteïnes F-box humanes implicades en processos de tumorigènesi:

➤ La F-box humana Skp2 s'ha vist que pot funcionar com una oncoproteïna, ja que un dels seus substrats és l'inhibidor de CDks p27^{kip}, descrit com a supressor tumoral. Així, en estudis clínics de pacients amb càncers (com càncers colorectals agressius, carcinomes de pit i limfomes humans), s'ha vist una relació inversament proporcional entre Skp2 i nivells de proteïna p27. A més, l'expressió de Skp2 correlaciona directa i significativament amb l'agressivitat i malignitat tumoral i s'associa a un pobre pronòstic en limfomes humans, càncer de pròstata i adenocarcinomes d'ovari (Guardavaccaro, D., and Pagano, M., 2004).

➤ Una altra F-box descrita anteriorment, Fbw7, s'ha descrit com a gen supressor de tumors, degut al paper que juga en la degradació dels seus substrats, ciclina E, Notch 1 i 4, c-Myc i c-Jun. S'han trobat nivells elevats de ciclina E en tumors d'ovari, de pit, i colorectal (Rajagopalan, H., et al., 2004) que correlacionen amb mutacions en Fbw7. Aquesta F-box funciona com a supressor tumoral ja que la seva pèrdua causa producció de micronuclis i inestabilitat genòmica. A més, també s'han trobat mutacions de Fbw7 en adenocarcinomes endometrials

primaris i pèrdua d'heterozigositat. Finalment, estudis preliminars en mutacions de Fbw7 s'han associat amb agressivitat tumoral (Guardavaccaro, D., and Pagano, M., 2004).

➤ β -catenina està implicada en la transducció de senyal i diferenciació de l'epiteli colorectal. En resposta a l'activació de la via de Wnt, β -catenina és defosforilada i activada, mentre que en absència de senyalització, β -catenina s'associa amb APC i la glicogen quinasa sintasa GSK-3 β . En aquest complex, GSK-3 β fosforila de forma constitutiva β -catenina, la qual és degradada pel sistema ubiquitina/proteasoma. La ubiquitinització de β -catenina sembla que podria ser dirigida per una família de proteïnes F-box que inclouen Slimb, β TrCP/Fbw1a i HOS/Fbw1b (Spiegelman, VS, et al., 2000). El gen que codifica per β -catenina i altres gens reguladors d'aquesta via es troben sovint mutats en càncers humans primaris com càncers colorectals, hepatocel·lulars, ovaris, endometrials, pròstata, tiroides i melanomes malignes. En tots els casos, la conseqüència d'aquestes mutacions és l'acumulació de β -catenina, la seva translocació a nucli i l'activació transcripcional de gens diana com c-Myc i ciclina D. A més, β -catenina també pot ser oncogènicament activada per inactivació del complex APC (Miller, JR., and Moon, RT., 1996).

➤ PTEN és un supressor tumoral que està implicat en la regulació del creixement, migració i mort cel·lular. Mutacions o delecions d'aquesta proteïna s'han trobat en varis càncer humans com càncer de pròstata i de bufeta. També s'ha descrit que una disminució de l'expressió de PTEN pot predisposar a la tumorigènesi i a una acceleració en la progressió tumoral. Per altra banda, s'ha descrit que aquesta proteïna està regulada per la via de la ubiquitina. L'E3 ubiquitina lligasa NEDD4-1 (de la família HECT) és qui reconeix i poliubiquitina PTEN per la seva degradació a través del proteasoma. A més, NEDD4-1 actua com a proto-oncogen, per la qual cosa una mala activació d'aquesta E3 o un increment en la seva expressió pot disminuir la funció de PTEN i contribuir al procés de tumorigènesi (Wang, X., et al., 2007).

Altres malalties:

La via de la ubiquitina/proteasoma també s'ha relacionat amb altres malalties de diferents tipus. Així, trobem alguns exemples de malalties genètiques com la fibrosi quística (CF). Aquesta malaltia es caracteritza per una absència funcional d'un canal de clor de membrana plasmàtica (CFTR). La majoria de casos de CF estan lligades a una mutació localitzada en la porció citoplasmàtica d'aquesta proteïna, CFTR Δ^{508} , que fa que la proteïna quedi retinguda a reticle endoplasmàtic i sigui degradada pel sistema de ubiquitinització (Ward, CL., 1995). Un altre exemple és el Síndrome d'Angelman's: aquest síndrome es caracteritza per dificultats severes en l'aprenentatge, associades a característiques facials i de comportament. Aquesta malaltia és un exemple d'*imprinting* genòmic on el gen afectat és l'E3 ubiquitina lligasa E6-A (Moncla, A., 1999). Segurament, degut a aquesta mutació, el substrat diana s'estabilitza. Finalment, el Síndrome de Liddle és una altra malaltia genètica relacionada amb el sistema de ubiquitinització. Aquesta és una forma d'hipertensió hereditària que resulta d'una deleció en el canal de sodi de ronyó ENaC. Aquesta proteïna interacciona amb la E3 lligasa NEDD4 (Stau, O., et al., 1997) de la família HECT. Aquesta mutació de la ENaC fa que no sigui reconeguda per la E3 lligasa, que augmenti la seva estabilitat i que es produeixi un excés de reabsorció de sodi i aigua, amb el desenvolupament de la hipertensió.

També s'ha vist una relació entre la via de la ubiquitinització i el gast muscular. La degeneració del múscul, degut a llargues immobilitzacions, denervació i estats catabòlics severes condueix a una activació accelerada de la via d'ubiquitinització. Això condueix a una degradació massiva de proteïnes miofibril·lars (actina i miosina) (Mitch, WE., and Goldberg, A., 1996). Moltes ubiquitina lligases que s'indueixen durant l'atròfia muscular s'han descrit recentment, però la seva funció i proteïnes diana encara es desconeixen.

Per altra banda existeixen alguns exemples d'interacció entre la via de la ubiquitina i els virus, on aquests aprofiten el sistema per escapar a la supervivència immunològica. Així trobem, per exemple, que en el virus d'Epstein-Barr (EBN), l'antigen nuclear 1 (EBNA1) és la única proteïna viral detectada regularment en totes les malalties associades a EBN. Això és degut a que la proteïna EBNA1 presenta un domini de repetició Gly-Ala en el C-terminal que interfereix amb la degradació depenent del sistema de ubiquitinització, protegint alhora les proteïnes antigèniques del reconeixement per part del sistema immunològic (Levitskaya, J., 1997).

Finalment, destacar que també existeixen malalties neurodegeneratives relacionades amb aquest sistema de degradació de proteïnes. Un dels casos més interessants relaciona la degradació a través del proteasoma del fragment C-terminal de la presenilina 2 (PS2), per tal de fer activa aquesta proteïna. La PS2 està implicada en el transport de la proteïna precursora amiloide i el seu processament. Això doncs, mutacions en la PS2 fan que el seu extrem C-terminal no pugui ser degradat i es doni una acumulació d'aquest fragment. Aquestes mutacions són responsables de més del 50% de casos de Alzheimer's primerencs (Ciechanover, A., 1998).

BASES DE L'ESTUDI I OBJECTIUS

BASES DE L'ESTUDI

Per tal d'identificar gens que poguessin participar en l'efecte pro-angiogènic de TGF- β 1, en el nostre laboratori es van generar una col·lecció de cDNAs, estimulats o reprimits per TGF- β 1 procedents de cèl·lules endotelials 1G11 cultivades en gels de col·lagen durant 4 hores.

Per realitzar això es va utilitzar una tècnica basada en PCR substractiva (Diatchenko, L. et al. 1996). Entre els gens induïts per TGF- β 1 es va trobar el de la F-box28.

OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat, doncs, la caracterització de la F-box28 utilitzant com a eina de treball línies endotelials de ratolí i línies d'adenocarcinoma de cèrvix humà.

Hem desglossat els objectius d'aquesta tesi en 4 capítols:

1. Estudi de l'expressió d'F-box28 i localització subcel·lular.
2. F-box28 com a E3 ubiquitina lligasa, regulació i vida mitja.
3. Possibles funcions d'F-box28 i implicació en la regulació del cicle cel·lular.
4. Estudi de substrats candidats de la F-box28.

RESULTATS

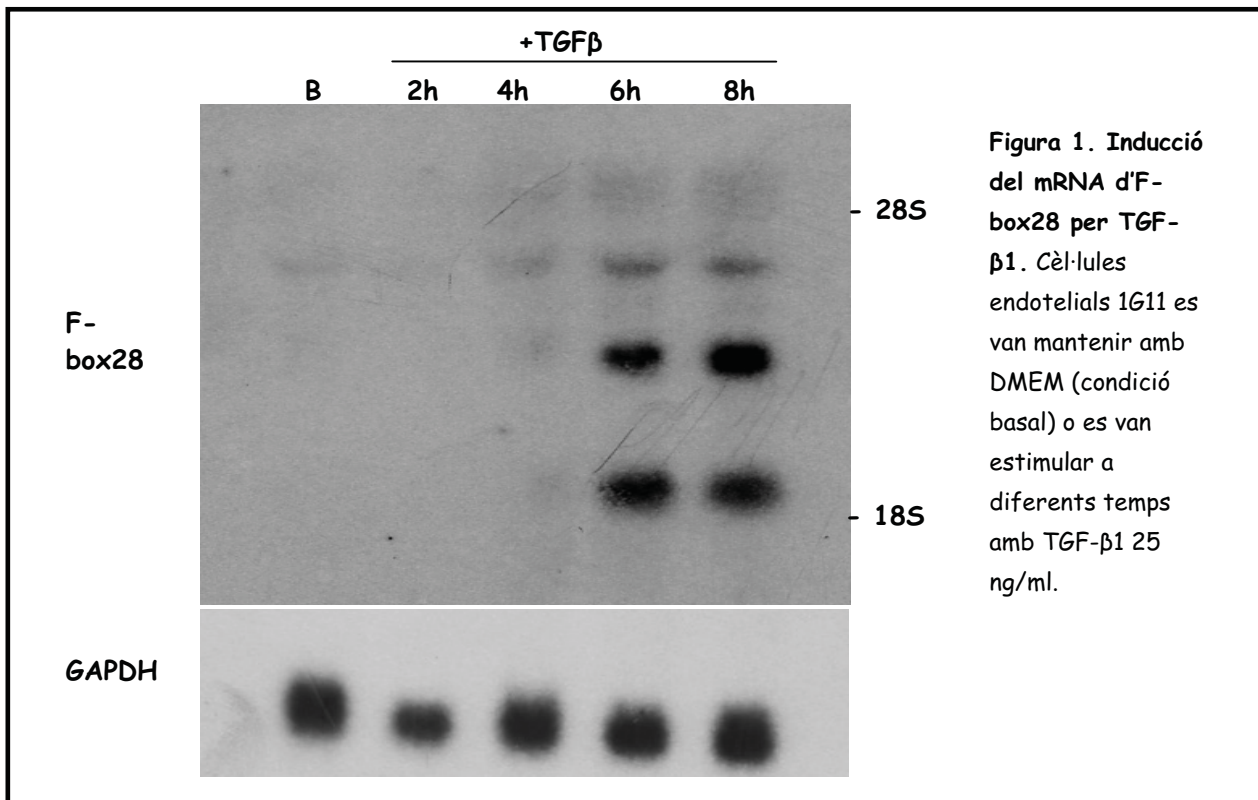
Pròleg: Comprovació i generació d'eines de treball:

En un estudi previ en el nostre laboratori i descrit en la introducció d'aquesta tesi, es va identificar el gen de la proteïna F-box28 com un gen no clonat i induït per TGF- β 1 en cèl·lules endotelials 1G11 immerses en gotes tridimensionals de col·lagen tipus I mitjançant PCR-substractiva. La identificació d'aquest gen es va fer per homologia de seqüència a la base de gens del *Pubmed*.

La F-box28 és induïda per TGF- β 1

Per comprovar l'expressió de la F-box28 vam aïllar mRNA de cèl·lules endotelials 1G11 estimulades a diferents temps amb TGF- β 1 i vam realitzar experiments de Northern Blot, utilitzant com a sonda el tros aïllat de la PCR substractiva que corresponia a la part 3' no traduïda del gen de la F-box28.

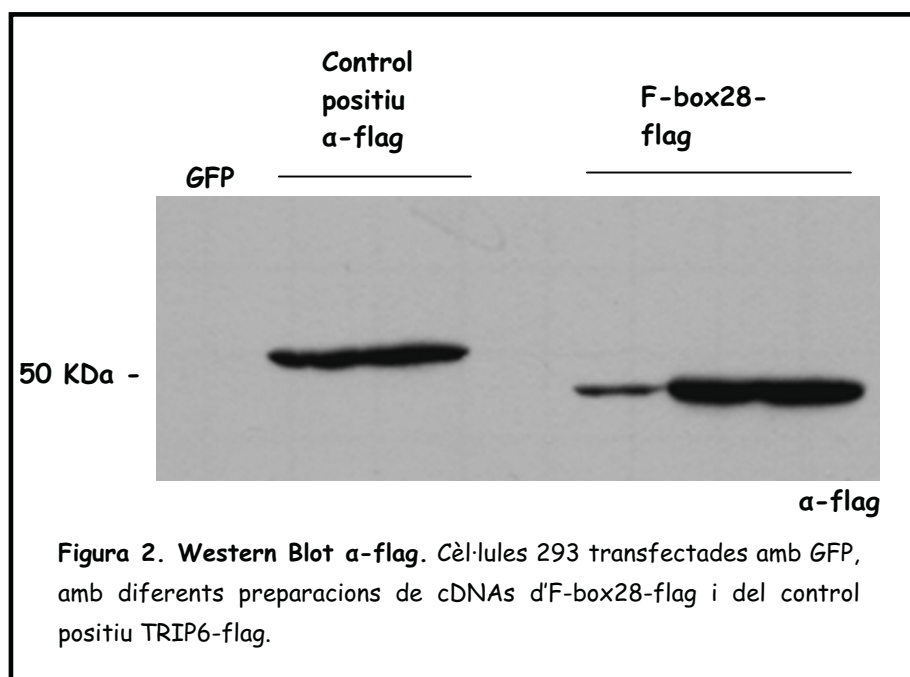
Com es pot veure a la **figura 1**, TGF- β 1 efectivament induïa l'expressió de diferents transcrits que hibridaven amb la sonda de la F-box28. Aquests transcrits presentaven mides d'aproximadament 1,8; 3,3; 4; i 4,8 Kb.



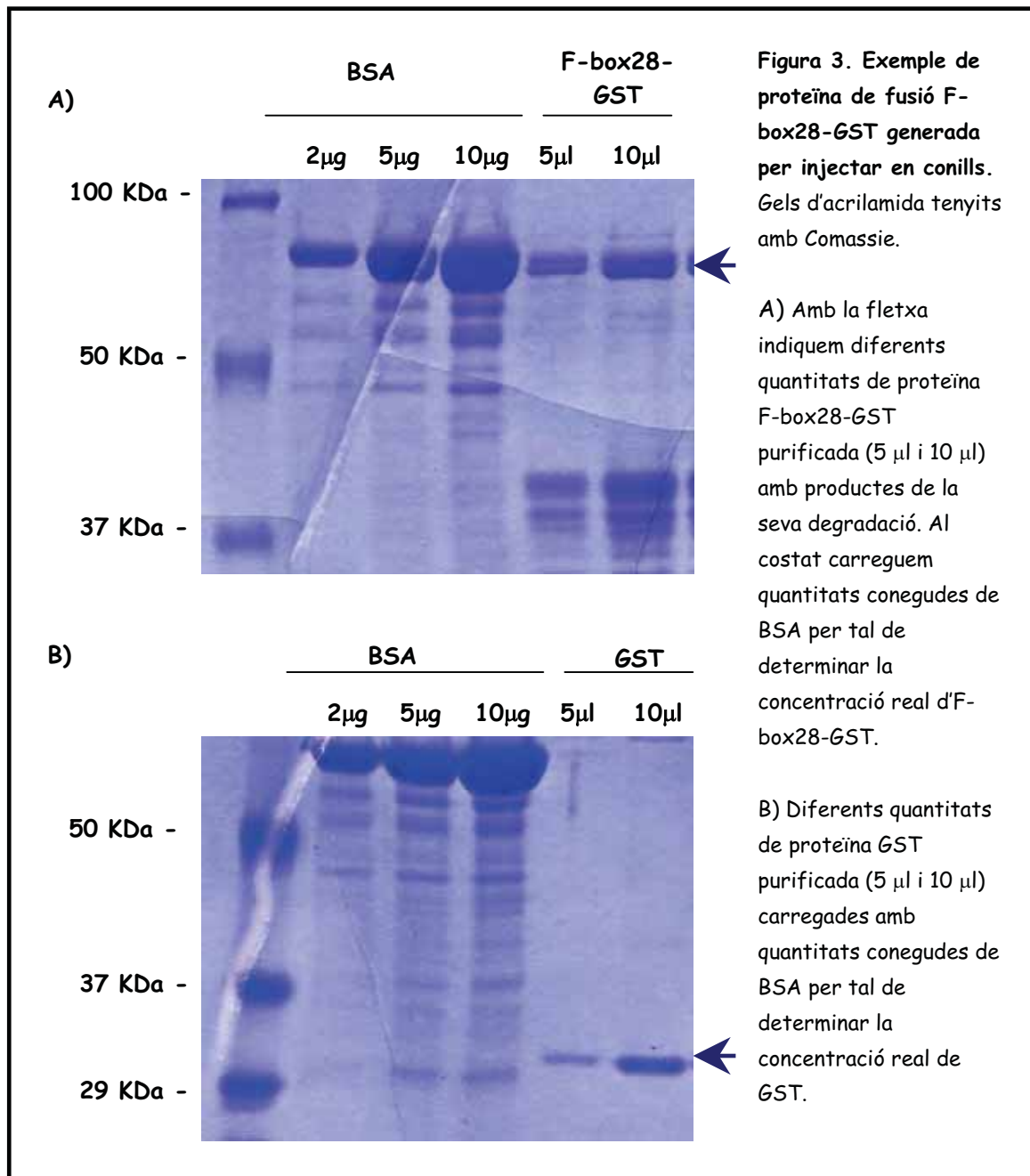
Caracterització d'anticossos per F-box28

Degut a que es tractava d'un gen encara no clonat, no disposàvem d'eines de treball, i una de les primeres coses que vam fer va ser obtenir el cDNA de la F-box28 a partir del "Kazusa DNA Research Institute, Japan" clonat en un vector pBC SK(+/-). D'aquí, el vam subclonar en un vector pcDNA3-flag generant la construcció F-box28-flag. Per tal de determinar el pes real de la F-box28 vam transfectar cèl·lules 293 amb la construcció F-box28-flag, un control negatiu transfectat amb GFP i un control positiu α -flag (la proteïna TRIP6-flag). Quan vam fer el

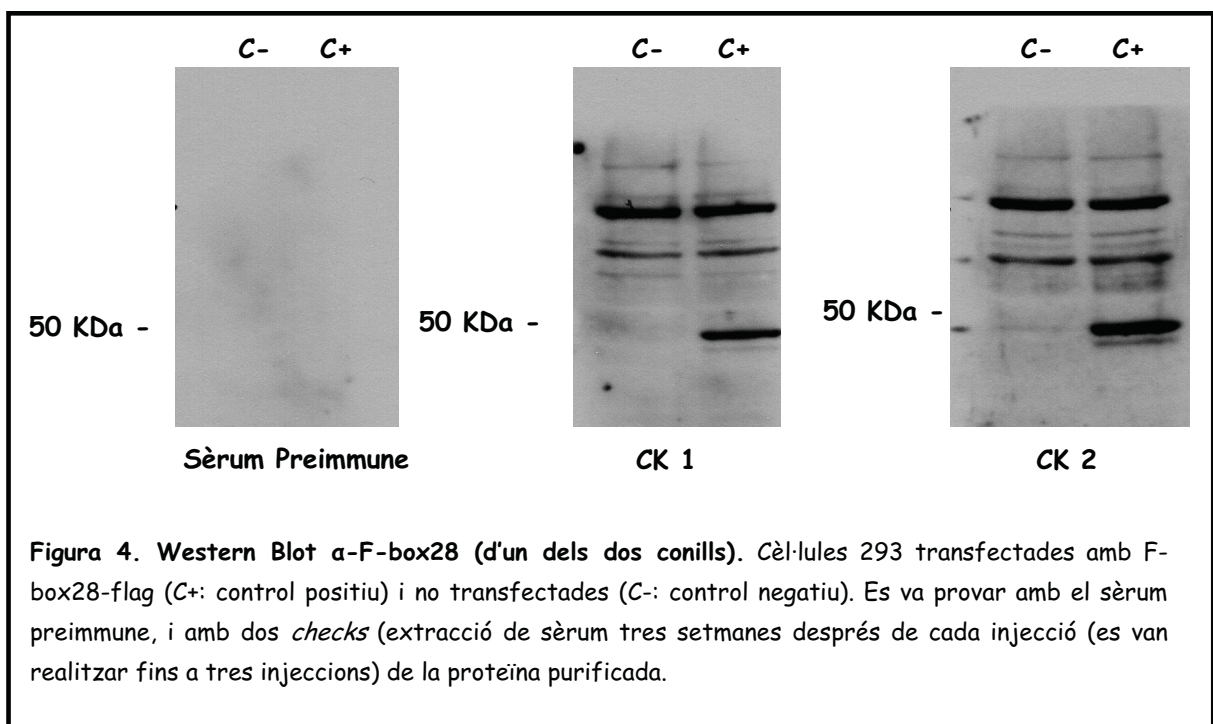
Western Blot α -flag, vam observar que en les mostres transfectades amb F-box28-flag es veia una banda a \approx 50Kda, que coincidia amb el pes teòric d'aquesta proteïna (**figura 2**).



Seguidament, vam intentar generar anticossos contra la F-box28. Per fer això, vam subclonar el cDNA de la F-box28 en un vector pGEX per tal de generar proteïna F-box28-GST (**figura 3**). Un cop vam tenir aquesta proteïna purificada la vam injectar en dos conills i en vam extreure els sèrums (realitzat al servei d'estabulari de Farmàcia, UB).



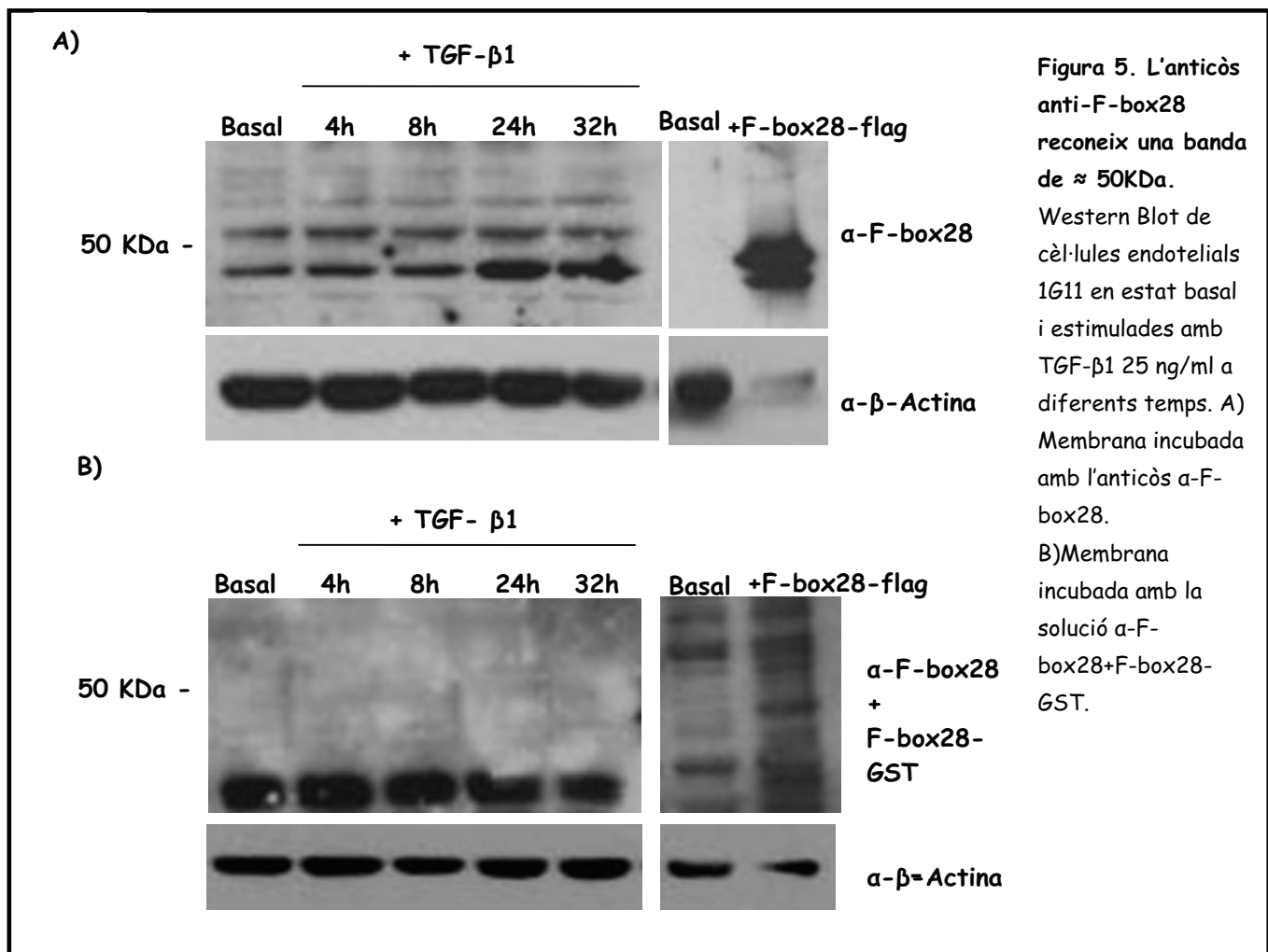
Per tal de determinar la seva eficiència i especificitat, vam transfectar cèl·lules 293 amb la construcció F-box28-flag, la qual vam utilitzar com a control positiu en un Western Blot amb aquest anticòs (figura 4).



Com podem veure a la **figura 4**, mentre que el sèrum preimmune no reconeixia cap proteïna en el Western Blot, els nostres anticòssos generats en el CK1 i CK2 sí que reconeixien la proteïna F-box28 sobreexpressada, i fins i tot una mica de l'endògena en el cas del Western Blot hibridat amb el CK2.

L'F-box28 té un pes de ≈ 50 KDa. L'anticòs generat en conills vam veure que reconeixia més bandes, a part de la de 50KDa. Per aquesta raó i per tal d'assegurar-nos que la banda que buscàvem era realment aquesta, vam fer un experiment amb cèl·lules endotelials 1G11 en medi

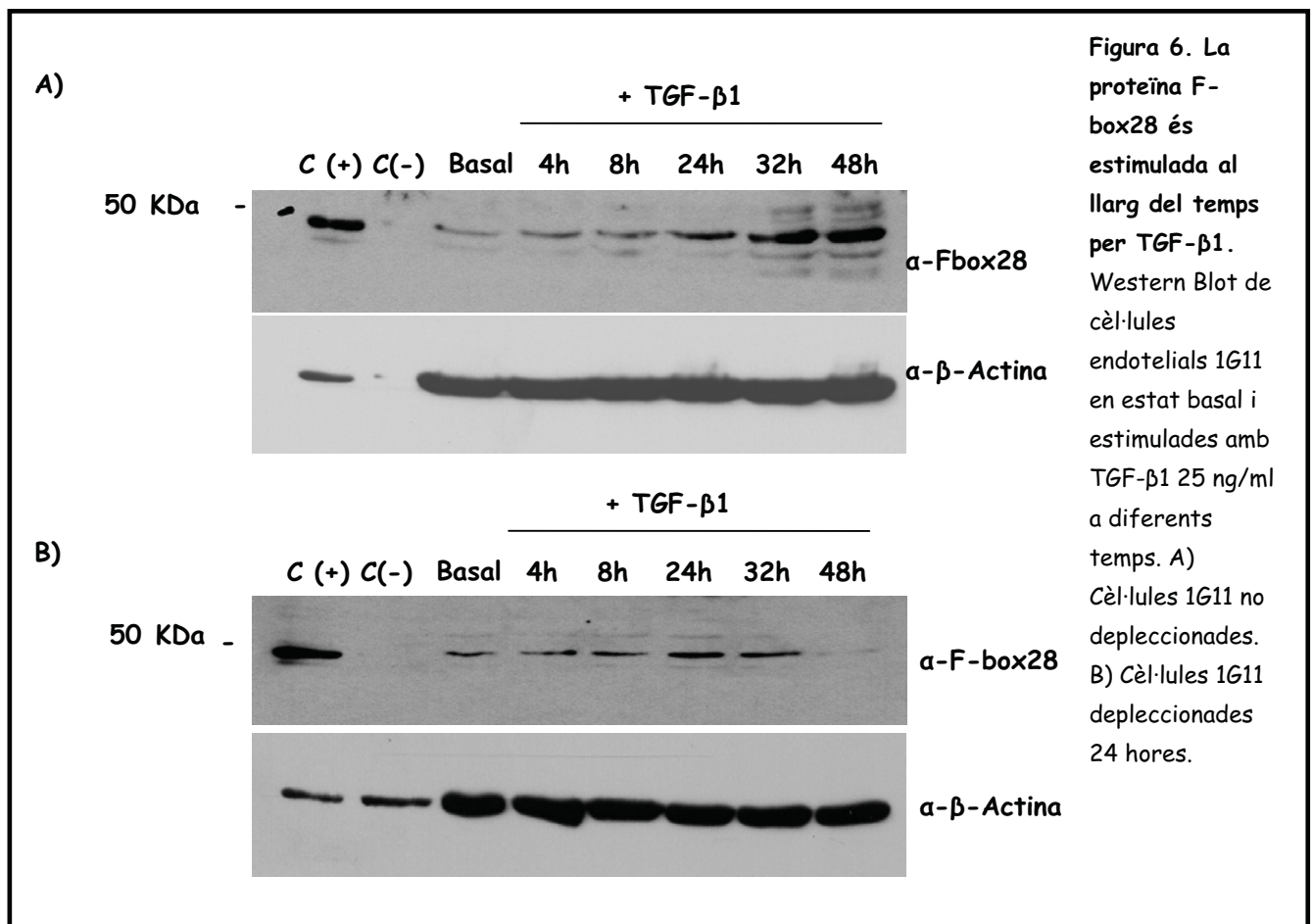
DMEM (basal) i cèl·lules estimulades amb TGF- β 1 a diferents temps. Amb aquests extractes vam fer dos experiments paral·lels de Western Blot: el primer el vam incubar amb l'anticòs anti-F-box28 i el segon amb una solució que contenia una incubació prèvia de l'anticòs amb la proteïna purificada F-box28-GST. Així vam veure que la banda que desapareixia i per tant que era l'específica, era la de \approx 50KDa (Figura 5).



Capítol 1: Caracterització:

i. Inducció de l'expressió d'F-box28 per TGF- β 1.

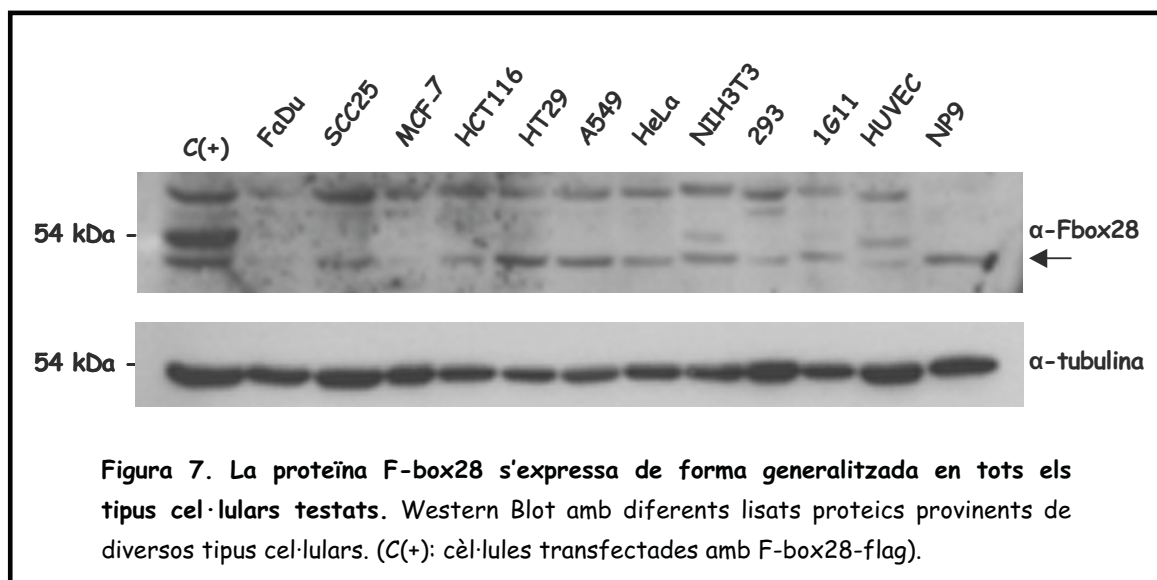
Per comprovar que TGF- β 1 estimulava la F-box28 a nivell de proteïna, igual que havíem vist a nivell de mRNA, vam mantenir cèl·lules endotelials 1G11 en estat basal i altres les vam estimular amb TGF- β 1 a diferents temps.



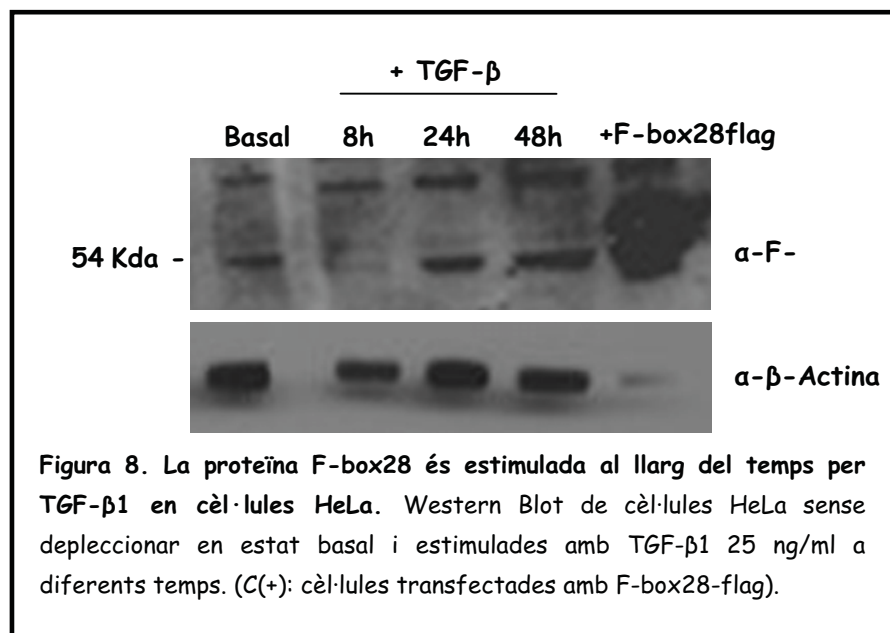
Aquest experiment el vam fer en cèl·lules en exponencial i en cèl·lules depleccionades. En ambdós casos, veiem una inducció de l'expressió de la proteïna al llarg del temps. Remarcar que la inducció de l'mRNA de l'F-box28 la veiem a les 8 hores, mentre que la de la proteïna era cap a les 24 hores (Figura 6).

ii. Expressió d'F-box28 en diferents tipus cel·lulars.

La F-box28 la vam identificar en un primer moment en cèl·lules endotelials 1G11. El que vam voler veure a continuació va ser si era una proteïna d'expressió principalment de tipus endotelial o bé, si s'expressava també en altres tipus cel·lulars. Per tal de veure això, vam obtenir lisats proteics de diferents tipus cel·lulars i en vam fer un Western Blot. Així, vam poder veure que independentment de la funció que pogués estar jugant en angiogènesi (o relacionada amb TGF- β 1), la F-box28 era una proteïna d'expressió generalitzada en els diferents tipus cel·lulars testats (Figura 7).



Havent comprovat que la F-box28 s'expressava en diferents tipus cel·lulars, vam voler comprovar si la inducció que havíem vist de la F-box28 per TGF- β 1 en cèl·lules endotelials 1G11 també es podia donar en altres tipus cel·lulars. Per això, vam estimular cèl·lules HeLa a diferents temps amb TGF- β 1 i vam fer un Western Blot. El que vam observar va ser una inducció al llarg de 48 hores de l'expressió proteica de la F-box28 (de la mateixa manera que havíem observat en cèl·lules endotelials), (Figura 8).



En el següent experiment vam voler comprovar què passava amb l'expressió proteica d'F-box28 en cèl·lules depleccionades al llarg de 48 hores i estimulades amb factors de creixement específics o amb medi complet amb sèrum. Així, en la figura 9 veiem que a diferència de TGF- β 1 que induïa l'expressió d'F-box28, factors de creixement com EGF no l'estimulen i fins i tot, en el cas de PDGF, disminueixen la seva expressió.

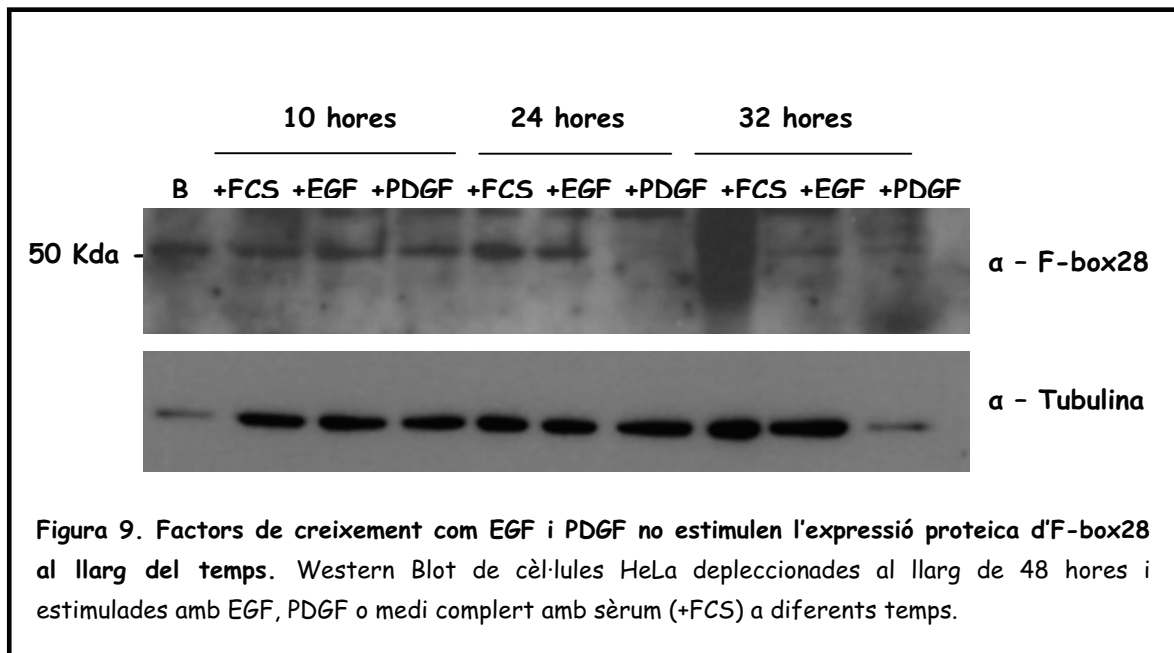


Figura 9. Factors de creixement com EGF i PDGF no estimulen l'expressió proteica d'F-box28 al llarg del temps. Western Blot de cèl·lules HeLa depleccionades al llarg de 48 hores i estimulades amb EGF, PDGF o medi complet amb sèrum (+FCS) a diferents temps.

iii. Localització subcel·lular.

Per tal de determinar la localització subcel·lular de la F-box28, vam intentar fer una immunofluorescència amb l'anticòs que havíem generat, però no va funcionar. Per aquesta raó vam decidir transfectar cèl·lules HeLa sembrades sobre cubres amb la construcció F-box28-flag i vam fer una immunofluorescència amb l'anticòs α -flag. Vam marcar els nuclis de les cèl·lules amb DAPI i els filaments d'actina (F-actina) amb faloidina. Els resultats van demostrar que la F-box28 presentava una distribució quasi exclusivament nuclear, ja que co-localitzava amb el DAPI (Figura 10).

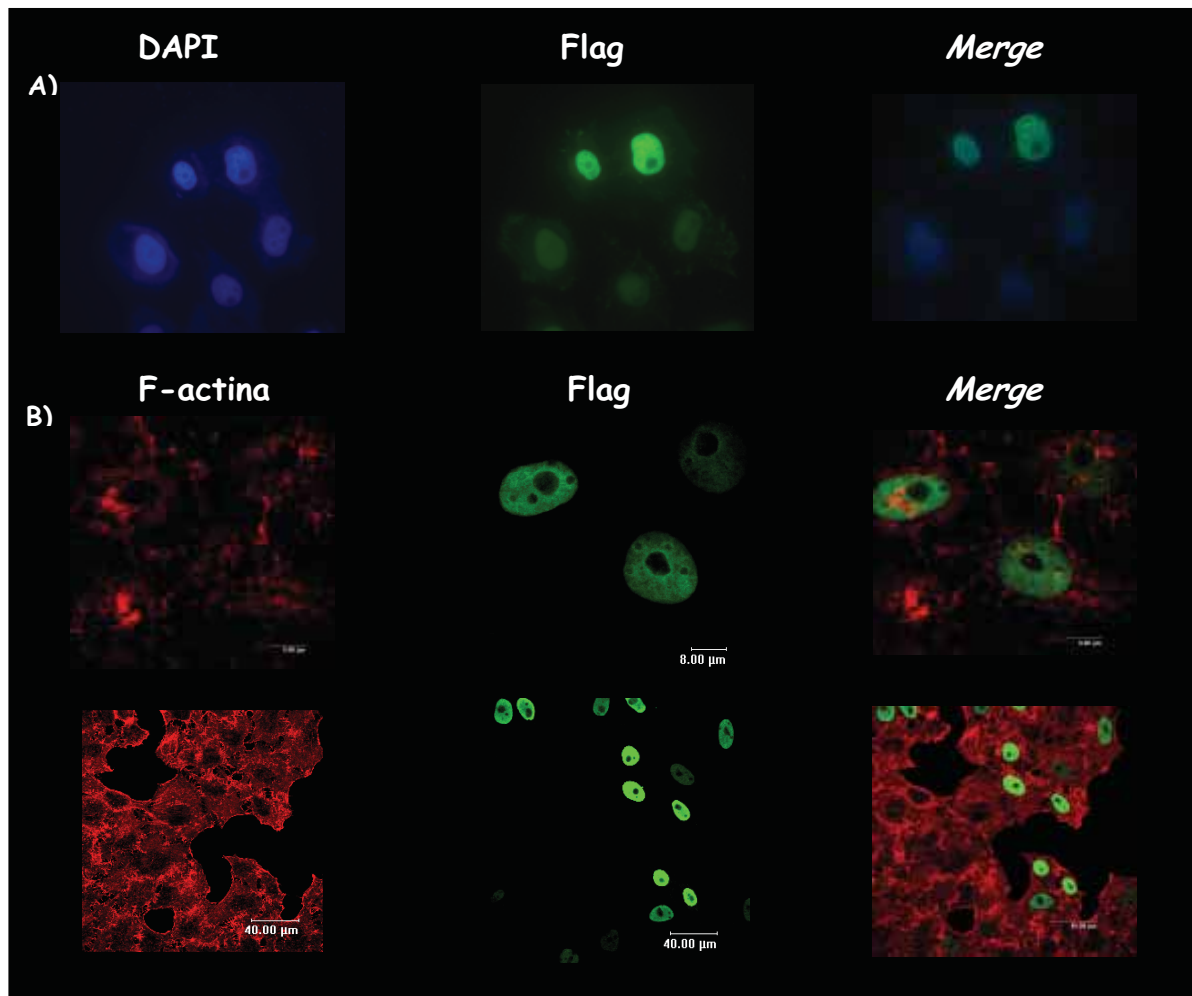


Figura 10. La proteïna F-box28 presenta un distribució majoritàriament nuclear.
 Immunolocalització de la F-box28-flag (verd) en cèl·lules HeLa transfectades durant 24 hores.
 A) DAPI en blau. B) Faloïdina en vermell.

Degut a aquesta localització nuclear, ens vam plantejar buscar altres dominis en la proteïna, a part del domini Fbox que ja havíem vist. Gràcies al programa *prosite* vam determinar

que en l'extrem C-terminal (Ct) de la F-box28 existia un possible domini de "Localització nuclear" (NLS) (Figura 11).

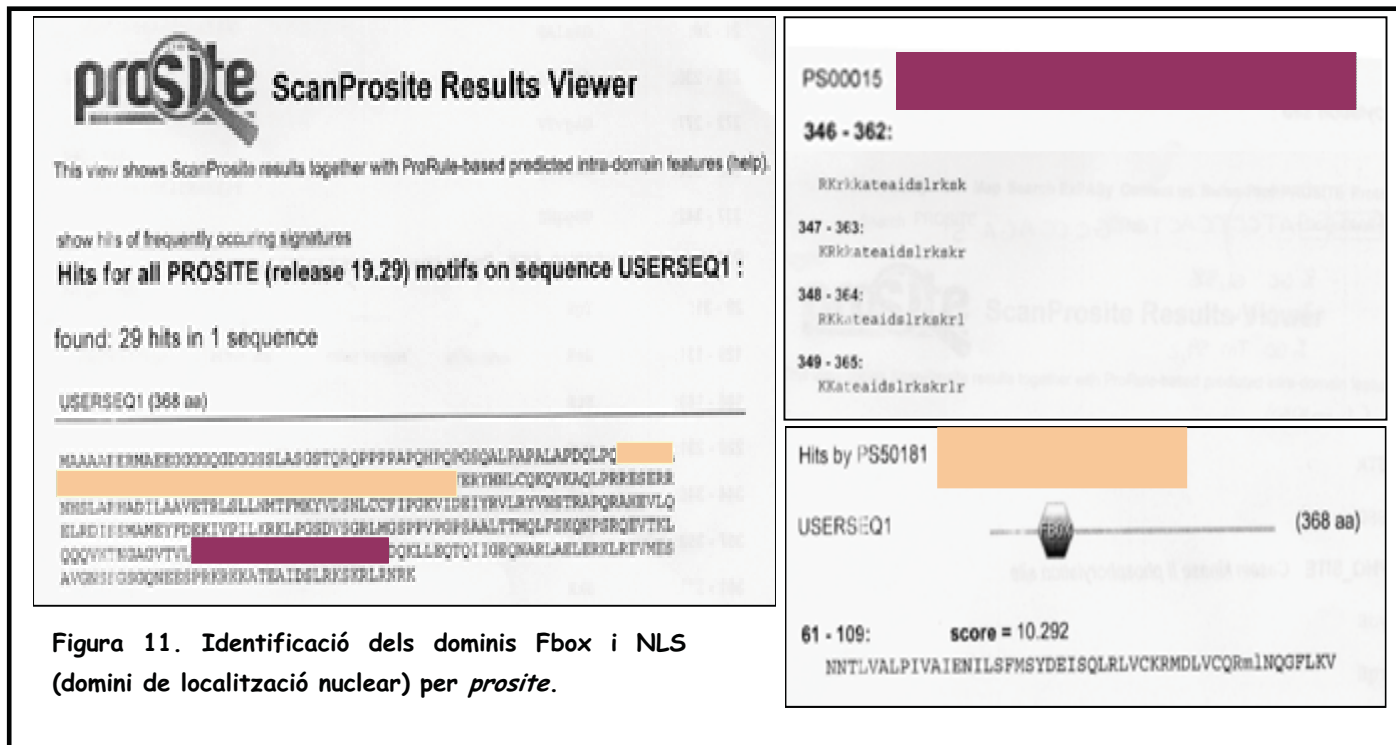
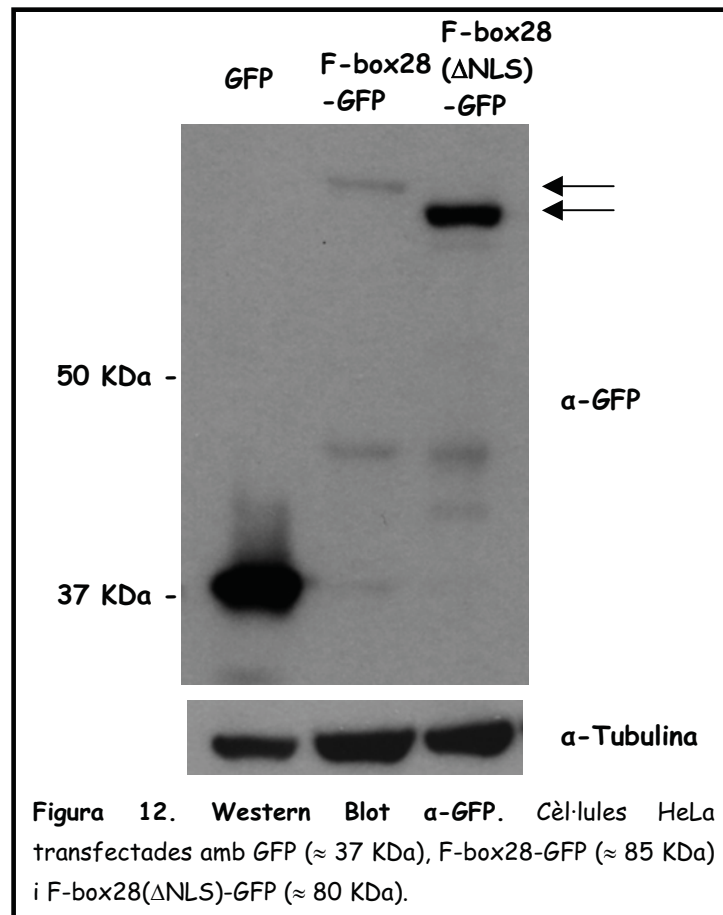


Figura 11. Identificació dels dominis Fbox i NLS (domini de localització nuclear) per *prosite*.

El que vam fer va ser una altra construcció de la F-box28 fusionada a la proteïna verda GFP (F-box28-GFP) i una altra a la qual li vam deleccionar aquest extrem Ct (F-box28(Δ NLS)-GFP). Per problemes tècnics, aquest extrem deleccionat va haver de ser més gran del que era pròpiament la seqüència NLS (aproximadament 64 aminoàcids). Després vam transfectar cèl·lules HeLa amb GFP, F-box28-GFP i F-box28(Δ NLS)-GFP i vam fer un Western Blot per tal de determinar la seva expressió (Figura 12).



Després d'observar que les diferents construccions s'expressaven a la mida esperada i de forma correcta, vam transfectar cèl·lules HeLa sembrades sobre cubres amb aquestes construccions i vam fer una immunofluorescència per tal de determinar la seva localització. Vam tornar a marcar els filaments d'actina del citoesquelet de les cèl·lules amb faloidina i els nuclis amb TO-PRO. Quan vam mirar aquestes preparacions vam veure que la F-box28-GFP presentava la mateixa localització nuclear (co-localitzava amb TO-PRO), ja observada anteriorment per la F-

box28-flag, mentre que la F-box28(Δ NLS)-GFP presentava una redistribució entre nucli i citoplasma, d'una manera molt similar a la de la GFP control (Figura 13).

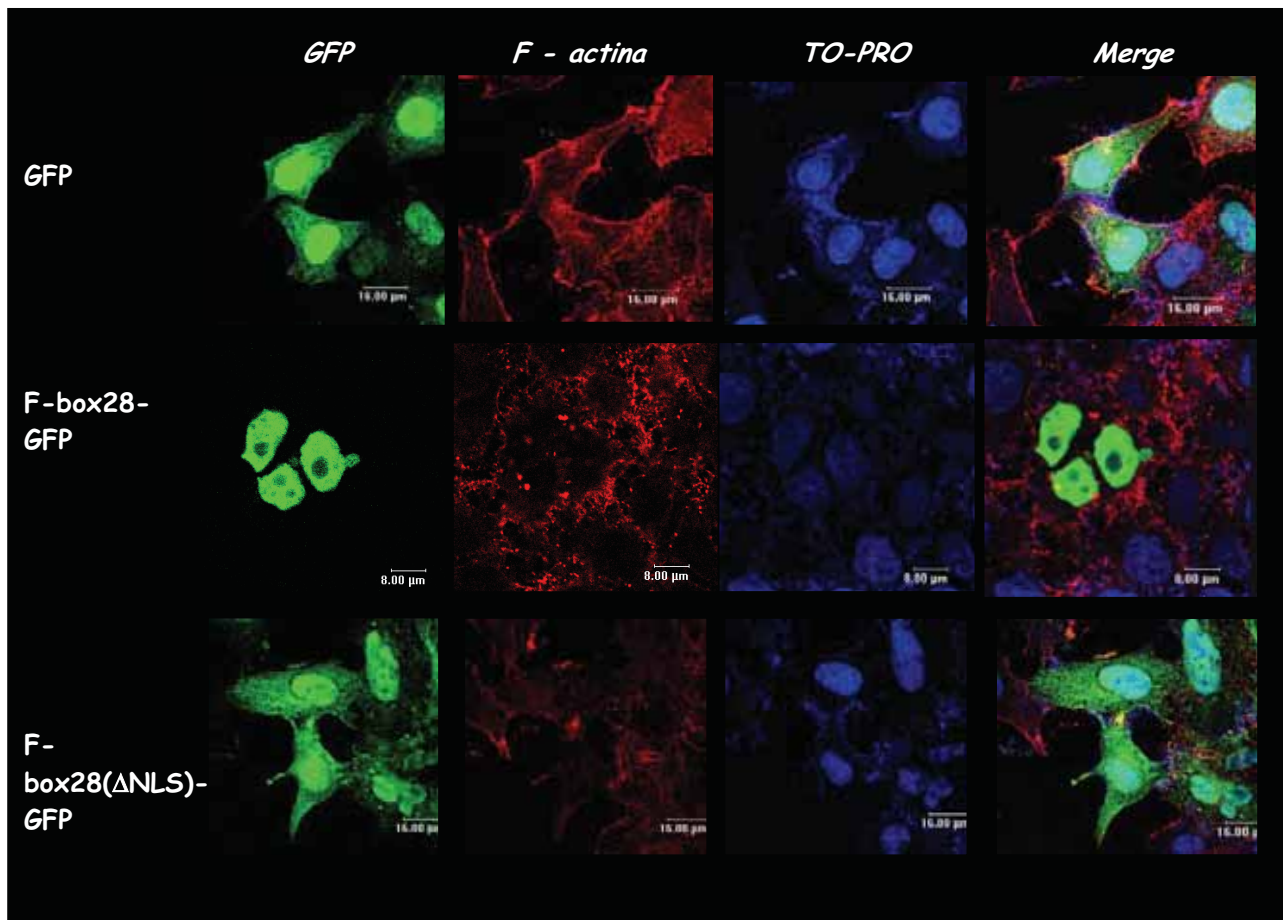


Figura 13. La proteïna F-box28(Δ NLS)-GFP presenta una redistribució nucli-citoplasma.

Immunolocalització de l'F-box28-GFP (verd) i F-box28(Δ NLS)-GFP en cèl·lules HeLa transfectades durant 24 hores.

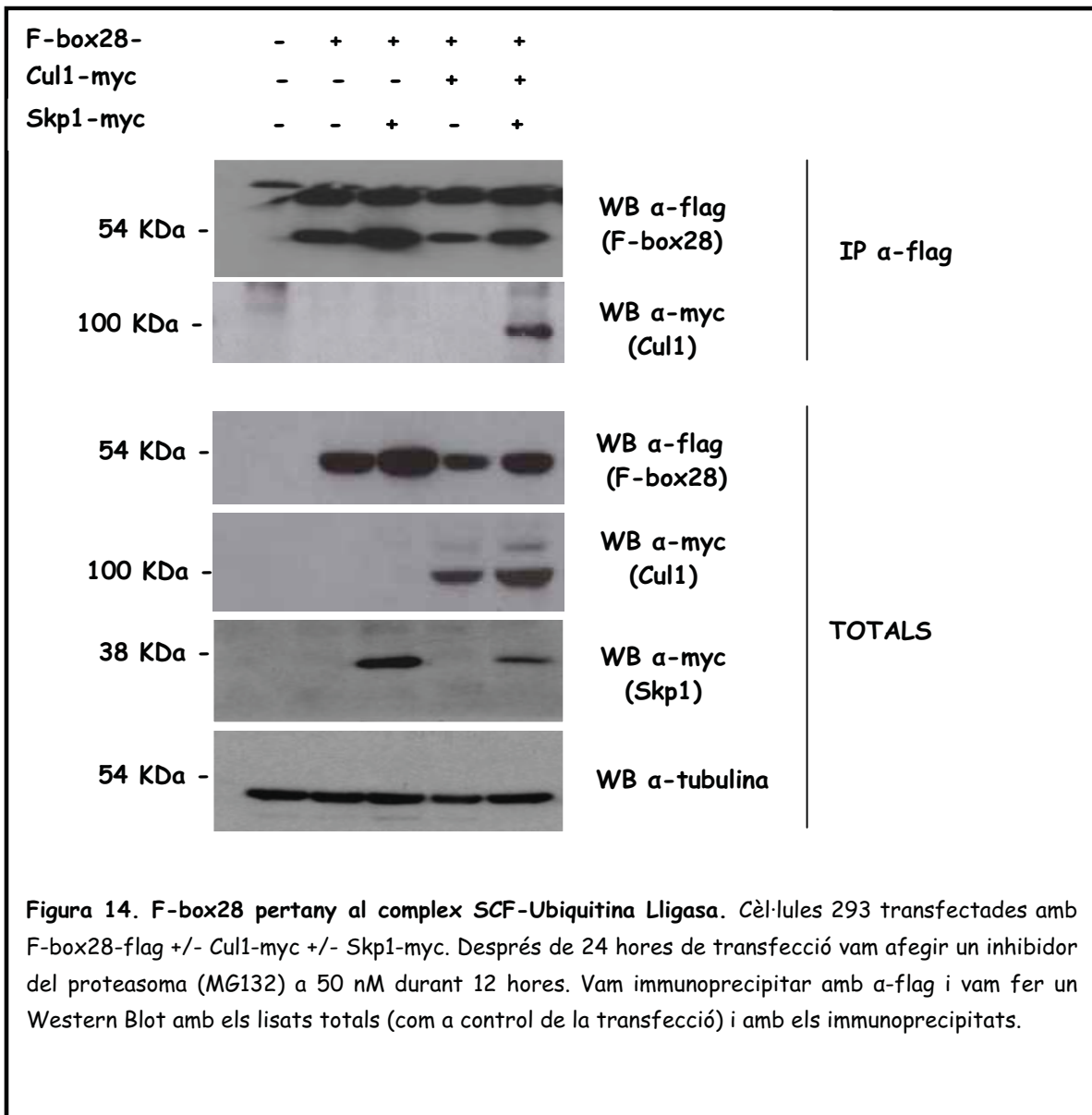
F - actina del citoesquelet (marcada amb faloidina) en vermell.

TO-PRO en blau.

Capítol 2: Degradació:

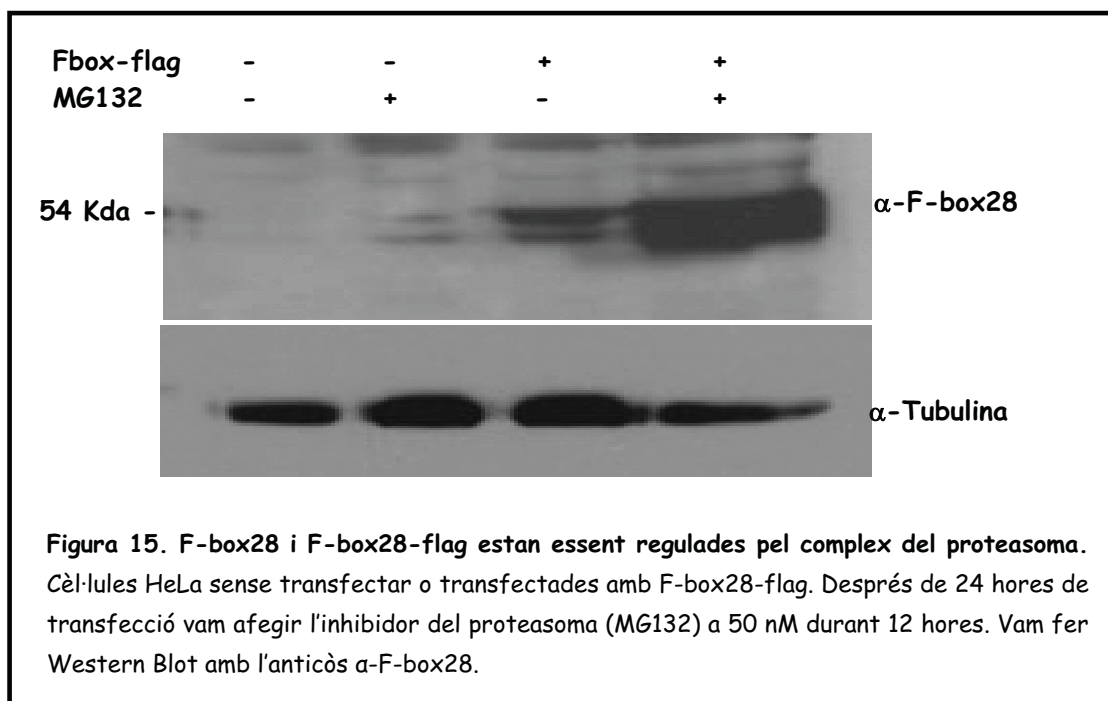
i. Formació complex SCF-Ubiquitina Lligasa.

El complex SCF-Ubiquitina lligasa està format per diferents proteïnes: Cul1, Skp1, Roc1 (o RBX1) i una Fbox. Per tal de veure si la F-box28 podia formar part realment d'aquest complex, vam transfectar cèl·lules 293 amb tres construccions : F-box28-flag, amb/sense Cul1-myc i amb/sense Skp1-myc. Després de 24 hores de transfecció vam afegir un inhibidor del proteasoma (MG132) durant 12 hores a 50 nM. Quan vam immunoprecipitar amb l'anticòs α -flag vam veure que la F-box28 interaccionava amb Cul1 només en la condició en que havíem transfectat amb les tres construccions. És a dir, que calia Skp1 perquè es donés aquesta interacció entre les tres proteïnes del complex. Per tant, podíem assegurar que la F-box28 també pertanyia a la família de la E3 ubiquitina lligasa SCF (**Figura 14**).



F-box28 és degradada pel proteasoma.

Com ja s'ha descrit anteriorment en la bibliografia (Galan, JM and Peter, M., 1999) moltes d'aquestes Fbox són proteïnes inestables, que a més de promoure la ubiquitinització de substrats específics, també poden tenir mecanismes d'autoubiquitinització i degradació a través del proteasoma per tal de regular els seus nivells d'expressió. Així, el que vam voler veure va ser si la F-box28 també podia estar essent regulada pel proteasoma. Per això vam cultivar cèl·lules HeLa sense transfectar o transfectades amb la F-box28-flag i les vam tractar durant 12 hores sense o amb l'inhibidor del proteasoma MG132. Quan vam fer el Western Blot vam poder observar que en la condició no transfectada, quan afegíem l'MG132 els nivells de proteïna d'F-box28 augmentaven, de la mateixa manera que passava amb la condició transfectada amb F-box28-flag (Figura 15).



Després de verificar que l'F-box28 estava regulada a través del proteasoma vam voler determinar si la degradació a través d'aquest complex implicava la ubiquitinització d'F-box28. Per això vam transfectar cèl·lules HeLa amb la construcció F-box28-flag i/o amb Ubiquitina-HA, vam tractar amb l'inhibidor del proteasoma MG132 durant 16 hores i vam fer un Western Blot α -flag. El resultat va ser que en la condició en que havíem transfectat amb ambdues proteïnes s'observava una banda amb un pes una mica més gran que el de la F-box28, corresponent segurament a la F-box28 monoubiquitinada. No vam observar clarament bandes més grans (Figura 16).

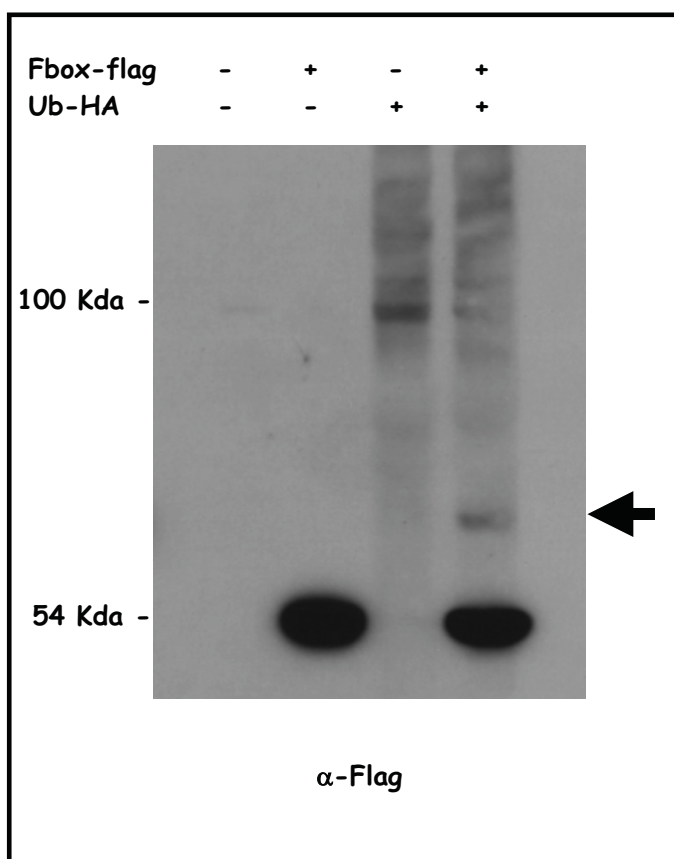
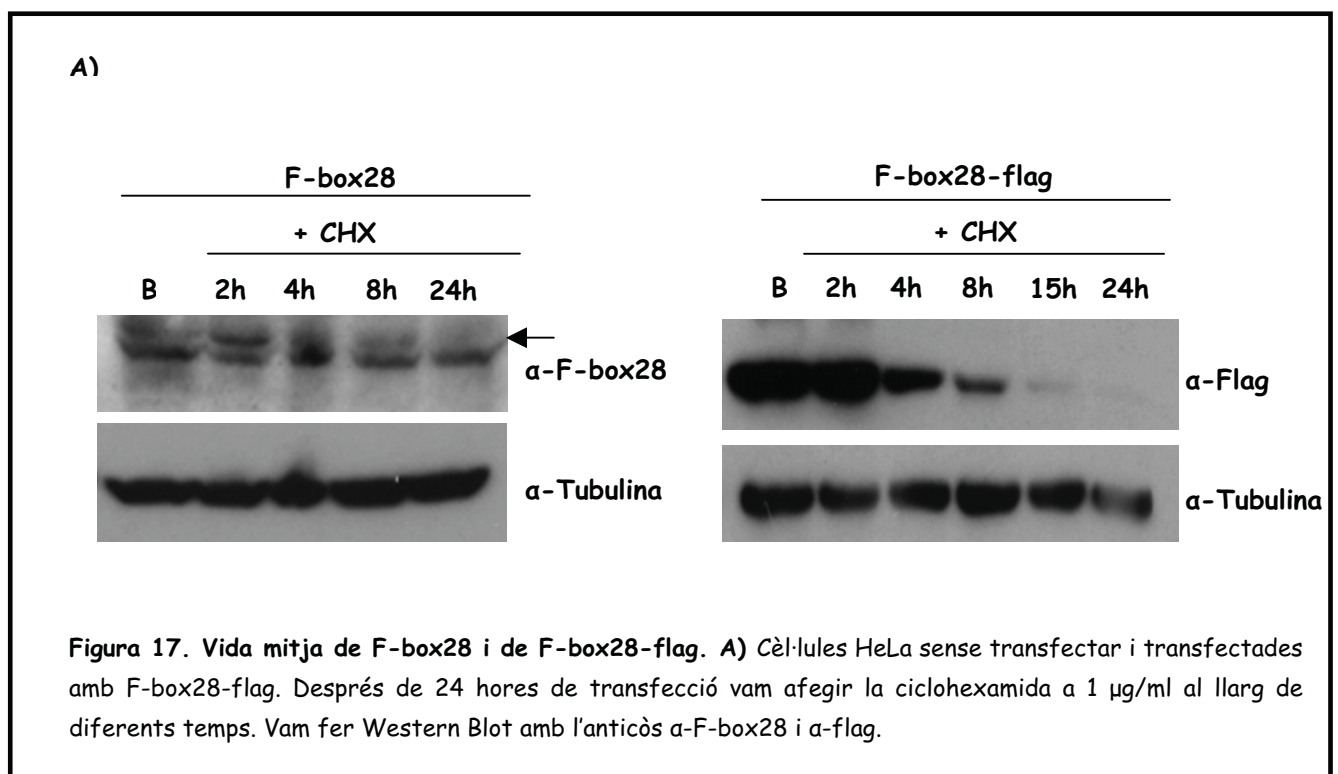


Figura 16. F-box28 es monoubiquitina. Cèl·lules HeLa sense transfectar o transfectades amb F-box28-flag i/o Ubiquitina-HA. Després de 24 hores de transfecció vam afegir l'inhibidor del proteasoma (MG132) a 50 nM durant 12 hores. Vam fer Western Blot amb l'anticòs α -Flag.

ii. Regulació de l'expressió proteica i vida mitja.

Per tal de determinar la vida mitja de la F-box28 vam cultivar cèl·lules HeLa sense transfectar i transfectades amb F-box28-flag i les vam tractar sense o amb un agent inhibidor de la síntesi proteica, la ciclohexamida, al llarg de diferents temps. Els resultats van indicar una vida mitja d'aproximadament 4-5 hores tant per l'F-box28 endògena com per la F-box28-flag (Figura 17).



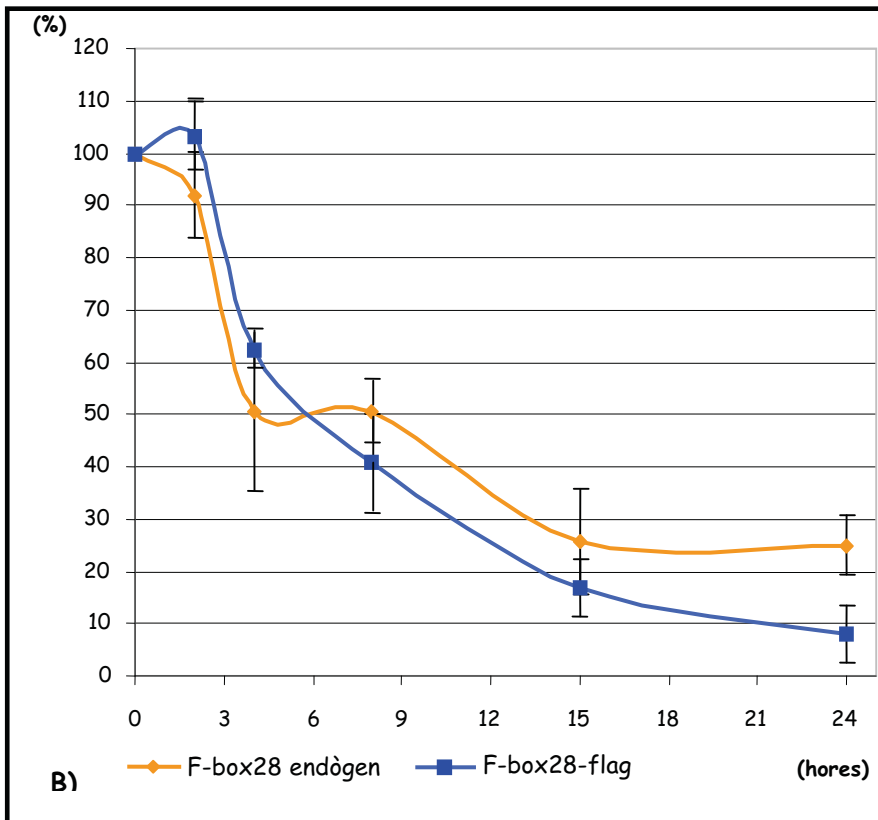
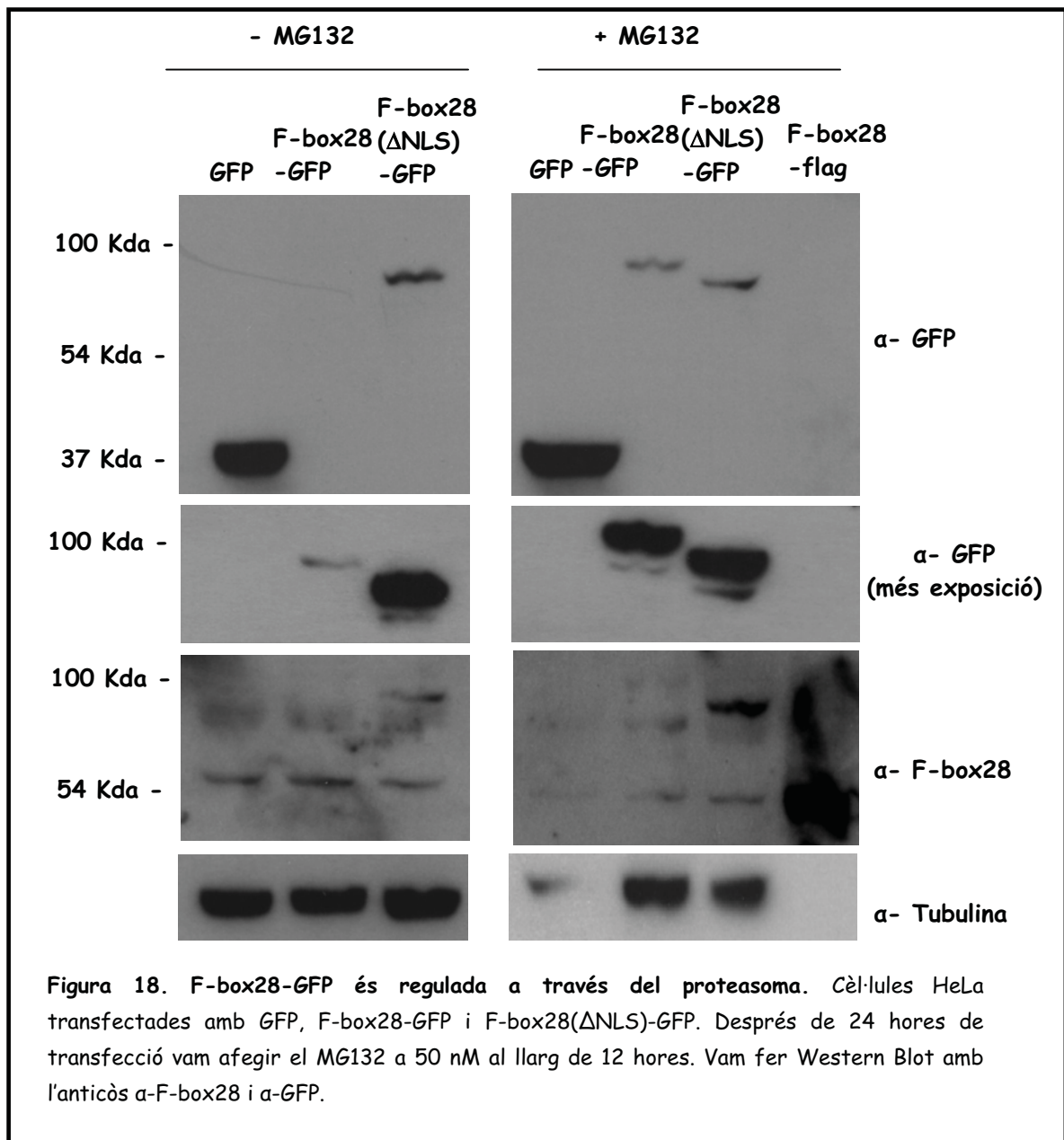
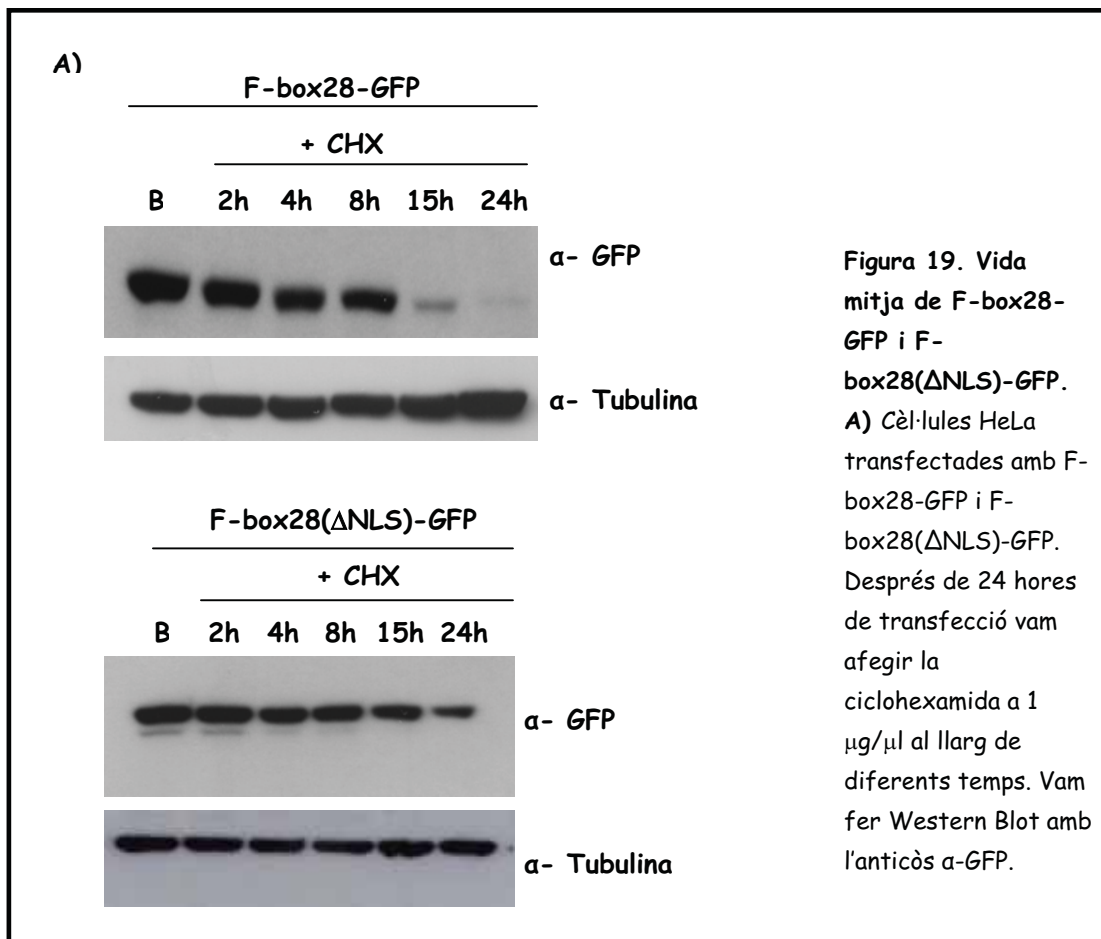


Figura 17. Vida mitja de F-box28 i de F-box28-flag. B) Quantificació de la quantitat d'F-box28 corregida per tubulina. Mitja +/- S.E. de 3-4 experiments independents.

Després de veure la vida mitja de la F-box28 i que estava essent regulada pel proteasoma vam voler mirar que passava amb la construcció a la qual li havíem deleccionat la seqüència NLS. Per analitzar això, el primer que vam fer va ser repetir l'experiment amb l'inhibidor del proteasoma MG132. En aquest cas, vam transfectar cèl·lules HeLa amb GFP, i les construccions F-box28-GFP i F-box28(Δ NLS)-GFP i les vam tractar amb MG132 durant 12 hores. Després vam fer Western Blot. En aquest cas vam veure que la F-box28-GFP també estava essent regulada pel proteasoma (ja que quan li afegíem el MG132 els seus nivell proteics augmentaven) però no així la F-box28(Δ NLS)-GFP, que era molt més estable (**Figura 18**).



Per tal de comprovar la vida mitja d'aquestes construccions vam transfectar cèl·lules HeLa amb F-box28-GFP i F-box28(Δ NLS)-GFP i els hi vam afegir cicloheximida al llarg de diferents temps. En aquest cas vam veure que la delecció de la seqüència NLS augmentava l'estabilitat al llarg del temps de la F-box28, i passava d'unes 4-5 hores per al cas de la F-box28-GFP a més de 36h en el cas de la F-box28(Δ NLS)-GFP (Figura 19).



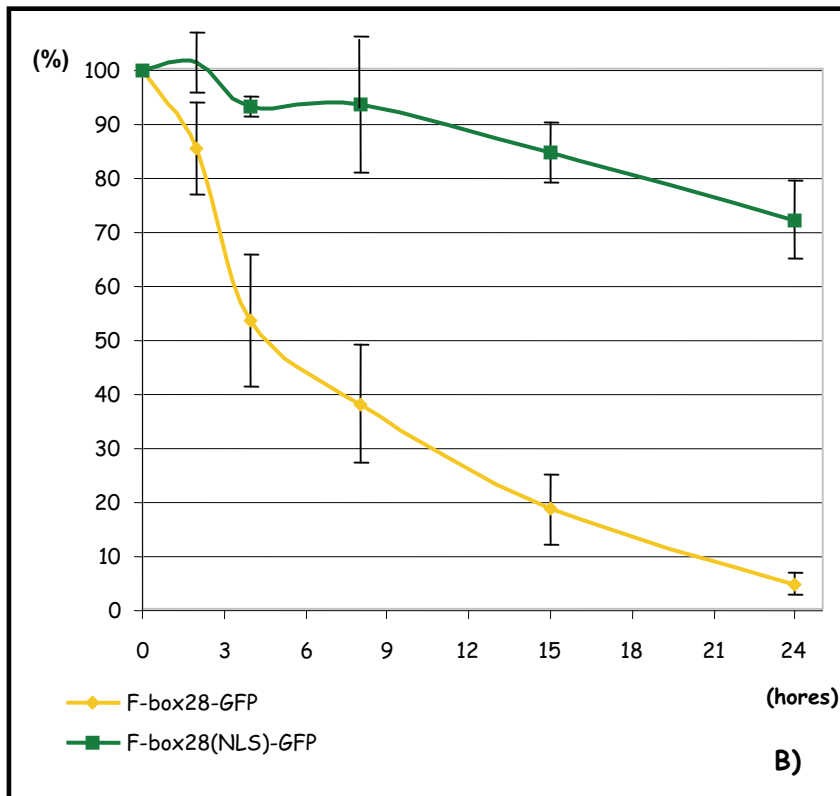


Figura 19. Vida mitja de F-box28-GFP i de F-box28(Δ NLS)-GFP. **B)** Quantificació de la quantitat d'F-box28 corregida per tubulina. Mitja \pm S.E. de 3-4 experiments independents.

Capítol 3: Funció:

Per tal de buscar la funció que F-box28 podia estar tenint dins de la cèl·lula, vam tenir en compte dos fets: el primer, la localització nuclear que presentava F-box28, i la segona, el fet que no havíem aconseguit generar clons estables que expressessin de forma constitutiva la nostra proteïna. Per aquestes dues raons vam pensar que podia tenir una funció relacionada amb apoptosi o bé amb cicle cel·lular.

i. Mort cel·lular:

El primer que vam voler mirar va ser si la sobreexpressió de la F-box28 podia estar causant apoptosi. Per tal de mirar-ho vam sembrar cèl·lules HeLa i les vam transfectar amb la construcció F-box28-GFP i amb GFP, com a control. 24 hores després de transfectar les cèl·lules HeLa les vam marcar amb anexina V i les vam analitzar per citometria de flux. L'anexina V és una proteïna que s'uneix específicament al fosfolípid fosfatidilserina, el qual es troba a la cara interna de la membrana plasmídica quan comença el procés d'apoptosi. Per tant, l'anticòs anexina V-FITC ens permet detectar cèl·lules que estan entrant en apoptosi. Com a control positiu en aquest experiment vam utilitzar estaurosporina. Aquest és un inhibidor de proteïnes quinases que bloqueja moltes quinases a diferents nivells. Sovint, s'utilitza com mètode general per induir l'apoptosi.

Quan vam mirar les cèl·lules verdes i vermelles vam veure que el $\approx 90\%$ de cèl·lules estaven vives, i per tant, que la F-box28 no estava produint l'entrada d'apoptosi de les cèl·lules, 24 hores post-transfecció (**Figura 20**).

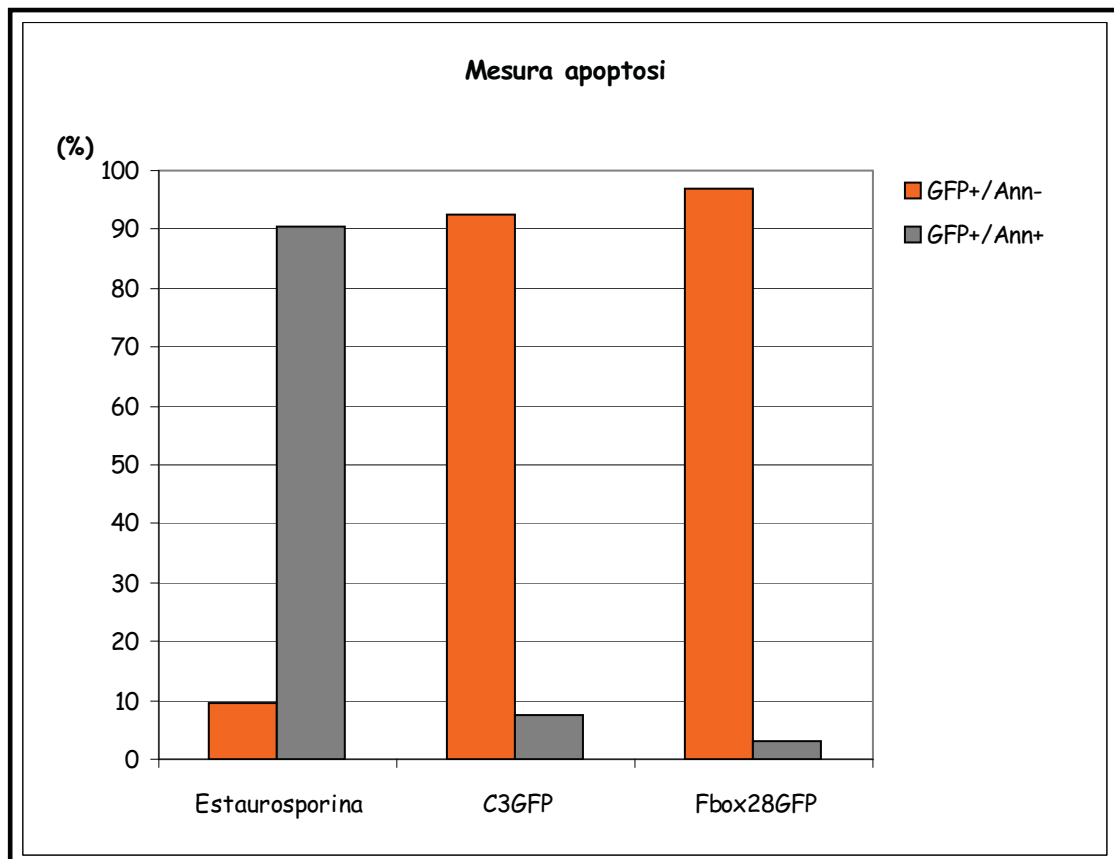


Figura 20. La sobreexpressió d'F-box28 no indueix apoptosi. Cèl·lules HeLa transfectades amb GFP o F-box28-GFP durant 24 hores es van marcar amb anexina V-FITC i es van analitzar per citometria de flux. Com a control positiu d'apoptosi es va utilitzar estaurosporina 0,5 μ M durant 24 hores (A la gràfica es mostren les mitges de dos experiments independents).

Verd: marcatge transfecció GFP/F-box28-GFP.

Vermell: marcatge apoptosi (anexina V-FITC).

Al veure que la funció de la F-box28 no estava relacionada amb apoptosi, vam pensar que potser sí que estava produint la mort de la cèl·lula però per una altra via diferent. Per aquesta raó el que vam fer va ser transfectar altre cop cèl·lules HeLa amb GFP, F-box28-GFP i també F-box28(Δ NLS)-GFP i les vam marcar amb iodur de propidi. Aquest s'intercala en els àcids nucleics incrementant sensiblement la seva fluorescència. La membrana de les cèl·lules vives no deixa entrar el iodur de propidi a l'interior del citoplasma, de manera que només quedaran tenyides les cèl·lules que tinguin danyada la seva membrana (mortes) i els nuclis aïllats.

Quan vam analitzar les cèl·lules vives i mortes per citometria de flux després de 24 hores de transfecció vam observar altra vegada quasi un 90% de cèl·lules vives. A més, no existia cap diferència entre les diferents construccions de l'F-box28 i el GFP control (**Figura 21**).

Per tant, podíem concloure que la sobreexpressió de la F-box28 durant 24 hores no estava afectant la viabilitat de la cèl·lula per apoptosi ni per cap altre mecanisme.

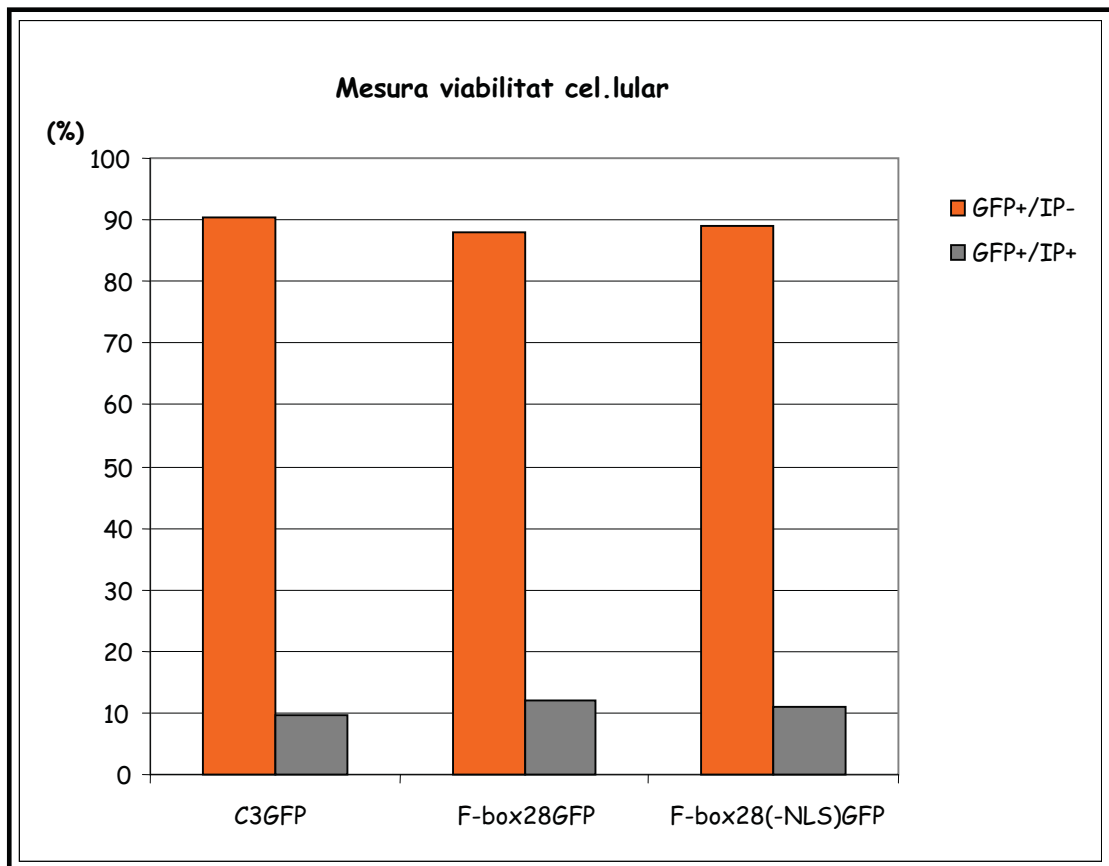


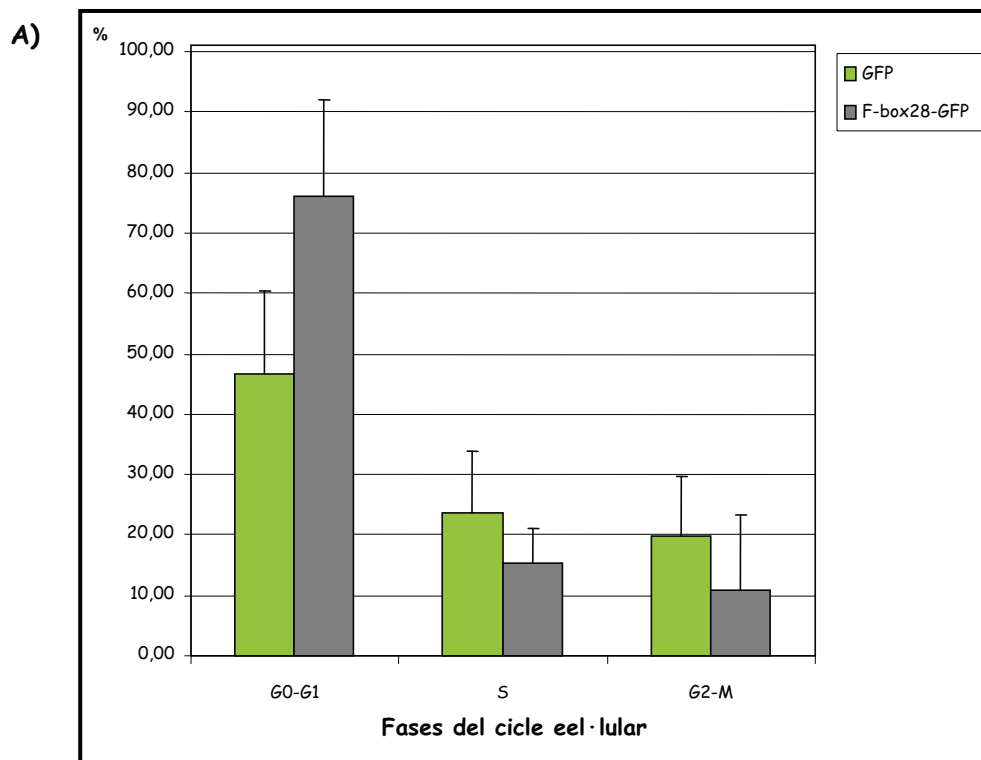
Figura 21. La sobreexpressió d'F-box28 no afecta la viabilitat de la cèl·lula. Cèl·lules HeLa transfectades amb GFP, F-box28-GFP o F-box28(Δ NLS)-GFP durant 24 hores es van marcar amb iodur de propidi i es van analitzar per citometria de flux.

Vermell: marcatge transfecció GFP/F-box28-GFP.

Verd: iodur propidi.

ii. Cicle cel·lular:

Després de descartar la mort cel·lular com a funció principal de l'F-box28, vam decidir mirar la segona opció: cicle cel·lular. Per aquest experiment, vam transfectar cèl·lules HeLa amb GFP i F-box28-GFP durant 24 hores i vam analitzar per citometria de flux les diferents fases del cicle cel·lular de les cèl·lules marcades amb verd (GFP positives) i vermell (iodur de propidi, marcatge del DNA). A més, també vam transfectar cèl·lules HeLa amb vector pCDNA3, per veure que les diferències que observàvem no eren degudes al procés de la transfecció. Per tant, també vam analitzar les cèl·lules que no eren verdes (no s'havien transfectat) de les condicions de GFP i F-box28-GFP i les vam comparar amb la condició transfectada amb pCDNA3.



B)

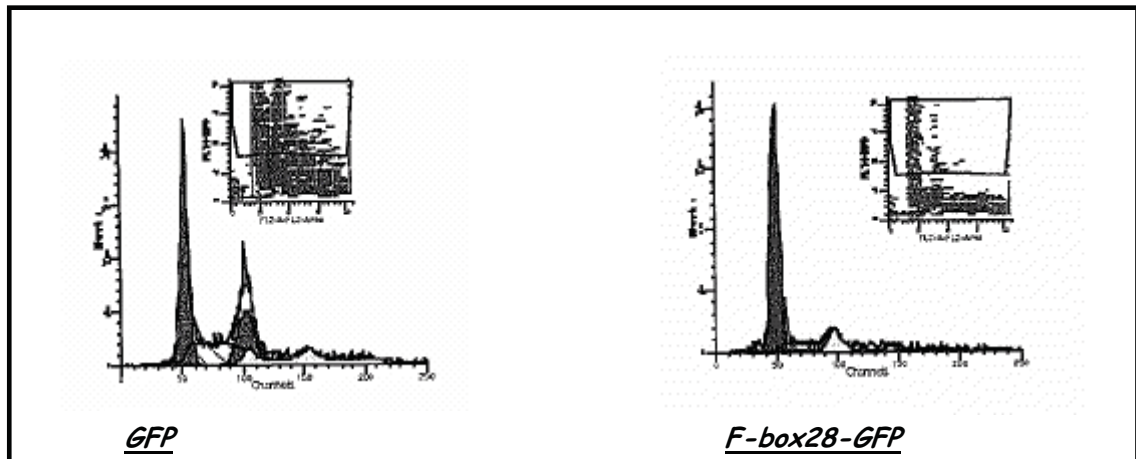


Figura 22. La sobreexpressió d'F-box28 induïx una parada parcial en la fase G1 del cicle cel·lular. Cèl·lules HeLa transfectedes amb GFP i F-box28-GFP durant 24 hores es van marcar amb iodur de propidi i es va analitzar el cicle cel·lular per citometria de flux.

- A) Anàlisi de cèl·lules marcades amb verd (transfectades) i amb iodur de propidi (marcatge DNA). (Mitja de 5 experiments independents).
- B) Exemple gràfic d'un dels experiments.

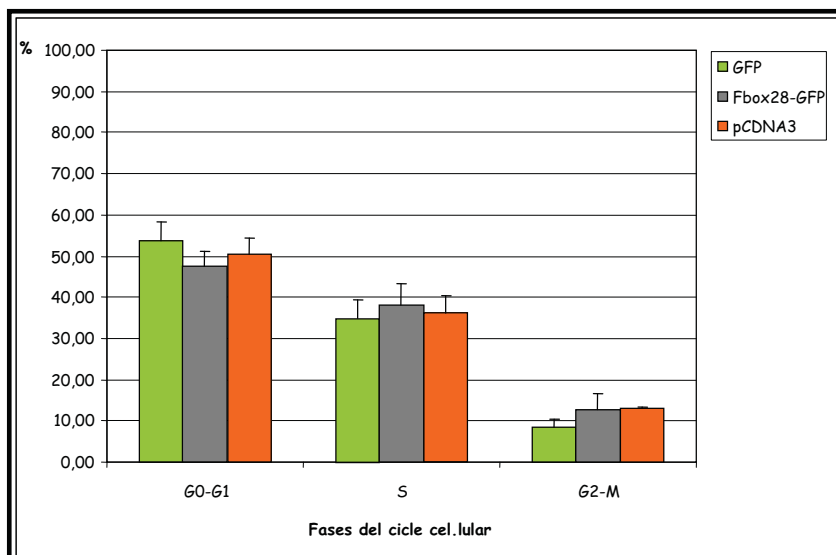


Figura 23. Control de cèl·lules no transfectedes. Cèl·lules HeLa transfectedes amb pCDNA3 i comparades amb les cèl·lules que no havien estat transfectedes de les condicions GFP i F-box28-GFP de l'experiment anterior (és a dir, les que presentaven marcatge vermell, iodur de propidi, i no verd).

Quan vam analitzar els % de les cèl·lules que es trobaven en cada fase del cicle cel·lular, vam observar que la condició transfectada amb F-box28-GFP estava induint una aturada parcial en la fase G1, ja que aquesta fase incrementava casi en un 30%, en relació a la condició control GFP, i la fase S i G2-M disminuïa en casi un 50% (**Figura 22**). Quan comparàvem les cèl·lules transfectades amb pCDNA3 i les "no transfectades" de la condició GFP i F-box28-GFP (marcatge només vermell amb iodur de propidi) veiem que els % eren molt similars. Per tant, l'efecte que estàvem observant era específic de la F-box28 i no era degut al procés de transfecció (**Figura 23**).

Una vegada vam veure la implicació d'F-box28 en parada de cicle cel·lular, vam voler avaluar què podia estar passant amb la construcció F-box28(Δ NLS)-GFP, a la qual li havíem deleccionat l'extrem C-terminal i que presentava una localització citoplasmàtica i nuclear. Per tant, vam repetir l'experiment anterior: vam transfectar cèl·lules HeLa i C2C12 amb GFP, F-box28-GFP i F-box28(Δ NLS)-GFP durant 24 hores i vam analitzar per citometria de flux el cicle cel·lular de les cèl·lules GFP i iodur de propidi positives. Com en el cas anterior, vam repetir els controls de transfecció amb pCDNA3.

En aquest cas, veiem el mateix efecte entre la transfecció entre GFP i F-box28-GFP (aturada parcial del cicle en fase G1) i quan miràvem l'efecte d'F-box28(Δ NLS)-GFP veiem que tenia un efecte molt similar a la situació control amb GFP, tant en el cas de les cèl·lules HeLa com en el de les C2C12 (**Figura 24**).

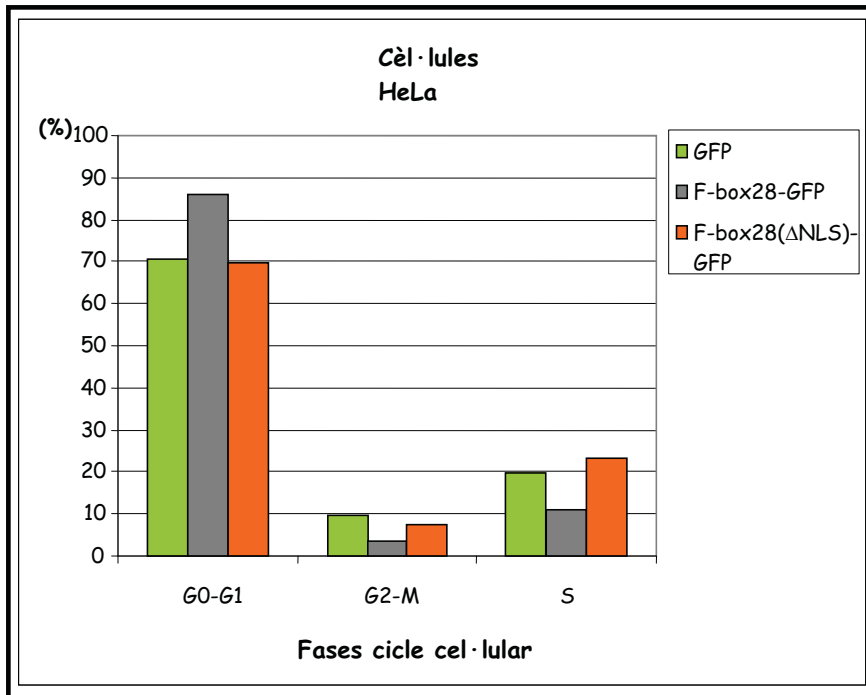
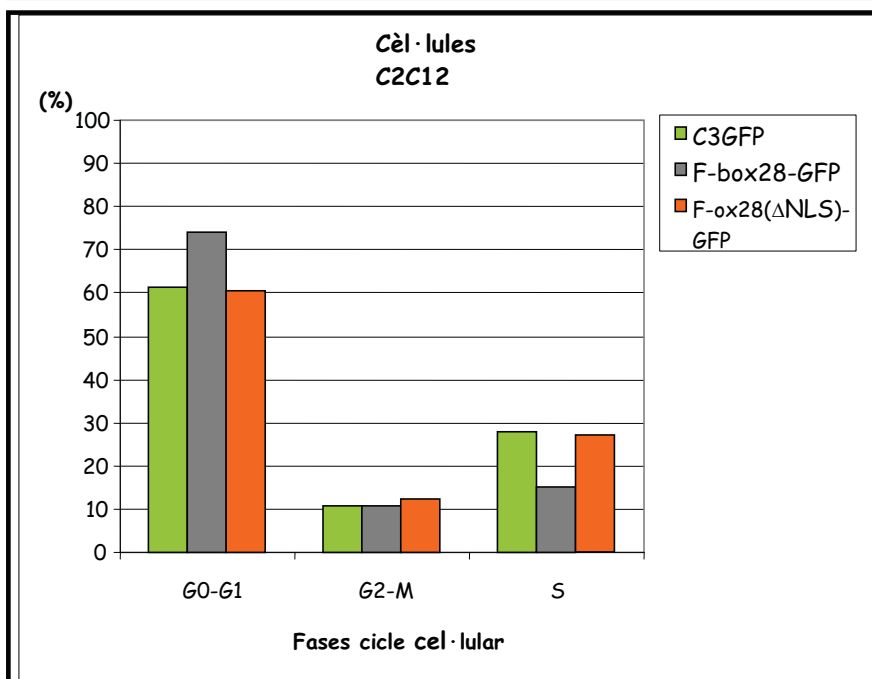


Figura 24. La sobreexpressió d'F-box28(ΔNLS)-GFP té el mateix efecte que la transfecció amb el control GFP. Cèl·lules HeLa i C2C12 transfectades amb GFP, F-box28-GFP i F-box28(ΔNLS)-GFP durant 24 hores. Per citometria de flux es van analitzar les cèl·lules marcades amb verd (transfectades) i amb iodur de propidi (marcatge del DNA).



Capítol 4: Interacció amb substrats:

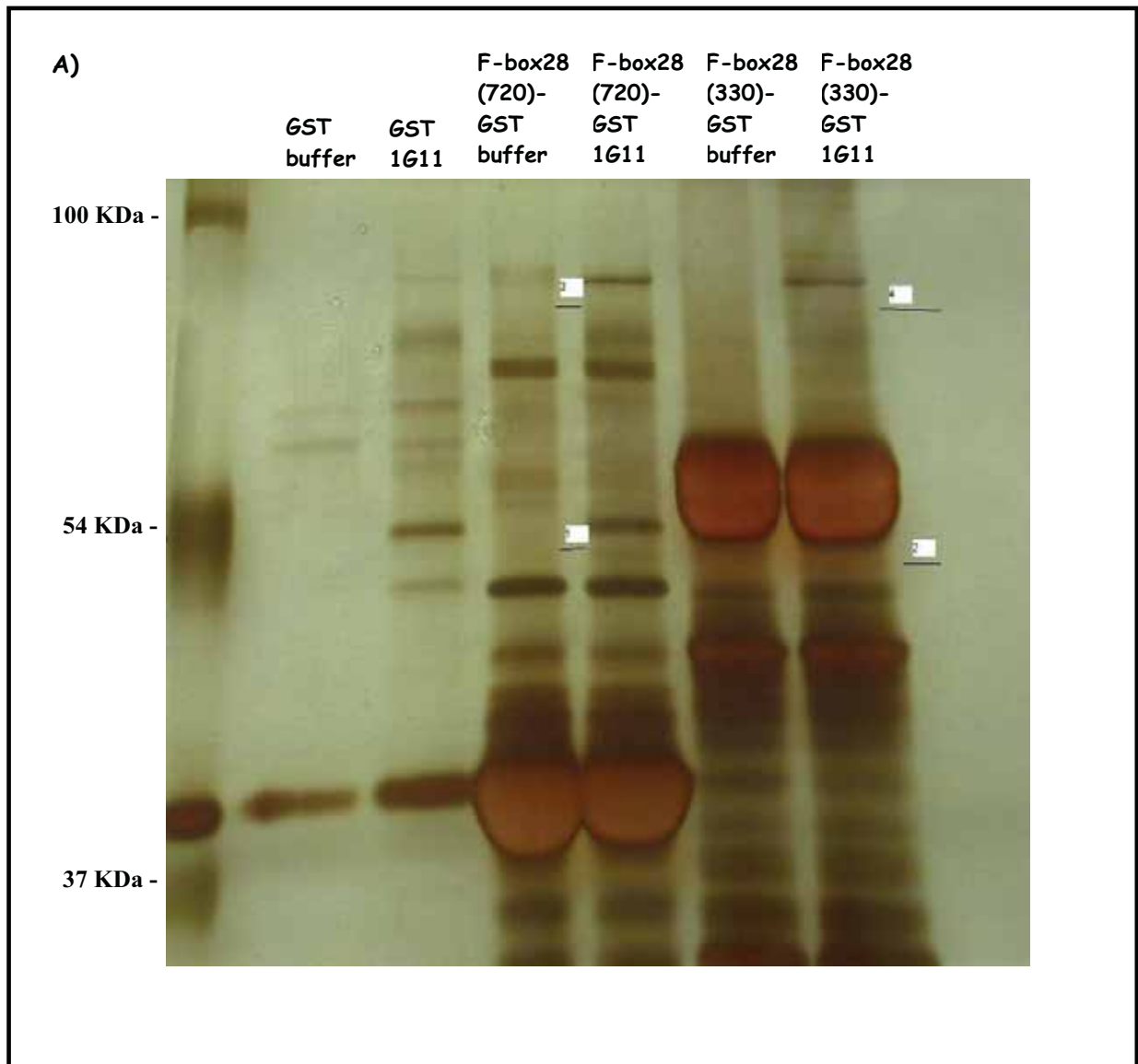
i. Aproximació per proteòmica:

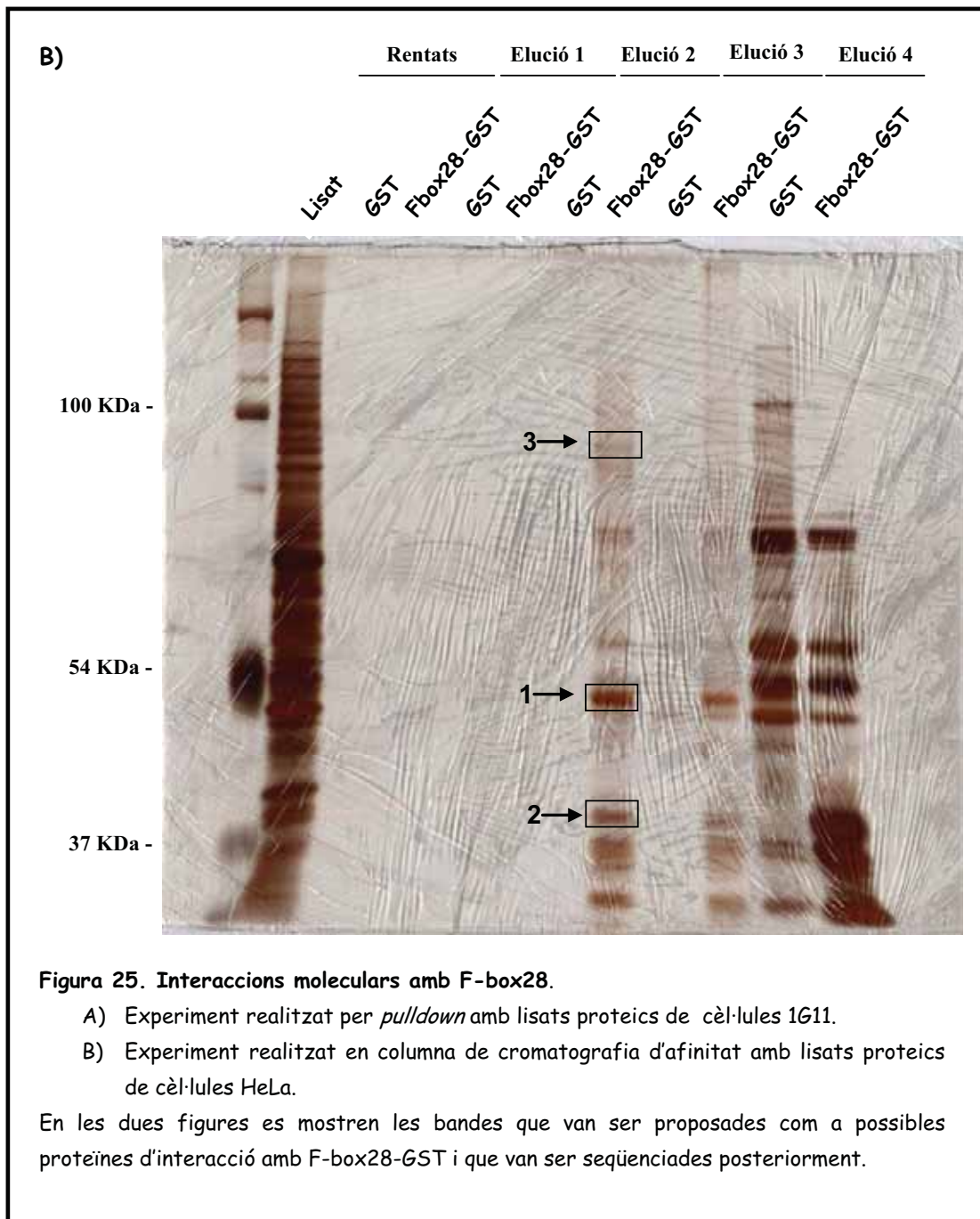
Per tal d'identificar possibles proteïnes d'interacció amb F-box28 vam generar tres proteïnes de fusió GST: F-box28-GST, F-box28(330)-GST i F-box28(720)-GST (detallades al capítol de Materials i Mètodes). Vam realitzar aquestes construccions degut a la poca estabilitat d'F-box28 i a que el possible domini d'interacció amb els substrats sol estar situat majoritàriament en l'extrem C-terminal.

Aquestes proteïnes de fusió es van incubar amb extractes proteics de cèl·lules 1G11. Es van realitzar els *pull-downs* i es van tenyir els gels amb plata. Les possibles bandes candidates es van enviar al servei de proteòmica de l'Hospital Clínic, on van ser seqüenciades. Degut a la gran varietat de proteïnes obtingudes per a cada banda vam decidir repetir el mateix experiment amb extractes proteics de cèl·lules HeLa, però el resultat va ser el mateix.

Com a conseqüència d'aquests resultats vam realitzar un nou experiment: aquesta vegada vam unir covalentment les proteïnes GST a una resina de *CNBr-Activated Sepharose 4B* en una columna de cromatografia d'afinitat. D'aquesta manera ens permetia l'anàlisi d'una quantitat encara més gran d'extractes proteics (**Figura 25**).

Després de varis experiments i sense un resultat concloent amb els dos mètodes, vam veure que de totes les bandes seqüenciades, el que sí que destacava era un nombre important de diferents proteïnes amb domini "Zinc Finger". Per tant, vam pensar que potser la F-box28 podria estar interaccionant amb algun factor de transcripció amb aquest domini, fet que cal estudiar en un futur.





ii. Altres aproximacions:

En la bibliografia s'han descrit moltes proteïnes Fbox que participen en la regulació del cicle cel·lular com Skp2 que interacciona amb el complex cdk2-ciclina A o FBXW8 amb la ciclina D1. Així, degut a que la F-box28 també presentava una funció relacionada amb parada del cicle cel·lular i que les tècniques per proteòmica no havien aportat resultats concloents, vam decidir buscar possibles substrats que participessin en la progressió del cicle cel·lular i que poguessin estar interaccionant amb la F-box28.

Per motius de limitació/disponibilitat d'eines de treball al laboratori, el primer que vam mirar va ser si la F-box28 podia estar interaccionant amb la ciclina A2. Com podem veure a la **figura 26**, quan fèiem pull-down amb proteïna purificada F-box28-GST i lisats que sobreexpressaven ciclina A2-HA aquesta interaccionava, a diferència de quan fèiem el mateix experiment amb GST sola.

Per altra banda, quan repetíem l'experiment amb la construcció F-box28(720)-GST, a la qual li mancava l'extrem C-terminal, també interaccionava amb menor grau amb la ciclina A2. Aquesta menor interacció, però, podria ser deguda a una menor càrrega de proteïna purificada.

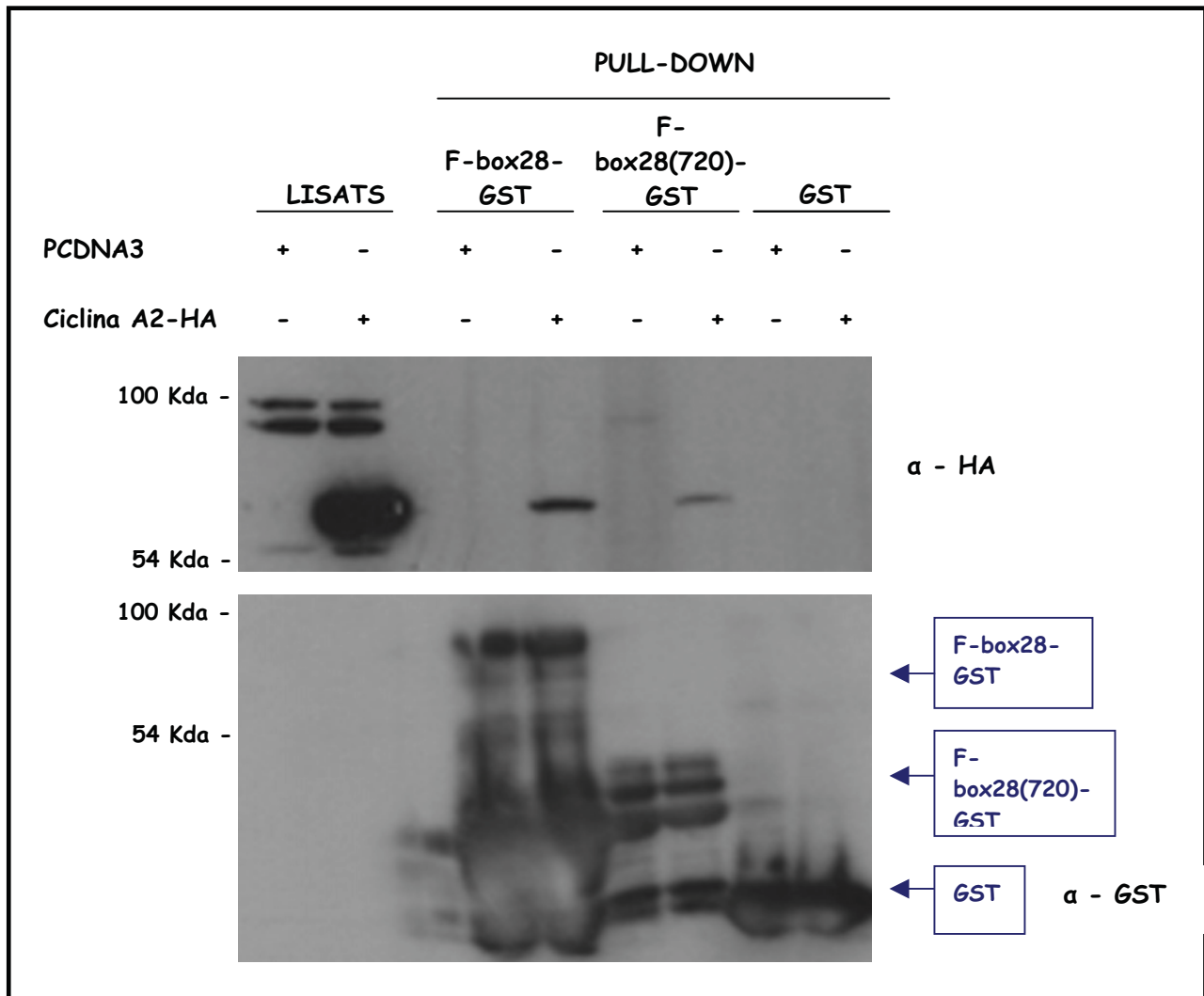


Figura 26. F-box28 interacciona amb la ciclina A2-HA per Pull-down. Cèl·lules HeLa transfectades amb Ciclina A2-HA o pCDNA3. Després de 24 hores de transfecció vam afegir l'inhibidor del proteasoma (MG132) a 50 nM durant 12 hores. Vam fer Pull-down amb els lisats proteics i les proteïnes de fusió F-box28-GST, F-box28(720)-GST i GST. Després vam fer un Western Blot α-HA i α-GST com a control de l'experiment.

Després de veure que la ciclina A2-HA interaccionava amb la proteïna purificada F-box28-GST per pull-down, vam voler veure si passava el mateix fent el revers. És a dir, sobreexpressant la F-box28-flag en cèl·lules HeLa i veure si interaccionava amb la proteïna purificada ciclina A2-GST. Com podem veure en la **figura 27** la interacció es donava de la mateixa manera.

A més, en aquest experiment vam voler avaluar la interacció de la F-box28 amb altres ciclins. Per això, vam fer pull-down amb els mateixos lisats proteics, on havíem sobreexpressat la F-box28-flag, però amb diferents ciclins unides a GST. Així, vam poder veure que la F-box28 també estava interaccionant amb la ciclina E i amb la ciclina D3, mentre que amb la ciclina D1, tot i tenir una major càrrega de proteïna purificada, no s'hi unia.

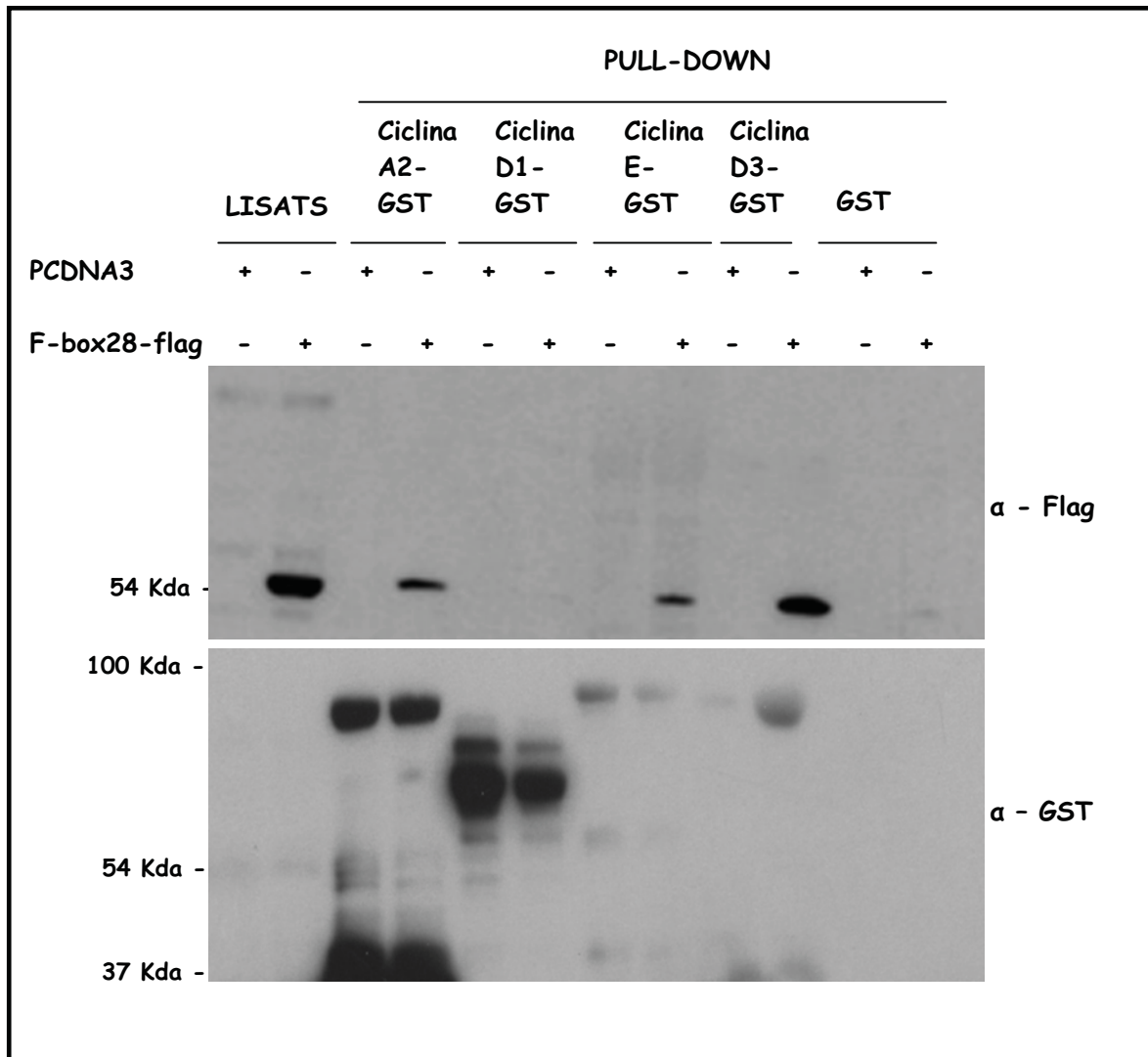


Figura 27. F-box28 interacciona amb diferents ciclins per pull-down. Cèl·lules HeLa transfectades amb F-box28-flag o pCDNA3. Després de 24 hores de transfecció vam afegir l'inhibidor del proteasoma (MG132) a 50 nM durant 12 hores. Vam fer Pull-down amb els lisats proteics i les diferents proteïnes de fusió: Ciclina A2-GST, Ciclina D1-GST, Ciclina D3-GST, Ciclina E-GST i GST. Després vam fer un Western Blot α -flag i α -GST com a control de l'experiment.

Per corroborar la interacció específica entre la ciclina D3 i la F-box28 vam decidir fer dos experiments addicionals. El primer va ser fer el revers del pull-down anterior, és a dir, sobreexpressar la ciclina D3 en cèl·lules HeLa i fer pull-down amb proteïna purificada F-box28-GST. Com podem veure a la **figura 28** el resultat es va confirmar.

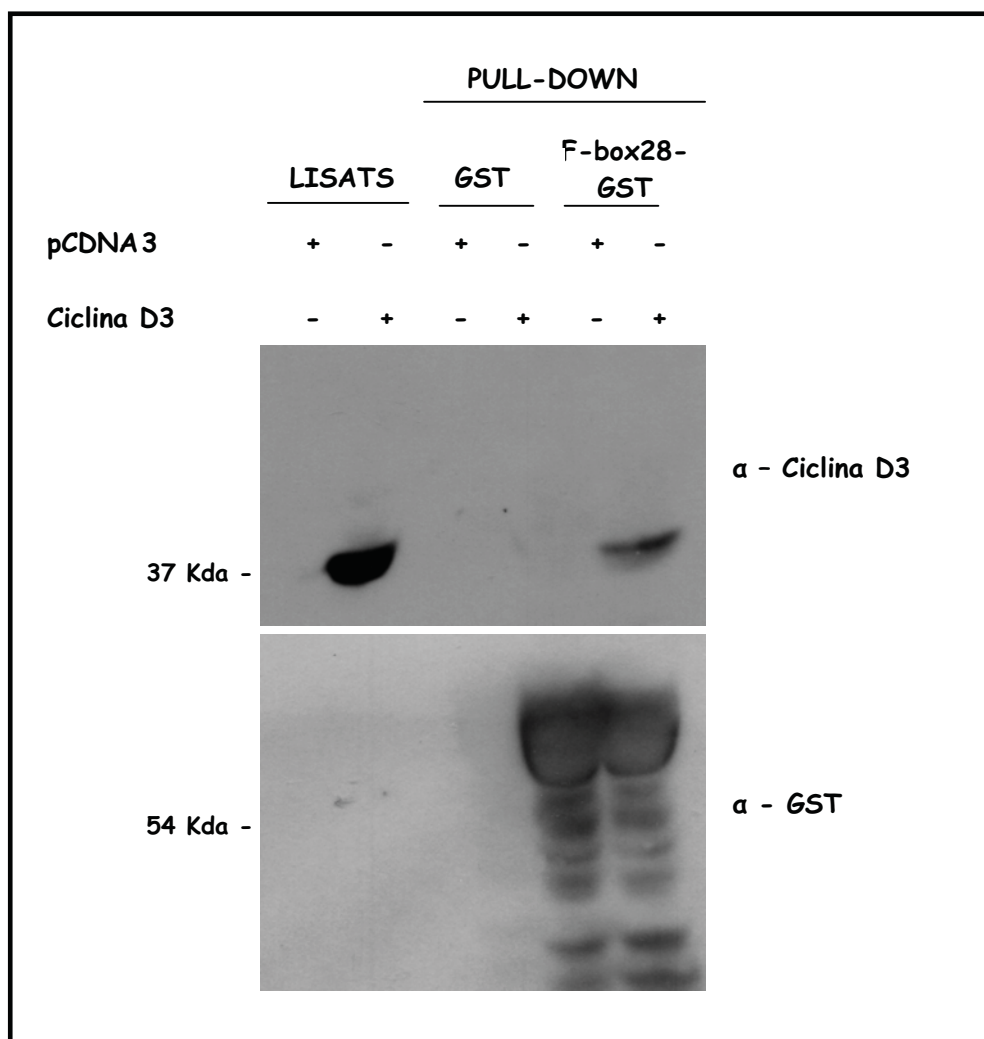


Figura 28. F-box28 interacciona amb la ciclina D3 "in vitro". Cèl·lules HeLa transfectades amb Ciclina D3 o pCDNA3. Després de 24 hores de transfecció vam afegir l'inhibidor del proteasoma (MG132) a 50 nM durant 12 hores. Vam fer Pull-down dels lisats proteics amb les proteïnes de fusió F-box28-GST i GST. Després vam fer un Western Blot α -ciclina D3 i α -GST com a control de l'experiment.

El segon experiment va consistir en transfectar cèl·lules HeLa amb Fbox-flag i/o ciclina D3 i fer una immunoprecipitació amb l'anticòs flag amb els lisats proteics, per tal de confirmar que aquestes dues proteïnes podien estar interaccionant dintre la cèl·lula. Els resultats van ser una vegada més, positius (**Figura 29**). Per tant, mitjançant experiments de pull-down i immunoprecipitació podíem confirmar que la F-box28 estava interaccionant amb la ciclina D3 i amb la ciclina A2.

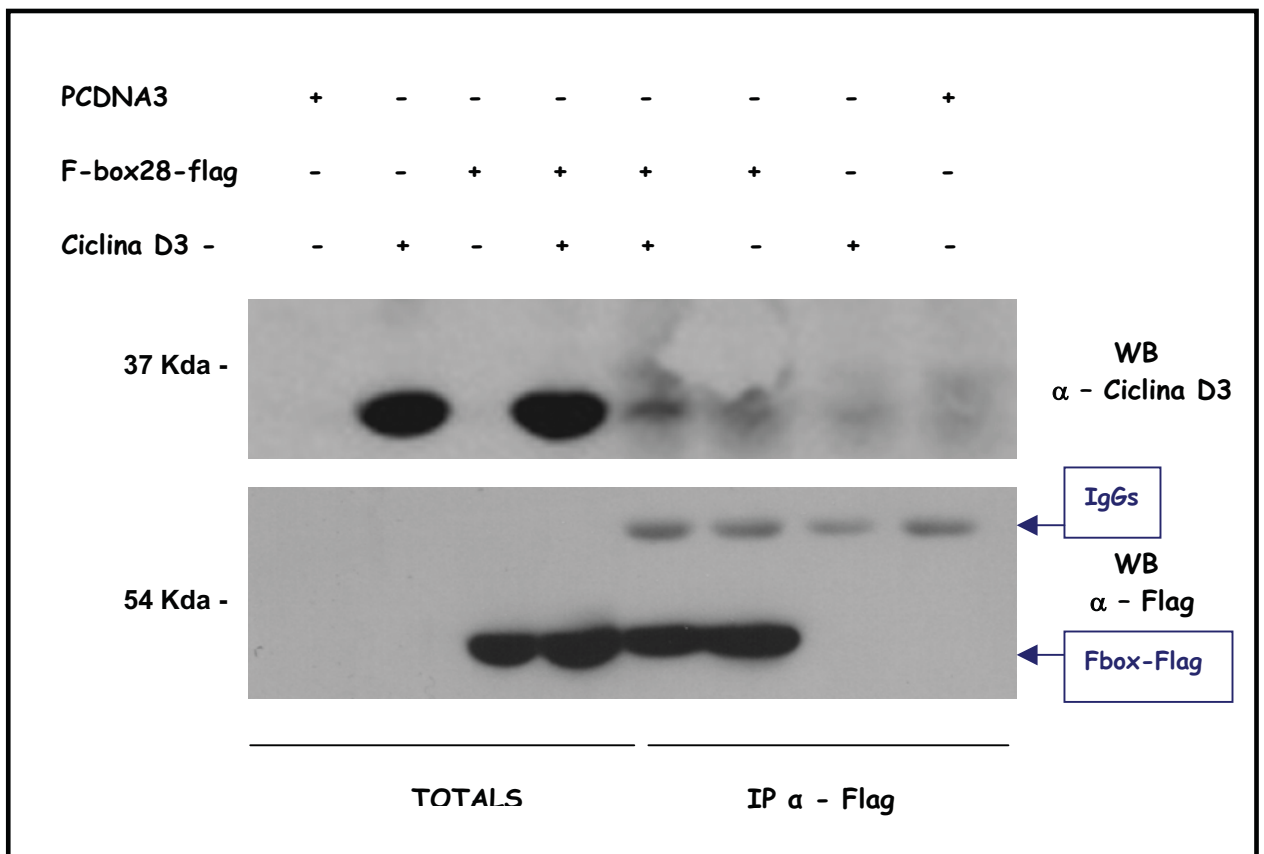


Figura 29. F-box28 interacciona amb la Ciclina D3 per immunoprecipitació. Cèl·lules HeLa transfectades amb pCDNA3, F-box28-flag +/- Ciclina D3 +/- . Després de 24 hores de transfecció vam afegir l'inhibidor del proteasoma (MG132) a 50 nM durant 12 hores. Vam immunoprecipitar amb α -flag i vam fer un Western Blot amb els lisats totals (com a control de la transfecció) i amb els immunoprecipitats.

Després de veure que la F-box28 estava interaccionant amb la ciclina A2 i D3 ens vam preguntar quina funció podria estar tenint la F-box28 sobre aquestes ciclins. Donat que la funció més coneguda dels complexos SCF és la seva implicació en vies de degradació de proteïnes, el més lògic era pensar que la F-box28 podia estar implicada en la ubiquitinització i degradació

d'alguna d'aquestes ciclines. Per això, vam transfectar cèl·lules HeLa amb F-box28-GFP i F-box28-flag per tal de veure si aquesta sobreexpressió es traduïa en una disminució dels nivells d'aquestes ciclines (**Figura 30**). Els resultats obtinguts en aquest experiment suggereixen que un augment de l'expressió d'F-box28 no causa alteracions en els nivells de les ciclines A2 i D3.

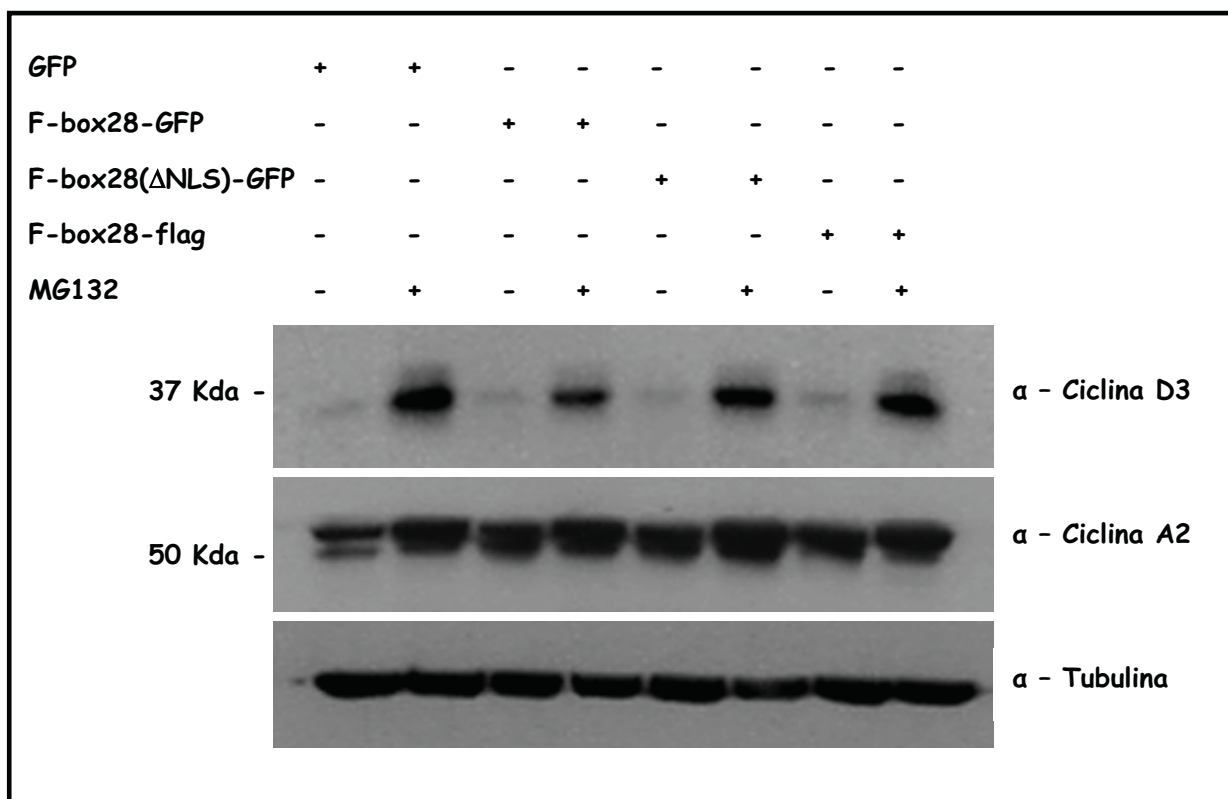


Figura 30. La sobreexpressió d'F-box28 no disminueix els nivells de ciclina D3 o ciclina A2. Cèl·lules HeLa transfectades amb GFP, F-box28-GFP, F-box28-flag i F-box28(Δ NLS)-GFP. Després de 24 hores de transfecció vam afegir l'inhibidor del proteasoma (MG132) a 50 nM durant 12 hores i vam fer Western Blot α -ciclina A i α -ciclina D3.

Per tal d'identificar possibles gens relacionats amb l'efecte proangiogènic de TGF- β 1, es va generar en el nostre laboratori una col·lecció de cDNAs, estimulats o reprimits per TGF- β 1, procedents de cèl·lules endotelials 1G11 cultivades en gels de col·lagen durant 4 hores. Entre els gens induïts per TGF- β 1 es va trobar el mRNA de la F-box28.

La F-box28 era un gen que encara no havia estat clonat. Per això, l'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat caracteritzar aquesta proteïna i trobar-ne la seva funció i possibles substrats.

F-box28 com a E3 ubiquitina lligasa

La degradació de proteïnes dependent d'ubiquitina té lloc a través d'una via que conté tres complexos enzimàtics principals: l'enzim activador de molècules de ubiquitina (E1), l'enzim conjugador (E2) i el complex ubiquitina lligasa (E3). Les proteïnes a les quals se'ls hi uneix molècules de ubiquitina són reconegudes pel proteasoma i degradades. El complex proteic SCF és una de les famílies d'E3 més ben caracteritzades fins el moment. Aquest està format per les proteïnes Skp1, Cul1 i una proteïna F-box. En alguns casos, però, també s'ha vist que les proteïnes F-box i Skp1 poden actuar en complexos no-SCF i fins i tot que algunes proteïnes F-box poden tenir funcions pròpies, independents de la resta del complex SCF, com és el cas de la F-box Fbl10. Aquesta proteïna s'ha vist que no interacciona ni amb Skp1 ni amb Cul1 i que interacciona amb el promotor de c-Jun reprimint la seva transcripció (Koyama-Nasu, R., et al., 2007). A través de prediccions computacionals de dominis F-box, moltes proteïnes F-box s'han pogut caracteritzar "in silico", encara que molt poques disposen d'evidències experimentals (Hagens, O., et al., 2005). En aquest estudi, nosaltres hem volgut caracteritzar la F-box28, una proteïna F-box putativa codificada per un gen originalment identificat a través de la base de dades i dipositat com a un mRNA incomplet. Així, mitjançant experiments d'interacció de proteïnes hem

podut demostrar que la F-box28 pertany a la família d'E3 SCF. En la formació d'aquest complex és Skp1 qui actua de proteïna adaptadora interaccionant a la vegada amb la F-box (a través del domini F-box) i amb l'extrem N-terminal de Cul1. En els nostres experiments hem pogut demostrar que en absència d'Skp1, la F-box28 no interacciona amb Cul1. Per tant, els nostres resultats suggereixen que la F-box28 participa en el procés de ubiquitinització d'algun substrat específic com a E3 ubiquitina lligasa del complex SCF.

A la vegada que les F-box són les encarregades de reconèixer substrats específics, aquestes proteïnes també requereixen d'una regulació pròpia. Per molts complexos SCF no es coneix com les cèl·lules regulen els seus nivells durant el cicle cel·lular i en resposta a senyals extracel·lulars. Per altres sí que es sap. Així, trobem exemples com la proteïna F-box Skp2 que varia els seus nivells d'una manera dependent del cicle cel·lular (amb nivells baixos durant la fase G1/G0 que pugen durant la fase S i tornen a disminuir després) i que sembla que seria ubiquitinada pel complex ubiquitina lligasa APC^{CDH1} durant la fase G1, que és quan aquest complex és actiu, per després ser degradada pel proteasoma (Wei, Wenyi, et al., 2004). A més, també trobem exemples d'altres F-box, com Grr1p i Cdc4p (F-box de llevats), intrínsecament inestables i que són degradades a través del complex del proteasoma 26S per un mecanisme d'auto-ubiquitinització del seu propi complex SCF i independent de la presència d'altres F-box i d'activitat Cdk. És a dir, aquesta degradació, a diferència del que ocorre amb la majoria de substrats dianes que són degradats pel complex SCF, no implica la fosforilació de Grr1p i Cdc4p (Galan, JM., and Matthias, P., 1999). Els autors d'aquesta publicació suggereixen que una vida mitja curta per part d'aquestes proteïnes pot ser important per permetre un canvi ràpid entre els múltiples complexos SCF que existeixen durant el cicle cel·lular i com a resposta a alteracions

en l'entorn. Tots aquests resultats suggereixen que la regulació dels complexos SCF afecta principalment a la proteïna F-box.

En els nostres resultats hem demostrat, mitjançant la utilització d'inhibidors de la síntesi proteica, com cicloheximida, que la F-box28 també és una proteïna inestable amb una vida mitja curta d'aproximadament 4-5 hores. A més, a l'utilitzar un inhibidor del proteasoma com MG132, hem observat que la F-box28 també és una proteïna que podria estar regulant els seus nivells d'expressió a través de la via del proteasoma, ja que quan afegim l'MG132 en cèl·lules en estat basal o en cèl·lules que sobreexpressen la construcció F-box28-flag veiem un augment de la quantitat de proteïna. Per altra banda, però, quan vam mirar en un gel SDS si la inhibició de la degradació de proteïnes a través del proteasoma implicava l'aparició de formes migratòries per sobre de la F-box28 (modificacions característiques de proteïnes ubiquitinades) només vam ser capaços de detectar clarament una forma separada per aproximadament 10 kDa, que podria correspondre a la forma monoubiquitinada, encara que no podem descartar la presència d'altres bandes específiques de més alt pes molecular però que serien més minoritàries.

El complex del proteasoma 26S està implicat en vies de proteòlisi dependent d'ubiquitina, però també en una segona via independent de la unió d'aquesta molècula. En aquesta segona via trobem degradació de proteïnes pel proteasoma 26S en presència d'ATP o degradació de proteïnes directament pel proteasoma lliure 20S. Aquesta via de degradació es caracteritza pel fet que la molècula de ubiquitina és reemplaçada per una altra proteïna o per una senyal de degradació. Entre les proteïnes degradades per aquesta via trobem c-Jun, calmodulina, p21^{Cip1} i p53 entre d'altres (Orlowski, M., and Wilk, S., 2003). Per tant, encara que a la bibliografia no hem trobat cap exemple fins ara que descriu una proteïna F-box degradada a través d'aquesta

via, degut als nostres resultats no podem descartar que la F-box28 sigui degradada per una via independent de la unió de ubiquitina. I llavors, què implicaria que la F-box28 sigui monoubiquitinada? Està clar que diferents tipus de conjugacions de ubiquitina es relacionen amb diferents processos cel·lulars. La monoubiquitinació, per exemple, es relaciona amb processos d'endocitosi, reparació de DNA, regulació transcripcional i canvi de localització subcel·lular entre d'altres (Haglund, K., et al., 2003). Així, podria ser que la F-box28 fos monoubiquitinada i aquesta unió d'una sola molècula d'Ub li conferís una funció o localització específica, o que realment fos poliubiquitinada, la qual cosa implicaria degradació a través de la via del proteasoma dependent de ubiquitina.

Localització subcel·lular de la F-box28

Per tal d'obtenir una primera idea de la funció de la F-box28, vam voler veure la seva localització subcel·lular. La localització subcel·lular de les F-box pot ser molt variada. Degut a que la localització del proteasoma no és exclusiva de citoplasma, també trobem F-box a nucli i implicades en vies de ubiquitinació i degradació.

Els proteasomes estan localitzats tant a nucli com a citoplasma de cèl·lules eucariòtiques. Aquests tenen múltiples senyals de localització nuclear (seqüències NLS) que faciliten canvis en la seva localització cel·lular i en la regulació espacial i temporal de la proteòlisi (Wolfgang B., et al., 1998).

Aquest sistema pot proporcionar nivells addicionals de regulació de la proteòlisi intracel·lular via la degradació de substrats específics així com via la compartimentació de les activitats específiques dels seus components. La degradació selectiva de diferents proteïnes

nuclears és necessària per la progressió del cicle cel·lular i la regulació transcripcional. Fins no fa gaire, es creia que l'exportació de les proteïnes a citoplasma era un procés necessari per tal que es donés la seva proteòlisi. En la bibliografia, però, comencem ja a trobar treballs que recolzen la idea d'un sistema proteasoma/ubiquitina funcional a nucli. Així, *Floyd et al.*, van demostrar que la proteïna MyoD era degradada a nucli d'una manera independent d'exportació nuclear (Floyd, ZE., et al., 2001). Per altra banda, també cal considerar el fet que encara que molts components del complex SCF estiguin presents tant a nucli com a citoplasma, moltes proteïnes F-box tenen una localització específica a nucli, com és el cas de les F-box Skp2, β -TrCp, Cdc4 o Fbxo25. Això suggereix que la localització cel·lular d'aquestes F-box podria ser responsable, en part, de la compartimentació subcel·lular de la degradació de proteïnes específiques per complexes SCF. Així, altres autors com *Blondel M., et al.*, van demostrar que el complex de llevat SCF^{Cdc4} es trobava a nucli gràcies a una seqüència NLS i que era el responsable de la ubiquitinització i degradació de l'inhibidor de Cdks Far1 en el nucli (Blondel, M., et al., 2000).

En el nostre treball hem demostrat que la F-box28 presenta dos dominis. Un domini F-box, conservat dins de la família de proteïnes F-box i necessari per la formació del complex SCF i un domini de localització nuclear (NLS) en l'extrem C-terminal. Les construccions generades al laboratori, F-box28-flag i F-box28-GFP ens van permetre determinar la seva localització dins la cèl·lula mitjançant immunofluorescència. Així, els resultats presentats en aquesta tesi van revelar que la F-box28 presenta una localització clarament nuclear, segurament gràcies a la seqüència NLS, ja que la construcció F-box28(Δ NLS)-GFP, on li havíem delectonat aquesta seqüència, mostra una redistribució entre nucli i citoplasma. A més, un altre fet interessant és remarcar la relació existent entre la localització nuclear de la F-box28 i la seva estabilitat. Quan vam mirar la vida mitja de la construcció F-box28(Δ NLS)-GFP tractant les cèl·lules

transfectades amb cicloheximida vam veure que la seva estabilitat era molt més gran que la de la construcció normal. Això suggereix dues hipòtesis: la primera consisteix en el fet que la localització nuclear de la F-box28 podria ésser necessària per la seva degradació i per tant, que segurament el reciclatge d'aquesta proteïna tindria lloc a través del sistema del proteasoma nuclear; la segona hipòtesi s'explicaria pel fet que la seqüència NLS d'aquesta proteïna conté un nombre elevat de lisines, que són els aminoàcids on s'uneixen les molècules de ubiquitina. Al delectonar aquesta seqüència de la proteïna aquesta no podria ésser ubiquitinada i per tant disminuiria la seva degradació a través del complex del proteasoma. Tenint en compte que els resultats obtinguts fins ara no ens han permès detectar clarament la forma poliubiquitinada de la F-box28, de moment ens decantaríem per la primera hipòtesi en espera que futurs experiments ens puguin aclarir millor aquest punt.

F-box28 i implicació en la regulació del cicle cel·lular

Les proteïnes F-box presenten un patró de regulació a diferents nivells i molt variat, com per exemple, síntesi, degradació i associació amb components del complex SCF (Kipreos, ET., et al., 2000). Així, en els nostres resultats hem pogut demostrar que la F-box28 presenta una regulació a nivell de degradació a través del sistema del proteasoma. Un altre mecanisme de regulació que presenta aquesta proteïna i que hem observat és a nivell d'inducció de la seva expressió per senyals extracel·lulars, com el factor antiproliferatiu TGF- β 1. Els nostres resultats demostren que a nivell transcripcional, TGF- β 1 induïx l'expressió del mRNA de la F-box28 cap a les 8 hores, mentre que a nivell de proteïna es veu una inducció més tardana, amb una aparició cap a les 24 hores. Per una altre costat, factors de creixement com EGF o PDGF no afecten l'expressió de la F-box28 al llarg del temps, o fins i tot la disminueixen (en el cas de

PDGF). Així, senyals pro-proliferatives no afecten o disminueixen l'expressió d'F-box28, mentre que TGF- β 1, factor antiproliferatiu, l'estimula.

La proteòlisi dirigida per ubiquitina pot jugar importants papers en molts processos cel·lulars bàsics. Entre aquests destaquen la regulació del cicle i la divisió cel·lular, la diferenciació i desenvolupament, morfogènesi de rets neuronals, modulació de receptors de membrana, regulació transcripcional, ritmes circadians, etc. La llista de proteïnes cel·lulars que són dirigides cap aquesta via de la ubiquitina/proteasoma ha crescut ràpidament en els últims anys. Entre aquestes trobem reguladors del cicle cel·lular com ciclines, inhibidors de Cdks, supressors tumorals i activadors i inhibidors transcripcionals (Glickmann, MH., et al., 2002). A la biografia, doncs, podem trobar gran quantitat d'F-box descrites i caracteritzades amb funcions i localitzacions molt variades. Centrant-nos en els exemples d'F-box nuclears citats anteriorment, trobem que Skp2, una de les proteïnes F-box més ben caracteritzades fins el moment, és una F-box implicada en la regulació del cicle cel·lular. És responsable, entre d'altres funcions, de la degradació i ubiquitinització de p21 i p27 durant el pas de la fase G1 a S (Lyuben, M., et al., 1999). Un altre exemple el trobem en la F-box β -TrCp, proteïna també nuclear i implicada en la degradació de la fosfatasa Cdc25a fosforilada durant el pas de la fase S a G2 (Jin, J., et al., 2003). Aquesta F-box, com moltes altres, s'ha descrit que participa en més vies de senyalització. Així, s'ha vist que també està implicada en la ubiquitinització i degradació de l'inhibidor de NF- κ B, afavorint l'activació de la transcripció per aquest factor (Spiegelman, VS., et al., 2000). Remarcar que aquesta via juga un paper important en l'activació de funcions de supervivència/apoptosi de la quinasa PKB/Akt (Ozes, ON., et al., 1999). Una altra F-box nuclear descrita recentment, Fbxo25, s'ha demostrat que presenta una expressió casi exclusivament neuronal en teixits embrionaris i s'hipotetitza la seva possible funció en sinapsi, connectivitat

entre regions del cervell i la seva implicació en malalties neurodegeneratives (Hagens, O., et al., 2005).

Tenint en compte doncs, aquests exemples anteriors vam intentar esbrinar la funció de l'E3 ubiquitina lligasa F-box28. Per això vam intentar generar clons estables que expressessin la proteïna de forma constitutiva, però no ho vam aconseguir. Per això, com una primera hipòtesi vam pensar que podia estar participant en vies d'apoptosi. Els nostres resultats demostren que la sobreexpressió de la F-box28 en cèl·lules HeLa no causa apoptosi ni tampoc afecta la viabilitat de la cèl·lula.

Com a segona hipòtesi ens vam plantejar si la F-box28 podria estar afectant el cicle cel·lular, ja que un gran nombre de proteïnes F-box citades a la literatura participen en aquests processos. Així, quan analitzem si la sobreexpressió d'aquesta proteïna pot estar afectant el cicle cel·lular sí que podem evidenciar en dos tipus cel·lulars diferents (cèl·lules HeLa i cèl·lules C2C12), un increment de la fase G1 i una disminució de les fases S i G2, indicant que s'està produint una aturada parcial de les cèl·lules en fase G1. A més, en resultats molt preliminars hem vist que quan repetim aquest experiment però disminuint l'expressió d'F-box28 mitjançant transfecció amb siRNAs, veiem una tendència contrària, és a dir, una disminució de la fase G1 i un lleuger augment de les fases S i G2 (resultats no mostrats). Per altra banda, i aprofitant la construcció generada al laboratori a la qual li havíem deleccionat la seqüència NLS, F-box28(Δ NLS)-GFP, vam veure que la sobreexpressió d'aquesta proteïna ens genera un patró de distribució de les cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular molt similar a la de la situació control. Podem concloure doncs, que molt probablement és necessària la localització a nucli de la F-box28 per tal d'exercir la seva funció, que està relacionada molt probablement amb una

regulació de la fase G1/S del cicle cel·lular. Aquest fet té la seva lògica si recordem que TGF- β 1 és un factor antiproliferatiu que provoca, en la majoria de tipus cel·lulars, una aturada d'aquestes en la fase G1 tardana del cicle cel·lular a través de dues vies: activació d'inhibidors de Cdks com p15^{INK4B} i de p21^{Cip1} i repressió de l'expressió de c-Myc (Youl, K., and Bae, S., 2001). Per tant, F-box28 podria estar col·laborant en alguna d'aquestes dues vies o bé fer alguna altra acció que afavoreixi l'efecte antiproliferatiu de TGF- β 1.

Com hem dit abans, sabem que la F-box28 està implicada en regulació del cicle cel·lular, ja que quan la sobreexpressem veiem una aturada en la fase G1 i quan disminuïm la seva expressió observem un lleuger augment de les fases S/G2. En la bibliografia trobem altres exemples d'aquest tipus: la sobreexpressió de la proteïna F-box Skp2 s'ha vist que causa un augment de la fase S (segurament degut a la seva implicació en la degradació de p27) i la seva deplecció un augment del pic sub-G1 i una inhibició de la fase G1 que causa una disminució de la proliferació cel·lular (Jiang, F., et al., 2005); per altra banda, el proto-oncogen c-myc és un regulador clau durant el cicle cel·lular i s'ha vist que la seva sobreexpressió causa un augment de la fase S mentre que la transfecció amb els corresponents RNAs causen una aturada de les cèl·lules en la fase G1 (Qi, Yitao., et al., 2006); també s'ha vist que la sobreexpressió d'inhibidors de Cdks com p27 causa una aturada en fase G1, mentre que la disminució dels seus nivells promou una fase G1 més curta i un augment de la fase S (Sa, Gaurisankar., et al., 2005). Per tant, tots aquests resultats suggereixen que l'expressió de proteïnes relacionades amb la regulació del cicle cel·lular en moments que no són els que corresponen o amb nivells que no són els adequats ens produeixen alteracions en les diferents fases del cicle, ja que es pot promoure la degradació de proteïnes que haurien d'estar presents en aquell moment o bé promoure que proteïnes que no hi haurien de ser estiguin presents (com l'exemple d'Skp2). Així, ens vam plantejar possibles substrats de la F-

box28 que ens poguessin explicar la seva implicació en la regulació del cicle cel·lular. Els nostres resultats van demostrar una interacció proteïna-proteïna de la F-box28 amb la ciclina A2 i la ciclina D3, mentre que no ho feia amb la ciclina D1.

En la bibliografia trobem treballs que descriuen que Skp2 pot unir-se al complex ciclina A-Cdk2, el qual pot fosforilar a p27 per tal que sigui ubiquitinat per Skp2 i degradat a través del proteasoma (Zhu, XH., et al., 2004). A més, en un altre treball més recent, es demostra que Skp2 competeix amb p27 per la unió al complex ciclina A-Cdk2. La unió d'Skp2 a la ciclina A té un paper positiu en el cicle, ja que s'ha vist que el trencament d'aquesta unió, i no la ubiquitinació i degradació de p27, comprometen l'habilitat d'Skp2 de promoure l'entrada de les cèl·lules en fase S (Ji, Peng., et al., 2006).

Per altra banda, poc es coneix sobre la funció de la ciclina D3 comparat amb la ciclina D1 i D2. Es sap que presenta un patró d'expressió durant el cicle cel·lular diferent que la ciclina D1 ja que en cèl·lules HeLa, el mRNA de la ciclina D3 apareix en la fase G1 tardana i roman estable durant la fase S, mentre que la ciclina D1 presenta un pic abans de la transició G1/S i després desapareix (Motokura, T., et al., 1992). Això podria ser degut a que s'ha descrit que E2F1, factor estimulador de l'activació de la ciclina E i A, també és capaç d'induir la transcripció de la ciclina D3 (i no de la ciclina D2 o D1), participant d'aquesta manera en la transició de la fase G1 a la S (Ma, Y., et al., 2003). En un altre treball publicat recentment, s'ha implicat la Fbxo7 en la formació i estabilitat del complex ciclina D3-Cdk6. S'ha observat que la sobreexpressió de la Fbxo7 incrementa l'activitat i assemblatge d'aquest complex, suggerint un paper de proto-oncogen per la Fbxo7 (Laman, H., et al., 2006). Per altra banda, també es sap que la ciclina D3 és degradada per la via del proteasoma en cèl·lules que han estat estimulades pel factor TNF o que

han patit estrès osmòtic. Sembla que les proteïnes p38^{SAPK} estan relacionades amb la regulació dels nivells de ciclina D3, ja que s'ha demostrat que la seva fosforilació per aquesta proteïna, causa la seva degradació a través del sistema del proteasoma (Casanovas, O., et al., 2004).

Els nostres resultats suggereixen que la sobreexpressió de la F-box28 en cèl·lules HeLa no causa una disminució ni de la ciclina A2 ni de la ciclina D3. Per tant, encara que no sabem per quin mecanisme F-box28 podria estar regulant el cicle cel·lular podem plantejar algunes hipòtesis: 1) primer de tot és lògic pensar que la F-box28, com a E3 ubiquitina lligasa amb una funció segurament antiproliferativa, podria induir aquesta parada del cicle cel·lular mitjançant la degradació de ciclins que juguen un paper important en la transició de les fases G1/S o bé, a través de la seva relocalització a citoplasma. Encara que els nostres resultats semblen contraris a aquesta hipòtesi no podem descartar que la F-box28 requereixi de senyals extracel·lulars antiproliferatives, com TGF- β 1, per realitzar la seva funció; 2) una altra hipòtesi és que la F-box28 no estigui afectant directament l'expressió de les ciclins i que estigui inhibint directament els complexos ciclina-Cdk, afectant la seva formació o bé afavorint la unió de diferents inhibidors de Cdk al complex; 3) finalment tampoc podem descartar una via indirecte, independent de la interacció amb les ciclins A2 i D3, en la que F-box28 afecti altres proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular.

Podem concloure doncs, que encara que no coneixem els mecanismes d'actuació de la F-box28, sí que podem dir que en el nostre model de cèl·lules HeLa i C2C12, F-box28 és una proteïna que respon a senyals antiproliferatives, com TGF- β 1, i que la seva sobreexpressió causa una aturada del cicle cel·lular. Així, podem suggerir que segurament la interacció amb les ciclins A2 i D3 ha de tenir un paper negatiu sobre la regulació del cicle cel·lular. Esperem que futurs

experiments ens ajudin a trobar el mecanisme per el qual F-box28 podria estar duent a terme la seva funció.

CONCLUSIONS

1. La proteïna identificada per PCR-substractiva com a F-box28 és una nova proteïna que pertany al complex E3 lligasa del complex ubiquitina lligasa SCF, ja que hem vist que interacciona amb les proteïnes Cul1 i Skp1 del complex.
2. F-box28 presenta una expressió baixa en estat basal i la seva expressió és induïda pel factor TGF- β 1, a nivell d'mRNA i proteïna, en cèl·lules endotelials 1G11 i en cèl·lules HeLa.
3. F-box28 és una proteïna de localització nuclear gràcies a una seqüència NLS en el seu extrem C-terminal.
4. F-box28 és una proteïna inestable de 4-5 hores de vida mitja que és regulada a través del proteasoma.
5. La sobreexpressió d'F-box28 en cèl·lules HeLa causa una aturada parcial en la fase G1 del cicle cel·lular, efecte que podria ser mediat per la seva interacció amb les ciclines A2 i D3.

MATERIAL I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS, TRANSFECCIONS I ASSAJOS *IN*

VIVO:

1.1. LÍNIES CEL·LULARS

CÈL·LULES 1G11 (Línia de cèl·lules endotelials de capil·lars de pulmó de ratolí):

Es cultiven en medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 20% FCS suplementat amb 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml sulfat d'estreptomicina, 2 mM piruvat sòdic, 1% d'aminoàcids no essencials, 100 µg/ml d'heparina i 150 µg/ml d'ECGS (*endotelial cell growth supplement*), a 37°C i amb un 5% de CO₂.

CÈL·LULES 293 (Línia de cèl·lules embriòniques humanes de ronyó):

Es cultiven en medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 10% FCS suplementat amb 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml sulfat d'estreptomicina i 2 mM piruvat sòdic, a 37°C i amb un 5% de CO₂.

CÈL·LULES HeLa (Línia de cèl·lules humanes d'adenocarcinoma de cèrvix):

Es sembren en medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 10% FCS amb 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml sulfat d'estreptomicina i 2 mM piruvat sòdic, a 37°C i amb un 5% de CO₂.

CÈL·LULES C2C12 (Línia de cèl·lules mioblàstiques de ratolí):

Es sembren en medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 10% FCS amb 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml sulfat d'estreptomicina i 2 mM piruvat sòdic, a 37°C i amb un 5% de CO₂.

Les quatre línies cel·lulars es sub-cultiven de la mateixa manera:

- Es renten les cèl·lules en PBS 1X dos cops.
- Es tripsinitzen durant 5 minuts a 37°C.
- S'afegeix dos cops el volum de tripsina amb medi per inactivar la tripsina.
- Es centrifuguen a 1500 rpm 5 minuts a temperatura ambient.
- Es ressuspèn el pellet de cèl·lules en medi complet.

Els sub-cultius els fem en dilucions 1/6-1/10 en plaques de 10 cm.

En el cas de les cèl·lules 1G11 seran plaques gelatinitzades a l'1% (La gelatina la preparem a l'1% en PBS 1X i la deixem a les plaques durant mínim 15 minuts a 37°C).

1.2. TRANSFECCIONS

Aquesta tècnica es basa en acomplexar una quantitat de DNA amb compostos lipídics capaços d'atravesar la bicapa lipídica de les cèl·lules. La confluència de les cèl·lules dependrà del tipus de transfecció, i la quantitat de DNA del nombre de cèl·lules i tamany de la placa.

i. Fugene6 Transfection Reagent (Roche)

Per pous *multiwell* de 12:

- Es sembren les cèl·lules a una densitat cel·lular entre 50-80% de confluència.
- La relació Fugene6:DNA que s'utilitza està entre 3:2, 3:1, i 6:1.
- En un tub estèril, afegir 100 µl de medi sense sèrum. Diluir el reactiu Fugene6 directament en aquest medi. Mesclar suaument.
- Afegir 0,5-1 µg de DNA en aquest medi. Mesclar suaument.

- Incubar mínim 15 minuts a temperatura ambient i afegir sobre les cèl·lules que volem transfectar.

ii. **PEI**

Per pous *multiwell* de 12:

- Es mesclen 10 µl de PEI (20% volum de mescla) amb 40 µl de NaCl 150 mM (filtrat prèviament).
- Per una altra banda mesquem 1 µg de DNA amb 50 µl de NaCl 150 mM.
- Vòrtex lleuger i afegim la mescla de PEI sobre el DNA.
- Vòrtex lleuger.
- Mantenim 20 minuts a temperatura ambient i afegim sobre les cèl·lules que volem transfectar.

iii. **Lipofectamine 2000 (Invitrogen)**

Per pous *multiwell* de 12:

- Es sembren les cèl·lules a una densitat cel·lular entre 90-95% de confluència, en medi Opti-MEM sense antibiòtic (mínim 2 hores prèvies a la transfecció).
- Diluir 1,6 µg de DNA en 100 µl de medi Opti-MEM sense sèrum. Mesclar suaument.
- Diluir 4 µl del reactiu Lipofectamine 2000 en 100 µl de medi Opti-MEM sense sèrum. Mesclar suaument i deixar incubant 5 minuts a temperatura ambient.
- Afegir el reactiu Lipofectamine 2000 sobre el DNA diluït. Mesclar suaument.
- Incubar mínim 20 minuts a temperatura ambient i afegir sobre les cèl·lules que volem transfectar.
 - Segons el tipus cel·lular (com cèl·lules HUVEC i HeLa) el medi de transfecció es canviarà pel medi complet amb sèrum corresponent després de 4-6 hores.

1.3. OBTENCIÓ DE CLONS INDUÏBLES: SISTEMA TET/OFF

El sistema d'expressió de tetraciclina (Tc) es basa en l'expressió estable i constitutiva d'un transactivador regulat per la tetraciclina (tTa), la qual cosa ens conduirà a l'expressió del gen d'interès (en el nostre cas, el del gen de la Fbox28) insertat *downstream* d'un promotor que respon a tTa. En el nostre cas, aquesta expressió és funcionalment inversa a la concentració de tetraciclina (*Tc-off system*).

- Els clons induïbles de la Fbox28 els vam fer en cèl·lules HeLa.
- Es sembren cèl·lules HeLa en plaques de 10 cm i es cotransfecten amb PEI amb un vector que expressa la resistència a puromicina (pTpuro) sota el control del promotor que respon a tTa (tetO-CMV) i amb el vector pUHD15-1 (que codifica per tTa sota el control d'un promotor CMV).
- Dos dies després de la transfecció s'afegeix puromicina (1 µg/ml i 2,5 µg/ml) al medi.
- Després de dues setmanes, piquem els clons resistents a puromicina per duplicat en un *multiwell* de 24.
- En els dos pouets hi afegim puromicina i només en un Tc 100 ng/ml. Es seleccionen els clons que creixen en medi sense Tc i que moren en la seva presència.
- Aquesta línia tTa estable, es transfecta amb un vector pTISN (Chambard, J., and Pognonec. P., 1998) , a on hem insertat el gen que codifica per la Fbox28 sota el control d'un promotor sensible a Tc, i que expressa resistència a neomicina.
- 48 hores després de la transfecció afegim 400 µg/ml de neomicina i 100 ng/ml de Tc i ho deixem fins que veiem aparèixer clons resistents (a l'afegir la Tc mantenim l'expressió de la Fbox28 silenciada).
- Piquem els clons resistents a neomicina i Tc per duplicat en un *multiwell* de 24.

- En un pouet afegim Tc i en l'altre no.
- Per veure que al treure la Tc s'indueix l'expressió de la Fbox28 ho fem mitjançant *western blot*.
- Congelem en nitrogen líquid els clons seleccionats.

1.4. ASSAIG D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

- a) Per immunofluorescència de cèl·lules HeLa sobre cubreobjectes, aquestes són transfectades en plaques que contenen cubreobjectes amb gelatina a l'1%. La gelatina es deixa una hora a 37°C. Després es fa un rentat amb PBS 1X i es sembren les cèl·lules a sobre.
- b) L'assaig es realitzarà a les fosques en una caixa de Petri forrada amb paper d'alumini.
- Rentar els pouets dos cops amb PBS 1X.
 - Afegir 1 ml de paraformaldehid 3% i deixar-ho a temperatura ambient 30 minuts.
 - Rentar 3 cops amb PBS 1X.
 - Afegir 1 ml de tritó-PBS 1X al 0,2% i deixar-ho a temperatura ambient 5 minuts.
 - Rentar 3 cops amb PBS 1X.
 - Afegir 1 ml de PBS 1X-BSA 2%, 30 minuts a temperatura ambient.
 - Diluir l'anticòs primari a la dilució corresponent. Incubar 1 hora a temperatura ambient.
 - Rentar 3 cops amb PBS 1X i dos cops més deixant-ho en agitació 5 minuts.
 - Diluir l'anticòs secundari 1:200. Incubar 1 hora a temperatura ambient.
 - Rentar 3 cops amb PBS 1X i dos cops més deixant-ho en agitació 5 minuts.
 - Retirar l'excés de líquid i muntar amb moviol sobre un porta. Secar.

- i. PBS 10X: 80 g NaCl
2 g KCl,
26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2,4 g KH_2PO_4 , pH 7,4 (per 1 litre aigua).
- ii. Paraformaldehid 16%: 16 g paraformaldehid en 80 ml d'aigua (en agitació anar afegint NaOH 5N fins que sigui transparent). Guardar a -20°C .
- iii. PBS 1X-BSA 2%: 2 g d'albumina en PBS 1X (en 100 ml de PBS 1X). Filtrar i congelar a -20°C .

1.5. CITOMETRIA DE FLUX

a) Anàlisi del cicle cel·lular

En aquest assaig vam voler mirar si la sobreexpressió de la proteïna Fbox-GFP podia estar causant algun efecte sobre el cicle cel·lular de cèl·lules HeLa asincròniques.

- Vam analitzar cèl·lules sense transfectar, així com cèl·lules transfectades amb vector buit (pCDNA3), GFP, Fbox28-GFP i la construcció Fbox28(Δ NLS)-GFP.
- 24 hores després de transfectar, es recull el medi d'incubació. Rentar dos cops amb PBS 1X i tripsinitzar. Ajuntar les cèl·lules tripsinitzades amb les cèl·lules flotants presents en el medi d'incubació.
- Centrifugar 1 ml d'una suspensió cel·lular a $1-2 \times 10^6$ cèl·lules/ml 5 minuts a 1.500 rpm.
- Rentar dues vegades amb 1% FCS en PBS 1X i centrifugar 1 minut a 1.500 rpm.
- S'afegeix paraformaldehid a l'1%. Deixar a 4°C en agitació 30 minuts.
- Es fa un rentat amb 1% FCS en PBS 1X a 2.000 rpm i a 4°C .

- Ressuspendre molt bé les cèl·lules en 0,5 ml d' 1% FCS en PBS 1X. Sobre 5 ml d'etanol al 70% fred (-20°C) s'afegeix gota a gota la suspensió de cèl·lules en PBS 1X ben disgregades.
- Fixar a -20°C (temps mínim 2 hores, pot estar fins a 3 setmanes).
- Centrifugar 5 minuts a 2.100 rpm i eliminar l'etanol.
- Rentar una vegada amb 1% FCS en PBS 1X, centrifugar i descartar la fase aquosa.
- Ressuspendre en 400 µl d'1% FCS en PBS 1X i afegir 25 µl de iodur de propidi (*stock* 1 mg/ml).
- Afegir 5 µl d'RNAsa A lliure de DNAsa (10 mg/ml) i incubar 30-45 minuts a 37°C i a les fosques.
- Analitzar per citometria de flux.

b) Anàlisi d'apoptosi / viabilitat cel·lular:

- Vam analitzar cèl·lules HeLa transfectades amb GFP, Fbox28-GFP i la construcció Fbox28(Δ NLS)-GFP.
- 24 hores després de transfectar, es recull el medi d'incubació. Rentar dos cops amb PBS 1X i tripsinitzar. Ajuntar les cèl·lules tripsinitzades amb les cèl·lules flotants presents en el medi d'incubació.
- Centrifugar 1 ml d'una suspensió cel·lular de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules/ml 10 minuts a 480xg.
- Rentar una vegada amb PBS 1X i centrifugar 5 minuts a 480xg.
- Ressuspendre les cèl·lules en 400 µl de tampó d'unió i incubar amb 1 µl d'anexina V-FITC (concentració final 1 µg/ml).
- Analitzar per citometria de flux.

Tampó d'unió: 10 mM HEPES, pH 7,4

2,5 mM CaCl₂

140 mM NaCl

➤ Per mesurar la viabilitat cel·lular, el protocol és el mateix però enlloc d'afegir anexina V-FITC, vam afegir 25 µl de iodur de propidi (*stock* 1 mg/ml).

2. CULTIUS PROCARIOTES

2.1. PLAQUES D'AGAR I MEDIS LÍQUIDS

1. El medi líquid LB es prepara amb (per 500 mL): 5 g *Bacto-tryptone*.

2,5 g extracte de llevat.

5 g NaCl.

Fins a 500 mL amb aigua i s'autoclava.

2. Les plaques d'agar es preparen amb els mateixos compostos afegint a més, 7,5 g d'agar.

Després s'autoclava, es deixa refredar i s'afegeixen els antibiòtics: Ampicil·lina (50 µg/ml) o Kanamicina (30 µg/ml). S'afegeixen uns 13 mL per placa i es deixen solidificar.

2.2. BACTÈRIES COMPETENTS:

1. **Termo-competents**: (a partir d'*stocks* congelats de JM 110)

- Picar l'*stock* congelat de bactèries i fer-lo créixer en un cultiu de 15 mL d'LB durant tota la nit a 37°C.

- Com que les bactèries entren en fase exponencial agafem 1 mL d'aquest cultiu i el fem créixer en 50 mL d'LB en agitació a 37°C.
- Mesurar la DO a 600 nm fins que sigui de 0,3-0,5.
- Mantenir les bactèries 30 minuts en gel.
- Centrifugar 15 minuts a 2.500 rpm a 4°C.
- Ressuspendre el pellet amb clorur càlcic 0,1 M fred.
 1. en 500 µl.
 2. Fins 1 mL.
 3. Fins 25 mL.
- Mantenir 30 minuts en gel.
- Centrifugar 15 minuts a 2.500 rpm a 4°C.
- Ressuspendre en clorur càlcic 0,1 M fred.
 1. en 1 mL.
 2. Fins a 5 mL.
- Congelar amb DMSO. Per 4 mL de bactèries afegir 140 µl de DMSO.
- Deixar 15 minuts en gel.
- Afegir 140 µl de DMSO i fer alíquotes de 100 µl. Congelar a -80°C.
 - El clorur càlcic que s'utilitza és la forma 6 vegades hidratada (encara que també es pot utilitzar la 2 vegades). Es ressuspén en aigua i es filtra.

2. **Electro-competents** (a partir d'*stocks* congelats de DH5 α)

- Picar l'*stock* congelat de bactèries i fer-lo créixer en un cultiu de 10 mL d'LB durant tota la nit a 37°C.
- Afegir 2,5 mL d'aquest cultiu en 250 mL d'LB i fer-lo créixer en agitació a 37°C.
- Mesurar la DO a 600 nm fins que sigui de 0,6-0,8.
- Mantenir les bactèries en gel 40 minuts.
- Centrifugar 20 minuts a 2.500 rpm a 4°C.
- Ressuspendre en 31,25 mL (dilució 1:8) d'aigua miliQ autoclavada.
- Centrifugar 20 minuts a 2.500 rpm a 4°C.
- Ressuspendre en 6,25 mL (dilució 1:40) d'aigua miliQ autoclavada amb 10% glicerol.
- Centrifugar 20 minuts a 3.000 rpm a 4°C.
- Ressuspendre en 6,25 mL d'aigua miliQ autoclavada amb 10% glicerol.
- Agafar una alíquota de 25 μ l en un volum final d'1 mL (aigua miliQ amb 10% glicerol) i mesurar la DO a 600 nm ($1 \approx 2,5 \times 10^8$ cèl·lules/mL)

$$DO_{600nm} \times \text{dilució} \times 2,5 \times 10^8 \text{ cèl·lules/mL} = X \text{ cèl·lules/mL}$$

$$\text{Total cèl·lules} = X \text{ cèl·lules/mL} \times 6,25 \text{ mL.}$$

- Centrifugar 20 minuts a 3.000 rpm a 4°C.
- Ressuspendre el pellet en un volum adequat d'aigua miliQ amb 10% glicerol per obtenir una concentració de $2,5 \times 10^{10}$ cèl·lules/mL.
- Fer alíquotes de 40 μ l.
- Congelar a -80°C

2.3. STOCKS DE GLICEROL:

- Creixem cèl·lules en medi LB líquid i antibiòtic durant la nit a 37°C en agitació. Aquesta suspensió es congela a -80°C amb glicerol al 15%.

3. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR:

3.1. EXTRACCIÓ DE DNA PLASMÍDIC

i. PREPARACIÓ DE MINIPREPS

Les minipreps es preparen a partir d'*stocks* de glicerol congelats o directament de la placa. En ambdós casos picarem amb una punta groga, o bé l'*stock* congelat o bé la colònia de la placa d'agar. Deixarem caure la punta en un medi líquid LB amb l'antibiòtic adequat i ho incubarem a 37°C en agitació tota la nit.

- Centrifugar 3 minuts a 13.000 rpm.
- Afegir 150 µl de tampó TE 1X (tris-EDTA) al pellet de bacteries i ressuspendre.
- Afegir 150 µl de tampó de lisi. Moure per inversió fins que quedi transparent.
- Afegir 150 µl d'acetat sòdic 3 M pH 5,2 i moure per inversió.
- Centrifugar 5 minuts a 13.000 rpm.
- Transferir el sobrenedant (on es troba el DNA plasmídic) a un *ependorf* nou. Afegir 450 µl d'isopropanol. Vòrtex.
- Centrifugar 10 minuts a 13.000 rpm.
- Rentar el pellet de DNA amb 750 µl d'etanol 70%.
- Centrifugar 3 minuts a 13.000 rpm.
- Eliminar el sobrenedant i deixar assecar el pellet uns 5 minuts.

- Ressuspendre en 50 µl d'aigua estèril i afegir RNAsa 80 µg/ml (concentració final).
- Guardar a -20°C.

TE 10X: 10 ml 1 M Tris pH 8,0
2 ml 0,5 M Na₂EDTA
(per 1 litre)

Tampó de lisi: NaOH 0,2 M
SDS 1%

ii. PREPARACIÓ DE MAXIPREPS:

Les maxipreps les preparem a partir del Kit de *QIAGEN Plasmid Purification (Cat. No. 12263)*, on es troben tots els reactius i material necessaris. El protocol que utilitzem és el de *Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kits*.

- Piquem una colònia d'un *stock* de glicerol congelat o d'una placa d'agar i la fem créixer unes 2-3 hores en 5 mL de medi LB amb l'antibiòtic corresponent a 37°C.
- Afegim aquest cultiu *starter* a 250 mL d'LB amb l'antibiòtic corresponent. Ho incubem en agitació tota la nit a 37°C.
- Centrifugar el cultiu a 6.000 rpm 15 minuts a 4°C.
- Ressuspendre el pellet en 10 mL del *buffer* P1.
- Afegir 10 mL del *buffer* P2, invertir 4-6 cops per barrejar-ho i incubar-ho a temperatura ambient durant 5 minuts.
- Afegir 10 mL del *buffer* P3 al lisat i barrejar immediatament invertint de 4-6 cops.
- Abocar el lisat en una columna de *QIAfilter*. Incubar a temperatura ambient durant 10 minuts.
- Equilibrar una columna de *QIAGEN-tip 500* afegint *buffer* QBT.

- Inserir la xeringa a la columna de *QIAfilter* i filtrar el lisat a la columna equilibrada prèviament.
- Rentar la columna *QIAGEN-tip 500* afegint 2x30 mL de *buffer QC*.
- Eluir el DNA amb 15 mL de *buffer QF*.
- Precipitar el DNA afegint 10,5 mL d'isopropanol. Vòrtex i centrifugar immediatament a 15.000 rpm durant 30 minuts a 4°C. Decantar el sobrenedant.
- Rentar el pellet de DNA amb etanol 70% i centrifugar a 15.000 rpm durant 10 minuts.
- Decantar el sobrenedant i deixar assecar el pellet 5-10 minuts.
- Ressuspendre el pellet en un volum adequat d'aigua miliQ.

3.2. QUANTIFICACIÓ DE DNA

La quantificació de DNA es fa a dues longituds d'ona: 260 nm (absorbància màxima dels àcids nucleics) i 280 nm (per proteïnes).

Relació $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}} > 1.7$

Una unitat de DO correspon a: 50 µg/ml de DNA de doble cadena.

40 µg/ml de DNA i RNA de cadena senzilla.

3.3. TÈCNiques DE CLONATGE: PCR, DIGESTIONS, LLIGACIÓ I TRANSFORMACIÓ

PCR:

El cDNA de la Fbox28 ens la van cedir del "Kazusa DNA Research Institute, Japan" clonat en un vector pBC SK(+/-). Vam dissenyar uns *oligonucleòtids sense* i *antisense* per tal d'amplificar per PCR la seqüència que volíem. En aquests *primers* hi vam introduir dues dianes d'enzims de restricció per facilitar la posterior clonació de la seqüència de la Fbox28 en altres vectors.

Eco RI

Sense 5' - AAA GCA GGG AAT TCA GAT GGC GGC GGC - 3'

Xba I

Antisense 5' - ACG TCG TCC TCT GGA TCT AGA GCC ATA - 3'

Reacció de PCR:

Mescla mare	
DNA motlle	1 µl
Primer sense	1 µl
Primer antisense	1 µl
Tampó 10X	5 µl
dNTPs 10 mM	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl
EcoTaq Polimerasa	1 µl
Aigua	37 µl
	50 µl

- Programa termociclador:

94°C	3 minuts	
{ 94°C	30 segons	} 25 cicles. Les temperatures variaran segons els primers que utilitzem.
{ 60°C	1,30 minuts	
{ 72°C	2 minuts	
72°C	10 minuts	
16°C	∞	

El producte de PCR el vam clonar en el vector d'expressió pCDNA3-flag, C3GFP i pTISN (expressió en eucariotes), i en vectors pGEX (per expressió en bacteries i posterior purificació).

i. En els vectors pCDNA3-flag i pTISN la clonació es va fer a partir de la seqüència que havíem obtingut mitjançant PCR amb els *primers* abans citats i que estava flanquejada per les dianes de restricció Eco RI i Xba I.

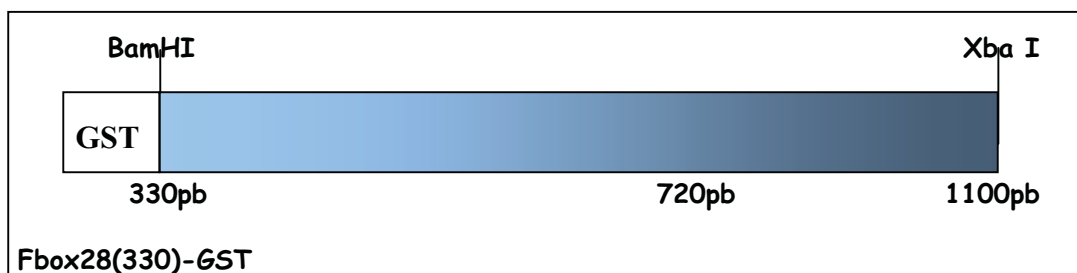
ii. En el cas del vector pGEX es van clonar diferents fragments de la proteïna:

a.



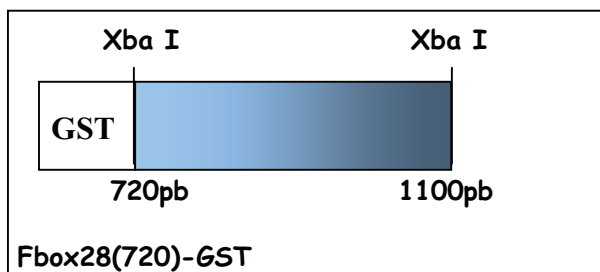
El fragment sencer de la proteïna Fbox28 de ≈1100pb, el vam subclonar en un vector Bluescript II mitjançant les dianes de restricció Eco RI a 5' i Xba I a 3'. D'aquí el vam clonar en un vector pGEX 4T.2 amb les dianes Eco RI i Not I.

b.



El fragment Fbox28(330)-GST el vam obtenir a partir de la seqüència original digerint amb dues dianes úniques BamHI (situada a ≈ 330 pb) i Xba I en l'extrem 3'. Aquest fragment de ≈ 770 pb el vam clonar en el vector pGEX 5X.3.

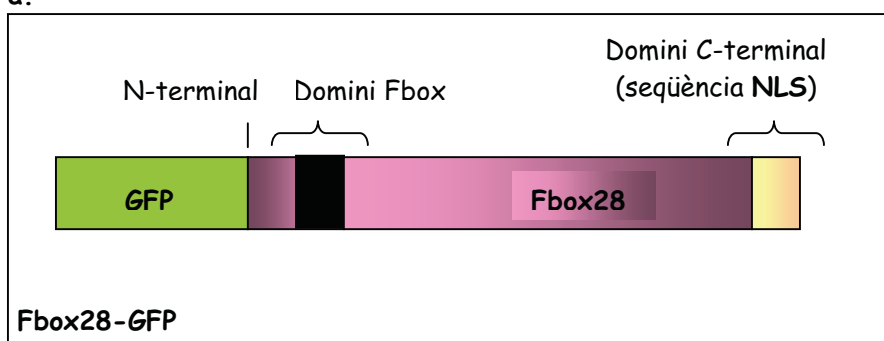
c.



El fragment Fbox28(720)-GST el vam obtenir a partir de la seqüència original digerint amb dues dianes úniques Eco RI (situada a ≈ 720 pb) i Xba I en l'extrem 3'. Aquest fragment de ≈ 380 pb el vam clonar en el vector pGEX 4T.1.

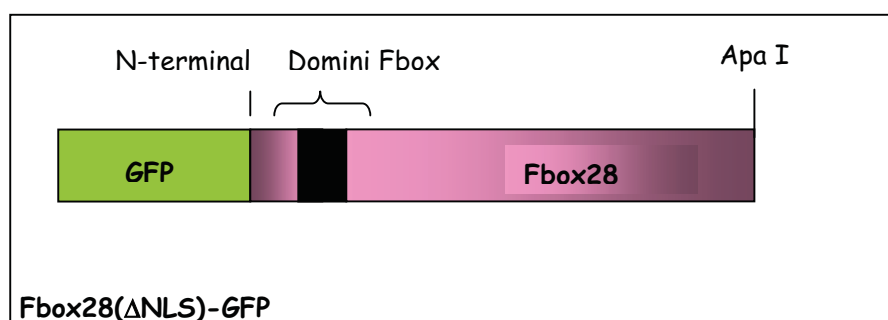
iii. Per la clonació en el vector C3GFP es va clonar la seqüència de la proteïna sencera i una altra construcció diferent on li havíem delectonat l'extrem C-terminal (≈ 200 nucleòtids).

a.



El fragment Fbox28-GFP el vam obtenir a partir de la subclonació Fbox28-Bluescript II. Vam digerir amb Eco RI i Xba I i ho vam clonar en el vector C3GFP. Així, vam obtenir la Fbox28 fusionada amb la proteïna GFP (*green fluorescent protein*).

b.



En l'extrem C-terminal de la proteïna vam trobar un domini de localització nuclear (NLS) i vam voler generar una construcció de la Fbox28 delectant aquest extrem i fusionada amb la proteïna GFP. Per això vam digerir la Fbox28 amb Eco RI i Xho I (delectant aproximadament 200 nucleòtids, dels quals realment 63 formaven part de la seqüència NLS) i ho vam subclonar en un vector Bluescript II. D'aquí, i digerint amb Eco RI a 5' i Apa I en 3' ho vam clonar en el vector C3GFP.

Digestió:

Es seleccionaran els enzims i tampons adequats segons es facin digestions amb un o varis enzims de restricció. Cal tenir en compte que el volum d'enzim que afegim no pot ser més gran del 10% del volum final de la reacció, ja que conté un 50% de glicerol.

- La reacció de digestió conté: aigua miliQ, DNA, tampó, enzim/s.
- Fer un petit *spin* a 13.000 rpm.
- Incubar a 37°C 1 hora (comprovar la temperatura adequada de cada enzim).
- Afegir *sample buffer* a concentració final 1X per cada reacció.
- Analitzar per electroforesi en un gel d'agarosa.

Sample buffer DNA 6X: 60% glicerol, 60 mM EDTA, blau de bromofenol.

Lligació:

- Digerim i ailem les bandes en gel d'agarosa corresponents a l'insert i el plàsmid (amb el kit de QIAgen *QIAquick gel extraction*).
- Quan la digestió es fa amb extrems cohesius, el plàsmid s'ha de tractar amb fosfatasa alcalina per tal que no relligui. El tractament de la fosfatasa el fem a 37°C 1 hora.
- Després fem una extracció fenol-cloroform per tal de canviar el *buffer* on està el plàsmid i poder fer la lligació en les mateixes condicions en que tenim l'insert.
 - S'afegeix 1v/v de fenol cloroform neutre.
 - Centrifuguem 5 minuts.
 - Agafem la fase aquosa on hi ha els àcids nucleics i afegim 1/10 d'acetat sòdic 3M pH 5,2. Fem un vòrtex.
 - Afegim 3 volums d'etanol 100% i centrifuguem 30 minuts.
 - Afegim 700 µl d'etanol 70%.
 - Deixem assecar el pellet i ressuspenem en un volum d'aigua estèril.
- La lligació la fem amb la T4 lligasa i posem una relació de plàsmid: insert 1:3.

- Ho posem en un bany a 16°C a la cambra freda durant tota la nit.
- Transformem la lligació en bacteries competents.

Transformació:

⇒ Per bacteries termo-competents transformarem 50 ng de DNA plasmídic. Aquesta transformació permet que les membranes de les bacteries formin uns porus quan les sotmetem a un *shock* tèrmic. Per aquests porus entrarà el DNA.

- Afegir a les alíquotes de bacteries competents la quantitat de DNA adequada.
- Mantenir en gel 5 minuts.
- *Shock* tèrmic d'1,5 minuts a 42°C.
- Mantenir en gel 2 minuts.
- Afegir 300 µl d'LB i incubar 45 minuts a 37°C perquè les bacteries es recuperin.
- Plaquejar en plaques d'agar amb l'antibiòtic corresponent, atemperades prèviament a 37°C.
- Incubar les plaques tota la nit a 37°C.

⇒ Per bacteries electro-competents transformarem uns 10 pg de DNA plasmídic . En aquest cas, els porus es formaran gràcies a un pols elèctric.

- Afegir a les alíquotes de bacteries competents la quantitat de DNA adequada (en gel).
- *Shock* elèctric de 0,07 milisegons i 1.470 volts.
- Afegir fins 1 mL d'LB calent i incubar 1 hora a 37°C perquè les bacteries es recuperin.
- Plaquejar en plaques d'agar amb l'antibiòtic corresponent (amb una dilució d'1:100 a 1:40 segons tamany del plàsmid), atemperades prèviament a 37°C.
- Incubar les plaques tota la nit a 37°C.

3.4. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

La concentració d'agarosa variarà segons el tamany del fragment que volem separar.

- Dissoldre l'agarosa (segons el % desitjat) en TBE 1X al microones.
- Afegir bromur d'etidi 0,5-1 µg/ml.
- Un cop el gel ha solidificat i hem afegit el DNA i els pesos moleculars, aplicar 100-110 volts i 400 miliampers.

TBE 5X: 0,45 M tris-base
0,45 M àcid bòric
10 mM EDTA pH 8.

3.5. SEQÜENCIACIÓ DE DNA:

La reacció de seqüenciació es realitzarà a partir del DNA motlle. La quantitat de DNA a seqüenciar dependrà del tipus d'àcid nucleic a partir del qual realitzarem la reacció.

DNA cadena senzilla	50-100 ng
DNA doble cadena	200-500 ng
DNA producte PCR	30-90 ng
Big Dye Reaction Mix	2 µl
Primer	3,2 pmol
Aigua miliQ	fins a 10 µl.

- **Programa termociclador:**

94°C	3 minuts	
{ 94°C	30 segons	} 25 cicles. Les temperatures variaran segons els primer que utilitzem.
50°C	5 segons	
60°C	4 minuts	
72°C	4 minuts	
16°C	∞	

- **Precipitació de la seqüència:**

- Afegir a la reacció de seqüència: 26 µl d'aigua miliQ
- 64 µl d'etanol 95%
- Vòrtex. Deixar reposar com a mínim 20 minuts (màxim 2 hores).
- Centrifugar 20 minuts a 14.000rpm.
- Descartar el sobrenedant i afegir 250 µl d'etanol 70%.
- Centrifugar 10 minuts a 14.000 rpm.
- Repetir el rentat.
- Eliminar qualsevol resta d'etanol i guardar a -20°C.
- Enviar a seqüenciar.

4. RNA

4.1. EXTRACCIÓ D'RNA:

- Treure el medi de les plaques d'on volem extreure el RNA.
- Afegir els mil·lilitres necessaris de tampó de lisi Ultraspec RNA (total RNA isolation Reagen, Biotecx) i deixar en agitació 10 minuts a temperatura ambient.
- *Scrapejar* plaques i deixar en gel 5 minuts.
- Vòrtex i afegir 200 µl de cloroform.
- Tornar a vortejar i mantenir 10 minuts en gel.
- Centrifugar a 10.000 rpm 15 minuts a 4°C.
- Pipetejar la fase aquosa (que conté el RNA) i afegir 600 µl d'isopropanol.
- Vortejar i precipitar a -20°C mínim 15 minuts.
- Centrifugar a 10.000 rpm 30 minuts a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i rentar amb 500 µl etanol 70%.
- Ressuspendre el pellet en aigua estèril.
- Mantenir la mostra guardada a -80°C o processar.

4.2. NORTHERN BLOT:

i. Electroforesi:

- En la preparació de les mostres carregarem uns 20 µg de RNA i afegirem el tampó de RNA per 5 vegades el volum de mostra que tinguem..

A més, cal preparar el bromur d'etidi amb el tampó de RNA:

per: 1 µl bromur etidi (stock 0,4 mg/ml) → 20 µl tampó de RNA 1X.

Deixar les mostres 10/15 minuts al bany a 65°C.

- Preparar el gel al 1,1%: 3,3 gr agarosa + 300 ml MOPS 1X.
- Bullir l'agarosa i deixar refredar al bany a 65°C.
- Afegir el formaldehid a l'agarosa i abocar en el suport del gel (2,7 ml per cada 50 ml d'agarosa).
- Córrer el gel a 100V.

Tampó MOPS 10X: 0,2 M MOPS
50 mM acetat sòdic
10 mM EDTA.

Tampó de càrrega RNA 6X: 6,6% glicerol
50% formamida
6% formaldehid
16% tampó MOPS 1X.

ii. **Transferència:**

- Muntar la transferència tenint en compte:
 - Posar un paper de filtre "pont" en contacte amb el SSC 10X.
 - Col·locar el gel de cap per avall.
 - Col·locar la membrana marcada en el primer carril i posar-la cap per a baix, per obtenir una màxima transferència.
 - Col·locar 3 papers "watman".

- Col·locar els papers de filtre i un pes a sobre.

iii. **Fixació:**

- Marcar amb dues marques a ambdues bandes els RNAs ribosòmics en el transiluminador.
- En un paper de filtre, col·locar la membrana i posar-la a una estufa de 80°C unes 2 hores.

iv. **Prehibridació:**

- Preparar la solució de prehibridació:
 - Bullir el DNA d'esperma de salmó 5 minuts a 95°C.
 - Posar-ho en gel de seguida.
 - Preparar la solució de prehibridació amb el següent ordre:
 - a. 5 ml formamida.
 - b. 2,5 ml SSPE 20X.
 - c. 1 ml Denhart's.
 - d. 0,25 ml SDS 20%.
 - e. 0,2 ml de DNA d'esperma de salmó.
 - f. 1,05 ml aigua estèril.
- Posar la membrana dins un tub d'hibridació.
- Hibridar a 42°C a una velocitat de 4 (rotor) unes 3 hores.

v. **Hibridació:**

- Ressuspendre la sonda: 41 µl TE + 4 µl sonda DNA.
- Bullir 5 minuts a 95°C per desnaturalitzar i posar-ho en gel.

- Per marcar la sonda, ressuspendre en el kit de *random primer* (Amersham Biosciences) la sonda prèviament bullida. Afegir 5 µl de nucleòtid radioactiu (α-dCTP) i posar-ho a 37°C 15/20 minuts.
- Bullir 5 minuts i deixar 5 minuts més en gel. Fer un petit *spin*.
- Mentre, afegir 2 ml de sulfat dextrà 50% en la solució de prehibridació.
- Afegir la sonda al tub d'hibridació sense tocar la membrana i incubar-ho a 42°C de 16 a 17 hores .

vi. **Rentats:**

- Fer dos rentats de: 2X SSC/0,1% SDS i 0,1X SSC/0,1% SDS.
- El primer rentat el fem a 50°C i uns 30 minuts.
- El segon rentat el fem a 50°C 45 minuts.

vii. **Visualització:**

- Col·locar la membrana en un *cassette phosphoimager* amb una pantalla i un film per revelar.

SSPE 20X: 175,3 g NaCl
27,6 g NaH₂PO₄ H₂O
7,4 g EDTA, pH 7,4 (per 1 litre).

SSC 20X: 175,3 g NaCl
88,22 g citrat sòdic, pH 7 (per 1 litre).

Denhardt's 50X: 5 g Ficol (Type 400, Pharmacia)
5 g polivinilpirrolidona
5 g albúmina de sèrum boví (per 500 ml).

DNA d'esperma de salmó: preparar un *stock* a 10 mg/ml en aigua. Sonicar i guardar congelat a -20°C.

Sulfat de dextrà: preparar *stock* al 50% dissolt en aigua.

5. PROTEÏNES:

5.1. LISI CEL·LULAR

- Rentem les cèl·lules dues vegades amb PBS 1X fred.
- Afegim el tampó de lisi i deixem en agitació a 4°C 10 minuts.
- *Scrapejem* el lisat cel·lular i centrifuguem a 13.000 rpm 10 minuts a 4°C.
- Guardem el sobrenedant a -20°C.

i. Tampons de lisi utilitzats

Tampó de lisi RIPA (en PBS pH 7,4): 1% NP40
0,5% deoxicolat sòdic
0,1% SDS.

Tampó de lisi tritó X-100 : 50 mM Tris-HCl pH 7,5
100 mM NaCl
5 mM EDTA
1% tritó X-100.

Tampó de lisi NP40 0,2%: NP40 0,2%
50 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
10% glicerol

ii. <u>Inhibidors de fosfatases</u>			
	Dissolvent	Concentració <i>stock</i>	Concentració utilitzem
Fluorur sòdic	Aigua	1 M	50 mM
Beta-glicerofosfat	Aigua	1 M	40 mM
Ortovanadat	Aigua, pH 10.	100 mM	200 µM.

iii. <u>Inhibidors de proteases</u>			
	Dissolvent	Concentració <i>stock</i>	Concentració utilitzem
Leupeptina	Aigua	5 mg/ml	1 µg/ml
Aprotinina	Hepes 0,01 M pH 8	2 mg/ml	4 µg/ml
Pepstatina	10% àcid acètic 90% etanol	1 mg/ml	1 µM
Benzamidina	Aigua	50 mg/ml	10 µg/ml
PMSF	Isopropanol	100 mM	1 µM

5.2. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

La quantificació de proteïnes la fem a partir del Kit "BCA Protein Assay kit (Pierce)".

- Es prepara una recta patró amb diferents concentracions de BSA (de 2 a 10 mg/ml de proteïna) per duplicat.
- S'afegeixen 5 µl de mostra en 15 µl d'aigua (també per duplicat).
- S'afegeixen 200 µl de reactiu A+B (50:1) en cada mostra i s'incuba a 37°C 30 minuts.
- Es llegeix en un lector de plaques a 540 nm.

5.3. WESTERN BLOTTING

- El gel de poliacrilamida (acrilamida i Bis-acrilamida) consta de dues fases: el *upper* (empaquetador) i el *lower* (resolutiu).

Gel Resolutiu						Gel Empaquetador	
	7%	8%	10%	12%	15%		
Acrilamida 40% (ml)	1,75	2	2,5	3	3,75	Acrilamida 40% (ml)	0,525
Tampó <i>lower</i> 4X (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	Tampó <i>upper</i> 4X (ml)	1,25
Aigua (ml)	5,75	5,5	5	4,5	3,75	Aigua (ml)	3,225
Temed (µl)	5	5	5	5	5	Temed (µl)	5
APS 10% (µl)	100	100	100	100	100	APS 10%	25

Tampó *lower* 4X: 1,5 M tris-HCl
0.4% SDS pH 8,8.

Tampó *upper* 4X: 0,5 M tris-HCl
0,4% SDS pH 6,8.

- En la preparació de les mostres carregarem uns 30 µg de proteïna i afegirem LSB 1X (d'un *stock* de LSB 4X). Bullir 5 minuts a 95°C.

LSB 4X (volum final 50 ml): 0,3 M SDS
0,25 M Tris pH 6,8
20 ml glicerol
10 mg bromofenol
6 ml 2-β-mercaptoetanol.

- Transferència a *nylon* (Millipore, Immobilon-P). Si la membrana és de *nylon* cal activar-la amb metanol 1 minut i rentar-la després amb aigua per hidratar-la.
- Transferir 1 hora en gel o a la cambra de 4°C a 400 miliampers i 100 volts.
- Bloquejar la membrana en llet al 5% diluït-la en tampó TBS durant 1 hora.
- Incubar amb l'anticòs primari: durant tota la nit o 2 hores a temperatura ambient.
- Rentar 3 vegades durant 10 minuts amb tampó TBS 0,1% tritó.
- Incubar amb l'anticòs secundari diluït en llet a l'1%.
- Rentar 3 vegades durant 10 minuts amb tampó TBS 0,1% tritó.
- Afegir l'ECL (ECL-Amersham).
- Revelar.

TBS: 50 mM tris base
150 mM NaCl
pH 7,5.

Tampó de transferència 10X: 0,1 M tris
2 M glicina.
Afegir 20% metanol en el moment de preparar el tampó a 1X.

"Stripping" de membrana de western blot:

- Submergir la membrana en "stripping buffer":

Solució "stripping buffer": 2% SDS
62,5 mM TrisHCl pH 7,5
100 mM 2-β-mercaptoetanol.

- Incubar al bany a 50°C 30 minuts agitant.
- Rentar la membrana amb tampó TBS 0,1% tritó 3 vegades durant 10 minuts.
- Afegir la llet 5% per bloquejar.

➤ Taula d'anticossos i dilucions:

<u>Anticòs</u>	<u>Western</u>	<u>Immunofluorescència</u>	<u>Immunoprecipitació</u>
α -GST <i>St. Cruz</i>	1:1000		
α -GFP <i>St. Cruz</i>	1:500		
α -tubulina <i>Sigma</i>	1:5000		
α -myc <i>Sigma</i>	1:1000		1,5 μ l
α - β -actina <i>St. Cruz</i>	1:200		
Ciclina A <i>Transduction Laboratories</i>	1:125	1:25	
α -HA	1:1000	1:200	1,5 μ g
α -flag <i>Sigma</i>	1:1000	1:200	1,5 μ l
α -Fbox28	1:250		
Ciclina D3 <i>St. Cruz</i>	1:200	1:50	

➤ **Anticossos secundaris i molècules de marcatge específic acoblades a fluorocrom.**

<u>Fluorocrom</u>	<u>Marcatge específic</u>	<u>Concentració final</u>
Alexa <i>Molecular Probes</i>	Detecció anticòs primari	10 µg/ml
Iodur de propidi <i>Sigma</i>	Nuclis	5 µg/ml
Phalloidina TRIT-C <i>Sigma</i>	F-actina	1 µg/ml
TO-PRO-3 iodide <i>642/661</i>	Nuclis	0,2 µM
Anexina V-FITC	Detecció apoptosi	1 µg/ml
DAPI	Nuclis	1,5 µg/ml

5.4. TINCIONS DE GELS D'ELECTROFORESI

Per tenyir gels de poliacrilamida s'utilitzen principalment la tinció amb blau de Comassie i la tinció amb plata. El blau de Comassie és una tècnica més ràpida però menys sensible que la tinció amb plata.

i. **Tinció amb blau de Comassie:**

El gel s'incuba amb la solució de Comassie durant 10 minuts en agitació. Després es renta dues vegades amb la solució de rentat el temps necessari fins veure les bandes de proteïnes.

Blau de Comassie: 45% metanol
10% àcid acètic
0,25% "Comassie Brilliant Blue".

Solució de rentat : 45% metanol
10% àcid acètic.

ii. **Tinció amb plata**

Per aquesta tinció utilitzem el kit " " (Amersham Biosciences).

- 3 rentats del gel amb aigua miliQ durant 10 minuts.
- Fixació durant mínim 30 minuts.
- 3 rentats amb aigua miliQ durant 5 minuts.
- Sensibilització durant 30 minuts.
- 3 rentats amb aigua miliQ durant 5 minuts.
- Tinció amb nitrat de plata durant 20 minuts.
- 3 rentats amb aigua miliQ durant 3 minuts.
- Revelat de 2-5 minuts en funció de les bandes que observem.
- Aturada de la reacció durant 10 minuts.
- 3 rentats amb aigua miliQ durant 5 minuts.

Solució fixadora : 40% etanol
10% àcid acètic.

Solució sensibilitzadora: 30% etanol
0,2% tiosulfat sòdic
6,8% acetat sòdic.

Solució tenyidora: 0,25% nitrat de plata.

Solució de revelat: 2,5% carbonat sòdic
0,04% formaldehid.

Solució de parada de la reacció: 1,46% EDTA-NH₂ · H₂O

6. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE FUSIÓ EN E.Coli:

Es van subclonar en plàsmids pGEX el cDNA de la proteïna Fbox28, i dos fragments més curts d'aquesta proteïna. Aquests fragments es van obtenir mitjançant talls amb enzims de restricció.

6.1 PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES

- Inocular 15 ml d'LB ampicil·lina amb bacteries (FBOX28, FBOX28-330, FBOX28-720) transformades amb el plàsmid pGEX d'interès. Incubar durant tota la nit a 37°C en agitació.
- Al matí afegir els 15 mL de cultiu ON en 500 mL d'LB Ampicil·lina. Incubar a 37°C unes 2 hores en agitació fins obtenir una OD₆₀₀ = 0,4.
- Induir les cèl·lules afegint IPTG 0,1 mM.

- Incubar durant 3 hores més a 37°C.
- Centrifugar a 3.500 rpm 15 minuts a 4°C.

Degut a que les proteïnes GST que volíem purificar eren molt insolubles vam utilitzar el mètode de purificació amb "Sarcosyl":

- En fred, treure el sobrenedant i ressuspènere el pellet en NET-S (1/20 del volum del cultiu original de bactèries).
- Sonicar en 4x30 segons a 4°C.
- Centrifugar a 8.500 rpm, 15 minuts, 4°C.
- Posar el sobrenedant en un falcon de 15 mL i afegir $\frac{1}{4}$ de volum de NET-20% tritó X-100 (a una concentració final de 4% tritó X-100). Deixar en agitació a 4°C 10 minuts.
- Afegir uns 400 μ L de "glutathione sepharose" en NETN + 0,5% de llet. Incubar en agitació 1 hora a 4°C.
- Rentar 3 cops amb NET-N fent *spins* de 3 minuts a 1.000 rpm a 4°C.
- Eluir la proteïna amb *buffer* d'elució.
- Dialitzar la proteïna eluïda en el *buffer* de diàlisi en agitació, a 4°C i durant tota la nit.

NET-S: 1,5% Sarcosil
20 mM tris pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8,0.

NET-20%tritó X-100: 20% tritó X-100
20 mM tris pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8,0.

NETN: 20 mM tris pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA pH 8,0
0,5% NP40.

Buffer d'elució: 50 mM tris pH 8,0
20 mM glutatió reduït (Sigma).

Tampó de diàlisi: 10 mM tris pH 7,5
10% glicerol.

7. DETECCIÓ DE LA UNIÓ PROTEÏNA-PROTEÏNA

7.1. EXPERIMENTS DE PULL-DOWN

- Les cèl·lules que es volen analitzar es renten amb PBS 1X fred i es lisen amb tampó NP40 0,2% i inhibidors de proteases.
- L'extracte proteic s'incuba amb 25 µg de la proteïna de fusió (GST, GST-Fbox28, GST-Fbox28-330, GST-Fbox28-720) en agitació i a 4°C durant tota la nit.
- S'afegeixen 30 µl de boletes de Sefarosa (per punt) i s'incuba durant 1 hora mínim.
- Es fan 3 rentats de les boletes amb el tampó de lisi i inhibidors de proteases a 4°C i 2.000 rpm durant 3 minuts.
- S'afegeix LSB 2X i es bull a 95°C 10 minuts.
- L'anàlisi es fa per western blot amb anticossos específics.

7.2. EXPERIMENTS D'IMMUNOPRECIPITACIÓ

- Les cèl·lules que es volen analitzar es renten amb PBS 1X fred i es lisen amb tampó NP40 0,2% i inhibidors de proteases.
- L'extracte proteic s'incuba amb l'anticòs amb el que es vol immunoprecipitar en agitació i a 4°C durant tota la nit.
- S'afegeixen 30 µl de mescla proteïna A i G i s'incuba durant una hora mínim.
- Es fan 3 rentats de les boletes amb el tampó de lisi i inhibidors de proteases a 4°C i 2.000 rpm durant 3 minuts.
- S'afegeix LSB 2X i es bull a 95°C 10 minuts.
- L'anàlisi es fa per western blot amb anticossos específics.

7.3. EXPERIMENTS AMB CROMATOGRAFIA D'AFINITAT

Construcció de les columnes d'afinitat:

- Es pesa la quantitat de CNBr-Activated Sepharose 4B necessària (equivalent a ≈ 500 µl) i es renta amb la solució d'activació.
- S'acoblen 1 mg de les proteïnes purificades GST i Fbox28-GST a la matriu incubant 16 hores a 4°C amb el tampó d'unió i en agitació.
- Després de tres rentats amb tampó d'unió, s'atura rentant amb 1 M Tris-HCl pH 8,0. Així es bloquegen els grups que reaccionen amb amines lliures.
- Per fer els enllaços covalents permanents, es fan rentats alternatius amb tampons àcids i bàsics.

- La columna s'equilibra amb la solució d'unió.

Tampó d'unió: 100 mM NaHCO₃
500 mM NaCl

Solució d'activació Sepharosa 4B: 1 mM HCl

Solució de saturació: 1 M Tris-HCl pH 8,0

Tampó àcid: 100 mM NaCH₃COO pH 4,0, 500 mM NaCl

Tampó bàsic: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl

Procediment:

- Passem a través de la columna, deixant que flueixi, l'extracte proteic que volem analitzar.
- Recollim la fracció que no s'uneixi a la columna (FT: *flowthrough*).
- Rentem la columna amb 3 volums del tampó de lisi que s'hagi utilitzat.
- Realitzem una sèrie d'elucions de les proteïnes que s'han quedat unides a la resina de la columna passant 1 mL de tampó de lisi amb diferents concentracions de NaCl: 250 mM, 500 mM, 750 mM i finalment glicina 200 mM pH 2,5 + 150 mM NaCl.
- Precipitem les proteïnes de totes les fraccions, excepte el FT, amb TCA 10%.
- Les mostres es ressuspenen amb LSB 1X i l'anàlisi es fa en un gel d'acrilamida amb posterior tinció amb plata.
- Les bandes d'interès s'analitzen per MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*).

Precipitació de proteïnes:

- S'afegeix un volum igual de 20% TCA (àcid tricloracètic) a cada mostra proteica que tenim.
- Incubem 30 minuts en gel.
- Centrifuguem 15 minuts a 14.000 rpm.
- Traiem el sobrenedant i ressuspenem en 300 µl d'acetona freda (-20°C).
- Centrifuguem 15 minuts a 14.000 rpm, traiem el sobrenedant i deixem assecar el pellet.
- Ressuspenem les mostres en LSB 1X.

- Adams, J. "Development of the proteasome inhibitor PS-431". (2002). *Oncologist*, 7:9-16.
- Adams, J. "The proteasome: structure, function, and role in the cell". (2003). *Cancer treatment reviews.*, 29:3-9.
- Alexandrow, M., et al. "Overexpression of the cMyc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor β -1". (1994). *Cell Biology* 92: 3239-3243.
- Aoyama, Y., et al. "MFB-1, an F-box-type ubiquitin ligase, regulates TGF- β signalling". (2004). *Genes to cells* 9:1093-1101.
- Aravin, L., and Koonin, EV. "The U-box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination". (1995). *Curr., biol.*, 4:132-134.
- Atfi, A., et al. "Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor- β through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway". (1997). *J. biochem. chem.*, 272:24731-24734.
- Bai, C., et al. "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box". (1996). *Cell* 86:263-274.
- Baumeister, W., et al. "The proteasome: paradigm of a self:compartmentalizing protease". (1998). *Cell*, 92:367-380.
- Benaroudk, N., et al. "The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes". (2001). *Biochimie.*, 311-318.
- Bercovich, B., et al. "Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates *in vitro* requires the molecular chaperone Hsc70". (1997). *J. biol. chem.*. 272:9002- 9010.
- Bertolino, P., Deckers, M., Lebrin, F., and ten Dijke., P. "Transforming growth factor- β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders". (2005). *Chest Journal* 128: 585-590.

- Bloom, J., and Pagano, M. "Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation". (2003). *Sem., cancer biol.*, 13:41-47.
- Blow, J.J., and Hodgson, B. "Replication licensing-defining the proliferative state?". (2002). *TRENDS cell biol.*, 12:72-78.
- Bochtler, M., et al. "The proteasome". (1999). *Annu. rev. biophys. biomol. struct.*, 28:295- 317.
- Borden, KLB. "RING domains: master builders of molecular scaffolds?". (2000). *J. mol. biol.*, 295:1103-1112.
- Brooks, P., et al. "Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells". (2000). *Biochem. J.*, 346:155-161.
- de Caestecker, MP., et al. "Role of transforming growth factor- β signaling in cancer". (2000). *J. Natl. Cancer Inst.*, 92:1388-1402).
- Cardozo, T., and Pagano, M. "The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine". (2004). *Nature Reviews*, 5: 739-751.
- Cardozo, T., and Pagano, M. "The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine". (2004). *Nature rev.*, 5:739-751.
- Carmeliet, P. "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis". (2000). *Nature Medicine*, 6(3):389-395.
- Casanovas, O., et al. "P38SAPK2 phosphorylates cyclin D3 at Thr-283 and targets it for proteasomal degradation". (2004). *Oncogene* 1-8.
- Cenciarelli, C., et al. "Identification of a family of human F-box proteins". (1999). *Curr. biol.*, 9:1177-1179.
- Chambard, J., and Pognonec. P. "A reliable way of obtaining stable inducible clons". (1998). *Nucleic Acids Research*, 26 (14): 3443-3444.

- Chu-Ping, M., et al. "Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain)". (1992). *J. biol. chem.*, 15:10515-10523.
- Chu-Ping, M., et al. "Identification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain)". (1992). *Biochim. Biophys. Acta.*, 3: 303-311.
- Chu-Ping, M., et al. "Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome". (1994). *J. biol. chem.*, 5: 3539-3547.
- Ciechanover, A. "The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life". (1998). *EMBO*, 17: 7151-7160.
- Clifford, R., et al. "FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C.elegans* hermaphrodite germline". (2000). *Dev.*, 127:5265-5276.
- Clifford, SC., et al. "The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1 α in renal cell carcinomas". (2001). *Oncogene* 20:5067-5074.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, AL. "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes". (1996). *Annu. rev. biochem.*, 65:801-847.
- Craig, KL., and Tyers, M. "The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction". (1999). *Prog. biophys. and molec. biol.*, 72:299-328.
- Dennler, S., et al. "Transforming growth factor β signal transduction". (2002). *J. of Leukocyte Biology* 71: 731-740.
- Derynck, R., et al. "An emerging complexity of receptors for transforming growth factor- β ". (1994). *Princess Takamatsu Symp.*, 24: 264-75.

- Derynck, R., Rosemary, J., et al. "TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression". (2001). *Nature genetics* 29: 117-129.
- Derynck, R., and Zhang, YE. "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling". (2003). *Nature* 425:577-584.
- Deshaies, RJ. "SCF and cullin/RING H2 based ubiquitin ligases". (1999). *Annu. rev. cell dev. biol.*, 15:435-67.
- Deveraux, Q., et al. "A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates". (1994). *J. biol. chem.*, 10:7059-7061.
- Dubiel, W., et al. "Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease". (1992). *J. biolog. chemis.*, 31:22369-22377.
- Floyd, ZE., et al. "The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD". (2001). *The J. of Biol. Chem.*, 276:22468-22475.
- Fujinami, K, et al. "Purification and characterization of the 26S proteasome from spinach leaves". (1994). *J. biol. chem.*, 41: 25904-25910.
- Galan, JM., and Peter, M. "Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism". (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:9124-9129.
- Glickmann, MH., et al. "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3". (1998). *Cell* 94:615-623.
- Glickmann, MH., and Ciechanover, A. "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction". (2002). *Physiol. rev.*, 82:373-428.
- Golias, CH., et al. "Cell proliferation and cell cycle control: a mini review". (2004). *Int. j. clin. prat.*, 58:1134-1141.

- Guardavaccaro, D., and Pagano, M. "Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases". (2004). *Oncogene* 23:2037-2049.
- Haglund, K., and Divik, I. "Ubiquitylation and cell signaling". (2005). *EMBO j.*, 24:3353- 3359.
- Harper, JW., et al. "The anaphase-promoting complex:it's not just for mitosis any more". (2002). *Genes and dev.*, 16:2179-2206.
- Hatakeyama, S., et al. " U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases". (2001). *J. biol. chem.*, 35:33111-33120.
- Heldin, HC., and ten Dijke, P. "SMAD destruction turns off signaling". (1999). *Nat. Cell. Biol.*, 1:195-197.
- Hermans, D. "F-box proteins: more than baits for the SCF?". (2006). *Cell Division* 1:30.
- Hershko, A., et al. "Components of ubiquitin-protein ligase system". (1983). *J. biol. chem.*, 13:8206-8214.
- Hershko, A., et al. "Ubiquitin-mediated protein degradation". (1988). *J. biol. chem.*, 30:15237-15240.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. "The ubiquitin system". (1998). *Annu. rev. biochem.*, 67:425-479.
- Hershko, D., et al. "Inverse relation between levels of p27kip1 and of its ubiquitin ligases subunits Skp2 in colorectal carcinomas". (2000). *Cancer* 91:1745-1751.
- Hochstrasser, M. "Ubiquitin-dependent protein degradation". (1996). *Annu. Rev. Genet.*, 30:405-39.
- Hoeller, D., et al. "Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination". (2006). *Nature cell biol.*, 8:163-169.

- Hoeller, D., et al. "E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins". (2007). *Molec. cell* 26:891-898.
- Iavarone, A., and Massagué, J. "Repression of the CDk activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF β in cells lacking the CDK inhibitor p15". (1997). *Nature* 387: 417-42.
- Itoh, S., and ten Dijke, P. "Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction". (2007). *Curr. Op. Cell Biol.*, 19:176-184.
- Jackson, PK., et al. "The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases". (2000). *Cell biol.*, 10: 429-439.
- Jakowlew, SB. "Transforming growth factor- in cancer and metastasis". (2006). *Cancer Metastasis Rev.*, 25:435-457.
- Ji, Peng., et al. "Skp2 contains a novel cyclin A binding domain that directly protects cyclin A from Inhibition by p27^{Kip1}". (2006). *J. biol. chem.* 281(33)24058-24069.
- Jiang, F., et al. "RNA silencing of S-phase kinase-interacting protein 2 inhibits proliferation and centrosome amplification in lung cancer cells". (2005). *Oncogene* 24:3409-3418.
- Jianping, J., et al. "SCF β -TrCp links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase". (2003). *Genes and Dev.*, 17:3062-3074.
- Jianping, J., et al. "Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins". (2004). *Genes and dev.*, 18:2573-2580.
- Johnson, DG., et al. "Cyclins and cell cycle checkpoints". (1999). *Annu. rev. pharmacol. toxicol.*, 39:295-312.
- Kaisa, H., et al. "Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis". (2003). *TRENDS in Biochem. Sci.*, 28:598-603..
- Kamura, T., et al. "Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase". (1999). *Science* 284:657-661.

- Keiichi I., and Keiko, N. "Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases". (2005). *Sem. cell and dev. biol.*, 323-333.
- Kipreos, ET., and Pagano, M. "The F-box protein family". (2000). *Genome Biology* 1 (5): reviews3002.1-reviews3002.7.
- Kipreos, ET. "Ubiquitin-mediated pathways in *C.elegans*". (2005). *Nat. rev. mol. cell. biol.*, 6:766-776.
- Knop, M., et al. "Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms". (1993). *Curr. opin. cell. biol.*, 5:990-996.
- Kobe, B., and Kajava, AV. "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif". (2001). *Curr. op. struct. biol.*, 11:725-732.
- Koegl, M., et al. "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly". (1999). *Cell* 96:635-644.
- Koepp, DM., et al. "How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle". (1999). *Cell* 97:431-434.
- Kong, M., et al. "Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction". (2000). *EMBO J.*, 19:1378-1388.
- Koyama-Neus, R., et al. "The F-box protein Fbl10 is a novel transcriptional repressor of c-Jun". (2007). *Nat. cell. biol.*, 9:1074-1080.
- Kraus, B., et al. "A novel cyclin gene (CNNF) in the region of the polycystic kidney disease gene (PDK1)". (1994). *Genomics* 24:27-33.
- Kretzschmar, M., and Massagué, J. "SMADS: mediators and regulators of TGF- β signaling". (1998). *Cur. Opin. Genet. Dev.*, 8: 103-111.
- Kumar, S., et al. "Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity". (1997). *J. biol. chem.*, 271:13548-13554.

- Lam, YA., et al. "A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal". (2002) *Nature* 416:763-767.
- Laman, H., et al. "Transforming activity of Fbxo7 is mediated specifically through regulation of cyclin D/cdk6". (2006). *EMBO J.* 1-13.
- Landström, M., et al. "Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor β in prostatic carcinoma cells". (2000). *Current Biology* 10: 535-538.
- Laney, JD., and Hochstrasser, M. "Substrate targeting in the ubiquitin system". (1999). *Cell* 97:427-430.
- Larsen, CN., and Finley, D. "Protein translocation channels in the proteasome and other proteases". (1997). *Cell* 91:431-434.
- Levitskaya, J., et al. "Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1". (1997). *Proc. natl. acad. sci.*, 94:12616-12621.
- Li, FN., et al. "Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle". (1997). *EMBO j.*, 16:5629-5638.
- Li, M., et al. "Mono-versus polyubiquitination : diferencial control of p53 fate by Mdm2". (2003). *Science* 302:1972-1975.
- Liang, M., Liang, YY., et al. "Ubiquitination and proteolysis of cancer-derived smad4 mutants by SCF^{Skp2}". (2004). *Molec. Cell. Biol.*, 24:7524-7537.
- Lyuben, M., et al. "p27^{Kip1} ubiquitination and degradation is regulated by the SCF^{Skp2} complex through phosphorylated Thr187 in p27". (1999). *Current Biology* 9:661- 664.
- Luisa Izzi and Liliana Attisano. "Ubiquitin-Dependent Regulation of TGF β Signaling in Cancer". (2006). *Neoplasia* 8: 677-688.

- Lutz, M., et al. "Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-box protein induced during programmed cell death". (2006). *FEBS letter*, 580:3921-3930.
- Ma, Y., et al. "Regulation of the cyclin D3 promoter by E2F1". (2003). *J. Biol. Chem.*, 279:16770-16776.
- Maitra, A., et al. "Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease". (2000). *Am. J. Pathol.*, 157:1105-1111).
- Markowitz, SD., and Roberts., A. "Tumor suppressor activity of the TGF- β pathway in human cancers". (1996). *Citok. and Growth fact. Reviews.*, 7(1):93-102.
- Marques, C., et al. "The triage of damaged proteins: degradations by the ubiquitin- proteasome pathway or repair by molecular chaperones". (2006). *FASEB j.*
- Marti, A., et al. "Interactions between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation". (1999). *Nat. cell. biol.*, 1:14-9.
- Masafumi, Muratami., et al. "How the ubiquitin-proteasome system control transcription". (2003). *Nature reviews* 4:1-10.
- Massagué, J., and Weis-Garcia, F. "Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals". (1996). *Cancer Surv.*, 27: 41-64.
- Massagué, J. "TGF- β signal transduction". (1998). *Annu. Rev. Biochem.*, 67:753-91.
- Massagué, J. "How cells read TGF- β signals". (2000). *Nature Reviews*, 1:169-178.
- Massagué, J., et al. "Smad transcription factors". (2005). *Genes and dev.*, 19:2783-2810.
- Miller, JR., and Moon, RT. "Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis". (1996). *Genes and dev.*, 10:2527-2539.

- Mitch, WE., and Goldberg, A. "Mechanisms of muscle wasting". (1996). *N. engl. J. med.*, 335:1897-1905.
- Moncla, A., et al. "Angelman syndrome resulting from UBE3A mutations in 14 patients from eight families: clinical manifestations and genetic counselling". (1999). *J. med. genet.*, 36:554-560.
- Motokura, T., et al. "Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogen". (1992). *J. biol. chem.* 28:20412-20415.
- Moustakas, A., and Heldin., CH. "Non-Smad TGF- β signals". (2005). *J. of Cell Sci.*, 118: 3573-3584.
- Nakayama, I., Nakayama, K. "Regulation of the cell cycle by the SCF-type ubiquitin ligases". (2005). *Cell and Develop. Biology*, 16: 323-333.
- Nigg, EA. "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints". (2001). *Nature rev.*, 2:21-32.
- Nuber, U., and Scheffner, M. "Identification of determinants in E2 ubiquitin-conjugating enzymes required for hect E3 ubiquitin-protein ligase interaction". (1999). *J. biol. chem.*, 11:7576-7582.
- Ogura, T., and Tanaka, K. " Dissecting various ATP-dependent steps involved in proteasomal degradation". (2003). *Mol. cell.*, 1:69-78.
- Orlowski, M., Cardozo C., and Michaud, C. "Evidence for the presenc of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids". (1993). *Biochem.*, 32:1563-1572.
- Orlowski, M., and Wilk, S. "Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome". (2003). *ABB*, 415:1-5.

- Pagano, M. "Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway". (1997). *FASEB J.*, 11:1067-1075.
- Pepper, MS. "Transforming growth factor-beta: Vasculogenesis, Angiogenesis, and Vessel Wall Integrity". (1997). *Cytok. And Growth Fact. Rev.*, 8 (1): 21-43.
- Peters, JM., et al. "Structural features of the 26S proteasome complex". (1993). *J. molec. biol.*, 4:932-937.
- Peters, JM., Franke, WW., and Kleinschmidt, JA. "Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm". (1994). *J. biol. chemist.*, 10:7709-7718.
- Pickart, C., and Eddins, MJ. "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms". (2004). *BBA*, 55-72.
- Pintard, L., et al. "Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family". (2004). *EMBO j.*, 23:1681-1687.
- Pfleger, CM., and Kirschner, MW. "The KEN-box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1". (2000). *Genes and dev.*, 14:655-665.
- Qi, Yitao., et al. "Cyclin a but not cyclin D1 is essential for c-myc-modulated cell-cycle progression. (2006). *J. cell. phys.* 210(1):63-71.
- Realini, C., et al. "Molecular cloning and expression of a γ -interferon-inducible activator of the multicatalytic protease". (1994). *J. biol. chem.*, 32:20727-20732.
- Reynisdóttir, I., Polyak, K., et al. " Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β ". (1995). *Genes and Dev.*, 9: 1831-1845.
- Reynisdóttir, I., and Massagué, J. "The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2". (1997). *Genes and Dev.*, 11: 492-503.

- Rivett, AJ., Palmer, A., and Knecht, E. "Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells". (1992). *J. histochem. and cytochem.*, 8:1165-1172.
- Russel, ID., et al. "The unstable F-box protein p58-Ctf13 forms the structural core of the CBF3 kinetochore complex". (1999). *J. cell biol.*, 145:933-950.
- Sa, Gaurisankar., et al. "The regulation of S phase initiation by p27Kip1 in NIH3T3 cells. (2005). *Cell cycle* 4(4):618-627.
- Sanchez, I., and Dynlacht, B. "New insights into cyclins, CDKs, and cell control". (2005). *Sem. cell. dev. biol.*, 16:311-321.
- Seoane, J. "Escaping from the TGF β anti-proliferative control". (2006). *Carcinogenesis* 27:2148-2156.
- Shafer, KA. "The cell cycle: a review". (1998). *Vet. pathol.*, 35:461-478.
- Shah, SA., Potter, MW., and Callery, MP. "Ubiquitin proteasome pathway: implications and advances in cancer therapy". (2001). *Surgical oncology*, 10:43-52.
- Scheffner, M., et al. "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53". (1993). *Cell* 75:495-505.
- Sherr, CJ., and Roberts, JM. "CDK inhibitors: positives and negative regulators of G1-phase progression". (1999). *Genes&dev.*, 19:1501-1512.
- Sherr, CJ. "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited". (2000). *Cancer research* 60:3689-3695.
- Shilarifard, A. "Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II". (1998). *FASEB*, 12:1437-1446.

- Schlesinger, DH., Goldstein, G., and Niall, HD. "The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells". (1975). *Biochem.*, 14:2214-8.
- Schwarz, K., et al. "Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 α/β , enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope". (2000). *J. immunol.*, 165:768-778.
- Siegel, PM., and Massagué, J. "Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer". (2003). *Nature reviews* 3:807-820.
- Smith, DM., Benaroudj, N., and Goldberg, A. "Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination". (2006). *J. struct. biolog.*, 72-83.
- Smith, TF., et al. "The WD repeat: a common architecture for diverse functions". (1999). *TIBS* 24:181-185.
- Spiegelman, DS., et al. "Wnt/ β -catenin signaling induces the expression and activity of β TrCP ubiquitin ligase receptor". (2000). *Molec. cell.*, 5:877-882.
- Staub, O., et al. "Regulation of stability and function of the epithelial Na channel (EnaC) by ubiquitination". (1997). *EMBO J.*, 16:6325-6336.
- Tanahashi, N., et al. "The proteasome-dependent proteolytic system". (1999). *Molec. biolog. rep.*, 26:3-9.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., et al. "Signaling inputs converge on nuclear effector in TGF- β signaling". (2000). *Trends Biochem. Sci.*, 25: 64-70.
- Tessema, M., et al. "Cell cycle and no end". (2004). *Virchows. arch.*, 444:313-323.
- Trotman, LC., et al. "Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression". (2007). *Cell* 12:141-156.

- VanDemark, AP., and Hill, CP. "Structural basis of ubiquitylation". (2002). *Curr. op. struct. biol.*, 12:822-830.
- Varshavsky, A. "The N-end rule: functions, mysteries, uses". (1996). *Proc. natl. acad. sci.*, 93:12142-12149.
- Varshavsky, A. "The ubiquitin system". (1997). *TIBS* 22: 383-387.
- Viallard, JF., et al. "Molecular mechanisms controlling the cell cycle: main considerations and implications in oncology". (2000). *Cancer/radiothérapie*, 5:109-129.
- Viñals, F., and Poysségur, J. "Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF- α signaling". (2001). *Molecular and Cell. Biol.*, 21:7218-7230.
- Virshup, DM., and Forger, DB. "After hours keeps clock researchers CRYing overtime" (2007). *Cell* 129:857-858.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis". (1999). *Annu. rev. biochem.*, 68:1015-1068.
- Ward, CL., et al. "Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway". (1995). *Cell* 83:121-127.
- Wang, X., et al. "NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN". (2007). *Cell* 128:129-139.
- Wei, Wenyi., et al. "Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex". (2004). *Nature* 428:194-198.
- Weissman, A. "Themes and variations on ubiquitylation". (2001). *Nat. Rev.*, 2:169-179.
- Welcker, M., et al. "The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation". (2004). *PNAS*, 101:9085-9090.

- Wilkinson, KD. "Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes". (1997). *FASEB*, 11:1245-1256.
- Xu, L., Wei, Y., et al. "BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3". (2003). *Nature* 425.
- Yam, CH., et al. "Regulation of Cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2". (1998). *Mol. and Cell Biol.* 19:635-645.
- Yao, T., et al. "Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1". (2006). *Cell*, 9:994-1002.
- Youl, K., and Bae, S. "TGF- β -dependent cell growth arrest and apoptosis". (2001). *J. of Biochem. And Molec. Biol.*, 35 (1): 47-53.
- Zhan, F., et al. "TGF- β induced G1 cell cycle arrest requires the activity of the proteasome pathway". (2002). *Exp. Cell Research.*, 281: 190-196.
- Zhang, F., and Laiho, M. "On and off: proteasome and TGF- β signaling". (2003). *Exp. Cell Research.*, 291:275-281.
- Zhang, L., and Wang, C. "F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F". (2005). *Oncogene* 1-13.
- Zheng, N., et al. "Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-Fbox^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex". (2002). *Nature* 416:703-709.
- Zu, XH., et al. "Noncatalytic requirement for cyclin A-cdk2 in p27 turnover". (2004). *Mol. cell. biol.* 24(13):6058-6066.
- Zwickl, P., Voges, D and Baumeister, W. "The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis". (1999). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 354: 1501- 1511.