



Universitat de Lleida


Transloquina, una proteïna associada a microtúbuls, regula la localització de ciclina D1 en cèl·lules quiescents

Maria Ruiz Miró

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

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

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

The background of the slide is a fluorescence microscopy image of several cells. The cells are stained with three different dyes: a red dye that highlights the cytoplasm and overall cell structure, a blue dye that stains the nuclei, and a green dye that highlights the microtubule network. The microtubules appear as a complex, fibrous network within the cells. The text is overlaid on the upper left portion of the image.

Transloquina, una proteïna
associada a microtúbuls, regula
la localització de ciclina D1 en
cèl·lules quiescents

Maria Ruiz Miró
Universitat de Lleida



Memòria presentada per Maria Ruiz Miró per a optar al títol de Doctor per la Universitat de Lleida.

Treball dirigit per la Dra. Neus Colomina Gabarrella i el Dr. Martí Aldea Malo, del Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida.

Lleida, 6 de gener de 2010.

Al Tarragó

Al Marc

Als meus pares

Al meu germà

ÍNDEX

Resum

Agraïments

INTRODUCCIÓ	1
1. Cicle cel·lular	3
1.1. Sistemes de control	4
1.2. La fase G1	6
2. Molècules implicades en la fase G1 del cicle	7
2.1. Ciclines	7
2.2. Cdk's	9
3. Ciclina D1	12
3.1. Control transcripcional de ciclina D1	12
3.2. Proteòlisi de la ciclina D1	15
3.3. Localització intracel·lular de la ciclina D1: GSK-3 β i CRM1	20
4. Regulació del complex Cdk4-ciclina D1	22
4.1. Formació del complex	22
4.2. Unió a proteïnes reguladores: Inhibidors del cicle cel·lular	24
4.3. Fosforilació per la quinasa CAK	33
5. Implicació en oncogènesi: ciclina D1b	34
6. Hipòtesi del treball de tesi	36
7. Objectius	38
MATERIALS I MÈTODES	39
1. Cultius cel·lulars	41
1.1. Cultius de MEFs, NIH3T3 i HEK293T	41
1.2. Transfeccions i tractaments cel·lulars	43
2. Obtenció de lentivirus en cèl·lules HEK293T	45
3. Construccions plasmídiques	46
4. Construccions lentivirals	48
5. Solubilitzacions en placa	48
6. Assaig d'interactors per di-híbrid	49
6.1. Protocol d'aparellament	51
6.2. Identificació, seqüenciació i confirmació de clons	52
7. Immunofluorescència	54
8. Incorporació de BrdU	55
9. Adquisició i anàlisi d'imatges	57

10. Anàlisi per FACS	58
11. <i>Western blot</i>	58
12. Obtenció d'un anticòs policlonal contra transloquina	60
13. Anàlisi d'interactors de ciclina D1 per espectrometria de masses	62
14. Immunoprecipitacions de ciclina D1	63

RESULTATS 65

1. La ciclina D1 es localitza al citoplasma en cèl·lules quiescents	67
2. Cerca d'altres condicions on la localització de ciclina D1 es veu afectada	73
3. FGF2 és important per la localització de ciclina D1	77
4. La ciclina D1 podria estar regulada per un mecanisme de retenció citoplasmàtica	80
5. Identificació d'interactors per afinitat i espectrometria de masses	85
6. Identificació d'interactors per di-híbrid	88
7. Dominis i interaccions de ciclina D1 i transloquina per di-híbrid	91
8. Interacció de ciclina D1 i transloquina en MEFs i cèl·lules HEK293T	95
9. La superexpressió de transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1	100
10. La superexpressió de ciclina D1 afecta a la localització de la transloquina	105
11. La interferència de transloquina causa una acumulació nuclear de ciclina D1	112
12. La interferència de transloquina provoca un augment de la fosforilació de RB	115

DISCUSSIÓ 121

1. La ciclina D1 no s'acumula al nucli en condicions de quiescència	123
2. La transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1 en cèl·lules quiescents	127
3. Conclusions	135

Figures suplementàries 137

Bibliografia 147

Resum

El cicle cel·lular és el conjunt d'esdeveniments ordenats que permeten a la cèl·lula donar lloc a dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. Diversos senyals externs i interns regulen aquest procés per a que la cèl·lula prolifere només en les condicions apropiades. Un punt de control important pel que fa a la coordinació de la proliferació amb el creixement cel·lular es troba en la fase G1 (punt de restricció), on la cèl·lula comprova que ha adquirit la massa i la maquinària necessària per la replicació del DNA. Les ciclines D són molècules que juguen un paper clau en la regulació de la fase G1. Les cèl·lules de mamífer contenen gens que codifiquen per 3 ciclines de tipus D altament homòlogues (D1, D2, D3), que s'expressen de manera específica de teixit i s'associen a Cdk4 o Cdk6 per formar una proteïna quinasa activa. D'aquestes tres ciclines la ciclina D1 és la més estudiada ja que es troba freqüentment superexpressada en molts càncers humans. L'expressió de ciclina D1 i la seva unió a Cdk4 representa un dels esdeveniments més importants, regulats per senyals mitogènics, necessaris per la progressió del cicle cel·lular a través del punt de restricció.

Les cèl·lules inhibeixen l'entrada en cicle en la fase G1 principalment per dos mecanismes diferents: la disminució de l'expressió de ciclines D i l'augment de les proteïnes KIP que inhibeixen l'activitat residual del complex Cdk4/6-ciclina D. Tot i discrepàncies d'origen metodològic, diferents estudis han observat l'acumulació de la ciclina D1 en el citoplasma de cèl·lules quiescents o diferenciades, suggerint l'existència d'altres mecanismes que podrien regular l'activitat dels complexos Cdk4-ciclina D1 a nivell de la seva distribució nucleo-citoplasmàtica. D'altra banda, en el nostre laboratori s'havia desvetllat un mecanisme de retenció citoplasmàtica de Cln3, l'homòleg funcional de ciclina D1 en llevat de

gemmació, que regula l'entrada en cicle i juga un paper molt important en la coordinació entre creixement i proliferació. Aquests antecedents ens van conduir a plantejar com a hipòtesi de treball d'aquesta tesi doctoral l'existència d'un mecanisme de control de la localització de la ciclina D1 entre el nucli i el citoplasma, que podria tenir un paper especialment rellevant en situacions d'aturada de la proliferació cel·lular.

En aquest treball hem demostrat que la ciclina D1 es localitza en el citoplasma de fibroblasts embrionaris de ratolí quiescents, i que això succeeix per un mecanisme independent de l'export mediat per Crm1. De la cerca d'interactors de ciclina D1 per di-híbrid i co-purificació hem identificat la transloquina, una proteïna que havia estat descrita com a important en el procés d'import nuclear de FGF2. En observar durant el nostre treball que FGF2 és un potent estimulador de l'acumulació nuclear de ciclina D1, varem decidir analitzar en detall les seves implicacions funcionals. La superexpressió de transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1 en cèl·lules proliferant. En canvi, la inhibició de l'expressió de transloquina causa l'efecte oposat, és a dir, indueix l'acumulació nuclear de ciclina D1 i la fosforilació de RB per Cdk4 en cèl·lules sotmeses a condicions de quiescència.

En resum, en aquest treball de tesi doctoral hem desvetllat i descrit un mecanisme de retenció citoplasmàtica de la ciclina D1 en fibroblasts embrionaris de ratolí, on la transloquina hi juga un paper important per a mantenir l'estat de quiescència cel·lular. La transloquina i Cdk4 s'uneixen i competeixen pel mateix domini de ciclina D1 i, donat que cal la formació prèvia del complex Cdk4-ciclina D1 per al seu import nuclear, aquest fet permet establir una base molecular senzilla pel propi mecanisme de retenció citoplasmàtica.

Resumen

El ciclo celular es el conjunto de sucesos ordenados que permiten a la célula originar dos células hijas genéticamente idénticas. Distintas señales internas y externas regulan este proceso para que las células proliferen sólo en las condiciones más apropiadas. Uno de los puntos de control importantes, donde se coordina la proliferación con el crecimiento celular se encuentra en la fase G1 (punto de restricción). En este punto la célula comprueba que ha adquirido la masa y la maquinaria necesaria para la replicación del DNA. Las ciclinas D son moléculas que tienen un papel clave en la regulación de la fase G1. Las células de mamífero contienen genes que codifican para tres ciclinas tipo D altamente homólogas (D1, D2, D3), que se expresan de forma específica de tejido y se asocian a Cdk4 o Cdk6 para formar una proteína quinasa activa. Entre las tres ciclinas, la ciclina D1 es la más estudiada, ya que se encuentra sobreexpresada en muchos cánceres humanos. La expresión de ciclina D1 y su unión con Cdk4 representa uno de los acontecimientos más importantes, regulados por señales mitogénicas, necesarios para la progresión del ciclo celular a través del punto de restricción.

Las células inhiben la entrada en ciclo en la fase G1 principalmente por dos mecanismos distintos: la disminución de la expresión de ciclinas D y el aumento de las proteínas KIP que inhiben la actividad residual del complejo Cdk4/6-ciclina D. A pesar de alguna inconsistencia de origen metodológico, distintos estudios han observado la acumulación de la ciclina D1 en el citoplasma de células quiescentes o diferenciadas, sugiriendo la existencia de otros mecanismos que podrían regular la actividad de los complejos Cdk4-ciclina D1 a nivel de su localización núcleo-citoplasmática. Por otro lado, en nuestro laboratorio se había descrito un mecanismo de retención citoplasmática de Cln3, el homólogo funcional de ciclina D1 en

levadura de gemación, que regula la entrada en ciclo y juega un papel muy importante en la coordinación entre crecimiento y proliferación. Estos antecedentes nos llevaron a plantear, como hipótesis de trabajo de esta tesis doctoral, la existencia de un mecanismo de control de localización de ciclina D1 entre el núcleo y el citoplasma, que podría tener un papel relevante en situaciones de detención de la proliferación celular.

En este trabajo hemos demostrado que la ciclina D1 se localiza en el citoplasma de fibroblastos embrionarios de ratón quiescentes, y que además sucede por un mecanismo independiente del exporte por Crm1. De la búsqueda de interactores de ciclina D1 por dihíbrido y co-purificación hemos identificado la transloquina, una proteína cuya implicación ya se había descrito en el proceso de importe nuclear de FGF2. Además, durante nuestro trabajo observamos que FGF2 es un potente estimulador de la acumulación nuclear de ciclina D1. La sobreexpresión de transloquina inhibe la acumulación nuclear de ciclina D1 en células proliferando. En cambio, la inhibición de la expresión de transloquina causa un efecto opuesto, induce la acumulación nuclear de ciclina D1 y la fosforilación de RB por Cdk4 en células sometidas a condiciones de quiescencia.

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral hemos identificado un mecanismo de retención citoplasmática de la ciclina D1 en fibroblastos embrionarios de ratón, donde la transloquina juega un papel importante para mantener el estado de quiescencia celular. La transloquina y Cdk4 se unen y compiten por el mismo dominio de ciclina D1, y puesto que la formación del complejo Cdk4-ciclina D1 es un requisito previo para el importe nuclear, este hecho permite establecer una base molecular sencilla para el propio mecanismo de retención citoplasmática.

Summary

The cell cycle is the series of events by which the cell duplicates its contents and divides into two daughter cells identical genetically. This process is regulated by different external and internal signals allowing the cell to proliferate under suitable conditions. Higher eukaryotes control proliferation and growth in late *G1* at the restriction point, where they ensure that enough appropriate nutrients and extracellular mitogens are present to enter a new cell cycle and initiate DNA replication. D-type cyclins are a key target in the regulation of *G1* phase. Mammalian cells contain genes encoding three highly homologous D-type cyclins (D1, D2, D3) that associate in a tissue specific manner with either Cdk4 or Cdk6 to form an active protein kinase. Among them, cyclin D1 is the most studied because its overexpression is frequently present in human tumors. Mitogen-driven upregulation of cyclin D1 levels and assembly into active complexes with Cdk4/6 are key events for exit from quiescence and *G1* progression in mammalian cells.

Quiescent cells are thought to inhibit cell cycle entry mainly by two different mechanisms: downregulation of D-type cyclin expression and upregulation of KIP proteins to inhibit residual Cdk4/6-cyclin D activity. However, cytoplasmic accumulation of cyclin D1 in quiescent or differentiated cells has been observed in different instances, suggesting the existence of other mechanisms to control the nucleocytoplasmic distribution of cyclin D1 as a function of growth signals. On the other hand, we have previously characterized a cytoplasmic retention device that sequesters Cln3, the functional homologue of D-type cyclins in budding yeast, to regulate *G1* progression and cell size homeostasis. Thus, as the initial hypothesis of this doctoral thesis, we asked whether mammalian cells

control the nucleocytoplasmic distribution of cyclin D1 as a function of growth signals.

In this doctoral thesis we show that cyclin D1 is localized in the cytoplasm in quiescent mouse fibroblasts by a mechanism that does not involve the Crm1 exportin. We have screened for cyclin D1 interactors by two-hybrid and co-immunopurification strategies and we have identified translokin, a protein that interacts with FGF2 and facilitates its nuclear import. We have also observed that FGF2 treatment of quiescent cells causes nuclear accumulation of cyclin D1. Overexpression of translokin prevents proper cyclin D1 accumulation in the nucleus of proliferating cells. On the other hand, downregulation of translokin levels results in nuclear accumulation of cyclin D1 and causes Cdk4-dependent phosphorylation of RB in quiescent cells.

In summary, in the present doctoral thesis we show that cyclin D1 is also subject to an analogous but different cytoplasmic retention mechanism in quiescent mouse fibroblasts. We have identified translokin as an interactor of cyclin D1 that plays an essential role to inhibit its accumulation in the nucleus under quiescence conditions. As translokin interacts with cyclin D1 domains also needed for Cdk4 binding and subsequent nuclear import, we propose that translokin is an essential component of a cytoplasmic retention mechanism of cyclin D1 that prevents cell cycle entry during cellular quiescence.

Agraïments

Em semblava que no arribaria mai el moment d'escriure els agraïments i ja hi sóc. He de donar tantes gràcies que no sé com fer-ho. Espero que amb aquestes paraules us pugui transmetre tot el que m'heu ajudat durant aquest anys. Però, de totes maneres, encara queda el més dur: fer una bona defensa de la tesi.

En primer lloc vull donar les gràcies al Martí Aldea, per dirigir la tesi, per donar-me l'oportunitat de realitzar-la i per haver après tant al teu costat. A la Neus Colomina per ajudar-me en tots els experiments i per animar-me amb els resultats per petits que fossin, negatius o positius. Sempre recordaré la teva frase: "Maria, aquest resultat és de llibre". A la Carme Gallego, per endinsar-me en el món dels cultius sobretot quan vaig arribar. A l'Eloi Garí, un di-híbrid sense tu no seria possible. Al Paco Ferrezuelo pels seus acudits tant dolents. Al Jordi Torres, qui admiro per haver arribat tan lluny sent tant jove.

Després de donar les gràcies al laboratori dels "jefes" continuo pel laboratori dels *mindundis*. Neus P. no et pensis que m'oblido de tu, també ets una *mindundina*. Gràcies Pos per ajudar-me en tots els meus dubtes, amb els cultius i per les xerrades sobre els nostres petitots. Al Marcel·lí, el metge de *CYC*, sempre ens has solucionat tots els nostres problemes. A la Rita, amb qui comparteixo la ciclina D1 i qui sempre es preocupa per mi. A la Marta, per les seves frases tan divertides i per les xerrades del Sergi i el Marc. Al Sera, per fer-me riure tant i tant i per explicar-me moltes xafarderies. A la Isis, petita bruixa, compartir taulell amb tu ha estat fantàstic. Em vaig sentir molt trista quan vaig tornar de la baixa de maternitat i ja havies marxat cap a la teva estimada BCN. A la Sònia, que t'he de dir!, gràcies per tantes coses, per donar-me la teva amistat des del principi, per escoltar-me sempre, per donar-me tants consells. Per mi

sempre seràs com una germana. Però sobretot, *mindundis*, gràcies per ser els meus amics.

Tampoc vull oblidar-me de l'Emili, amb qui vaig compartir taulell a l'inici d'aquesta tesi (eres una mica desastrós!). A la Rana, per ser tan feliç. A les dues últimes adquisicions del laboratori, la Siba i el Galal, amb qui he compartit poc temps, però sempre han estat molt amables amb mi. A la Núria Brunet, per les nostres grans converses, què farem després de la tesi?

També vull donar les gràcies a tota la gent del departament de CMB que m'han ajudat en algun moment o que hem compartit l'hora de dinar.

Per altra banda, agraeixo al Xavier Matias-Guiu qui ha confiat amb mi per iniciar el nou projecte del Biobanc. A tots els meus nous companys de l'IRBLleida per fer tan fàcil la meva adaptació (la Sònia, la Irene, la Katia, l'Oriol, el Josep Maria, el Joan, la Montse, la Carolina, l'Anais) i al'Ana i la Dolors del laboratori de genètica molecular. Gràcies també a l'Eugeni, per ajudar-me en tot moment. *Gracias Manu por pensar en mi (gracias de todo corazón)*.

No sé que faria aquí sense la meva estimada gran família i sense el meu poble, l'Albi. Vull donar tantíssimes gràcies als meus pares per estimar-me tant, per estar sempre al meu costat, per recolzar-me en tot moment i per estar sempre disposats a cuidar al Marc. *Gracias papá por decirme en todo momento: "estudia mucho que el saber no ocupa lugar"*. Gràcies mare per tots els *tapers* de dinar. Al meu germà, a la Sílvia i a les dues petites (l'Anna i la Laura), és tant divertit estar amb vosaltres... A la resta de família de l'Albi, als meus padrins qui m'han cuidat molts estius, als meus tiets, cosins i cosinets (ara ja en són 15 de petits!). A la colla, amb qui he compartit tants dinars, sopars i hem fet grans rialles. A l'Eva i el Lluís, i al Llorenç i la Bea, pels sopars a les nostres cases i per tots els dissabtes a la

nit, que ara ja són impossibles!!!. A tu Bea, sempre amb una gran rialla, gràcies per confiar amb mi i per ser una gran amiga.

A la Patri i l'Isabel, les meves millors amigues de la facultat, amb qui puc confiar en tot moment per molt lluny que estiguin (com tu Patri, a Alemanya o al Canadà). A la Vane, a qui admiro per la seva gran valentia en moments molt durs.

Als meus sogres per estimar-me com una filla més i sempre estar disposats a ajudar-me. Al meu sogre, qui em va donar l'anunci del diari per fer la tesi doctoral (sense ell potser no l'hauria fet). Als meus cunyats l'Araceli i el Quico i els petits l'Àlex i l'Eva per tantes alegries.

He deixat pel final, als meus grans amors, el Tarragó i el Marc. Gràcies Ta per fer-me tan feliç, per estimar-me, per recolzar-me, per fer-me veure les coses des de diferents punts de vista, per riure tant i també plorar, per estar al meu costat tant en els bons com en els mals moments i per aguantar-me en la recta final de la tesi. Però, sobretot, gràcies per compartir el que més estimem en aquesta vida, el nostre fill Marc. Gràcies ratolinet, per totes les abraçades que em dones quan arribo de treballar, per les teves rialles i per aprendre tan al teu costat (és tan gratificant veure com et vas fent gran, vas aprenent i com et fas entendre!!!!) El més bonic que hi ha en aquesta vida és estimar-vos i sentir-me estimada. Moltes gràcies per estar al meu costat.

Gràcies a tots!

INTRODUCCIÓ

1. Cicle cel·lular

El cicle cel·lular és el conjunt d'esdeveniments ben ordenats que permeten a la cèl·lula donar lloc a dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. El cicle coordina tots els esdeveniments necessaris pel creixement de les cèl·lules, assegurant-se que tot succeeixi en la seqüència temporal correcta. A més, rep diversos senyals que regulen aquest procés per a que la cèl·lula proliferi només en les condicions apropiades i d'un entorn adequat. Aquest cicle (**figura 1**) està format per quatre fases: la fase G1 o primer intermedi (*gap 1*), la fase S, la fase G2 o segon intermedi (*gap 2*), i la fase M o mitosi (Vermeulen et al., 2003; Morgan, 2007).

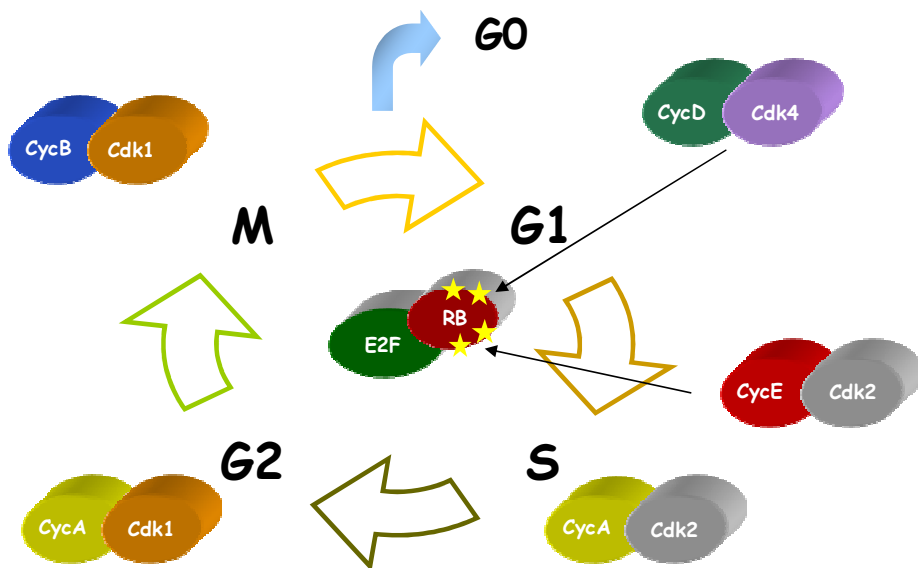


Figura 1. Diferents complexos Cdk-ciclina juguen papers importants en cada fase del cicle cel·lular. La principal funció dels complexos Cdk4-ciclina D i Cdk2-ciclina E al final de la fase G1 i durant la transició G1/S és fosforilar la proteïna RB per alliberar el factor de transcripció E2F, el que causa una onada d'activació transcripcional amb el propòsit final d'activar els orígens de replicació i executar així la duplicació del DNA.

INTRODUCCIÓ

En la fase M és on es dona la segregació dels cromosomes entre les dues cèl·lules filles i la divisió cel·lular (citocinesi), que correspon a la divisió dels components nuclears i citoplasmàtics per ser finalment distribuïts en les dues cèl·lules filles. En la fase S es dona la replicació del DNA. Les dues fases intermèdies G1 (abans de la fase S) i G2 (després de la fase S) són importants ja que en aquests períodes la cèl·lula es prepara per la replicació del DNA (G1) i per la divisió cel·lular (G2).

1.1. Sistemes de control

La transició a través del cicle cel·lular està altament regulada per diversos sistemes de control. Els principals components d'aquests sistemes de control són uns enzims anomenats quinases dependents de ciclins (Cdks). Com altres proteïna quinases, les Cdks catalitzen la unió covalent dels grups fosfat de l'ATP a les proteïnes substrat. Aquesta fosforilació provoca canvis en l'activitat dels substrats o la interacció amb altres proteïnes. D'altra banda, l'activitat de les Cdks va oscil·lant al llarg del cicle cel·lular provocant canvis en la fosforilació dels components de la maquinària de control i, per tant, l'inici de les diferents fases del cicle cel·lular (Norbury and Nurse, 1992).

L'activitat de les Cdks es modula per la unió a proteïnes reguladores anomenades ciclins, per fosforilació i per la unió a proteïnes inhibidores de Cdks (Sherr and Roberts, 1995).

Les oscil·lacions en els canvis d'activitat de les Cdks són degudes principalment a les variacions en els nivells de les ciclins. Durant les fases del cicle es van sintetitzant diferents tipus de ciclins que formen diferents complexos Cdk-ciclina amb funcions específiques per a cada fase del cicle cel·lular (Morgan, 1997).

El primer punt de control es troba en la fase *G1* (punt de restricció) on s'assoleix un nivell d'activació dels complexos Cdk-ciclina *G1* suficient per a executar l'entrada en cicle només si les condicions són ideals per la proliferació cel·lular (Sherr, 1993; Reed, 1992). L'activació dels complexos provoca la fosforilació de proteïnes necessàries per l'inici de la replicació del DNA, la duplicació dels centrosomes i altres esdeveniments. Finalment les Cdk de la fase *G1/S* i fase *S* promouen l'activació dels complexos Cdk-ciclina de la fase *M* els quals porten al segon punt de control en la transició *G2/M* (*G2/M checkpoint*). Aquests complexos provoquen la unió del fus i porten a la cèl·lula cap a la metafase. El tercer punt de control és la transició entre la metafase i anafase on es dona la segregació de les cromàtides germanes en la mitosi i citocinesi per obtenir finalment les dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. El pas a través d'aquest punt de control es dona quan els complexos Cdk-ciclina de la fase *M* estimulen un enzim anomenat APC (complex promotor de l'anafase), que destrueix proteolíticament les ciclins i proteïnes importants per la unió de les cromàtides germanes. L'activació d'aquest enzim desencadena la separació i segregació de les cromàtides germanes. Totes les Cdk són inactivades per la destrucció de les ciclins, permetent a determinades fosfatases defosforilar els substrats de les Cdk. Aquesta defosforilació és important per poder finalitzar completament la mitosi i la citocinesi (Norbury and Nurse, 1992).

Les cèl·lules entren en un nou cicle cel·lular quan reben els senyals intracel·lulars i extracel·lulars adequades, i aquest control té lloc normalment en la fase *G1*. Això assegura que l'entrada en el cicle cel·lular només es dona quan existeixen les condicions ambientals apropiades. En cas contrari, les cèl·lules s'aturen normalment en *G1* deixant de dividir-se i entren en la fase *G0* (Morgan, 2007).

1.2. La fase G1

La fase G1 del cicle cel·lular és la fase més sensible als senyals extracel·lulars (Sherr, 1994). Quan les cèl·lules entren en la fase G1 adquireixen la massa i la maquinària necessària per la replicació del DNA. Els complexos Cdk4-ciclina D són els responsables de la regulació de la fase G1. Les cèl·lules de mamífer contenen gens que codifiquen per 3 ciclins de tipus D altament homòlogues (D1, D2, D3) (Sherr, 1995), que s'expressen de manera específica de teixit (Matsushime et al., 1991; Xiong et al., 1991; Sherr, 1995) i s'associen a Cdk4 o Cdk6 per formar una proteïna quinasa activa (Matsushime et al., 1994; Bockstaele et al., 2006). D'aquestes tres ciclins la ciclina D1 és la més estudiada ja que es troba freqüentment superexpressada en molts càncers humans. La seva regulació està controlada a nivell transcripcional, post-transcripcional i traduccional. L'expressió de ciclina D1 i la seva unió a Cdk4 representa un dels esdeveniments més importants, regulats per mitògens, necessaris per la progressió del cicle cel·lular a través del punt de restricció. Tant per l'expressió de ciclina D1 com per la seva unió a Cdk4 és necessària l'activació de proteïna quinases per senyals extracel·lulars (Cheng et al., 1998; Weber et al., 1997; Albanese et al., 1995; Lavoie et al., 1996; Winston et al., 1996; Aktas et al., 1997; Kerkhoff and Rapp, 1997). La proteòlisi de ciclina D1 i la seva localització cel·lular també ve determinada per factors de creixement (Diehl et al., 1997; Diehl et al., 1998). Com la majoria de les ciclins, la ciclina D1 és una proteïna molt làbil amb un temps de vida mitja entre 20-30 minuts (Matsushime et al., 1991). Tant la poliubiquitinització com l'export nuclear de ciclina D1 depèn de la fosforilació en un residu treonina específic (T286), localitzat a prop de l'extrem C-terminal, per la quinasa glicogen sintasa 3 β (GSK-3 β). Els factors de creixement modulen l'activitat de GSK-3 β i la localització a través de la via de senyalització Ras, PI3K i Akt. Akt

fosforila GSK-3 β en S9 disminuint la seva activitat catalítica. GSK-3 β és exclosa del nucli durant la fase G1 però en la fase S del cicle torna a entrar al nucli per tenir accés al complex Cdk4-ciclina D1 i poder fosforilar la ciclina D1 (Alt et al., 2000; Diehl et al., 1997; Diehl et al., 1998). Una vegada fosforilada, l'exportina nuclear CRM1 transporta la ciclina D1 al citoplasma per a ser degradada via ubiquitinització.

La quinasa dependent de ciclina D1 realitza dues funcions importants a través del punt de restricció. La primera funció és catalítica i involucra la inactivació per fosforilació de la proteïna retinoblastoma (RB) (Kato et al., 1993). Aquesta fosforilació provoca l'alliberació dels factors de transcripció E2F que eren inhibits per RB i així activa gens necessaris per la transició G1/S i per la fase S, com per exemple la mateixa ciclina E. La segona funció és el segrest per titulació de membres de la família de proteïnes inhibidores CIP/KIP, el que facilita l'activació de complexos Cdk2-ciclina E i, per tant, promou l'entrada a la fase S on es dona la replicació del DNA. La unió de les proteïnes CIP/KIP als complexos de ciclina D1 no té sempre un efecte inhibidor sinó que facilita la unió de ciclina D1 a Cdk4 i assegura la localització nuclear inhibint l'export de ciclina D1 durant la fase G1 del cicle cel·lular (Alt et al., 2002; Sherr and Roberts, 2004).

2. Molècules implicades en la fase G1 del cicle

2.1. Ciclines

Les ciclines són una petita família de proteïnes que es caracteritzen per la seva unió i activació de les Cdks. La concentració de la majoria de les ciclines varia durant el cicle cel·lular provocant oscil·lacions en l'activitat i especificitat de les Cdks i, per tant, controlant els esdeveniments del cicle. La concentració de les ciclines està principalment regulada per l'expressió dels gens de ciclina i per la seva destrucció proteolítica. Hi ha quatre

INTRODUCCIÓ

classes de ciclines involucrades en el control del cicle: ciclines G1, ciclines G1/S, ciclines S, i ciclines M (Roberts, 1999).

Les ciclines G1 (Cln3 en llevat i ciclina D en vertebrats) coordinen el creixement cel·lular i l'entrada a un nou cicle a través del punt de restricció. Els seus nivells augmenten en resposta a senyals externs i interns de creixement cel·lular (Sherr, 1994; Sherr, 1995). Les ciclines G1/S (Cln1 i Cln2 en *S.cerevisiae* i ciclina E en vertebrats) oscil·len durant el cicle, augmentant al final de G1 i disminuint un cop iniciada la fase S. La principal funció dels complexos Cdk-ciclina en G1/S és desencadenar el pas a través del primer punt de control per iniciar els esdeveniments necessaris per l'inici de la replicació del DNA, principalment inhibint sistemes que eviten l'activitat de la Cdk de la fase S. Junt amb l'augment de les ciclines G1/S també apareixen les ciclines S (Clb5 i Clb6 en llevat i ciclina A en vertebrats) que al formar el complex amb les respectives Cdk esdevenen els responsables directes de la replicació del DNA. Els nivells d'aquestes ciclines són constants durant la fase S, G2 i el principi de la mitosi. La concentració de les ciclines de la fase M augmenta quan la cèl·lula s'apropa a la mitosi. Aquests complexos són responsables dels esdeveniments en la mitosi. La seva destrucció porta a la finalització de la mitosi i la citocinesi.

Tot i tenir variacions en la seva estructura primària totes les ciclines tenen una estructura terciària similar coneguda com "cyclin fold" formada per dos dominis que cadascun d'ells conté cinc hèlices α . El primer domini de cinc hèlices correspon a la caixa ciclina conservada entre totes elles, per on s'uneixen i activen a la Cdk (Brown et al., 1995). En particular, la cinquena hèlix contacta molt estretament amb l'hèlix PSTAIRE de la Cdk i, com veure'm més endavant, l'activa produint canvis profunds en la seva conformació.

2.2. Quinases dependents de ciclina (Cdks)

Les quinases dependents de ciclina (Cdk) són una família de serina-treonina proteïna quinases (34-40 kDa) que contenen un centre catalític sotmès a una regulació molt especial. Prop d'aquest centre s'uneix la subunitat reguladora, la ciclina. Per la plena activació del complex Cdk-ciclina es necessita la fosforilació de residus treonina que es troben al llaç T, també prop del centre actiu de la Cdk (Honda et al., 2005; De Bondt et al., 1993). Originàriament les Cdks es van identificar com a enzims que controlen els esdeveniments del cicle cel·lular, però hi ha membres de la família de les Cdks que estan involucrats en altres processos cel·lulars. Les cèl·lules animals contenen almenys 9 Cdks on només quatre (Cdk1, 2, 4 i 6) estan involucrades directament en el control del cicle cel·lular. Un altre membre de la família Cdk7 també contribueix al control del cicle indirectament actuant com a quinasa (CAK) que fosforila i activa altres Cdks (Harper and Elledge, 1998). Les Cdks 7, 8 i 9 són components importants en la transcripció per la RNA polimerasa II i la Cdk5 està involucrada en el control de diferenciació de les cèl·lules nervioses.

En *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* tots els esdeveniments del cicle estan controlats per una sola Cdk. En *S. pombe* s'anomena Cdc2 i en *S. cerevisiae* Cdc28. En eucariotes multicel·lulars el control del cicle és governat per al menys dues Cdks, Cdk1 i Cdk2, que actuen en la fase M i fase S respectivament. En cèl·lules animals també hi participen dues Cdks addicionals (Cdk4 i Cdk6), que són importants en la regulació de l'entrada en cicle en resposta a factors extracel·lulars. La funció de la Cdk ha estat ben conservada durant l'evolució ja que, per exemple, si en cèl·lules de llevat es bescanvia la seva Cdk per una Cdk humana, aquestes poden proliferar amb normalitat.

INTRODUCCIÓ

Les Cdk's realitzen la seva funció en el cicle per mitjà de la fosforilació d'un gran nombre de proteïnes. Aquestes proteïnes són fosforilades en residus serina o treonina en una seqüència específica que és reconeguda pel lloc actiu de la Cdk. Aquesta seqüència específica està formada per la serina (S) o treonina (T) que serà fosforilada seguida d'una prolina (P) i, normalment, d'un aminoàcid qualsevol (X) i un aminoàcid bàsic lisina (K) o arginina (R), dues posicions després del residu diana, donant lloc a la seqüència consens [S/T*][PX][K/R] (Russo et al., 1996).

Les Cdk's tenen una estructura terciària formada per dos lòbuls: un petit lòbul N-terminal format per làmines β i un gran lòbul C-terminal format per hèlices α . Entre aquests dos lòbuls s'uneix l'ATP i posteriorment s'hi unirà el substrat. En estudis cristal·logràfics de la proteïna Cdk2 humana s'ha vist que entre els dos lòbuls hi ha un llaç flexible anomenat T-loop que bloqueja la unió a la proteïna substrat. A més quan la Cdk és inactiva hi ha diversos aminoàcids amb una posició incorrecta que evita la reacció de transferència de fosfat de l'ATP. Per tant, perquè la Cdk sigui activa necessita diversos canvis estructurals. En el control de l'activitat de la Cdk estan involucrades dues hèlices α , una altament conservada amb un consens PSTAIRE i una altra hèlix més curta. Quan la ciclina s'uneix a la Cdk aquestes dues hèlices modifiquen llur posició contribuint de forma molt important als canvis estructurals que activen la Cdk (De Bondt et al., 1993; Honda et al., 2005). Com mostra la **figura 2**, la rotació de l'hèlix PSTAIRE orienta adequadament determinats aminoàcids en el centre actiu de la quinasa. Endemés, l'altra hèlix es fon i permet el desplaçament del T-loop obrint l'accés al centre actiu.

En l'estudi cristal·logràfic del complex Cdk4-ciclina D1 la quinasa dependent de ciclina D1 (Cdk4) també està formada per aquests dos lòbuls ja esmentats. El lòbul N-terminal (residus 1-96) està format principalment

per 5 làmines β i per l'hèlix PISTVRE (αC en **figura 3**) on s'uneix la ciclina D1, mentre que el lòbul C-terminal (residus 97-303) està format principalment per hèlices α .

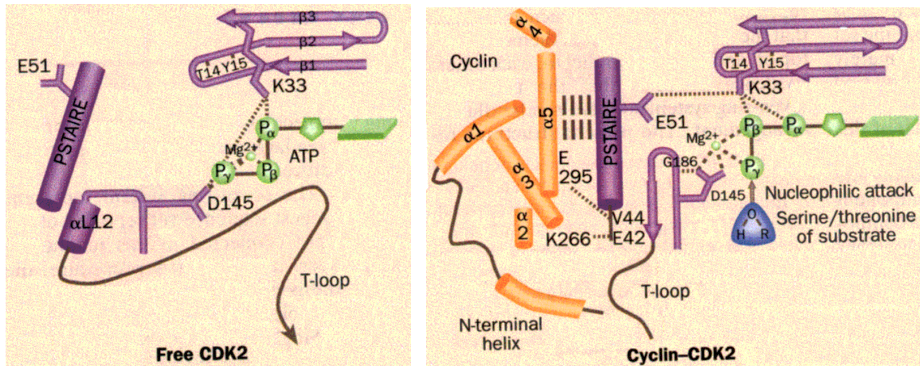


Figura 2. Canvis conformacionals induïts per la interacció entre Cdk2 i ciclina E. La interacció entre l'hèlix $\alpha 5$ de la ciclina i l'hèlix PSTAIRE de Cdk2 causa una rotació d'aquesta darrera hèlix que orienta adequadament determinats aminoàcids en el centre actiu de la quinasa. Endemés, l'hèlix $\alpha L12$ de Cdk2 es fon i permet el desplaçament del T-loop obrint l'accés al centre actiu. Tret de Jeffrey et al. (1995).

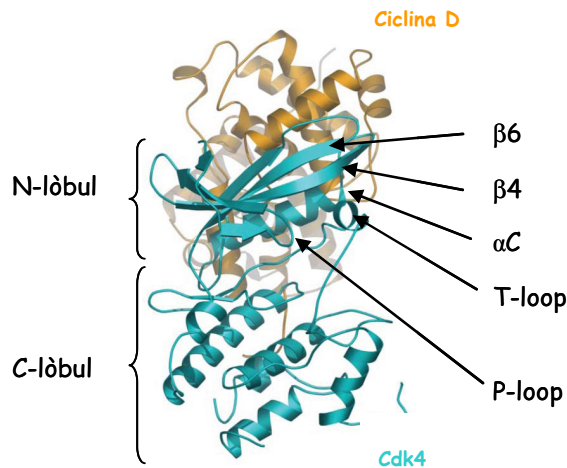


Figura 3. Estructura del complex Cdk4 i ciclina D1 S'indiquen els dos lòbuls (N i C terminal) de la Cdk4, així com trets estructurals importants del centre actiu. Tret de Day et al. (2009)

INTRODUCCIÓ

Per a l'activació de *Cdk4* es necessita la unió de la ciclina i la fosforilació del residu T172 en el *T-loop* per la quinasa activadora de *Cdks* (CAK). Tot i així, la conformació que adquireix el complex no és suficient per aconseguir una total activació (Day et al., 2009). Aquesta important qüestió es tractada amb més detall més endavant.

3. Ciclina D1

3.1. Control transcripcional de ciclina D1

Els nivells de ciclina D1 són incrementats durant la transició *G0/G1* per l'estimulació de factors mitogènics (Matsushime et al., 1991). La inducció de la ciclina D1 per mitògens té lloc mitjançant l'activació d'una classe de proteïnes serina-treonina quinases anomenades proteïna quinases activades per mitògens (MAPKs) o quinases regulades per senyals extracel·lulars (ERKs) (Filmus et al., 1994; Chang and Karin, 2001). Aquesta via involucra seqüencialment la proteïna d'unió a GTP Ras i la proteïna quinasa Raf-1 que fosforila les quinases MAPK/ERK (MEKs), que a la vegada activen les ERKs per induir llur translocació nuclear i l'activació de l'expressió dels gens diana. La inactivació de Ras provoca una disminució dels nivells de ciclina D1 (Aktas et al., 1997; Peeper et al., 1997), i s'ha demostrat que aquesta senyalització està implicada en la regulació de la ciclina D1 per dues vies (Lavoie et al., 1996). L'activitat del promotor de ciclina D1 és estimulat per la superexpressió de les MAPKs o les seves dianes c-Ets 2 o AP-1, mentre que l'activació transcripcional per EGF és reduïda per inhibidors de la proteïna MAPKs i Ets (Albanese et al., 1995). Ras també activa la via de senyalització PI3 quinasa (PI3K), que a través de la proteïna quinasa B (PKB o Akt) regula la transcripció de la ciclina D1. A més, aquesta via també regula l'estabilitat de la ciclina per mitjà de la inhibició de GSK-3 β (veure més endavant). La via de senyalització Ras és

també important per l'associació de la ciclina D1 amb Cdk4 (Cheng et al., 1998). La via de senyalització de les MAPKs pot estimular l'expressió de factors de transcripció AP-1 que inclou membres de la família Fos, Jun i ATF (Balmanno and Cook, 1999; Shaulian and Karin, 2001). El promotor de la ciclina D1 humana conté un lloc consensu AP-1 que és regulat per Fos i Jun (Albanese et al., 1995; Shen et al., 2007). Jun pot formar un complex amb ATF2 per regular l'element de resposta a AMP cíclic (CRE). ATF2 forma un complex amb la proteïna d'unió a CRE i junts estimulen l'activitat del promotor de la ciclina D1.

Diferents factors de transcripció com les proteïnes STAT (Matsumura et al., 1999), NF- κ B (Guttridge et al., 1999), Egr-1 (Yan YX et al., 1997), Ets (Albanese et al., 1995), Rac (Joyce et al., 1999) i receptors nuclears s'han trobat que activen el promotor de ciclina D1.

La β -catenina també activa la transcripció de ciclina D1 a través de la via Wnt per l'activació dels llocs d'unió a TCF/LEF (Shtutman et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999). En absència de Wnt, β -catenina forma part del complex d'axina on GSK-3 β la fosforila per ser degradada via proteasoma. En canvi, quan Wnt s'uneix al seu receptor Frizzled, s'activa la proteïna Dvl, un antagonista de GSK-3 β , que permet una acumulació citoplasmàtica de β -catenina. Així, la proteïna acumulada al citoplasma es transloca al nucli on s'uneix als factors de transcripció Tcf/Lef per estimular l'expressió de gens com la ciclina D1. D'altra banda, Notch a través del factor de transcripció CSL també activa el promotor de la ciclina D1 (Stahl et al., 2006).

Les citoquines també estimulen l'expressió del gen de ciclina D1. Aquestes s'uneixen a receptors de la superfície cel·lular i inicien la senyalització a través de la via JAK-STAT. En concret, les citoquines activen l'activitat del promotor de ciclina D1 via STAT3 i STAT5

INTRODUCCIÓ

(Matsumura et al., 1999; Mishra and Das, 2005; Leslie et al., 2006; Wang et al., 2007; Gu et al., 2008).

A més d'aquest factors solubles la matriu extracel·lular (ECM) també té un paper important en regular l'expressió de la ciclina D1. Les proteïnes de la ECM com el col·lagen, la fibronectina i la vitronectina activen les quinases d'adhesió focal (FAK). Les FAK poden estimular les ERKs i activar la transcripció per AP-1 i Ets-B. FAK també pot activar el promotor de la ciclina D1 pel factor de transcripció KLF8 (Kruppel like factor 8) (Assoian and Klein, 2008; Kothapalli et al., 2008).

Finalment, hi ha factors que també estimulen l'expressió de ciclina D1 d'una manera específica de teixit i per vies especialitzades (Tan et al., 2006; Itoh et al., 2008).

Diferents repressors transcripcionals han estat descrits que inhibeixen el promotor de la ciclina D1. Per exemple, jumonji (Jmj o JARID2), la proteïna SIP1 i Oct-1. En neurogènesi i en la proliferació de miòcits cardíacs el factor de transcripció Jmj inhibeix l'expressió de la ciclina D1 (Takahashi et al., 2007; Toyoda et al., 2003). Oct-1 pot inhibir o induir l'expressió de ciclina D1. En cèl·lules epitelials sembla que l'eliminació de Oct-1 indueix l'expressió de la ciclina. Oct-1 pot formar un complex amb CREB per activar el gen de la ciclina D1 a través de CRE. En aquest cas Oct-1 no s'uneix directament al gen de la ciclina D1 sinó que actua com co-activador de CREB.

La repressió de la transcripció de la ciclina D1 és molt important per mantenir l'estat de quiescència i per evitar la proliferació cel·lular descontrolada (Ciciatello et al., 2004). Un nombre de factors de transcripció s'han descrit com a supressors de tumors per tenir la capacitat d'inhibir la transcripció del gen de ciclina D1 i la progressió del cicle cel·lular com, per exemple, CSL, ATF3, SMAR1 (scaffold matrix-associated region-

1), ZO-2 (zona occludens 2) i p53. CSL també actua com inhibidor i pot actuar com activador com ja hem comentat anteriorment a través de Notch (Proweller et al., 2006). ATF3 és un membre de la família AP-1 que s'indueix per estrés i s'uneix al promotor de ciclina D per reprimir la transcripció. El *knock out* de ATF3 mostra un augment del creixement de MEFs per formar colònies que creixen en agar (Lu et al., 2006). SMAR1 inhibeix la transcripció del gen de ciclina D1 per unió al complex repressor HDAC (Rampalli et al., 2005). El proto-oncogen myc pot formar un complex amb la proteïna ZO-2 i inhibir la transcripció de ciclina D1 (Huerta et al., 2007). Finalment, p19ARF també actua com repressor del gen de ciclina D1 (D'Amico et al., 2004).

3.2. Proteòlisi de la ciclina D1

Els nivells de la proteïna ciclina D1 estan regulats per un mecanisme dependent d'ubiquitinització a través de la progressió del cycle cel·lular. La ciclina D1 és una molècula molt inestable i és degradada via proteasoma. En general la degradació de les proteïnes pel sistema ubiquitina-proteasoma involucra l'activació seqüencial dels enzims relacionats amb la ubiquitina: l'enzim d'activació dependent d'ATP (E1), l'enzim conjugador d'ubiquitina (E2) i la lligasa que reconeix el substrat (E3). Les ubiquitin lligases E3 tenen especificitat de substrat i poden ser una única proteïna o un complex multiproteic. Dues classes diferents de lligases E3 participen en la regulació de la progressió del cycle cel·lular. La primera classe és la família de proteïnes d'ubiquitin lligases E3 Skp1/Cul1/F-box (SCF), que són mediadores de la degradació de les proteïnes involucrades en la transició G1-S. L'altra classe de lligases E3 constitueix el complex promotor d'anafase que principalment participa en la transició G2-M (Takahashi-Yanaga and Sasaguri, 2007).

INTRODUCCIÓ

Els nivells de ciclina D1 augmenten moderadament durant la transició *G0/G1* i es mantenen mes o menys baixos i constants al llarg del cicle cel·lular gràcies a diferents mecanismes de degradació. Per exemple, la degradació de la ciclina és molt important per la replicació del DNA ja que una superexpressió evita l'entrada en la fase S en fibroblasts (Fukami-Kobayashi and Mitsui, 1999; Pagano et al., 1994). S'ha demostrat que la superexpressió de la ciclina D1 inhibeix la proliferació cel·lular a través de la unió a PCNA i Cdk2. Estudis per Diehl et al. (1997) van demostrar que la degradació de la ciclina D1 via ubiquitina-proteasoma és dependent de la fosforilació en la posició T286. La fosforilació és augmentada per la unió a Cdk4 i a més la mutació T286A augmenta molt l'estabilitat de la ciclina. Aquests estudis també van demostrar que la Cdk4 no és necessària per a la fosforilació de la T286, indicant la implicació d'una quinasa addicional. Diehl et al. (1998) van identificar la proteïna GSK-3 β per la seva capacitat de fosforilar la ciclina D1 en la T286 i induir la seva degradació en resposta a senyals mitogènics. A més, GSK-3 β provoca la redistribució de la ciclina D1 del nucli al citoplasma com comentarem en el següent apartat. Guo et al. (2005) van confirmar el paper de la T286 en la degradació de ciclina D1 en la fase S i també van demostrar que els nivells de la proteïna fosforilada eren elevats durant aquesta fase del cicle. Hi ha evidències experimentals que indiquen que la degradació de ciclina D1 no és només dependent de GSK-3 β com, per exemple, en cèl·lules de càncer de mama MCF-7, on la inhibició de l'activitat de GSK-3 β no evita una degradació de ciclina D1 per ubiquitinització (Alao et al., 2006b; Germain et al., 2000). De la mateixa manera un mutant de ciclina D1 que no pot unir-se a Cdk4 (ciclina D1 KE) també és ubiquitinitzat. Totes aquestes evidències porten a pensar que hi ha altres mecanismes involucrats en la degradació de la ciclina D1 independentment de la T286.

Hi ha altres motius involucrats en la degradació de la ciclina D1 (figura 4). La caixa de destrucció R29-X-X-L32 situada en l'extrem N-terminal (X correspon a qualsevol aminoàcid) té un paper important en la degradació de la ciclina D1 per radiació ionitzant. La E3 lligasa responsable de la proteòlisis és APC/C però podria no ser important en la degradació relacionada amb el cicle (Agami and Bernards, 2000).

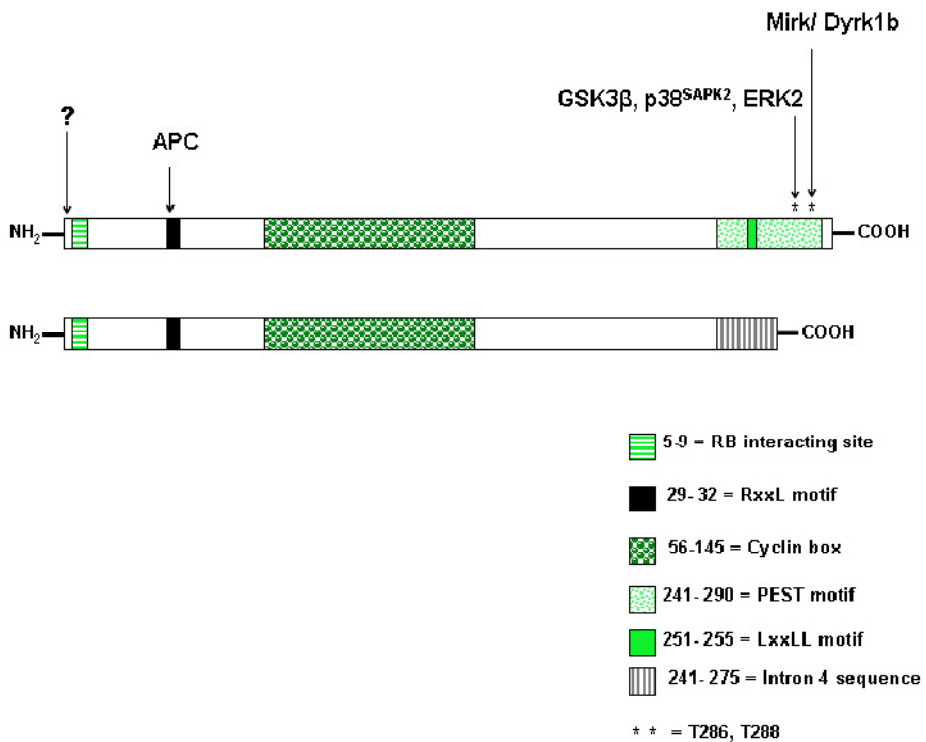


Figura 4. Representació esquemàtica dels llocs importants per la degradació de la ciclina D1. El motiu RxxL és necessari per la degradació via APC per radiació ionitzant (Agami and Bernards, 2000). GSK-3 β fosforila la T286 i regula l'export nuclear de ciclina D1 i l'estabilitat (Diehl et al., 1998; Alt et al., 2000). p38SAPK2 i ERK2 també regulen l'estabilitat de la ciclina D1 fosforilant T286 (Okabe et al., 2006; Casanovas et al., 2000; Thoms et al., 2007). La quinasa Mirk/Dyrk1b fosforila la T288 (Zou et al., 2004) regulant l'estabilitat de la ciclina D1. Tret de Alao (2007).

INTRODUCCIÓ

Un altre residu important és la T288 identificada per Zou et al. (2004). Aquests autors van descriure que un membre de la família DYRK (DYRK1B) fosforila la ciclina D1 en aquesta posició provocant la seva degradació. Dyrk1b és una serina/treonina quinasa que es troba al nucli i s'expressa en el múscul esquelètic i en certes línies cel·lulars derivades de carcinomes però no es detecta en molts teixits normals. Aquesta proteïna és activa en la fase G0 i a l'inici de G1. La inhibició de Dyrk1b provoca un augment en els nivells de ciclina D1 però no afecta als nivells de mRNA. A més pot fosforilar la ciclina en presència de LiCl, un inhibidor de GSK-3 β . GSK-3 β i Dyrk1b podrien cooperar per regular els nivells de ciclina D1. La quinasa Dyrk1b és activa principalment en G0/G1, per tant, podria regular els nivells de ciclina D1 en situacions on no hi hagués activitat GSK-3 β .

Casanovas et al. (2000) van demostrar que l'estrès osmòtic també regula l'estabilitat de la ciclina D1 depenent de la proteïna quinasa p38SAPK. Endemés de regular negativament la seva expressió a nivell transcripcional, p38SAPK fosforila la ciclina D1 *in vitro* en la T286 i augmenta la seva degradació via ubiquitina-proteasoma. S'ha vist que les cèl·lules que superexpressen p38SAPK redueixen els nivells de ciclina D1, mentre que el bloqueig de l'activitat de p38SAPK per un inhibidor específic augmenta la transcripció de ciclina D1 i els nivells de la proteïna.

La ciclina D1 és degradada mitjançant SCF, una lligasa citoplasmàtica del tipus E3. S'ha descrit que el complex SCF (Fbx4/ α B-crystallin) és el responsable de la ubiquitinització de la ciclina D1 (Barbash et al., 2007; Lin et al., 2006). α B-crystallin és una xaperona molecular que es va descriure com una proteïna que s'uneix a FBX4 per promoure la ubiquitinització de diferents substrats. FBX4 pertany a la família de proteïnes F-box i necessita α B-crystallin per reconèixer la ciclina D1. S'ha demostrat també que l'expressió del complex SCF (Fbx4/ α B-crystallin) és

reduït en línies tumorals provocant una estabilització i superexpressió de la ciclina D1. També s'ha implicat la ubiquitin lligasa SCF (SKP2) en la degradació de ciclina D1 ja que una regulació negativa de SKP2 provoca una acumulació de ciclina D1, tot i que no hi ha evidències d'una ubiquitinització mediada per SKP2. El complex SKP2-CSK1 és el responsable de la ubiquitinització de p27 fosforilat en T187 (Bornstein et al., 2003; Ganoth et al., 2001).

En un altre estudi fet per Okabe et al. (2006) s'ha identificat una altra lligasa E3 FBXW8 responsable de la ubiquitinització de la ciclina D1 en cèl·lules cancerígenes. FBXW8 interacciona amb la ciclina D1 de manera depenent de la fosforilació de la T286. Aquest estudi també identifica la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK) ERK2 com una nova quinasa capaç de fosforilar la ciclina D1 en la T286. Per la fosforilació de la ciclina la quinasa ERK2 necessita un domini D conservat dins de la ciclina (residus 173-193). La presència de la quinasa ERK2 facilita la ubiquitinització de la ciclina D1 per FBXW8. A més, la mutació de la T286 per una alanina o la deleció del domini D elimina aquesta activitat. A diferència del complex Fbx4/ α B-crystallin, FBXW8 s'expressa clarament en diferents línies cel·lulars cancerígenes.

A més d'aquestes dues proteïnes F-box (Fbx4 i FBXW8) també s'ha identificat una altra proteïna F-box (FBXO31) implicada en la degradació de la ciclina D1 en cèl·lules aturades en G1 després del dany al DNA. La seva degradació és deguda a la interacció directa amb FBXO31 i depèn de la fosforilació de la T286 (Santra et al., 2009). En una altre estudi (Feng et al., 2007) sobre la regulació de la ubiquitinització de la ciclina D1 s'ha vist que hi ha 18 lisines implicades. Per eliminar la ubiquitinització de la ciclina D1 és necessària la substitució de 17 de les 18 lisines, i aquest mutant té una localització predominantment nuclear.

INTRODUCCIÓ

Finalment, també s'ha vist que l'antienszim ODC, un regulador de la ornitina descarboxilasa també regula la degradació de la ciclina D1 via proteasoma independentment de la ubiquitina i de la fosforilació en la T286. El desenvolupament tumoral com el creixement són també inhibits amb un augment de l'activitat de l'antienszim (Newman et al., 2004).

3.3. Localització intracel·lular de la ciclina D1: GSK-3 β i CRM1

Un altre dels sistemes de regulació de la ciclina D1 és la seva localització subcel·lular. En la transició G1-S la ciclina D1 ha de ser fosforilada en la T286 a prop del C-terminal per la quinasa GSK-3 β (Diehl et al., 1998) per poder ser exportada del nucli i ser degradada via ubiquitinització. Durant la fase G1 del cicle GSK-3 β és principalment citoplasmàtica però en la transició G1-S una part important de la proteïna s'acumula en el nucli per poder accedir a la ciclina D1 i realitzar la seva funció (**figura 5**).

GSK-3 β està regulada per la via de senyalització Ras-PI3K-Akt. La senyalització per Ras inhibeix l'activitat de GSK-3 β . Ras i PI3K actuen juntes per activar Akt i aquesta finalment fosforila GSK-3 β en la serina 9 (Cross et al., 1995; Dudek et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997) per inhibir la seva activitat i per tant afavorir l'acumulació nuclear de ciclina D1 durant la fase G1 del cicle. La fosforilació en la T286 de la ciclina D1 facilita la interacció amb l'exportina nuclear CRM1 activant la sortida de la ciclina D1 del nucli (Alt et al., 2000). CRM1 és una exportina que s'uneix a senyals d'export nuclear riques en leucines o zones hidrofòbiques. La ciclina D1 té dues zones que podrien ser dos senyals d'export nuclear que corresponen als residus 87-94 (RFLSLEPL) i als residus 290-295 (VRDVDI), aquesta última seqüència és pròxima al lloc de fosforilació de GSK-3 β i és molt similar entre les tres ciclines. La substitució de les valines i isoleucines

per alanines en aquesta seqüència elimina la interacció i s'obté una acumulació nuclear de la ciclina sense afectar a la seva fosforilació en la T286 (Benzeno and Diehl, 2004).

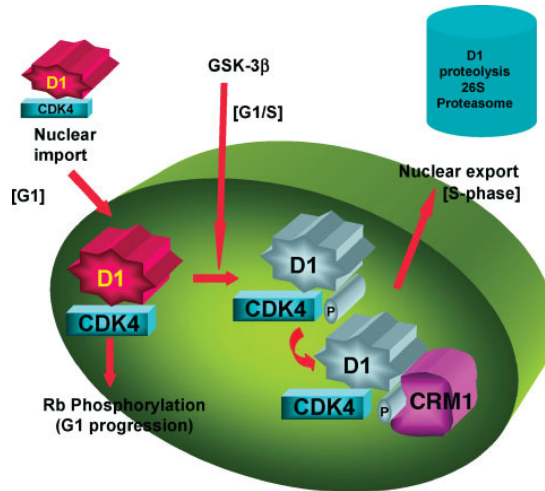


Figura 5. Regulació de la localització subcel·lular de la ciclina D1. Durant la fase G1 del cicle la ciclina D1 s'uneix a Cdk4 i als inhibidors CIP/KIP de manera que el complex entra al nucli per fosforilar RB i provocar la transició de la fase G1 a la fase S. La quinasa GSK-3 β entra en el nucli durant aquesta transició i fosforila la ciclina D1 en la T286 per ser exportada del nucli per CRM1, ubiquitinitzada i degradada pel proteasoma. Tret de Gladden and Diehl (2005).

S'ha demostrat que una ciclina D1 on s'ha substituït la treonina 286 per una alanina (T286A) no pot ser fosforilada per la proteïna GSK-3 β i per tant, no pot ser exportada des del nucli al citoplasma per l'exportina CRM1. Aquest mutant és molt estable i nuclear durant tot el cicle quan, en canvi, la ciclina D1 normal és citoplasmàtica en la fase S (Diehl et al., 1998). S'ha vist que la superexpressió de la ciclina D1 escurça la fase G1 del cicle però no provoca la transformació cel·lular i el creixement tumoral (Quelle et al., 1993; Resnitzky et al., 1994). En canvi, la superexpressió del mutant T286A afavoreix el creixement tumoral i facilita el creixement de cèl·lules

INTRODUCCIÓ

NIH3T3 independentment de l'adherència en un medi amb agar (Alt et al., 2000). El mutant de ciclina D1 que no s'uneix a l'exportina CRM1 també és capaç de transformar les cèl·lules.

4. Regulació del complex Cdk4-ciclina D1

El control en cada moment del nivell d'activitat de les Cdk's és el principal responsable de la correcta progressió del cicle cel·lular. Els mecanismes reguladors de l'activitat de les Cdk's, indirectament, també controlen els diferents esdeveniments del cicle. La formació del complex, la regulació dels nivells de la ciclina, la fosforilació de la Cdk, la unió a proteïnes reguladores i la localització subcel·lular són tots ells mecanismes reguladors importants del complex Cdk4-ciclina D1.

4.1. Formació del complex

Hem comentat anteriorment que per l'activació del complex és important la unió de les dues subunitats Cdk4 i la ciclina D1, i també és imprescindible la fosforilació del residu T172 de Cdk4 per la quinasa CAK (Cdk7-ciclina H) (Kato et al., 1994a). En l'activació de la Cdk estan involucrades dues hèlixes α , una altament conservada amb un consens PSTAIRE i una altra hèlix més curta. D'una banda, la rotació de l'hèlix PSTAIRE orienta adequadament determinats aminoàcids en el centre actiu de la quinasa. Endemés, l'altra hèlix es fon i permet el desplaçament del T-loop obrint l'accés al centre actiu. Ara bé, com a característica més sorprenent del complex Cdk4-ciclina D1, tot i la interacció entre la ciclina i l'hèlix αC (PISTVRE), aquesta hèlix no adopta el canvi conformacional associat a l'activació de les Cdk's (Day et al., 2009), com s'observa en altres complexos binaris. L'estructura que adopta Cdk4 s'assembla més a les estructures dels monòmers de Cdk2 i Cdk7 o a l'estructura de Cdk6 unida a

l'inhibidor p19, és a dir, a conformacions de la quinasa en que els residus del centre actiu no es disposen adequadament i, per tant, fan que la quinasa sigui inactiva. Més concretament, el T-loop s'estabilitza en una conformació inactiva causada per les interaccions amb els lòbuls N- i C-terminal de la quinasa. A més no té lloc una rotació suficient de l'hèlix αC de Cdk4 que interacciona amb l'extrem N-terminal de la ciclina D i, per tant, es redueix l'àrea superficial del complex comparat amb la majoria d'altres complexos binaris. L'estructura més similar al complex és la formada per p19-Cdk6-ciclina K (figura 6) on l'inhibidor indueix un canvi conformacional en l'hèlix αC que manté a la Cdk en una conformació inactiva (Brotherton et al., 1998). Així, a diferència del complex Cdk2-ciclina A, Cdk4 no s'activa només per unió a la ciclina D, i es creu que el complex necessita una proteïna CIP/KIP per tal d'assolir una conformació totalment activa (Day et al., 2009).

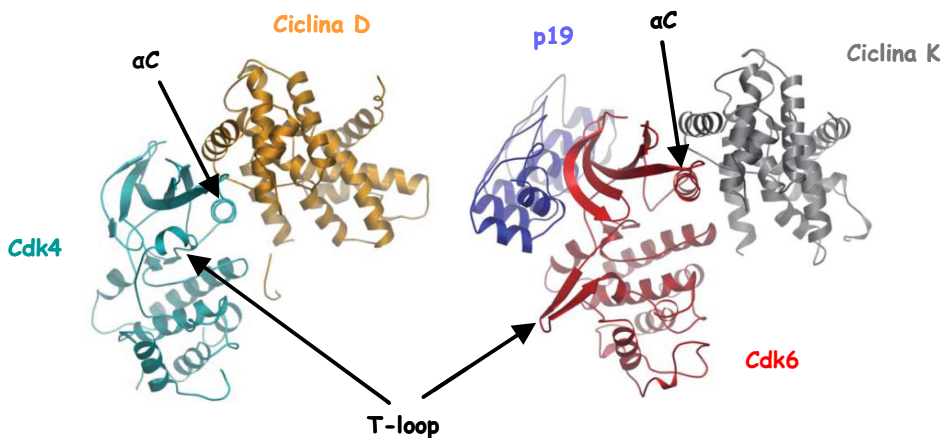


Figura 6. Comparació de complexos Cdk-ciclina. El primer complex correspon a Cdk4-ciclina D. La ciclina D s'uneix al lòbul N-terminal i a l'hèlix αC de Cdk4. El segon correspon al complex ternari p19-Cdk6-ciclina K. La unió de l'inhibidor p19 manté l'hèlix αC en una conformació inactiva. La disposició de l'hèlix αC en els dos complexos és similar (Day et al., 2009).

4.2. Unió a proteïnes reguladores: Inhibidors del cicle cel·lular

L'activitat de les Cdks en la fase G1 i en la transició G1/S també està regulada pels inhibidors de les Cdks (CKIs). En general els CKIs han estat considerats com a reguladors negatius dels complexos Cdk-ciclina ja que són responsables d'inhibir ràpidament l'activitat del complex en resposta a la diferenciació o senyals antiproliferatives (Sherr and Roberts, 1995; Sherr and Roberts, 1999). Ara bé, existeixen dues famílies d'inhibidors. La primera són els inhibidors de la família INK4 "(inhibitors of Cdk4)" que inhibeixen exclusivament la subunitat catalítica Cdk4/Cdk6 i s'indueixen en resposta a senyals antiproliferatives com TGF β o senescència. Formen part d'aquesta família quatre proteïnes: p16 (Ink4a, Serrano et al., 1993), p15 (Ink4b, Hannon and Beach, 1994), p18 (Ink4c, Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995), i p19 (Ink4d, Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995), que tenen en comú múltiples repeticions anquirina. La unió de Ink4 a Cdk4 indueix un canvi conformacional que afecta a la unió de la ciclina i redueix l'afinitat per l'ATP. L'altra família d'inhibidors és l'anomenada CIP/KIP composta per tres proteïnes: p21 (Cip1, Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993; Dulic et al., 1994; Noda et al., 1994), p27 (Kip1, Polyak et al., 1994a,b; Toyoshima and Hunter 1994), i p57 (Kip2, Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995), que s'uneixen als diferents complexos Cdk-ciclina que actuen durant la fase G1 i la transició G1/S.

Les quatre proteïnes INK4 comparteixen motius estructurals, les repeticions anquirina, que estan formades per parells d'hèlix α que s'apilen cara a cara. p16 i p15 tenen 4 repeticions anquirina i p18 i p19 en tenen 5. Aquests dominis estructurals estan involucrats en la unió a la regió de la Cdk4 oposada al lloc d'unió a la ciclina, lluny del centre catalític. Les proteïnes INK4 indueixen un canvi al·lostèric a les quinases dependents de

ciclina D que altera el lloc d'unió a la ciclina i redueix l'afinitat per l'ATP. A més, per evitar la formació dels complexos Cdk4-ciclina D les proteïnes INK4 també forcen la distribució dels inhibidors CIP/KIP en el complex Cdk2-ciclina E (Ortega et al., 2002).

L'expressió de les proteïnes INK4 és diferent durant el desenvolupament. En ratolí p18 i p19 s'expressen durant el desenvolupament embrionari, mentre que p16 i p15 només es detecten després del naixement en molts teixits, de manera que l'expressió de p16 augmenta amb l'edat (Zindy et al., 1997). L'expressió de les proteïnes INK4 també s'indueix per resposta a diferents vies inhibidores del creixement. L'estrès oncogènic i la senescència cel·lular indueixen l'expressió de p16. També s'ha implicat a p16 com mediador en l'activitat inhibidora de JunB en cèl·lules de ratolí. JunB indueix l'expressió de p16 i hi ha 3 llocs d'unió AP-1 en el promotor de p16 (Passequet et al., 2000). De la mateixa manera, el factor de transcripció Ets, un mediador de la via Ras/Raf/MEK també activa el promotor de p16 en fibroblasts senescentos (Ohtani et al., 2001). Normalment Ets és fosforilat per la quinasa MAP en certs moments del cicle cel·lular. p15 també es regula en resposta a estímuls oncogènics i la seva expressió és regulada per TGF β en cèl·lules epitelials (Hanon and Beach, 1994; Pei and Xiong, 2005). El promotor de p15 és sensible a l'activació directa per proteïnes SMAD en un mecanisme que també comporta la dissociació de Myc com a repressor del promotor de p15 (Seoane et al., 2001). En cèl·lules deficientes en p15, TGF β encara és capaç d'induir l'aturada del creixement per repressió de l'activador de Cdks, la fosfatasa Cdc25A (Iavarone and Massague, 1997). L'expressió de p19 és periòdica durant el cicle, de manera que la transcripció és més elevada durant les fases S i G2, i la seva degradació depèn del mecanisme ubiquitina/proteasoma. En G1 els nivells de p19 són baixos per facilitar la unió del complex Cdk4-ciclina D.

INTRODUCCIÓ

Una altra proteïna pot modular la interacció entre els inhibidors INK4 i les quinases Cdk4 i Cdk6. La proteïna d'unió a Cdk4, p34(SEI-1), s'uneix als complexos Cdk4-ciclina D1 fent que el complex sigui resistent a la inhibició per p16 (Sugimoto et al., 1999). A l'afegir sèrum en cèl·lules quiescents l'expressió de p34(SEI-1) ràpidament s'indueix i l'expressió ectòpica de SEI-1 permet als fibroblasts proliferar fins i tot a baixes concentracions de sèrum. SEI-1 facilitaria la formació i activació dels complexos Cdk4-ciclina D1 front a les proteïnes INK4.

Endemés de p16, el locus INK4a/ARF codifica per una altra proteïna supressora de tumors, ARF (p19^{ARF} en ratolí i p14^{ARF} en humans). Tot i que comparteixen alguns exons (**figura 7**), les dues proteïnes tenen orígens de lectura diferents i per tant, no hi ha similitud entre aminoàcids realitzant funcions moleculars diferents. Com hem dit, mentre que p16 és un inhibidor de Cdk4 i Cdk6, i actua aturant el cicle cel·lular en la fase G1, ARF regula l'estabilitat de p53 bloquejant la seva degradació a través de la inactivació de la ubiquitin lligasa MDM2 (Gil and Peters, 2006; Kim and Sharpless, 2006). Sembla ser que p16 és més important en senescència cel·lular i en la supressió de tumors en cèl·lules humanes, mentre que ARF podria jugar un paper més important en cèl·lules de ratolí (Ohtani et al., 2009).

La majoria de cèl·lules somàtiques humanes paren de dividir-se després d'un nombre finit de divisions cel·lulars i entren en un estat anomenat senescència cel·lular o replicativa. Aquestes cèl·lules són irreversiblement aturades en la fase G1 del cicle cel·lular sense ser capaces de dividir-se però són viables i actives metabòlicament durant un llarg període de temps (Hayflick and Moorhead, 1961). Molts tumors contenen cèl·lules que eviten la senescència replicativa. Per això, la senescència cel·lular pot tenir un paper important en la supressió de tumors (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

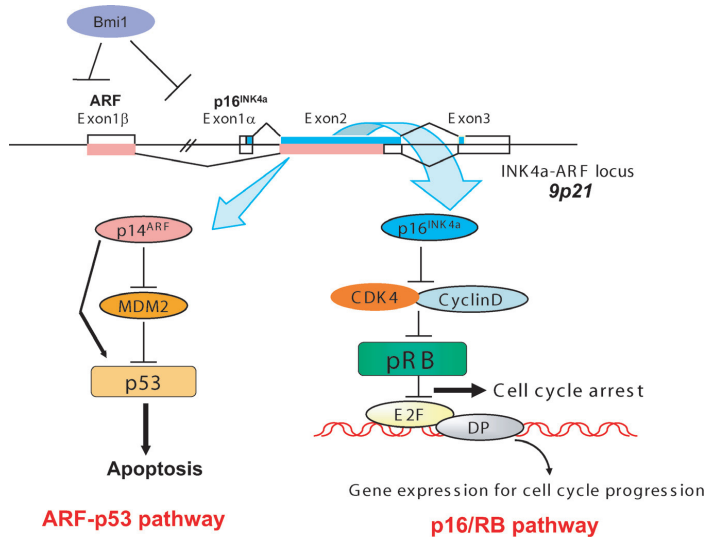


Figura 7. El *locus Ink4a/Arf*. El gen p16^{INK4a} es localitza en el *locus Ink4a/ARF* en el cromosoma humà 9p21. Aquest locus codifica per p16^{INK4a} i ARF que comparteixen un segon exó però utilitzant diferents pautes de lectura. p16 s'uneix directament i inhibeix Cdk4/6. D'altra banda, ARF s'uneix a MDM2 estabilitzant i activant p53. Tret d'Ohtani et al. (2009).

S'han proposat diferents hipòtesis per explicar els mecanismes de la senescència cel·lular. Per una banda es proposa que la pèrdua del potencial proliferatiu és degut a una acumulació de dany o estrès com per exemple per condicions de cultiu inapropiades o que pot ser per un procés programat genèticament. Tot i que hi ha moltes evidències que suggereixen que la senescència en cèl·lules humanes està genèticament controlada per la divisió cel·lular amb mecanismes que escurcen els telòmers (Wright and Shay, 2000). També hi ha treballs que suggereixen que pot ser induïda per estrès com la continua estimulació mitogènica, l'exposició d'una alta concentració d'oxigen i el dany al DNA (Serrano and Blasco, 2001). Tot i així, hi ha evidències que indiquen que la senescència cel·lular té lloc *in vivo*, tenint un paper important en la supressió de tumors, l'edat, malalties vasculars i fibrosi (Collado et al., 2006; Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Janzen et

INTRODUCCIÓ

al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006; Krizhanovsky et al., 2008; Michaloglou et al., 2005; Minamino and Komuro, 2008; Molofsky et al., 2006).

En humans i rosegadors les proteïnes supressores de tumors RB i p53 són fonamentals en la senescència cel·lular (Hara et al., 1991; Shay et al., 1991). L'activitat de RB i p53 és altament regulada per fosforilació, per interaccions proteïna-proteïna i per l'estabilitat de la proteïna (Classon and Harlow, 2002; Sharpless and DePinho, 2002). Com ja hem explicat anteriorment les Cdk2, 4 i 6 tenen un paper crític en controlar l'activitat de RB. Quan RB és fosforilat per les Cdk2 perd la capacitat d'unir-se al factor de transcripció E2F facilitant la transactivació de gens implicats en l'inici de la replicació del DNA (Stevaux and Dyson, 2002; Maehara et al., 2005). Aquest procés necessita la regulació estricta de les Cdk2 de manera dependent del cicle cel·lular, on p16 i p21 inhibeixen les Cdk2 i indueixen l'entrada en la senescència cel·lular (Serrano et al., 1997; Hara et al., 1996; Noda et al., 1994). L'activació simultània de p21 i p16 manté en estat actiu la proteïna RB (McConnell et al., 1999; Mitra et al., 1999) i la progressió del cicle s'atura en G1 (Alcorta et al., 1996). La via p16-RB i p53-p21 són freqüentment inactivades en càncers humans i d'aquí la seva importància en el procés tumoral (Zambetti, 2007; Ruas and Peters, 1998). Hi ha autors que han demostrat que els nivells de p16 són extremadament baixos en cèl·lules normals proliferant i s'indueixen en la senescència cel·lular. A més, la superexpressió de p16 provoca l'aturada del creixement cel·lular. Serrano et al. (1997) van demostrar que Ras oncogènic provoca una senescència cel·lular prematura junt amb una acumulació de p53 i p16.

Tots els inhibidors de la família CIP/KIP tenen un domini N-terminal que s'uneix tant a la subunitat ciclina com a la Cdk. Inicialment es pensava que la família d'inhibidors CIP/KIP interferien l'activitat de les quinases

dependent de ciclina E, A i D. Però s'ha vist que actuen tant com a reguladors negatius com positius per a Cdk4-ciclina D1. p21 és una diana transcripcional de p53 i intervé en l'aturada del cicle cel·lular en G1 induïda pel dany al DNA (El-Deiry et al., 1993; Gartel and Tyner, 1999). L'expressió de p27 normalment és elevada en cèl·lules deprivades de sèrum o altres estats de quiescència i ràpidament disminueix quan les cèl·lules entren en cicle (Besson et al., 2006; Coats et al., 1996). p57 té un paper molt important durant el desenvolupament embrionari. A diferència de p21 i p27, p57 té una expressió més específica de teixit. La regulació transcripcional de p57 és mediada per factors que tenen un paper important durant l'embriogènesi com Notch, Hes1 o MyoD. En ratolins, la manca de p57 provoca moltes deficiències en el desenvolupament i moren en néixer (Yan Y et al., 1997; Zhang et al., 1997).

La funció no catalítica del complex Cdk4-ciclina D és el segrest dels inhibidors CIP/KIP, sobretot p21 i p27. Com hem comentat anteriorment, en cèl·lules quiescents els nivells de p27 són relativament alts, mentre que els de p21 són baixos però normalment augmenten en resposta a senyals mitogèniques durant la fase G1 del cicle. Els inhibidors p21 i p27 podrien jugar papers relativament diferents durant l'entrada en cicle, en particular en relació a la formació del complex Cdk4-ciclina D. D'altra banda, l'augment dels nivells d'aquest complex per senyals mitogènics segrestaria els esmentats inhibidors alliberant així el complex Cdk2-ciclina E que, un cop actiu, permetria l'entrada en fase S. La fosforilació de p27 en un residu treonina específic (T187) pel complex Cdk2-ciclina E desencadena la seva degradació i també facilitaria la pròpia activació del complex. L'activitat de p27 és regulada per la seva abundància ja que augmenta en resposta a diferents senyals antiproliferatius i a la seva localització (Castano et al., 1998; Cheng et al., 1996). En cèl·lules quiescents p27 és nuclear i el seu

INTRODUCCIÓ

import es regula pel senyal de localització nuclear (NLS) (Chu et al., 2008). A l'inici de G1 l'export de p27 pot ser important per la unió i import nuclear dels complexos Cdk4-ciclina D. Tant p27 com p21 faciliten la unió dels complexos Cdk4-ciclina D *in vitro* i *in vivo* com també el seu import nuclear. p27 és un element important en resposta a senyals extracel·lulars, regula l'aturada del creixement induïda per TGF β (Koff et al., 1993), per la inhibició per contacte (Polyak et al., 1994a), pel creixement en suspensió (Zhu et al., 1996) i per anàlegs de l'AMP cíclic (Kato et al., 1994b). p27 principalment s'uneix a substrats nuclears com és el complex Cdk-ciclina, i el transport de p27 en certs càncers al citoplasma inactiva la seva activitat inhibidora. Generalment s'accepta que p27 és un potent inhibidor de Cdk2 *in vitro* i *in vivo* (Sherr et al., 1999).

Ja hem comentat que durant la fase G1 del cicle cel·lular la ciclina D1 es localitza en el nucli però després en la fase S s'exporta al citoplasma (Baldin et al., 1993). Ni la ciclina D1 ni Cdk4 contenen un senyal de localització nuclear, en canvi p21 i p27 si el contenen i s'ha demostrat que són importants per la localització nuclear del complex Cdk4-ciclina D1 (LaBaer et al., 1997). Tant la ciclina D com Cdk4 s'acumulen en el nucli de cèl·lules SAOS-2 en presència de p21. En canvi, en absència de p21 o utilitzant el mutant p21N (que no conté el NLS) tant la ciclina D1 com Cdk4 es localitzen en el citoplasma. Uns resultats similars també es van observar amb p27 i p57. Per altra banda, també s'ha demostrat que la calmodulina és important per l'activitat de Cdk4 i també per l'acumulació nuclear del complex Cdk4-ciclina D1 en la fase G1 del cicle (Taulés et al., 1998).

L'estructura tridimensional de p27 en complex amb Cdk2-ciclina E té llocs d'unió diferents per Cdk i la ciclina, tot i que sembla interaccionar exclusivament amb el dímer. p27 interacciona amb la ciclina a través d'una seqüència conservada, la regió LFG (domini d'unió a la ciclina) (Adams et al.,

1996; Castano et al., 1998; Cheng et al., 1996). Aquest domini és present en tots els inhibidors CIP/KIP i en diversos substrats de Cdks com RB i p107 (Adams et al., 1999). p27 també interacciona amb Cdk2 per la regió d'unió a la quinasa del extrem N-terminal (Russo et al., 1996). Es pensa que p27 podria inhibir el complex de diferents maneres. Per exemple, podria bloquejar físicament el lloc actiu de la Cdk evitant l'accés de l'ATP. També podria evitar l'accés del substrat al complex o impedir la unió del complex via interaccions amb la ciclina, o podria evitar la fosforilació del complex per CAK (Kato et al., 1994a). p27 és un potent inhibidor de Cdk2, però l'efecte de p27 sobre els complexos Cdk4-ciclina D és contradictori. En limfòcits, en cèl·lules epitelials o queratinòcits proliferant p27 no inhibeix Cdk4-ciclina D i el trímer format és sempre catalíticament actiu (Blain et al., 1997; Cheng et al., 1999; Mahony et al., 1998; Sherr and Roberts, 1999; Soos et al., 1996). *In vitro*, p27 recombinant pot unir-se a Cdk4-ciclina D sense inhibir el complex (Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997). Altres autors suggereixen que p27 podria ser important per a estabilitzar el complex Cdk4-ciclina D en un estat actiu (Alt et al., 2002; Cheng et al., 1998; Kato et al., 1994b; LaBaer et al., 1997). Per altra banda, s'ha mostrat que la superexpressió de p27 inhibeix Cdk4/6 en alguns tipus cel·lulars (Obaya et al., 2002; Vlach et al., 1996). Així, el complex p27-Cdk4-ciclina D en cèl·lules epitelials quiescents o limfòcits és inactiu (Bagui et al., 2003; Nourse et al., 1994). Per tant, p27 unit al complex Cdk4-ciclina D pot tenir un efecte inhibidor o no.

James et al. (2008) han identificat un mecanisme on p27 actua com inhibidor o no depenent de l'estat de creixement de la cèl·lula. En cèl·lules proliferant p27 és fosforilat en les tirosines Y88 i Y89 provocant la seva unió al complex de forma no inhibidora. Per contra, en cèl·lules confluents l'activitat tirosina quinasa es redueix, i el complex és inactiu (**figura 8**).

INTRODUCCIÓ

Aquestes tirosines de p27 poden ser fosforilades per quinases com Abl o Src (Grimmler et al., 2007) i converteixen a p27 en un element no inhibidor unit a Cdk4, mentre que la mutació en aquests llocs fa que no puguin ser fosforilats i que p27 s'uneixi a Cdk4 actuant sempre com inhibidor. En cèl·lules epitelials la superexpressió del mutant Y89F inhibeix Cdk2 i Cdk4 en condicions no confluents i per tant amb elevada activitat tirosina quinasa. La superexpressió de p27 normal atura el creixement cel·lular per la inhibició de Cdk2, però el mutant Y89F causa una aturada en creixement més important ja que les dues Cdks són inactives. Mirant l'estructura de p27-Cdk2-ciclina E, aquests residus formen part de l'hèlix 3-10 de p27 i sembla que podrien unir-se directament al lloc catalític de Cdk2. Aquesta interacció podria bloquejar l'accés de l'ATP i inactivar la quinasa. En canvi, amb la fosforilació de les dues tirosines Y88 i Y89 es podria trencar aquesta interacció i la Cdk podria tornar a ser activa. Tot i perdre aquestes interaccions, p27 podria unir-se a la ciclina D1 pel motiu d'unió a la ciclina (CBM) o pel domini RXL (residus 37-59) i la presència d'aquest dos llocs, un en la ciclina i l'altre en la Cdk, podria explicar com p27 s'uneix al complex de manera no inhibidora. Sembla que la mutació d'un dels dos residus és suficient per desplaçar l'hèlix 3-10 del lloc catalític de Cdk4 i permetre la seva activitat (Blain, 2008).

Larrea et al. (2008) han mostrat que la fosforilació de p27 en T157 i T198 per PKB promou la unió del complex p27-Cdk4-ciclina D en la forma inactiva. *In vivo*, p27 unit a Cdk4 està més fosforilat en T157 i T198 que p27 unit a Cdk2, i s'ha vist que hi ha una disminució de la unió de ciclina D i Cdk4 si es comparen els mutants de p27 T157A i T198A amb p27wt. Per tant, com hem comentat anteriorment, la fosforilació de p27 en els residus Y88 i Y89 per tirosines quinasa com Src seria important per tal d'evitar la

inhibició del centre actiu de la Cdk, mentre que per tal d'afavorir la unió del complex seria més important la fosforilació de p27 en T157 i T198 per PKB.

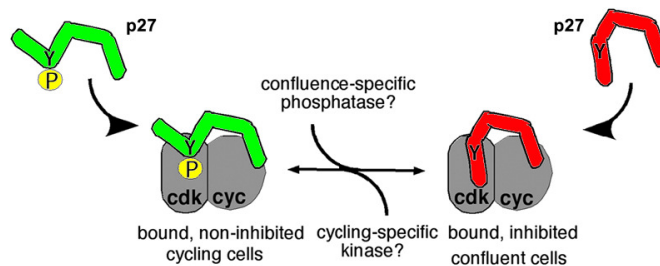


Figura 8. p27 actua com inhibidor en cèl·lules quiescents i com activador en cèl·lules ciclant. p27 és fosforilat en les tirosines Y88 i Y89 en cèl·lules ciclant abans o després de la unió al complex Cdk4-ciclina D, i en aquest estat conformacional no inactiva la quinasa. En canvi, la defosforilació de p27 el permetria d'inhibir l'activitat quinasa en cèl·lules confluents (Blain, 2008).

4.3. Fosforilació per la quinasa CAK

Les Cdk's necessiten també ser regulades, positiva i negativament, per fosforilació (Bockstaele et al., 2006). Per assolir una completa activació, les Cdk's necessiten ser fosforilades en el T-loop, en una treonina que en el cas de Cdk4 és la T172. La unió de la ciclina és important per la fosforilació de la T172 ja que provoca un canvi conformacional al complex facilitant aquesta fosforilació. No s'han trobat monòmers de Cdk4 fosforilats en la T172. En canvi, la unió de la Cdk4 amb la ciclina es pot donar sense la fosforilació de la treonina ja que la mutació T172A no afecta a la unió (Kato et al., 1994a). La quinasa responsable d'aquesta fosforilació és CAK (quinasa activadora de Cdk's) que correspon al complex Cdk7-ciclina H-Mat1 (Fisher et al., 1995). Ray et al. (2009) han observat que la interacció de p27 no fosforilat en les tirosines Y88 i Y89 amb Cdk4 evita la

INTRODUCCIÓ

fosforilació de la T172 per CAK. Tot i que el complex Cdk7-ciclina H està present i és actiu en cèl·lules aturades per contacte, l'associació de p27 amb Cdk4-ciclina D1 evita la fosforilació del T-loop. Quan p27 és fosforilat en les tirosines Y88 i Y89 en cèl·lules proliferant o *in vitro* per Abl, CAK fosforila Cdk4 fins i tot sense la dissociació de p27. Per tant, p27 podria ser primer fosforilat en Y88 i Y89, i seguidament permetre que CAK fosforili Cdk4 en T172. Diehl and Sherr (1997) van demostrar que la T156 de la ciclina D1 també és important per la fosforilació del complex Cdk4-ciclina D1 per part de CAK. Cdk4 unida al mutant de ciclina D1 T156A no pot ser fosforilada per CAK i, per tant, el complex és catalíticament inactiu i incapaç de fosforilar RB. Endemés al superexpressar-los ectòpicament, Cdk4 i el mutant T156A de ciclina D1 s'uneixen en el citoplasma, no són importats al nucli i inhibeixen la progressió del cicle cel·lular. La fosforilació de CAK no és important pel transport del complex al nucli ja que el mutant Cdk4 T172A junt amb ciclina D1 és importat al nucli. Tot i així, el complex Cdk4-ciclina D1 T156A es localitza en el nucli quan es superexpressa a més l'inhibidor de Cdks p21, el que suggereix que el mutant T156A de ciclina D1 mostraria alteracions conformacionals que podrien impedir una correcta i eficient formació del complex amb Cdk4, explicant així el defecte en la seva acumulació nuclear (Bockstaele et al., 2006).

5. Implicació en oncogènesi: ciclina D1b

La superexpressió de ciclina D1 està molt implicada en el desenvolupament i la progressió del càncer. Ja hem comentat però que la sola superexpressió de ciclina D1 no provoca la transformació cel·lular. En canvi, hi ha una variant de ciclina D1 molt relacionada en la progressió del càncer (Kenudsen, 2006).

La ciclina D1 està codificada per 5 exons. Al 1995, Betticher et al. van descriure una variant de ciclina D1 per *splicing* defectuós entre els exons 4 i 5, que perdia els 33 aminoàcids de l'extrem C-terminal de la proteïna (**figura 9**). Aquesta variant és la ciclina D1b que, en mancar-li l'extrem C-terminal, no té ni la seqüència PEST ni els residus T286 i T288.

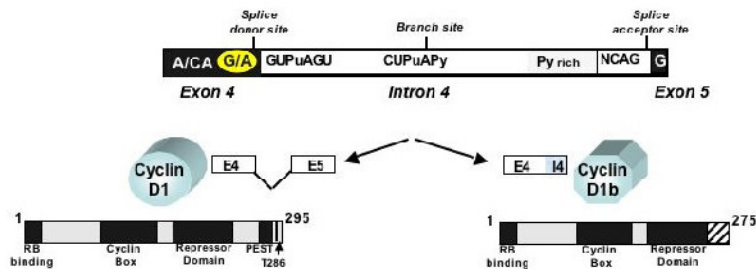


Figura 9. Splicing alternatiu del transcrit de ciclina D1. Un lloc acceptor alternatiu en l'intró 4 dona lloc a la ciclina D1b, que perd la regió PEST i les T286 T288 de l'extrem C-terminal. El polimorfisme G/A té influència sobre aquest *splicing* alternatiu (Knudsen, 2006).

Es va predir que la pèrdua d'aquests elements provocaria una proteïna més estable que la proteïna sencera i que residiria en el nucli. La immunofluorescència de la ciclina D1b fusionada a GFP va revelar que la proteïna era majoritàriament nuclear (Lu et al., 2003). Aquesta observació va ser important en el moment d'avaluar l'expressió de la ciclina D1 en tumors ja que el compartiment cel·lular en el que es troba la ciclina D1 és un factor pronòstic important en molts tumors. En canvi, la predicció de que la ciclina D1b seria més estable que la ciclina D1 sencera va ser errònia ja que es va veure que la variant de *splicing* de la ciclina D1 no és més estable (Lu et al., 2003; Solomon et al., 2003). Per tant, la degradació de la ciclina D1b havia de ser per un sistema diferent de la T286 i a la unió a CRM1.

INTRODUCCIÓ

El nucleòtid polimòrfic G/A870 és important en l'obtenció de la variant de ciclina D1 (ciclina D1b) i tant el polimorfisme com aquesta variant estan molt implicats en oncogènesi. La ciclina D1b s'uneix a Cdk4 igual que la ciclina D1, però no és un potent activador de Cdk4 ni de la fosforilació de RB. A més, a diferència de la ciclina D1, la ciclina D1b facilita la transformació cel·lular i la formació de tumors. Per tant, sorprèn que la ciclina D1b tingui aquesta capacitat de transformació sent més o menys igual d'estable que la ciclina D1 completa i sent un pobre activador de Cdk4. Tanmateix, la ciclina D1b podria deure la seva major activitat oncogènica a la seva localització predominantment nuclear.

Hi ha estudis que mostren com la variant de ciclina D1 pot modular l'activitat dels inhibidors p21 i p27. El domini de ciclina D1 que s'associa a p21 és el mateix en la ciclina D1b (aminoàcids 20-70) (Zwicker et al., 1999). Ciclina D1b podria tenir la mateixa capacitat de segrestar a p21 i p27 dels complexos Cdk2 igual que la ciclina D1 completa. També se sap que p21 promou la localització nuclear de ciclina D1 a través de la inhibició de la fosforilació de la T286 (Alt et al., 2002), però aquesta funció no es necessària per la ciclina D1b. És possible que la localització nuclear o l'augment de la mobilitat o canvis estructurals en la regió C-terminal facilitin l'activitat de transformació.

6. Hipòtesi del treball de tesi

Les cèl·lules quiescents inhibeixen l'entrada en cicle principalment per dos mecanismes diferents: la disminució de l'expressió de ciclina D1 i l'augment de les proteïnes KIP que inhibeixen l'activitat residual del complex Cdk4-ciclina D. Tot i així, encara que amb certes discrepàncies, s'ha observat l'acumulació de la ciclina D1 en el citoplasma de cèl·lules quiescents o diferenciades en diferents estudis (Sumrejkanchanakij et al.,

2003; Tamamori et al., 2003). Per tant, sembla que podrien haver-hi altres mecanismes per a regular l'activitat dels complexos Cdk4-ciclina D1 mitjançant el control de la distribució nucli-citoplasma de la ciclina D1.

Depenent de la tècnica utilitzada s'observen variacions en la localització de la ciclina D1. El fraccionament cel·lular o la purificació selectiva d'òrgànuls cel·lulars és un mètode útil per l'estudi de la localització de proteïnes i de la redistribució dins la cèl·lula. Les tècniques de fraccionament cel·lular s'han utilitzat força en els estudis de degradació i de localització de la ciclina D1, i aquests estudis suggereixen que la majoria de ciclina D1 es localitza en el citoplasma de varies línies cel·lulars. L'estudi del segrest citoplasmàtic de la ciclina D1 en neurones post-mitòtiques, en cardiomiòcits i en línies cel·lulars cancerígenes està sobretot basat en tècniques de fraccionament cel·lular (Alao et al., 2006a). En qualsevol cas, el fraccionament de cèl·lules MCL i de múltiples mielomes suggereix que la ciclina D1b és molt més nuclear, tot i també trobar-se en el citoplasma (Krieger et al., 2006), i l'anàlisi per microscòpia confocal també suggereix que en cèl·lules MCF-7 la localització de la ciclina D1 és en molt bona part citoplasmàtica. En canvi, la majoria d'estudis per immunofluorescència mostren que la ciclina D1 té una localització predominantment nuclear. Ara bé, aquests estudis han utilitzat sempre metanol per fixar i permeabilitzar les cèl·lules, el que podria limitar la detecció de la ciclina D1 en el citoplasma.

Finalment, en el nostre laboratori s'havia desvetllat un mecanisme de retenció citoplasmàtica de Cln3, l'homòleg de ciclina D1 en llevat de gemmació, que regula de forma clau l'entrada en cicle i juga un paper molt important en la coordinació entre creixement i proliferació (Garí et al., 2001; Wang et al., 2004; Vergés et al., 2007).

INTRODUCCIÓ

Tots aquests antecedents ens van permetre proposar com a hipòtesi de treball d'aquesta tesi doctoral l'existència d'un mecanisme de control de la localització de la ciclina D1 entre el nucli i el citoplasma, que podria tenir un paper especialment rellevant en situacions d'aturada de la proliferació cel·lular.

7. Objectius

1. Analitzar la localització de ciclina D1 en diferents models i condicions, i identificar possibles interactors

- a. Analitzar la localització de ciclina D1 en el nostre model per immunofluorescència i estudiar la influència de paràmetres metodològics.
- b. Cercar condicions on la localització de ciclina D1 estigui afectada per tal d'identificar l'existència de mecanismes moleculars responsables.
- c. Cercar possibles interactors de ciclina D1 per di-híbrid i per purificació per afinitat i espectrometria de masses.

2. Analitzar la implicació dels interactors identificats en la localització i regulació de la ciclina D1

- a. Determinar, tant per di-híbrid com per immunoprecipitació, els dominis importants per la interacció entre la ciclina D1 i els candidats identificats.
- b. Determinar l'efecte dels interactors sobre la localització de ciclina D1 inhibint o superexpressant l'expressió de les molècules implicades.
- c. Analitzar la rellevància funcional dels interactors sobre la fosforilació de RB com a diana clau del complex Cdk4-ciclina D1.

MATERIALS I MÈTODES

1. Cultius cel·lulars

1.1. Cultiu de MEFs, NIH3T3 i HEK293T

Els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) s'obtenen de ratolins de 14 dies de gestació (E14). Una vegada s'han sacrificat els ratolins, s'extreuen els embrions, se separen de la placenta i es fiquen en una placa petri de 100mm amb uns 6 o 7 ml de HBSS (*Hanks' balanced salt solution*). Es tallen les quatre extremitats i el cap, amb unes pinces traiem tots els òrgans i només ens quedem amb la carcassa dels embrions. Aquestes es renten unes tres vegades amb DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) amb antibiòtics (penicilina/streptomicina) sense sèrum, es fiquen en una placa petri de 35mm i amb un bisturí es trituren fins obtenir una massa ben homogènia que sigui pipetejable. Fiquem tots els embrions ben triturats en un tub Falcon de 50 ml amb 10 ml de tripsina-EDTA 0.25% durant 10 min a 37°C i s'agita de tant en tant. Inactivem la tripsina amb medi DMEM complementat amb 10% de sèrum FBS (*Fetal Bovine Serum*). Es disgrega pipetejant suaument dues o tres vegades. Es recull el sobrenedant en un tub de 10 ml, es torna a afegir 10 ml de DMEM 10% sèrum i recollim uns altres 10 ml de sobrenedant. La resta de carcasses les eliminem. Els dos tubs es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 min. S'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet en 1 ml de DMEM 10% sèrum. Fem el comptatge de la viabilitat de les cèl·lules obtingudes amb blau tripà i una vegada fet es planten 1×10^6 cèl·lules en plaques petri de 100 mm amb 10 ml DMEM 10% sèrum. Les cèl·lules són incubades en una atmosfera humida amb un 5% de CO_2 a 37°C. D'un ratolí s'obtenen uns 14 embrions i d'aquí es poden obtenir entre 10 i 15 milions de cèl·lules. Els MEFs obtinguts després de la primera divisió, és a dir a P1 es congelen a -80°C durant 2-3 dies i després es passen al congelador de N_2 . Tots els experiments els hem fet a partir d'aquests MEFs congelats.

MATERIALS I MÈTODES

Per obtenir MEFs quiescents es deixen créixer durant 4-5 dies fins que arriben a alta confluència. Passats aquests dies es depriven les cèl·lules, és a dir, es renten amb medi sense sèrum i s'afegeix medi nou amb un 0.5% de sèrum durant 24 h. Per obtenir els MEFs ciclant a partir de cultius a alta confluència, es tripsinitzen per a dividir-los 1/3, es planten amb medi nou amb un 10% de sèrum i es deixen créixer durant 18 h.

Les cèl·lules NIH3T3 van ser adquirides d'ATCC (*American Type Culture Collection*) són una línia cel·lular immortalitzada de fibroblasts embrionaris de ratolí. Les cèl·lules són incubades amb medi DMEM complementat amb un 10% de sèrum (FBS) i antibiòtics a una atmosfera humida amb un 5% de CO_2 a $37^\circ C$.

Les cèl·lules HEK293T (*Human Embryonic Kidney*) són una línia cel·lular humana de cèl·lules de ronyó embrionàries i són un bon model per superexpressar i purificar proteïnes. Aquestes cèl·lules també les hem incubat en les mateixes condicions que la línia cel·lular NIH3T3.

Per mantenir les cèl·lules es cultiven en medi DMEM amb antibiòtics i un 10% de sèrum. Cada 2-3 dies quan ja hi ha un 80% de confluència es divideixen. Per dividir-les, primer s'aspira el medi de la placa i es renta amb un tampó fosfat salí PBS escalfat a $37^\circ C$ per eliminar tot el sèrum. Es desenganxen les cèl·lules de la placa amb tripsina a $37^\circ C$ durant 1-2 min i s'inactiva amb medi DMEM 10% sèrum. Es recullen les cèl·lules i es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 min. Seguidament es resuspèn el pellet amb 1 ml de medi DMEM 10% sèrum, es fa el comptatge de les cèl·lules i es planten en les plaques corresponents.

Per a la congelació es tracten les cèl·lules amb tripsina i es divideixen tal i com hem descrit anteriorment. El pellet de cèl·lules es resuspèn en 1 ml de medi de congelació (90% FBS + 10% DMSO). Les cèl·lules es resuspenen i s'alíquoten en vials de congelació de 1 ml a $1-2 \times 10^6$

cèl·lules per vial. Els vials es desen un mínim de 24 h a -80°C i després es passen al contenidor de N_2 líquid.

Per a la descongelació, primerament es treuen els vials del contenidor de N_2 líquid i es posen ràpidament en un bany a 37°C . Les cèl·lules es passen a un tub de fons cònic amb 10 ml DMEM amb antibiòtics i sense sèrum. Es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 min. S'aspira el medi i s'afegeix 1 ml de medi amb 10% de sèrum, es resuspèn el pellet i seguidament es planten les cèl·lules.

El reactiu blau tripà s'utilitza pel recompte de les cèl·lules viables ja que tenyeix les cèl·lules mortes de color blau i així es poden diferenciar de les cèl·lules vives. L'hem utilitzat per fer el recompte de cèl·lules a l'hora d'obtenir els MEFs. Un cop ja tenim les cèl·lules resuspeses es fa una dilució amb HBSS i s'afegeix el blau tripà a una concentració final del 0.1%. Esperem 5 min per l'acció del colorant i fem el comptatge de les cèl·lules a la cambra de Neubauer.

1.2. Transfeccions i tractaments cel·lulars

Primerament les cèl·lules es planten en plaques tractades amb col·lagen en el cas de les HEK293T, mentre que per les cèl·lules NIH3T3 no és necessari el pretractament de plaques a no ser que es vulguin deprivar de sèrum a alta confluència. Passades unes 12-24 h es dilueix el DNA en Opti-MEM i es mescla suaument. Per altra banda es mescla la lipofectamina amb Opti-MEM i s'incuba a temperatura ambient durant 5-10 min. Després de la incubació es mescla la dilució del DNA i la de la lipofectamina, es mescla suaument i s'incuba durant 20 min a temperatura ambient. Després dels 20 min s'afegeix la mescla, on ja s'han format els complexos, a les cèl·lules perquè quedin ben cobertes. S'incuba en atmosfera humida amb un 5% de CO_2 a 37°C durant 15 min. Passat aquest temps s'elimina el medi de

MATERIALS I MÈTODES

transfecció, s'afegeix medi amb sèrum i es deixen les cèl·lules a l'incubador amb un 5% de CO_2 a $37^\circ C$ fins observar l'expressió del gen reporter (GFP), com en el cas dels vectors lentivirals. Com a exemple, per plaques de 4 pous (pous de 15 mm o bé 2 cm^2) es planten unes 50.000 cèl·lules en el cas de les HEK293T i unes 30.000 cèl·lules per les NIH3T3 per pou i es transfecten amb $1\ \mu g$ de DNA. El DNA es dilueix en $50\ \mu l$ d'Opti-MEM i s'utilitzen $2\ \mu l$ de lipofectamina per pou prèviament diluïda en $50\ \mu l$ d'Opti-MEM. S'afegeixen els $100\ \mu l$ de la barreja de transfecció més $100\ \mu l$ d'Opti-MEM a les cèl·lules sense medi perquè quedin ben cobertes. Després de la incubació s'elimina el medi i s'afegeix $400\ \mu l$ de medi amb sèrum.

Pel que fa als diferents tractaments, les condicions emprades foren les següents:

- Creixement en plaques d'agarosa (creixement en suspensió): Les cèl·lules es fan créixer en plaques amb 1% d'agarosa durant 15 h en presència de medi DMEM amb un 10% de sèrum.
- Geldanamicina (inhibició de la xaperona Hsp90): Els MEFs es planten en medi DMEM amb 10% sèrum durant 15 h i després es tracten amb $10\ \mu M$ de geldanamicina durant 3 h.
- Tunicamicina i Tapsigargina (inducció de la via UPR): Els MEFs es planten en medi DMEM amb 10% sèrum durant 15 h i després es tracten amb $1\ \mu M$ tapsigargina o $1\ \mu g/ml$ tunicamicina durant 1 o 4 h.
- Xoc tèrmic a $42^\circ C$: Les cèl·lules NIH3T3 es planten en presència de medi DMEM 10% sèrum i es deixen créixer durant 15 h a $37^\circ C$. El xoc tèrmic es fa seguidament a $42^\circ C$ durant 90 min.
- FGF1 i FGF2 (factors de creixement de fibroblasts): Tant els MEFs com les cèl·lules NIH3T3 plantades arriben a confluència i es depriven com hem explicat anteriorment. Passades les 24 h de privació les cèl·lules es tracten amb FGF1 o FGF2 a una concentració final de $50\ ng/ml$ durant 24 h.

- LiCl (inhibició de la quinasa GSK-3 β) i Leptomicina B (inhibició de l'exportina CRM1): Les cèl·lules NIH3T3 es tracten amb 20 mM LiCl durant 16 h o bé amb leptomicina B a 10 ng/ml durant 3 h.

2. Obtenció de lentivirus en cèl·lules HEK293T

Les cèl·lules HEK293T es planten unes 12-24 h abans de la transfecció en plaques de 100 mm tractades amb col·lagen a 2×10^6 cèl·lules per placa. Per transfectar les cèl·lules es necessiten 24 μ g de DNA per cada placa de 100mm amb una proporció 2:1:1 dels següents vectors:

- 12 μ g del vector lentiviral
- 6 μ g pVSV-G (plasmidi que codifica per l'embolcall víric)
- 6 μ g p Δ R (plasmidi empaquetador que conté les proteïnes gag i pol)

Per una banda es dilueixen els tres vectors amb 1.5 ml d'Opti-MEM i per l'altra es dilueixen 240 μ l de 10 μ M PEI (polietienimina) en 1.26 ml d'Opti-MEM. S'afegeix la dilució de PEI sobre la del DNA, es barreja molt suaument durant 2-5 s i s'incuba durant 10 min a temperatura ambient. Les plaques amb les cèl·lules es renten amb Opti-MEM. Passat el temps d'incubació, s'afegeixen a les cèl·lules 5 ml d'Opti-MEM i la mescla de transfecció i es deixen durant 1 h a l'incubador a 37°C. Finalment, s'elimina el medi de transfecció i s'afegeixen 10 ml de medi amb sèrum. Després de 3-4 dies les cèl·lules ja han produït els virus suficients per a la infecció.

Després de 3-4 dies de la transfecció, les cèl·lules HEK293T ja han produït virus i es pot recollir el sobrenedant que es filtra amb una membrana de nitrocel·lulosa de 0.45 μ m. Des del moment de la primera recollida de virus sempre es treballa sota la campana de seguretat biològica BioIIA.

Per a la concentració de virus es centrifuga el sobrenedant filtrat a 3500 rpm durant 20 min en tubs VIVASPIN 20 (*Sartorius Stedim Biotech*),

MATERIALS I MÈTODES

que contenen una membrana de tall per 100 KDa. Els lentivirus es mantenen a 4°C durant un mes com a màxim. S'han utilitzat virus concentrats per poder infectar a la vegada amb dos tipus diferents, per exemple, amb els lentivirus dels shRNAs de Tlk i p27.

Els MEFs es resuspenen amb el medi filtrat que conté els virus en el moment de plantar-los. Passades 24 h de la infecció es canvia el medi i s'afegeix medi nou amb 10% sèrum. Es canvia el medi al quart dia després de la infecció, al vuitè es depriven les cèl·lules durant 24 h i després ja es poden recollir. Pels experiments d'anàlisi de la fosforilació de RB les cèl·lules han estat deprivades durant 48 h.

3. Construccions plasmídiques

Tots els DNAs plasmídics els hem obtingut utilitzant els reactius de QIAGEN Maxi Kit o TALENT TA 200 PL1 miniprep Kit, sempre seguint les instruccions del fabricant. La qualitat del DNA obtingut es comprova per electroforesi i marcatge amb bromur d'etidi. La concentració del DNA obtingut es mesura utilitzant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*).

S'han seguit els protocols descrits en *Current Protocols Biology* (Ausubel et al., 1987) pel que fa a la manipulació i l'anàlisi del DNA per a obtenir noves construccions en plasmidis.

En els vectors pcDNA3 o bé pCMV-SPORT6, on hi ha clonades els ORFs i les fusions de proteïna amb les que hem treballat, hi ha el promotor CMV, que tot i donar nivells alts d'expressió, mostra una clara dependència de sèrum. És per aquesta raó que en determinats vectors d'expressió es va substituir pel promotor del gen de la ubiquitina, que va comportar-se de forma constitutiva independentment de la presència o absència de sèrum.

Taula 1. Vectors plasmídics i lentivirals

Nom	Vector	Descripció	Referència
pMmCdk4	pCMV-SPORT6-Cdk4	Quinasa dependent de ciclina Cdk4	Invitrogen
pMmHsc70	pCMV-SPORT6-Hspa8	Xaperona Hsc70	Invitrogen
pHsHip	pCMV-SPORT6-ST13	Co-xaperona Hip	Invitrogen
pMmHop	pCMV-SPORT6-Stip1	Co-xaperona Hop	Invitrogen
pMmCHIP	pCMV-SPORT6-Stub1	Co-xaperona CHIP	Invitrogen
pMmHsp40	pCMV-SPORT6-Dnajb1	Co-xaperona Hsp40	Invitrogen
β -cat	pcDNA3-6His- β -catenina	Expressa sota el promotor CMV la β -catenina	Antonio G. Herreros
β -cat S37Y	pcDNA3- β -catenina (S37Y)	Derivat de l'anterior amb la mutació puntual S37Y en β -cat	Antonio G. Herreros
pCYC193	pcDNA3-3FLAG-CycD1	Expressa sota el promotor CMV la ciclina D1, amb 3 epítops FLAG	Fet al nostre laboratori
pCYC291	pcDNA3-GFP-CycD1	Expressa sota el promotor CMV la ciclina D1 humana marcada amb GFP	Fet al nostre laboratori
pCYC342	pcDNA3-2NLS-GFP-CycD1	Expressa sota el promotor CMV la fusió GFP-ciclina D1 amb dues senyals de localització nuclear (NLS)	Fet al nostre laboratori
pCYC352	pcDNA3-GFP-CycD1 Δ CT	Expressa sota el promotor CMV la ciclina D1, amb la deleció dels últims 37 residus i marcada amb GFP	Fet al nostre laboratori
pCYC510	pcDNA3-3FLAG-CycD1 K112E	Vector que expressa sota el promotor CMV la ciclina D1 amb una mutació puntual K112E i marcada amb 3 epítops FLAG	Fet al nostre laboratori
pCYC521	pcDNA3-3HA-Tlk Cter	Expressa sota el promotor CMV la part Cterminal de la transloquina, marcada amb 3 epítops HA	Fet al nostre laboratori
pCYC564	pDSL-shRNA Tlk	Vector lentiviral que expressa el shRNA contra la Tlk	Fet al nostre laboratori
pCYC587	pNBM470-3HA-Tlk wt	Expressa sota el promotor CMV la transloquina, amb 3 epítops HA	Fet al nostre laboratori
pCYC589	pDSL-shRNA control	Vector lentiviral que s'utilitza per expressar el shRNA control	Fet al nostre laboratori
pCYC723	pDSL Δ UbiGFP-CMVp-3HA-CBP-CycD1	Vector lentiviral que expressa sota el promotor CMV la fusió 3HA-CBP-ciclina D1	Fet al nostre laboratori
pCYC764	pcDNA3-GFP-CycD1 Δ CB	Expressa sota el promotor CMV la ciclina D1 amb la deleció de la caixa ciclina i marcada amb GFP	Fet al nostre laboratori
pCYC766	pNBM470-3HA-TlkNter	Expressa sota el promotor CMV la part N-terminal de la transloquina, marcada amb 3 epítops HA	Fet al nostre laboratori
pCYC801	pDSL Δ UbiGFP-Ubip-3HA-CBP-CycD1	Vector lentiviral que expressa sota el promotor UBI la fusió 3HA-CBP-ciclina D1	Fet al nostre laboratori
TRCN0000071065	pLKO.1-puro-shRNA p27	Vector lentiviral que expressa un shRNA contra p27	Sigma

MATERIALS I MÈTODES

Per les mutacions puntuals o delecions hem utilitzat la mutagènesi dirigida segons el mètode PCR-SDM (*Site-Directed Mutagenesis*), basat en el protocol publicat per (Weiner and Costa, 1994).

4. Construccions lentivirals

Per les construccions lentivirals dels shRNA Tlk s'han utilitzat els protocols de clonatge basats en recombinació, *Gateway Technology* (Invitrogen). Les construccions lentivirals s'han fet en el vector pDSL (ATCC) després d'eliminar-li la unitat transcripcional GFP i de substituir el promotor CMV pel promotor del gen de la ubiquitina (Ubi).

Entre els 5 shRNA de transloquina expressats en el pDSL només el corresponent a NM_026665.2-1210 GCAGTGTTAATGAAGAACTTT ens va donar una forta disminució dels nivells de proteïna en els experiments en MEFs. El siRNA Tlk utilitzat en les transfeccions de les cèl·lules NIH3T3 havia estat descrit per Bossard *et al.* (2003).

Els shRNA de p27 van ser adquirits de Sigma. Entre els 5 shRNA de p27 adquirits només vam obtenir una forta disminució de l'expressió de p27 amb un dels clons, el corresponent a NM_009875.2-620s1c1 TGAAGAACTAA CCCGGGACTT.

5. Solubilitzacions en placa

Els MEFs, crescuts en plaques de 100mm, s'han analitzat en dues condicions de creixement: ciclant, amb medi complementat amb 10% sèrum, o bé quiescents, a alta confluència i amb medi complementat amb 0,5% sèrum.

Els extrems totals s'obtenen a partir d'una placa de cèl·lules ciclant o quiescents, en el tampó SR (2% SDS en 0,125 M Tris-HCl pH6,8). Per obtenir la fracció soluble les cèl·lules es tracten durant 1 min en la placa,

amb un tampó que conté 10 mM Hepes-NaOH pH6.8, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 20% glicerol, 1 mM DTT, 0.2% Tritó X100 i inhibidors de proteases i fosfatases. Es recull el sobrenedant i es precipita amb TCA. Les cèl·lules restants a la placa es recullen amb SR, és el que s'anomena la fracció insoluble.

Per la solubilització amb Tween 20 s'ha utilitzat un procediment similar a la solubilització amb Tritó X100. El tampó que s'ha utilitzat en aquest cas conté un 0.2% de Tween 20 en lloc de Tritó X100. La fracció soluble s'obté després de tractar les cèl·lules sobre la placa durant 2 h. Aquesta fracció es divideix en dues parts i es filtra a través de columnes Microcon (Millipore), amb els talls de pes molecular determinats a 30 kDa i 100 kDa.

6. Assaig d'interactors per di-híbrid

Per identificar proteïnes que poden unir-se a la ciclina D1 s'ha utilitzat el sistema del doble híbrid. Aquest sistema permet seleccionar i caracteritzar, a partir d'una genoteca de proteïnes, una proteïna presa (*prey*) que interacciona amb la proteïna esquer (*bait*). Aquest mètode es basa en les propietats de la proteïna Gal4 del llevat *Saccharomyces cerevisiae* on els dominis responsables de la unió al DNA (Gal4BD) i de l'activitat transcripcional (Gal4AD) funcionen de manera independent (**figura 10**).

Aquest mètode necessita una sèrie d'elements determinats:

1) Una fusió proteica entre el domini Gal4BD i l'esquer que en el nostre cas és la ciclina D1. Per fer la fusió s'utilitza un vector episomal d'expressió que conté el promotor constitutiu del gen ADH1 i el gen TRP1 com a marcador fenotípic (plasmidi pGBKT7, Clontech).

MATERIALS I MÈTODES

2) Una genoteca de fusió al domini Gal4AD i les proteïnes codificades per diferents cDNAs que provenen del teixit/cultiu on volem identificar les interaccions. Aquestes fusions també estan clonades en vectors episomals d'expressió que contenen el promotor constitutiu ADH1 i el gen LEU2 com a marcador fenotípic (plasmidis pGADT7-Rec i pACT2).

3) Una soca de llevat portadora de fusions transcripcionals entre un promotor controlat per Gal4 i diferents gens reporter, bàsicament HIS3 i ADE2. La utilització del gen HIS3, que codifica per l'enzim IGP deshidratasa de la ruta biosintètica de la histidina, és especialment útil perquè permet controlar els nivells d'expressió basal utilitzant concentracions variables de 3-aminotriazol (3-AT), que és un inhibidor de l'activitat IGP deshidratasa.

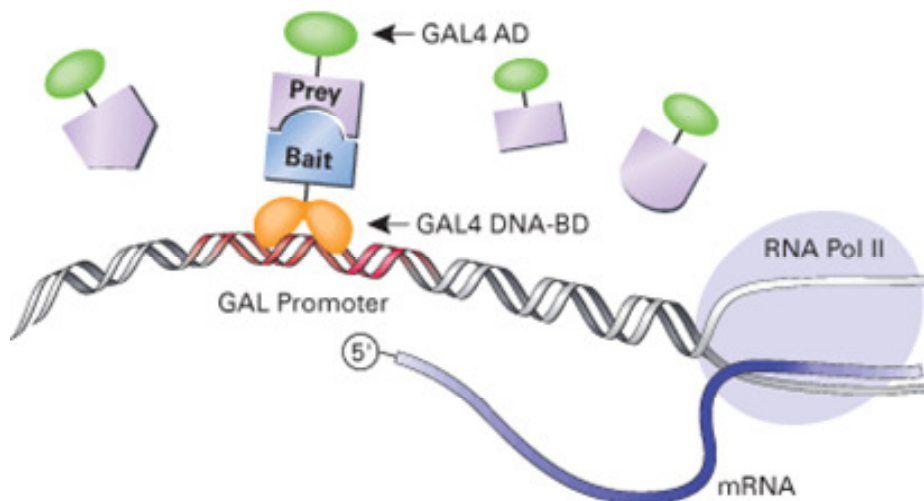


Figura 10. Esquema de l'anàlisi d'interactors de ciclina D1 per dí-híbrid. Com a esquer (*bait*) hem utilitzat la ciclina D1 humana i com a col·leccions de preses (*pray*) dues genoteques de ratolí, una embrionària i una altra de cervell adult.

La proteïna *bait* i la genoteca es transformen en llevats haploides amb fenotipus sexual diferents (a i α). Després de l'aparellament de les dues soques se seleccionen els diploides per creixement en absència de triptòfan i leucina. En els diploides on hi hagi una interacció entre la proteïna *bait* i la procedent de la genoteca es reconstitueix la proteïna Gal4 i, per tant, s'activa la transcripció del gen de selecció fent que els diploides puguin créixer en absència d'histidina i adenina.

En el nostre cas s'ha utilitzat com a esquer la ciclina D1 sencera que s'ha clonat en el vector pGBKT7 per produir una proteïna de fusió Gal4BD-ciclina D1 en la soca AH109. Aquesta construcció s'ha comprovat per *western blot* utilitzant un anticòs contra c-myc. L'activació basal de la proteïna es va determinar en SC+leu+ade-trp-his a diferents concentracions de 3-aminotriazol (3-AT) 0, 1, 2, 5, 10mM. Com a font de proteïnes presa s'han utilitzat dues genoteques: una genoteca embrionària de ratolí de 11 dies (BD Matchmaker cat. num. 638868) clonada en el vector pGADT7-Rec, i una genoteca de cervell de ratolí (Clontech cat. num. ML4008AH) clonada en el vector pACT2.

6.1 Protocol d'aparellament

La soca AH109 (Mat a) transformada amb la fusió Gal4BD-ciclina D1 es va fer créixer durant tota la nit amb 10 ml de medi SC+his+ade+leu-trp. L'endemà es va diluir fins una $OD_{600}=0.005$ amb 100 ml de medi YPD+ade i es va fer créixer tota la nit fins una $OD_{600}=1$ (per un total de 10^9 cèl·lules).

Com a control es va fer créixer la soca Y187 (Mat α) transformada amb el vector pGADT7-Rec o pACT2 amb medi SC+his+ade+trp. Es va diluir fins una $OD_{600}=0.005$ amb 100 ml de medi YPD+ade i es va fer créixer tota la nit fins una $OD_{600}=1$ (per un total de 10^9 cèl·lules).

MATERIALS I MÈTODES

Una alíquota de la genoteca transformada en la soca Y187 (Mat α) es va descongelar en gel, i lentament es van afegir 10 ml de YPD+ade prèviament escalfat a 30°C i es va incubar durant 2 h. La viabilitat cel·lular es va calcular per un recompte de colònies en medi SC+his+ade+trp-leu fent dilucions 1/10000 i 1/100000 del cultiu.

Es van afegir 90 ml de la soca bait (ciclina D1) als 10 ml de la genoteca, i es van filtrar en 10 membranes Millipore humides (GS 47mm). Els 10 filtres es van col·locar en 10 plaques (no massa seques) prèviament escalfades de YPD+ade i es van incubar durant 6 h a 30°C. Passades les primeres 5 h es va comprovar mitjançant el recompte de zigots per microscòpia òptica que l'aparellament s'estava donant correctament. Paral·lelament es van incubar 10 ml de la soca transformada amb el vector pGADT7-Rec o pACT2 amb 10 ml del cultiu de la soca *bait* i també es va sotmetre al mateix protocol d'aparellament.

Després de les 6 h es van recollir les cèl·lules rentant els filtres amb 1 ml de medi SC. Els 10 ml de cèl·lules que es van obtenir es van sembrar en 20 plaques de 14 cm de diàmetre amb medi SC+ade-his-leu-trp amb 2 mM o 10 mM 3-AT. Les plaques es van incubar a 30°C durant una setmana. Abans de sembrar es va agafar una petita alíquota del cultiu que es va plaquejar en medi SC+ade+his a dilucions 1/1000 i 1/10000 per calcular la viabilitat i l'eficiència de conjugació. Pel cultiu control es va fer el mateix procediment.

6.2. Identificació, seqüenciació i confirmació de clons

Després d'una setmana d'incubació a 30°C, les colònies que van créixer en les plaques SC-trp-leu-his + 3-AT es van aïllar i comprovar per *replica-plating* en medi SC-trp-leu-his + 3-AT amb o sense adenina. Les colònies que creixien en les condicions més estrictes, és a dir sense

histidina i adenina, es processaven per identificar el gen mitjançant PCR. Una petita quantitat de cèl·lules es resuspenen en 15 μ l d'aigua estèril, s'afegeix una culleradeta de boles de vidre (0.6mm de diàmetre, Sigma) i es calenta a 95°C durant 2 min. Les cèl·lules es sotmeten a una disrupció mecànica (Ribolyzer, potència 4.5, 45 s). Seguidament es centrifuga a 12000 rpm durant 10 min. S'agafen 2 μ l del sobrenedant per 18 μ l de la mescla de PCR (Taq buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μ M primers, 1 u Taq). La reacció de PCR es va dur a terme amb els següents paràmetres: 95°C 5 min, 30 x (94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 2 min), 72°C 7 min.

Després d'analitzar els primers clons vam veure que la gran majoria pertanyien a la proteïna Cdk4. Per tant, per descartar des d'un principi aquests clons vam afegir un tercer primer a la PCR de colònia que ens identificava directament Cdk4.

Els fragments de PCR a seqüenciar es van purificar (QIAQuick PCR purification, Qiagen Ref. 28106) abans de preparar les reaccions de seqüenciació amb 4 μ l *terminator ready reaction mix* (Applied Biosystems), 3.2 pmols 5'AD primer, i 50 ng del fragment purificat a un volum final de 10 μ l. La reacció de seqüenciació per PCR es va dur a terme amb els següents paràmetres: 96°C 1 min, 25 x (96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 4 min)

El DNA obtingut es va precipitar, es va resuspendre en 15 μ l de Hi-Di formamida (Applied Biosystems) i es va analitzar al seqüenciador 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi). Les seqüències es van identificar utilitzant el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST en NCBI), i la pauta dels clons es va comprovar utilitzant el programa *Translate Tool* (EXPASY)

Per tal de purificar els plasmidis portadors i confirmar la interacció amb la ciclina D1, els clons identificats es van fer créixer en 1.5 ml de cultiu YPD durant tota la nit en tubs estèrils de 12.5 ml. Es va comprovar que la

MATERIALS I MÈTODES

OD₆₀₀ fos superior a 5 unitats i després es van centrifugar durant 5 s a 13400 rpm. Les cèl·lules es van resuspendre en 15 µl del tampó de resuspensió (Plasmid Miniprep kit, TALENT) i es van sotmetre a disrupció mecànica (Ribolyzer, potencia 4.5, 45 s). Es va afegir 70 µl del tampó de resuspensió i es va centrifugar a 12000 rpm durant 5 min. Es van agafar 70µl del sobrenedant i es va continuar la purificació amb el mateix kit. Els 50µl eluïts de la columna es van transformar en 150 µl de cèl·lules competents E.coli DH5a. El cultiu es va sembrar en plaques de medi LB amb ampil·lina (Amp) i es va obtenir entre 1 i 40 colònies per clon. Es va tornar a recuperar el plasmidi dels clons crescuts amb LB+Amp i la identitat dels clons es va tornar a confirmar per seqüenciació. Finalment, per tal de confirmar la interacció dels plasmidis obtinguts es van cotransformar en soques de llevat AH109 amb el vector pGBKT7 amb o sense la fusió a ciclina D1 i es va observar el creixement en medi SC-trp-leu-his + 3-AT amb o sense adenina.

7. Immunofluorescència

Per la tècnica d'immunofluorescència es planten 60.000 MEFs o 30.000 NIH3T3 per pou de 16mm, en plaques de 4 pous i després dels tractaments, transfeccions o infeccions, se varen seguir els següents passos:

- Rentar les cèl·lules amb PBS fred
- Fixar les cèl·lules amb paraformaldehid (PPA) 4% a 4°C durant 20 min
- Rentar amb PBS fred
- Tractar les cèl·lules amb metanol fred (-20°C) durant 2 min
- Rentar amb PBS fred dues vegades
- Bloquejar amb 5% llet o 5% BSA (BS) durant 30 min
- Rentar amb PBS

- Incubar amb l'anticòs primari durant 2-3 h diluït en BS
- Rentar amb PBS tres vegades
- Incubar amb l'anticòs secundari durant 1 h en BS en la foscor
- Rentar amb PBS tres vegades
- Montar amb 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Hoestch (Sigma 33258) en SlowFade (Molecular Probes).

Per tal d'observar la ciclina D1 al citoplasma, la fixació es va dur a terme a temperatura ambient per 20 min i la permeabilització amb 0.1% saponina per 5 min a 4°C.

Els anticossos primaris emprats així com els temps i dilucions s'especifiquen en la **taula 2**.

Els anticossos secundaris marcats amb diferents fluorocroms del tipus Alexa varen ser adquirits de Molecular Probes i emprats rutinàriament a una dilució 1:500 per 1 h a temperatura ambient.

8. Incorporació de BrdU

Per tal de calcular el percentatge de cèl·lules que ha passat per fase S en un temps determinat s'utilitza la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). Es tracta d'un anàleg de la timidina que s'incorpora al DNA durant la replicació. Posteriorment es pot visualitzar per immunofluorescència amb anticossos αBrdU . El protocol inclou els següents passos:

- Plantar les cèl·lules en plaques de 4 pous (pous de 16mm)
- Afegir BrdU al medi de cultiu a una concentració final 10 μM durant 6 h abans de recollir les cèl·lules ciclant o quiescents
- Rentar les cèl·lules amb PBS a 4°C
- Fixar les cèl·lules amb 4% paraformaldehid (PPA) a 4°C durant 20 min
- Rentar amb PBS
- Tractar amb 2N HCl durant 10 min

Taula 2. Anticossos emprats per immunofluorescència (IF) i *western* (WB)

Antigen	Referència	Dilució per IF	Dilució per WB	Temps d'incubació
Actina	Monoclonal C4 Chemicon Intl.	----	1/1000	1 h
BIP	Policlonal SPA-826 Stressgen	----	1/1000	1 h
BrdU	Monoclonal OBT0030 Immunologicals Direct	1/200	----	2-3 h
Cdk2	Policlonal 06-505 Upstate	----	1/250	1 h
Cdk4	Policlonal C-22 Santa Cruz	1/200	1/250	2-3 h (IF) 1 h (W)
Ciclina D1	Monoclonal D1-7213-G Zymed	1/200	----	2-3 h
Ciclina D1	Policlonal 06-137 Upstate	----	1/200	1 h
Ciclina D1	Monoclonal DCS-6 BD Pharmlingen	1/200	1/200	14-16 h 4°C
Ciclina E	Policlonal 06-459 Upstate	----	1/200	1 h
FLAG	Monoclonal M2 Sigma	----	1/250	1 h
GAPDH	Policlonal ab9485 Abcam	----	1/1000	1 h
GFP	A11122 Molecular Probes	1/200	1/200	2-3 h (IF) 1 h (W)
HA	Monoclonal 3F10 Roche	1/100	----	2-3 h
HA	Monoclonal 12CA5 (stock laboratori)	----	1/200	1 h
p21	Policlonal 05-345 Upstate	----	1/500	1 h
p27	BD Biosciences	----	1/500	1 h
p57	Policlonal H-91 Santa Cruz	----	1/200	1 h
phospho RB S608	Policlonal 2181 Cell Signaling	----	1/500	14-16 h 4°C
phospho RB S780	Policlonal 9307 Cell Signaling	----	1/500	14-16 h 4°C
Tubulina	Monoclonal DM-1A Sigma	----	1/2000	1 h
Ttk	Policlonal Ttk-1045 Col·laboració AbBcn	----	1/100	14-16 h 4°C

- Neutralitzar amb 0.1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a pH8.5 per 10 min
- Rentar amb PBS
- Tractar amb 0.5% Tween 20 i 10% BSA en PBS (TBP) durant 30min
- Rentar amb PBS
- Incubar les cèl·lules amb l'anticòs αBrdU (1/200) en TBP (1/10) per 2 h
- Rentar amb PBS tres vegades
- Incubar amb l'anticòs secundari (1/500) desitjat durant 1 h en la foscor
- Rentar amb PBS tres vegades
- Montar amb 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Hoestch en SlowFade (Molecular Probes).

9. Adquisició i anàlisi d'imatges

Totes les imatges s'han adquirit en el microscopi invertit Olympus IX71 i en el microscopi Olympus BX51, utilitzant els objectius de 20X i 40X i el programa DP Controller.

Per l'anàlisi del senyal nuclear de ciclina D1 on s'ha avaluat un gran nombre de cèl·lules s'ha utilitzat el programa IMAGE J, i s'ha representat el senyal nuclear relatiu de ciclina D1, és a dir, el valor mitjà del senyal nuclear de ciclina D1 per a cada cèl·lula menys el valor mitjà del senyal citoplasmàtic promig del camp, i relativitzat a aquest darrer valor.

Quan hem analitzat la localització de les fusions GFP-ciclina D1 sota els tractaments amb leptomicina B i LiCl, donat que els valors citoplasmàtics podien determinar-se sense ambigüitats, el senyal nuclear va obtenir-se com a rati dels valors de pixel en el nucli als obtinguts del citoplasma.

Hi ha gràfiques on s'ha representat simplement la mitjana dels pixels nuclears de ciclina D1, com és el cas de l'anàlisi de l'efecte de les xaperones i de la β -catenina. En l'anàlisi del xoc tèrmic també s'ha mesurat

el valor dels píxels nuclears de ciclina D1 però s'ha fet la representació en freqüències.

10. Anàlisi per FACS

La citometria de flux (FACS) s'utilitza per analitzar la proporció de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular. Per aquesta anàlisi cal un marcador fluorescent com és el iodur de propidi, que s'intercala en l'estructura de doble hèlix del DNA. Aquest colorant s'uneix de forma proporcional a la quantitat de DNA, de manera que el senyal que s'obté al citòmetre és indicatiu del contingut en DNA de cada cèl·lula.

Per poder fer aquesta mesura al citòmetre, les cèl·lules han d'estar en suspensió. Primer es recullen amb tripsina i seguidament s'hi afegeix medi nou amb un 10% de sèrum. Es centrifuguen durant 2 min a 2000 rpm i es renten 1 vegada amb PBS. El pellet de cèl·lules es resuspèn amb 70% etanol per permeabilitzar-les durant 1 h a 4°C. Passat aquest temps es centrifuga durant 5 min a 6000 rpm i el pellet es resuspèn en 1 ml de SSC que conté 50 µg/ml RNasa i 50 µg/ml de iodur de propidi, i s'incuba durant 30min a 37°C.

11. *Western blot*

Les cèl·lules es renten amb PBS a 4°C i es recullen en el volum necessari de SR per placa (200 µl per una placa de 100 mm). Seguidament les cèl·lules se soniquen fins que quedin pipetejables. En aquest moment mesurem la quantitat de proteïna per absorbància a 280 nm, en el espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), per poder carregar les mateixes quantitats de cada mostra. Afegim el volum corresponent de 4xSS (20% sacarosa i 0,05% blau bromfenol) fins a obtenir una concentració final de 5S, i un 2% final de 2β-mercaptoetanol.

Finalment les mostres es bullen durant 5 min a 95°C abans de carregar-les en un gel d'acrilamida. Carreguem entre 50 i 100 µg de proteïna per carril.

L'electroforesi en gels de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) s'utilitza per a separar proteïnes segons el seu pes molecular en condicions desnaturalitzants. El dodecil sulfat sòdic (SDS) és un detergent aniónic que desnaturalitza les proteïnes i els hi dóna una càrrega neta negativa. Quan s'aplica un camp elèctric constant de 20mA per gel dins un tampó electròlit, les proteïnes corren a través d'una matriu porosa de poliactilamida cap al pol positiu depenent del seu pes molecular. Utilitzem el sistema Miniprotean de BioRad.

Els gels es preparen a partir d'una solució formada per acrilamida 30% i bis-acrilamida 2% i la polimerització dels gels s'inicia per addició de TEMED com iniciador de la reacció i al persulfat amònic que s'utilitza com a catalitzador.

El gel empilador conté un percentatge d'acrilamida baix (5%) i un pH lleugerament àcid. En aquesta part es carreguen les mostres, s'empaqueten i surten totes les proteïnes del mateix punt de partida.

El gel separador és la part on les mostres es resolen electroforèticament. Té un pH bàsic i el percentatge d'acrilamida que conté serà més alt o més baix depenent del pes molecular de la proteïna a estudiar. Per proteïnes amb un pes molecular petit com la ciclina D1 (36KDa) o p21 (21KDa), utilitzem gels del 12% o 15% d'acrilamida, per proteïnes d'uns 50 kDa com la transloquina, els gels són del 10% i per proteïnes de més alt pes molecular com RB, els gels són del 7,5%.

Un cop les proteïnes han estat separades per l'electroforesi, es transfereixen a una membrana de PVDF (Millipore). Per hidratar les membranes, primer es tracten amb metanol, seguidament es passen per aigua i es deixen finalment amb el tampó de transferència. S'utilitza el

MATERIALS I MÈTODES

sistema de transferència en semi sec i s'aplica un camp elèctric constant de 60 mA per gel. Les proteïnes carregades negativament i desnaturalitzades, es desplacen des del gel d'acrilamida cap al pol positiu i queden retingudes a la membrana.

Un cop les proteïnes estan transferides, la membrana es bloqueja amb una solució que conté un 5% de llet desnatada en tampó TBST (20 mM Tris, 0.125 M NaCl, 0.1% Tween 20), durant 1 h a temperatura ambient o durant tota la nit a 4°C. La membrana es renta amb tampó TBST i s'incuba amb l'anticòs primari. Depenent de l'anticòs que utilitzem es fan una dilució i un temps d'incubació determinats (veure **taula 2**). Es torna a rentar la membrana amb TBST i es tracta amb el corresponent anticòs secundari conjugat a peroxidasa (Amersham), que rutinàriament es va utilitzar a una dilució 1:10000. Els últims rentats es fan amb TBST i s'incuba la membrana durant 5 min amb el substrat quimioluminiscent SuperSignal West Dura (Pierce). Les proteïnes a estudiar es detecten en l'aparell Lumi-Imager, que disposa d'una càmera CCD (Boehringer Mannheim) a baixa temperatura. La quantificació de bandes es va dur a terme amb el software del mateix aparell.

12. Obtenció d'un anticòs policlonal contra transloquina

El clon original de transloquina obtingut en el di-híbrid (Tlk Cter) es va amplificar per PCR i es va clonar en el vector pET21a, utilitzant BamHI com a diana de restricció. La construcció que es va obtenir és una fusió de la seqüència de TlkCter i l'epítotop 6His, en l'extrem C terminal. L'expressió d'aquesta proteïna es va fer en la soca de *E. coli* BL21 DE3 amb el propòsit de purificar-la.

Es posa a créixer un precultiu en medi LB amb ampicil·lina a 50 µg/ml (LB Amp) tota la nit a 37°C, que l'endemà es dilueix 1/100 en un nou

cultiu de LB Amp. Quan el cultiu té una OD_{600} entre 0.2 i 0.4, s'indueix l'expressió amb 1 mM IPTG durant 6 h a 37°C. Passat aquest temps es centrifuga el cultiu a 3500 rpm durant 20 min a 4°C. En aquest punt el pellet pot ser congelat amb N_2 líquid i desar-se a -80°C.

Per a la purificació de la proteïna el pellet es resuspèn en tampó de lisi (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 pH8, 10 mM Tris-HCl pH8, 8 M urea). Per lliurar les bactèries en el tampó se soniquen durant 10 s unes 5 vegades. L'extracte es centrifuga a 13000 g durant 10 min i el sobrenedant s'uneix a les boles de níquel-nitriloacètic àcid unit a agarosa (Ni-NTA agarose, Qiagen) durant 1 h. Es renten les boles Ni-NTA amb el tampó de lisi i s'elueix la proteïna unida específicament amb l'addició del mateix tampó de lisi amb 20 mM EDTA, que separa els ions níquel de la reïna. Tot el procés es porta a terme a temperatura ambient, en condicions desnaturalitzants. Els eluats es van emprar directament per injectar conills i obtenir l'anticòs policlonal de Tlk amb col·laboració de l'empresa AbBcn.

De dos conills immunitzats amb el pèptid corresponent al fragment Tlk Cter-6His, un d'ells (C1) va proporcionar sèrum capaç de detectar baixos nivells de la proteïna recombinant TlkCter per *western blot*. Com a control negatiu es va emprar sèrum preimmune del mateix conill C1. Ara bé, degut a l'alt nombre de bandes inespecífiques que apareixien quan s'utilitzava directament el sèrum C1 per *western blot*, es va procedir a la purificació de l'anticòs contra Tlk. Els passos d'aquest protocol són els següents:

- Separar 100 μ g de TlkCter-6His en un únic pou per SDS-PAGE
- Transferir a una membrana de nitrocel·lulosa
- Tenyir amb Ponceau S i retallar la banda corresponent a TlkCter-6His
- Rentar 3 vegades durant 5 min amb TBS (20mM Tris-HCl, 0,125 M NaCl)
- Bloquejar amb 5% de llet en TBS

MATERIALS I MÈTODES

- Rentar 3 vegades durant 5 min amb TBS
- Incubar amb 200 μ l del sèrum més 300 μ l de TBS
- Agitar suaument durant 2 h
- Rentar 3 vegades durant 10 min amb TBS
- Eluir durant 20 min amb 500 μ l de 0.2 M glicina, 1 mM EGTA, pH 2.5
- Neutralitzar l'eluat amb 20 μ l de 1 M Tris
- Afegir glicerol al 5%, aliquotar i desar a -80°C

13. Anàlisi d'interactors de ciclina D1 per espectrometria de masses

Per l'anàlisi de la doble immunopurificació s'han utilitzat les cèl·lules HEK293T amb un total de 20 plaques de 150 mm, 10 plaques pel control i 10 plaques transfectades amb els vector 3FLAG-CBP-ciclina D1. La primera purificació utilitza el fragment CBP, que correspon al motiu d'unió a Calmodulina. Les cèl·lules es recullen amb PBS fred, es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 min a 4°C , i el pellet obtingut es resuspèn amb el tampó de lisi: 10 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1% Tween 20, 0.5 mM DTT i inhibidors de proteases i fosfatases.

L'extracte de cèl·lules se solubilitza durant 1 h rodant a 4°C i seguidament se centrifuga a 300 g durant 2 min a 4°C . El sobrenedant s'incuba amb reïna de Calmodulina conjugada a agarosa (*Calmodulin Affinity Resin, Stratagene*). Després de la unió, les perles es renten i es fan dues elucions en el tampó de lisi amb 10 mM EGTA en comptes de MgCl_2 .

La segona part és una immunoprecipitació amb l'anticòs contra l'epítop FLAG, conjugat a perles d'agarosa (α FLAG M2-Agarose, Sigma). Finalment, es renten les perles i s'analitza la quantitat de proteïna 3FLAG-CBP-ciclina D1 unida per *western-blot*, utilitzant l'anticòs monoclonal contra l'epítop FLAG (clon M2, Sigma).

Per la immunopurificació de 3FLAG-CBP-ciclina D1 en extreus entrecreuats amb DSP també es varen fer servir 20 plaques de 150 mm de cèl·lules HEK293T per l'anàlisi d'immunopurificació. Les cèl·lules es van recollir de la mateixa manera que en la doble immunopurificació, però el pellet es va resuspendre en el següent tampó: 10% sacarosa, 10 mM Hepes NaOH pH 7.5, 0.1% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF. Les cèl·lules varen ser homogeneïtzades amb el *Douncer* i seguidament tractades amb DSP (*dithiobis-succinimidylpropionate*, Pierce), per entrecreuar covalentment proteïnes presents en l'extracte quan el compost ester del DSP reacciona amb amides primàries. Després de solubilitzar amb 0.2% SDS, els extractes varen ser sonicats i centrifugats a 4000 rpm durant 5 min i seguidament la fracció soluble es va complementar amb Tritó X100 al 1% final. L'extret obtingut va ser sotmès a la purificació per afinitat utilitzant la reina α FLAG M2-agarosa. L'entrecreuament és reversible i és eliminat mitjançant el 2 β -mercaptoetanol durant la preparació de la mostra per SDS-PAGE.

En ambdós tipus d'immunopurificacions, la reina final va ser sotmesa a tripsinització i anàlisi per nanocromatografia bidimensional acoblada a un espectròmetre de masses TOF-TOF equipat amb nanoelectrospray (Enrique Calvo, CNIC, Madrid).

14. Immunoprecipitacions de la ciclina D1

Els MEFs es varen recollir en PBS fred, i després d'una centrifugació a 1000 rpm durant 5 min a 4°C, varen ser resuspendos en tampó de lisi: 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20, 2.5 mM DTT i inhibidors de proteases i fosfatases. Després de trencar les cèl·lules amb el *Douncer*, el extracte es va incubar a 4°C per 1 h en un rotador. L'extret es va centrifugar a 300 g durant 5 min a 4°C i el sobrenedant es va dividir en dues fraccions. A una d'elles s'hi va afegir

MATERIALS I MÈTODES

l'anticòs contra ciclina D1 (DCS-6) i a l'altra, l'anticòs contra l'epítop Myc (clon 9E10, Santa Cruz) com a control, i es varen incubar durant 1 h a 4°C. Per a la immunoprecipitació s'utilitzà la proteïna A unida a perles magnètiques (*Dynabeads, Invitrogen*), seguint les instruccions del fabricant.

Les immunoprecipitacions a partir de cèl·lules HEK293T s'han fet de manera similar a les de MEFs. El tampó de lisi utilitzat és el mateix, però en lloc de $MgCl_2$ 2mM s'ha utilitzat 2 mM EDTA. Els extractes cel·lulars varen ser immunoprecipitats amb reïna α FLAG agarosa (M2, Sigma).

RESULTATS

Durant la fase G1 del cicle cel·lular la majoria d'organismes eucariotes realitzen un control de la proliferació cel·lular que és especialment important per evitar desequilibris entre proliferació i creixement cel·lular. Concretament en l'anomenat punt de restricció, les cèl·lules esdevenen compromeses a iniciar el cicle cel·lular, i engeguen la maquinària necessària perquè la replicació del DNA es realitzi de forma eficaç. Les molècules clau del control en la fase G1 del cicle cel·lular són els complexos Cdk4-ciclina D i es coneixen força dades de la regulació de ciclina D1 a diferents nivells (transcripcional, post-transcripcional i traduccional), però encara es disposa de poques dades sobre el control en la fase G1 sobre la localització nuclear dels complexos Cdk4-ciclina D i se sap encara menys de la seva implicació en oncogènesi.

El nostre treball es basa en la hipòtesi que els complexos Cdk4-ciclina D són regulats a nivell de localització subcel·lular i tracta, per tant, d'identificar i caracteritzar els mecanismes moleculars responsables, així com els senyals als quals obeeixen per a participar en el control de la proliferació cel·lular.

1. La ciclina D1 es localitza al citoplasma en cèl·lules quiescents

Per realitzar aquest treball hem utilitzat fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) i la línia cel·lular NIH3T3, derivada de MEFs per supressió de senescència. Els MEFs van ser obtinguts per un procés de tripsinització a partir d'embrions de 14 dies. Després de plantar-los en plaques Petri i arribar a alta confluència durant uns 5-6 dies es van deprivar de factors tròfics durant 24 hores. A aquests MEFs ens referirem com **quiescents**. En aquest punt vam dividir les cèl·lules en presència de sèrum per estimular-les durant 16-18 h i així entrar en cicle. A aquests MEFs ens referirem com **ciclant**.

RESULTATS

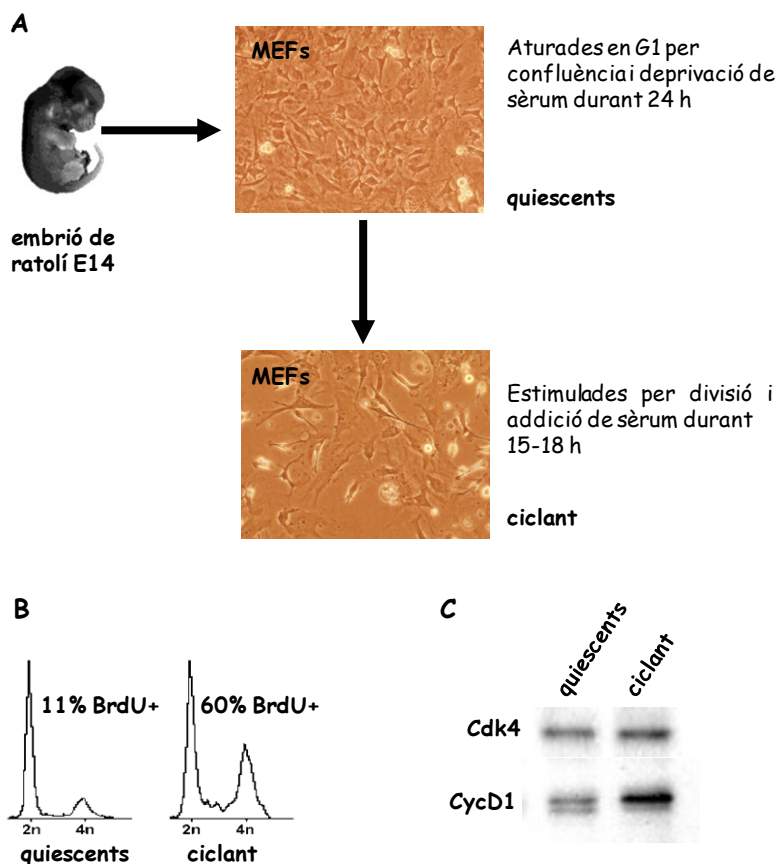


Figura 11. Model de treball: *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs).

A. Els MEFs van ser obtinguts a partir d'embrions de ratolí de 14 dies i mantinguts en medi DMEM 10% sèrum. Després d'arribar a alta confluència van ser deprivats en medi DMEM 0.5% sèrum durant 24 hores per aturar-los en fase G1 (quiescents) i seguidament van ser dividits i plantats en DMEM 10% sèrum per estimular-los durant 15-18 hores (ciclant).

B. Cèl·lules ciclant i quiescents analitzades per incorporació de BrdU i FACS.

C. Els nivells de proteïna de ciclina D1 (α CycD1 policlonal) i Cdk4 van ser analitzats per *western* en cèl·lules ciclant i quiescents.

Durant tot aquest treball hem estat comparant la localització subcel·lular dels complexos Cdk4-ciclina D tant en cèl·lules quiescents com en cèl·lules ciclant. Vam poder observar que, tant per FACS com per incorporació de BrdU (bromdeoxiuridina), al tenir una alta confluència i deprivar les cèl·lules de factors tròfics la majoria de cèl·lules no replicaven el DNA i s'acumulaven en G1. La quantitat de proteïna Cdk4 mesurada per western-blot era la mateixa en cèl·lules ciclant com en quiescents. En canvi, la quantitat de ciclina D1 va mostrar una disminució propera al 50% en cèl·lules quiescents (**figura 11**).

Com podem observar en la **figura 12** tant la deprivació de factors tròfics com la confluència varen ser factors importants per la localització subcel·lular de ciclina D1. Les cèl·lules ciclant presenten una clara acumulació de ciclina D1 al nucli i quan es troben en condicions quiescents el senyal nuclear disminueix. Això coincideix amb el fet que RB, la diana principal dels complexos Cdk4-ciclina D1 al final de G1, és al nucli (Kato et al., 1993). A temps curts de deprivació no varem observar canvis importants en el senyal nuclear de ciclina D1. En canvi, a temps llargs de deprivació (18, 24 i 36 h) junt amb una alta confluència es va observar una forta disminució dels nivells nuclears de ciclina D1. Els resultats suggereixen que, tot i haver una certa disminució dels nivells totals de ciclina D1 en cèl·lules quiescents, part de la ciclina D1 podria quedar retinguda en el citoplasma. En la **figura suplementària S1** mostrem la localització de Cdk4 i es pot observar també una clara disminució del senyal nuclear en les cèl·lules quiescents. Donat que ambdues proteïnes Cdk4 i ciclina D1 es necessiten una a l'altra per a ser importades al nucli (Matsushime et al., 1994), aquesta dada dóna suport a un control de la localització del complex en condicions de quiescència per deprivació de factors tròfics i elevada confluència cel·lular.

RESULTATS

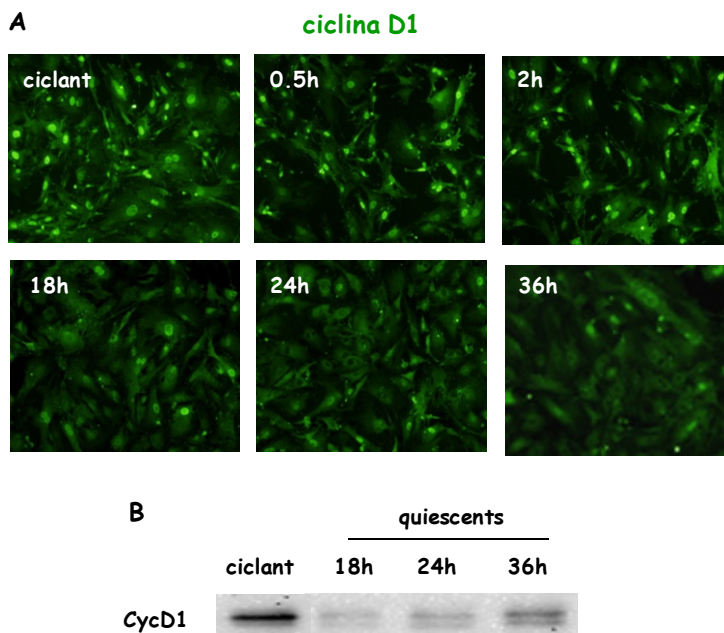


Figura 12. La privació de factors tròfics i la inhibició per contacte afecten la localització intracel·lular de la ciclina D1 en MEFs.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 endògena (D1-7213-G monoclonal) en cèl·lules ciclant i quiescents per la inhibició per contacte i la privació de sèrum (DMEM 0.5%) durant diferents temps (0.5, 2, 18, 24 i 36 h).

B. Per *western es* va determinar la quantitat de proteïna ciclina D1 (CycD1) de les cèl·lules ciclant i de les privades de sèrum a 18h, 24h i 36h (quiescents).

Per establir de manera clara la nostra hipòtesi sobre la regulació de la localització citoplasmàtica de ciclina D1, i evitar possibles artefactes d'inespecificitat per part dels anticossos emprats en la detecció de la ciclina D1 al citoplasma, vam clonar la proteïna marcada amb l'epítip HA en un vector lentiviral i així poder determinar de forma unívoca la localització tant nuclear com citoplasmàtica de la ciclina D1 en MEFs i NIH3T3 infectats. Primer vam utilitzar un vector lentiviral amb un promotor de citomegalovirus (CMVp), però vam observar que augmentava l'expressió de la proteïna de les cèl·lules ciclant respecte les quiescents. En canvi, a l'utilitzar el promotor

d'ubiquitina (UBIp) l'expressió de la proteïna era la mateixa en les dues situacions. En la **figura 13** mostrem la immunofluorescència amb un anticòs α HA de la proteïna 3HA-CycD1 expressada des del promotor UBIP en el vector lentiviral (Ubip-3HA-CycD1) en cèl·lules ciclant i quiescents. Com a control vam utilitzar cèl·lules no infectades.

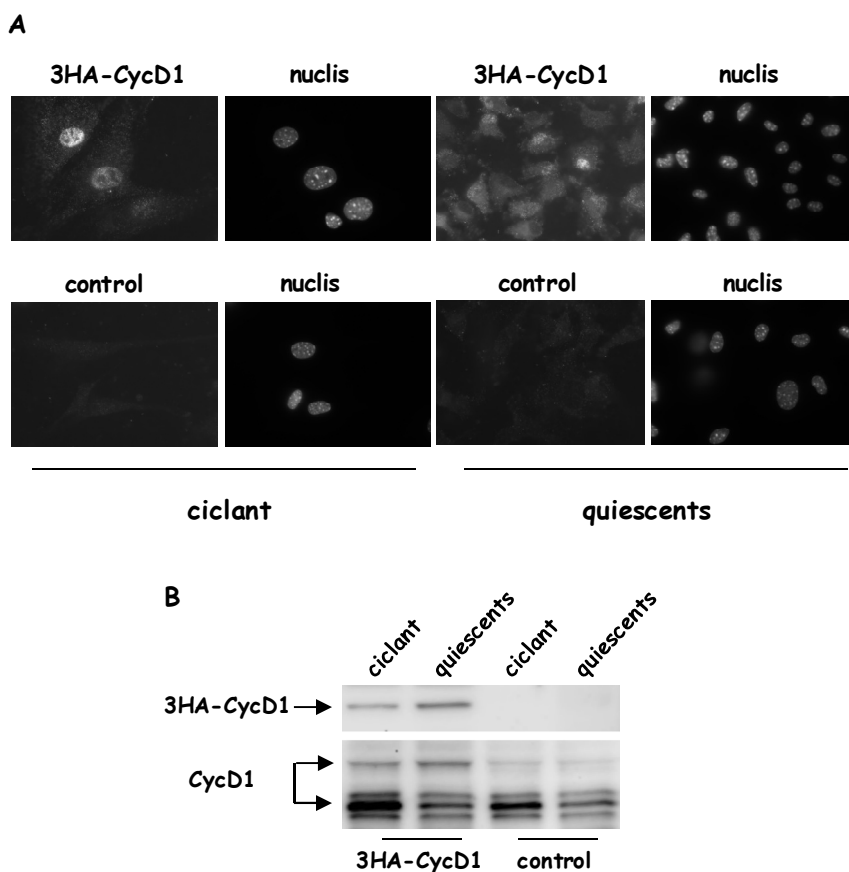


Figura 13. La ciclina D1 exògena mostra una localització similar a l'endògena en MEFs.

A. Immunofluorescència de 3HA-CycD1 (monoclonal α HA 3F10) de cèl·lules ciclant i aturades en G1 infectades amb el vector lentiviral UBIP-3HA-CycD1. Es mostren també cèl·lules no infectades com a control. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Els nivells de ciclina D1 es van analitzar per *western* utilitzant l'anticòs contra l'epítip HA per observar la ciclina D1 exògena i un anticòs policlonal (α CycD1) per detectar tant l'endògena com l'exògena.

RESULTATS

Podem veure una clara acumulació nuclear de la ciclina D1 quan les cèl·lules estan ciclant, que no s'observa quan es troben en estat quiescent. D'altra banda, aquest mètode ens va permetre detectar la presència específica de ciclina D1 en el citoplasma sense ambigüitats. A més, quan vam mesurar la quantitat de proteïna per *western blot* amb l'anticòs α HA vam observar que els nivells de 3HA-CycD1 lentiviral són els mateixos en les dues situacions. En canvi, amb l'anticòs contra ciclina D1 vam poder observar també l'augment de la proteïna endògena en les cèl·lules ciclant respecte les quiescents. En la **figura suplementària S2** mostrem també la localització citoplasmàtica i nuclear de la ciclina D1 lentiviral en cèl·lules NIH3T3 i els nivells de proteïna per *western*, on observem exactament el mateix que en MEFs.

Els resultats obtinguts ens confirmen que hi ha un canvi de localització de ciclina D1 al comparar les cèl·lules quiescents i ciclant, ja que els nivells de proteïna ciclina D1 que expressa el vector lentiviral en les dues situacions són els mateixos. Per tal de confirmar aquesta localització citoplasmàtica de ciclina D1 en la **figura 14** mostrem la immunofluorescència i el *western* de ciclina D1 en MEFs wt i knockout (*CCND1*^{-/-}). En aquests experiments varem poder avaluar l'especificitat dels diferents anticossos disponibles per a ciclina D1, i varem concloure que l'anticòs DCS-6 és el més específic. Contràriament a l'esperat, tot i haver estat emprat en els principals treballs publicats en relació al control de la localització de ciclina D1 (Diehl et al., 1998; Alt et al., 2000), l'anticòs D1-7213-G va oferir un clar senyal inespecífic en MEFs *CCND1*^{-/-}.

En resum, les nostres dades suggereixen que la ciclina D1 podria estar regulada per algun mecanisme de retenció al citoplasma o d'import/export nuclear quan les cèl·lules es troben aturades en la fase G1 del cicle cel·lular en condicions de quiescència.

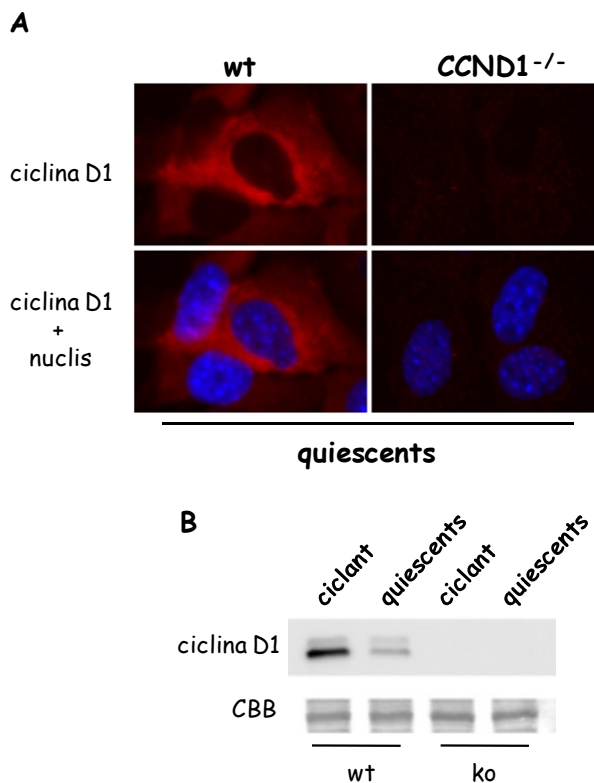


Figura 14. La ciclina D1 es detecta en el citoplasma de cèl·lules quiescents.

A. Els MEFs wt i *knockout* (CCND1^{-/-}) de ciclina D1 es van permeabilitzar amb saponina i es van analitzar per immunofluorescència utilitzant l'anticòs monoclonal contra ciclina D1 (DCS-6). Els nuclis van ser tenyits amb Hoechst.

B. Anàlisi per *western-blot* dels nivells de ciclina D1. CBB és una banda tenyida amb Coomassie Blue com a control de càrrega.

2. Cerca d'altres condicions on la localització de ciclina D1 es veu afectada

Després de caracteritzar el nostre model vam fer una cerca de condicions on la localització de ciclina D1 també està afectada per tal d'establir possibles connexions funcionals.

RESULTATS

Ja hem vist que tant la confluència com la deprivació de factors tròfics són importants per la localització de la ciclina D1. Vam pensar que les xaperones, que ajuden al replegament de proteïnes, podrien estar involucrades en aquests canvis de localització ja que se sap, per exemple, que la Hsc70, una de les proteïnes més abundants en el citosol i nucli de la cèl·lula, ajuda a la formació del complex Cdk4-ciclina D1 (Diehl et al., 2003). Endemés, el nostre grup ha demostrat recentment la implicació de xaperones del tipus Hsp70 i Hsp40 en la retenció i alliberament del complex Cdk-ciclina G1 homòleg en llevat de gemmació (Vergés et al., 2007). Les coxaperones Hsp40, Hop, Hip i Chip són factors importants pel replegament de les proteïnes ja que modulen el domini ATPasa de Hsc70 (Hip) o s'uneixen al domini C-terminal de Hsc70 (Hop i Chip). En tot aquest complex de xaperones i coxaperones també està involucrada Hsp40 o DnaJ per activar el domini ATPasa de Hsc70.

Els MEFs van ser transfectats amb GFP (control) i cotransfectats amb GFP i la xaperona Hsc70 o les diferents coxaperones. Passades les 24 hores de transfecció vam fer la immunofluorescència contra CycD1 endògena amb l'anticòs D1-7213-G i contra GFP utilitzant un anticòs policlonal i així poder mesurar el valor de pixel del senyal nuclear de ciclina D1. Comparant cèl·lules transfectades només amb GFP (control) i les que coexpressen les dues proteïnes en cap cas no es va observar una diferència significativa del senyal nuclear (**figura suplementària S3**). Així, dels nostres experiments vàrem concloure que ni la superexpressió de la xaperona Hsc70 ni de les coxaperones Hsp40, Hop, i Hip afecten la localització de ciclina D1, observant-se només un lleu efecte en superexpressar Chip.

Una altra de les xaperones que podria estar implicada en la localització de ciclina D1 és la Hsp90 ja que està involucrada en el

replegament de Cdk4 i ajuda a la seva estabilització (Stepanova et al., 1996). Els MEFs ciclant van ser tractats amb 10 μ M geldanamicina, un inhibidor de la xaperona Hsp90, durant 3 h. Per immunofluorescència contra ciclina D1 vam observar una disminució del senyal nuclear respecte les cèl·lules no tractades (control) però aquesta disminució també es va observar en quantificar els nivells de proteïna per *western*, indicant per tant un efecte a nivell d'expressió (**figura suplementària S4**).

El creixement en suspensió de les cèl·lules va ser una altra de les condicions on també vam analitzar si la localització de ciclina D1 es veia afectada. Hi ha estudis on l'expressió de ciclina D1 és reduïda quan hi ha una desorganització del citoesquelet (cèl·lules crescudes en suspensió) i per tant un bloqueig en la progressió del cycle cel·lular (Bohmer et al., 1996; Fringer and Grinnell, 2001). Tot i observar una disminució dels nivells nuclears de ciclina D1 (**figura suplementària S5**), no varem ser capaços de detectar de forma específica un senyal citoplasmàtic de ciclina D1. Donat que en aquestes condicions s'ha descrit una forta disminució del nivells d'expressió de ciclina D1, varem descartar d'analitzar amb més detall la possibilitat d'una regulació addicional a nivell d'acumulació nuclear.

La β -catenina té un paper important en l'adhesió cel·lular ja que fa de pont físic i funcional entre la cadherina i el citoesquelet d'actina. A més és una proteïna que està implicada en la via de senyalització Wnt on una acumulació i estabilització de β -catenina al citoplasma fa que es transloqui al nucli i activi l'expressió de diversos gens, entre ells la ciclina D1 (Shtutman et al., 1999). Per tal d'analitzar un possible paper de β -catenina en la localització de ciclina D1, les cèl·lules NIH3T3 van ser transfectades amb plasmidis expressant GFP(control), GFP i β -catenina, i GFP i el mutant S37Y β -catenina, una versió més estable de la proteïna, car la GSK-3 β fosforila la β -catenina en S33 i S37 assenyalant-la per a la seva degradació (Sadot et

RESULTATS

al., 1997). Mentre que la localització de ciclina D1 en cèl·lules quiescents no es va veure afectada al superexpressar β -catenina i el mutant hiperestable S37Y, en les cèl·lules ciclant varem observar una lleugera disminució del senyal nuclear per superexpressió de β -catenina respecte el control (**figura suplementària S6**). En canvi, el mutant hiperestable S37Y de β -catenina es va comportar exactament igual que el control, indicant que si β -catenina tingués un paper en regular la localització de ciclina D1 en cèl·lules ciclant, aquesta necessitaria la S37 o la fosforilació en S37.

Una altra de les condicions on vam analitzar la localització de ciclina D1 és durant un xoc tèrmic. En aquest cas, la distribució de freqüències segons el senyal nuclear de la ciclina D1 després del xoc tèrmic va mostrar un moderat desplaçament cap a valors més baixos, coincidint amb una disminució similar en els seus nivells per *western* (**figura suplementària S7**).

La via UPR (*Unfolded Protein Response*) ha estat implicada en la regulació de la traducció de la ciclina D1 (Brewer et al., 1999). Per tal d'analitzar un possible paper també en la seva localització, es van tractar cèl·lules NIH3T3 ciclant amb 1 μ M tapsigargina o 1 μ g/ml tunicamicina durant 1 o 4 h. Mentre que la tunicamicina va afectar també la síntesi de ciclina D1 (**figura suplementària S8**) i no va permetre analitzar la possibilitat d'un control en la localització, la inducció de la via UPR amb tapsigargina va tenir un fort efecte en la localització de la ciclina D1 sense afectar els nivells de proteïna mesurats per *western* (**figura 15**). Aquest resultat suggereix que la localització citoplasmàtica de la ciclina D1 podria estar també regulada per la via UPR per a col·laborar amb el mecanisme descrit de regulació traduccional en evitar l'entrada en cicle en condicions d'estrés al retícle.

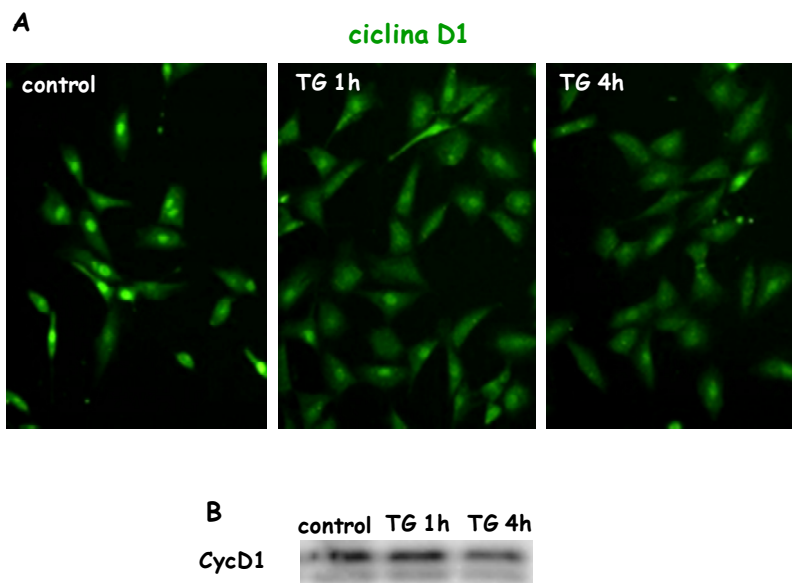


Figura 15. La inducció de la via UPR amb tapsigargina (TG) en cèl·lules NIH3T3 afecta a la localització de ciclina D1.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 (D1-7213-G) de NIH3T3 ciclant: no tractades (control) o tractades amb 1 μ M tapsigargina durant 1 o 4 h.

B. Mesura dels nivells de proteïna ciclina D1 per *western* (CycD1).

3. FGF2 és important per la localització de ciclina D1

Els FGFs són factors de creixement fibroblàstic que actuen sobretot a través de la unió als seus receptors tirosina-quinasa i també per la unió a heparina. Per la unió als seus receptors els factors de creixement activen diverses vies de transducció de senyal. Els FGFs es troben implicats en una gran varietat de processos com la diferenciació, la regulació de la proliferació i la migració cel·lular (Bikfalvi et al., 1998; Malecki et al., 2004). Per tant, FGF2 podria ser un possible candidat en regular la localització de ciclina D1. Per aquest motiu vam tractar MEFs quiescents amb FGF1 o FGF2 a una concentració de 50 ng/ml durant 24 hores. Com pot observar-se en la **figura 16**, només el factor de creixement FGF2 va produir un augment en els nivells de ciclina D1 endògena per *western*, i també un fort augment del

RESULTATS

seu senyal nuclear. Per tal de dissociar els efectes de síntesi i localització vam analitzar la fusió 3HA-CycD1 expressada des del vector lentiviral ja descrit (*Ubip-3HA-CycD1*). La **figura 17** mostra que els nivells de 3HA-CycD1 lentiviral no varien quan comparem les cèl·lules control amb les tractades amb FGF1 o FGF2. En canvi, només hi ha un fort augment del senyal nuclear de 3HA-CycD1 en les cèl·lules quiescents quan són tractades amb FGF2. Resultats pràcticament idèntics varen ser obtinguts en cèl·lules NIH3T3 (**figures suplementàries S9 i S10**).

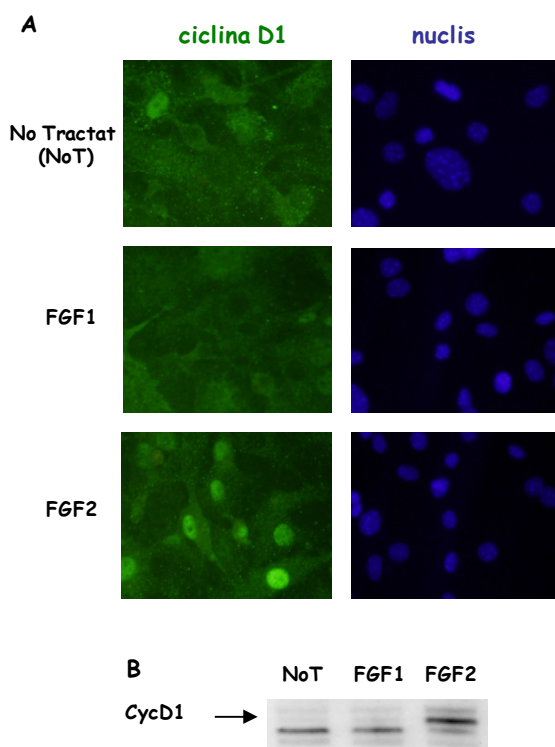


Figura 16. Augment del senyal nuclear de ciclina D1 endògena al tractar els MEFs quiescents amb FGF2.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 (D1-7213-G) en MEFs quiescents tractats amb FGF1 o FGF2. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Per *western-blot* es va determinar la quantitat de ciclina D1 endògena (CycD1).

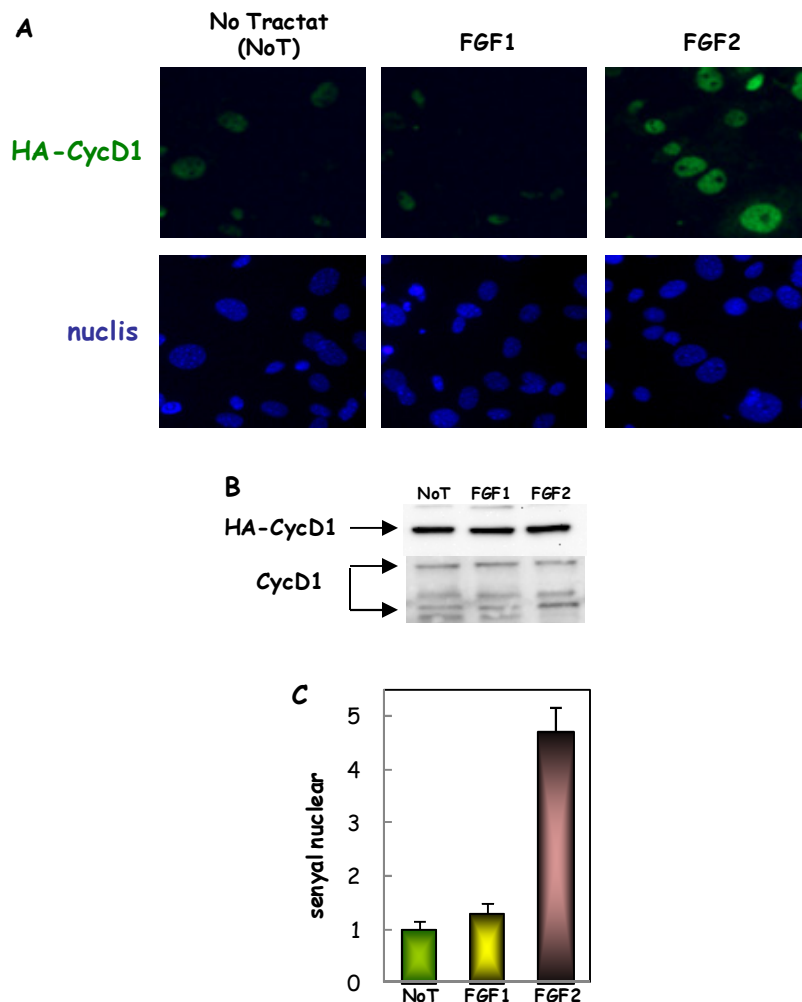


Figura 17. Augment del senyal nuclear de ciclina D1 exògena al tractar els MEFs quiescents amb FGF2.

A. Els MEFs van ser infectats amb un vector lentiviral que expressa 3HA-CycD1 i la immunofluorescència es va fer contra l'epítot HA (α HA 3F10). Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Per *western* es va determinar la quantitat de proteïna tan per la ciclina D1 endògena (α CycD1) com per l'exògena (α HA).

C. En la gràfica es representa el senyal nuclear relatiu de ciclina D1 exògena en les diferents condicions. Les barres inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

4. La ciclina D1 podria estar regulada per un mecanisme de retenció citoplasmàtica

Fins ara hem mostrat resultats que demostren que l'acumulació nuclear de la ciclina D1 és inhibida sota condicions de quiescència, suggerint l'existència de mecanismes fins ara desconeguts de retenció citoplasmàtica o de regulació a nivell d'import/export nuclear. Validant el nostre model de manipulació per transfecció, una fusió de la ciclina D1 a GFP (GFP-D1) tampoc s'acumula en el nucli en cèl·lules quiescents. En la **figura 18** es mostren cèl·lules NIH3T3 ciclant i quiescents superexpressant la fusió GFP-D1 per transfecció.

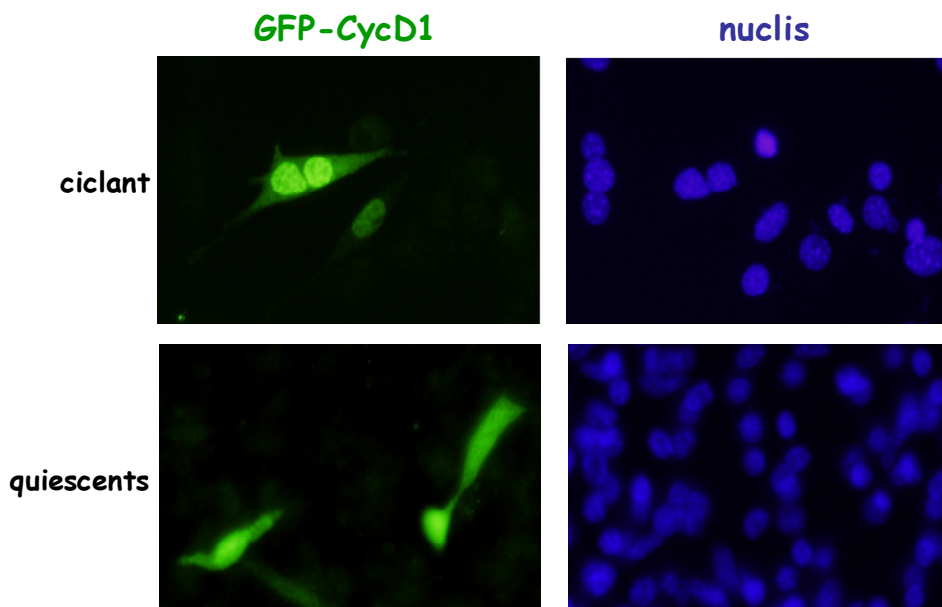


Figura 18. GFP-CycD1 té una localització molt similar a la ciclina D1 endògena en cèl·lules NIH3T3.

Cèl·lules ciclant i quiescents van ser transfectades amb GFP-CycD1 i analitzades per immunofluorescència (α GFP). Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

Ja que en fase S la proteïna quinasa GSK-3 β fosforila a la ciclina D1 en T286 per a ser exportada al citoplasma per l'exportina Crm1 (Diehl et al., 1997; Diehl et al., 1998), vàrem voler comprovar si el mecanisme que controla la localització de ciclina D1 en cèl·lules quiescents és el mateix que en la fase S. La **figura 19** mostra que el mutant GFP-CycD1 Δ CT és totalment nuclear en cèl·lules quiescents.

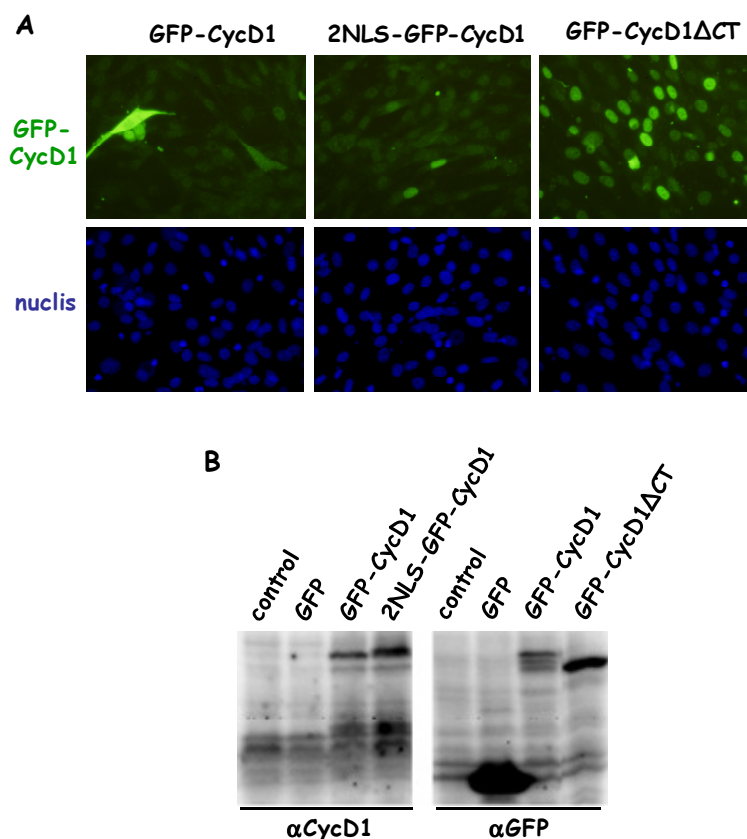


Figura 19. El mutant Δ CT de la ciclina D1 és preferentment nuclear en cèl·lules NIH3T3 quiescents

A. Les cèl·lules quiescents van ser transfectades amb GFP-CycD1, 2NLS-GFP-CycD1 o GFP-CycD1 Δ CT. La immunofluorescència es va fer contra GFP.

B. Els nivells de les diferents fusions de ciclina D1 a GFP es van mesurar per *western*. amb anticossos policlonals contra ciclina D1 o GFP.

RESULTATS

Aquest mutant manca els darrers 37 aminoàcids de l'extrem C-terminal, on resideixen bona part de la seqüència PEST i els residus T286 i T288, i és pràcticament idèntica a la ciclina D1b, el mutant per *splicing* defectuós que mostra una elevada capacitat tumorigènica. En el cas d'aquest mutant GFP-CycD1 Δ CT només observem la proteïna en el *western* contra GFP ja que l'anticòs de ciclina D1 està dirigit contra els últims aminoàcids de ciclina D1. En la **figura 20B** mostrem la quantificació del rati nucli/citoplasma de les cèl·lules quiescents transfectades amb GFP-CycD1 (wt), GFP-CycD1 Δ CT, i 2NLS-GFP-CycD1. Aquests resultats impliquen directament el domini C-terminal de la ciclina D1 en la regulació de la seva localització. En la transició G1-S el complex Cdk4-ciclina D1 ha de ser nuclear per a fosforilar la proteïna retinoblastoma i així alliberar el factor de transcripció E2F per a produir l'onada d'activació transcripcional que finalment executarà la replicació del DNA (Kato et al., 1993). Ja en fase S, la ciclina D1 és fosforilada en T286 per GSK-3 β , i en ser reconeguda per l'exportina Crm1 és exportada al citoplasma i degradada via proteasoma (Alt et al., 2000). Nosaltres hem observat que ni la inhibició de Crm1 amb Leptomicina B ni de GSK-3 β amb LiCl aconsegueix que la ciclina D1 s'acumuli en el nucli en condicions de quiescència (**figura 20C**). Aquests resultats indiquen que els mecanismes de regulació de la localització de la ciclina D1 en les fases G1 i S són diferents, i suggereixen l'existència d'un nou mecanisme de retenció citoplasmàtica, donat que una fusió de la ciclina D1 a un senyal de localització nuclear (2NLS-GFP-CycD1) simula només en part els efectes de la mutació Δ CT com podem veure en les **figures 19 i 20B**.

El nostre grup ha publicat recentment que l'homòleg de ciclina D1 en llevat, Cln3, s'uneix al reticle endoplasmàtic junt amb Cdc28 (l'homòleg de Cdk4) quan les cèl·lules es troben a l'inici de la fase G1 del cicle cel·lular (Wang et al., 2004; Vergés et al., 2007). Pel treball realitzat en el nostre

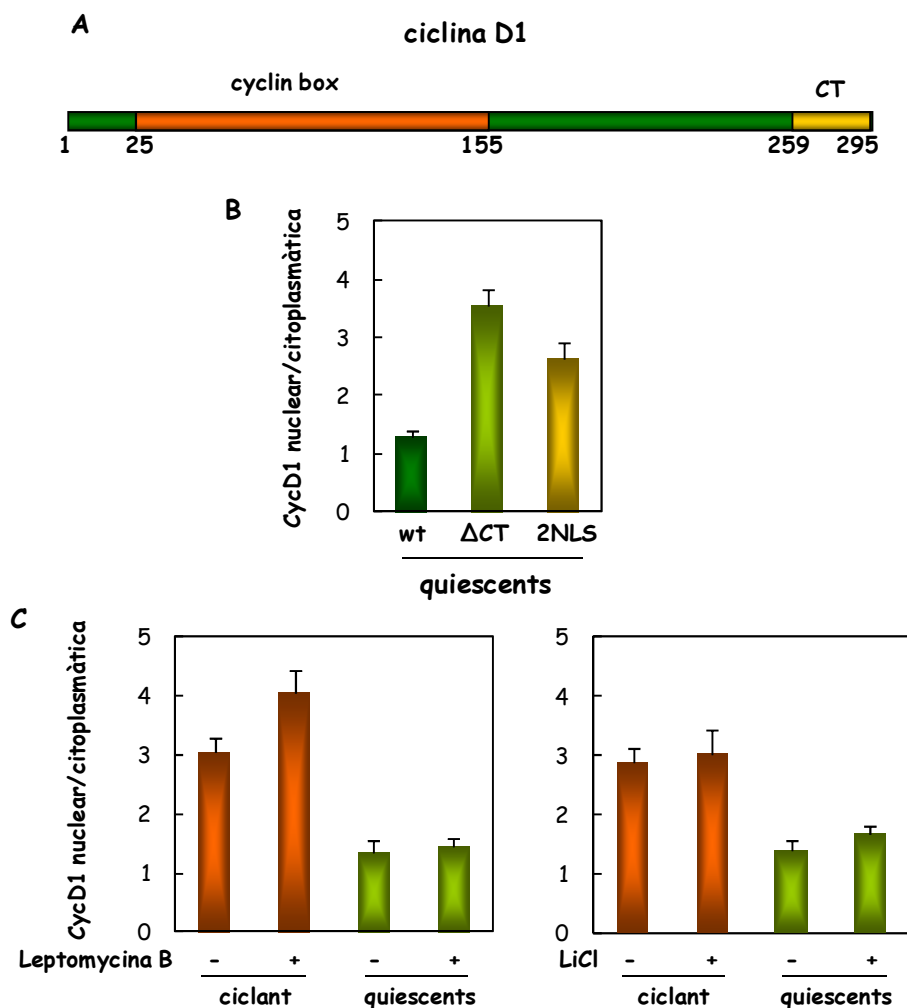


Figura 20. La ciclina D1 en condicions d'aturada en G1 podria estar regulada per un mecanisme de retenció citoplasmàtica.

A. Esquema de la ciclina D1 mostrant el domini *cyclin box* d'interacció amb la Cdk i el domini C terminal (CT).

B. Ratis nucli/citoplasma del senyal nuclear de GFP-CycD1 (wt), 2NLS-GFP-CycD1 (2NLS), i GFP-CycD1ΔCT (ΔCT) en cèl·lules quiescents. Les barres inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

C. Ratis nucli/citoplasma del senyal nuclear de GFP-CycD1 en cèl·lules ciclant o quiescents tractades amb 10 ng/ml leptomicina B durant 3 h i amb LiCl durant 16 h. Les barres representen els valors de la mitjana i inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

RESULTATS

grup en llevat i pels resultats obtinguts fins al moment també pensem que aquesta retenció citoplasmàtica en condicions de quiescència podria estar relacionada amb estructures cel·lulars com el reticle endoplasmàtic o el citoesquelet.

La ciclina Cln3 presenta una elevada insolubilitat a Tritó X100 en extrems totals. Per comprovar si la ciclina D1 es comporta de forma similar a la ciclina Cln3 de llevat, vam provar de solubilitzar la proteïna en presència de Tritó X100 o Tween 20 en cèl·lules ciclant o quiescents.

En un primer experiment (**figura 21A**) vam tractar les cèl·lules amb Tritó X100 i la major part de ciclina D1 va ser solubilitzada en les cèl·lules ciclant, mentre que en condicions de quiescència una gran part de la ciclina D1 no va solubilitzar-se. Per contra, el tractament amb Tween 20 sí va solubilitzar una fracció important de la ciclina D1 en les cèl·lules quiescents. Aquestes fraccions solubilitzades amb Tween 20 de les dues condicions es van passar per columnes Microcon R30 (30KDa) i R100 (100KDa), i es van mesurar els nivells retinguts de ciclina D1. Només en les cèl·lules quiescents una gran part de la proteïna es va trobar retinguda en la columna R100, indicant que la ciclina D1 podria estar formant part de grans complexes només en quiescència (**figura 21B**).

A l'observar que la ciclina D1 podria estar formant part d'algun complex en el citoplasma en condicions de quiescència vam intentar identificar noves proteïnes implicades en la localització dels complexes Cdk4-ciclina D1 per dues vies: (1) purificació per afinitat o immunopurificació i anàlisi per espectrometria de masses, i (2) selecció basada en la tècnica del di-híbrid amb la ciclina D1 i dues genoteques de ratolí.

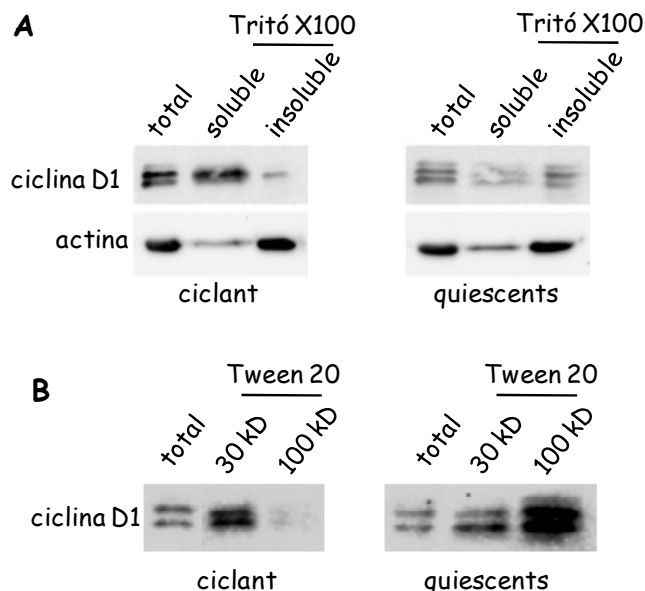


Figura 21. La ciclina D1 és present en complexos més grans i insolubles en condicions de quiescència.

A. MEFs ciclant i quiescents van ser tractats amb 0.2% Tritó X100 sobre placa durant 1 min per obtenir una fracció soluble i una fracció insoluble. Per *western-blot* es va analitzar la ciclina D1 i l'actina.

B. Les fraccions solubilitzades amb Tween 20 es van filtrar a través de columnes microcon R30 (30KD) o R100 (100KD) i la ciclina D1 retinguda es va analitzar per *western*.

5. Identificació d'interactors per afinitat i espectrometria de masses

Vam fusionar dos epítops FLAG i CBP a la ciclina D1 per fer una doble immunopurificació que ens permetés identificar possibles interactors per espectrometria de masses aplicada directament a les fraccions copurificades per doble afinitat. Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb el vector 3FLAG-CBP-CycD1 i solubilitzades amb Tween 20. La fracció soluble es va purificar primer per unió a calmodulina i després a la reïna FLAG. Com a control vam utilitzar cèl·lules HEK293T no transfectades. En la **figura 22** podem veure el seguiment de la purificació

RESULTATS

de la proteïna per *western* α FLAG. Proves prèvies amb l'epítip HA havien donat resultats negatius.

Després de la doble immunopurificació es van analitzar les mostres per espectrometria de masses i es van identificar una sèrie de proteïnes, alguna ja coneguda com la xaperona Hsc70, així com d'altres xaperones de la mateixa família o el factor associat a TBP.

A

<i>Cyclin D1</i>	<i>gi 23273807</i>
<i>heat shock 70kDa protein 1B [Homo sapiens]</i>	<i>gi 4885431</i>
<i>HSP70-2</i>	<i>gi 4529892</i>
<i>dnaK-type molecular chaperone HSPA1L - human</i>	<i>gi 2119712</i>
<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	<i>gi 74143862</i>
<i>TBP-associated factor [Homo sapiens]</i>	<i>gi 1732073</i>

B

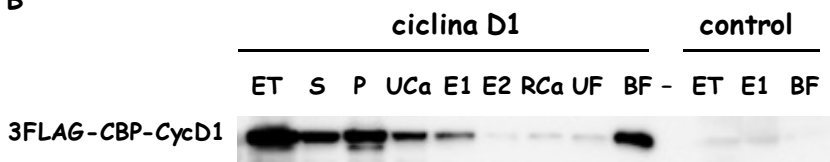


Figura 22. Proteïnes co-purificades per doble afinitat amb ciclina D1 i identificades per espectrometria de masses (2D-nLC acoblada a nanoelectrospray-MS).

A. Les fraccions solubles de cèl·lules HEK293T transfectades amb 3FLAG-CBP-CycD1 van ser primer purificades per unió a calmodulina i després per unió a la reïna α FLAG. La doble purificació va ser analitzada per espectrometria de masses.

B. *Western* α FLAG de les mostres obtingudes durant la purificació de cèl·lules transfectades amb 3FLAG-CBP-CycD1 i les mostres control (no transfectades). **ET**: Extret total; **S**: Soluble; **P**: Pellet; **UCa**: No unit a calmodulina; **E1**: Elució 1; **E2**: Elució 2; **RCa**: Restes unides a calmodulina; **UF**: No unit a α FLAG; **BF**: Unit a α FLAG.

En un segon experiment vam utilitzar la fracció soluble tractada amb DSP (*dithiobis-succinimidylpropionate*) per entrecreuar químicament els

possibles components dels complexos amb la ciclina D1. Després d'una solubilització amb SDS (que seguidament es va quelar amb Tritó X100), l'extret obtingut es va sotmetre a la purificació per afinitat utilitzant la reïna FLAG. En la **figura 23** mostrem el gel de tinció amb plata de les purificacions a partir de cèl·lules transfectades amb 3FLAG-CBP-CycD1 i cèl·lules control.

A

Cyclin D1
KIAA1360 protein (unknown)
Spindlin
translation initiation factor eIF-4A I
CAP, adenylate cyclase-associated protein 1
Nuclear RNA export factor 1

AAA52136
 Q9P2I7_HUMAN
 Q7KZJ8_HUMAN
 CAE99179
 CAPI_HUMAN
 Q68CW9_HUMAN

B

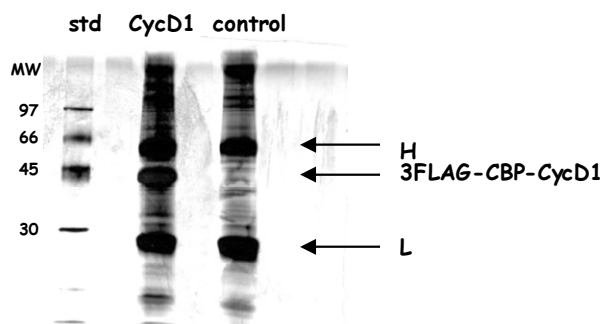


Figura 23. Proteïnes co-immunoprecipitades amb ciclina D1 i identificades per espectrometria de masses (2D-nLC acoblada a nanoelectrospray-MS).

A. Les cèl·lules HEK293T transfectades amb 3FLAG-CBP-CycD1 van ser tractades amb DSP, solubilitzades amb SDS i sotmeses a doble immunopurificació amb reïna α FLAG. L'anàlisi de proteïnes en la mostra final es va fer per espectrometria de masses.

B. Gel de tinció amb plata. Es mostra la immunopurificació de les cèl·lules control i de les cèl·lules transfectades amb 3FLAG-CBP-CycD1. També s'indiquen les bandes corresponents a l'anticòs (H,L) i l'estàndard de proteïna (std).

RESULTATS

Després de l'anàlisi per espectrometria de masses vam obtenir una sèrie de proteïnes de funció diversa: *spindlin* (una proteïna nuclear que augmenta el nombre de cèl·lules en fase S i G2/M per la seva superexpressió), eIF4AI (un factor d'inici de la traducció amb activitat helicasa), CAP (proteïna associada a l'adenilat ciclase), un factor nuclear d'export d'RNA, i una proteïna de funció desconeguda KIAA1360.

6. Identificació d'interactors per di-híbrid

Vam utilitzar com a *bait* la ciclina D1 sencera i dues genoteques diferents, l'embrionària de ratolí i la de cervell de ratolí. En la genoteca embrionària de ratolí vam obtenir 926 clons dels quals 845 van ser Cdk4, 38 clons que no es van poder validar posteriorment i 43 clons que corresponen a les proteïnes que s'esmenten a la **taula 3**. Entre ells, vam obtenir factors de transcripció, la calmodulina, la xaperona Hsp1 o 84, proteïnes zinc *finger*, citocrom c oxidasa, miopalladin, c-myc, p57 (inhibidor de Cdk) i d'altres. També vam obtenir proteïnes relacionades amb el citoesquelet com la proteïna MAP1B LC1, que té un paper important en la regulació del citoesquelet neuronal (Schoenfeld and Obar, 1994). Safb2 es troba tant al nucli com al citoplasma, és un corepressor del receptor d'estrogen, i inhibeix la proliferació cel·lular quan se superexpressa (Townson et al., 2003). Finalment, la transloquina és una proteïna que es troba associada als microtúbuls i s'uneix específicament al factor de creixement FGF2 per a facilitar el seu import al nucli (Bossard et al., 2003).

En la genoteca de cervell de ratolí vam obtenir 37 clons dels quals 5 corresponien a Cdk4, 9 clons que no es van poder validar posteriorment i 23 clons que corresponen a les proteïnes que s'especifiquen a la **taula 3**.

Taula 3. Interactors de ciclina D1 per di-híbrid.

CLON	Gentoteca Embrió	Gentoteca Cervell
Ankrd12 (ankyrin repeat domain 12)	1	
Ap2m1 (adaptor protein complex AP-2)	1	
Arid2 (AT rich interactive domain 2)	3	
Calmodulin 2 (calcium-binding protein)	2	
Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4)	632	5
Cox1 (cytochrome c oxidase subunit)		1
Cox11 (cytochrome c oxidase subunit)	2	1
Cox2 (cytochrome c oxidase subunit)	2	
EF1 α (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha)		1
EF1 β 2 (translation elongation factor 1 beta 2)	1	
GABA receptor (gamma-aminobutyric acid receptor, subunit alpha 4)		3
GAPDH (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase)		1
Gtf2e2 (transcription initiation factor IIE, beta subunit)		1
Hmgn2 (high mobility group nucleosomal binding domain 2)	1	
Hsp1 (Hsp90-type chaperone, heat shock protein)	6	
MAP1A-LC2 (microtubule-associated protein 1A)		1
MAP1B LC1 (microtubule-associated protein 1B)	1	
mKIAA0157 protein (unknown function)	1	
Mypn (myopalladin)	1	
Nfe2/1 (nuclear factor, erythroid derived)	2	
p57 (Cdk-inhibitor)	1	
Procollagen type I alpha 2	1	
Proteasome subunit beta type 6	2	
RalGDS-like factor		1
Ranbp9 (Ran GTPase binding)		4
RNA helicase	1	
Safb2 (scaffold attachment factor B2)	2	
SCLIP (intracellular signaling cascade, microtubule associated)		2
SuccDH (succinate dehydrogenase)		1
TAF9 (TFIID subunit, general transcription factor)	1	
Tcerg1 (transcription elongation regulator 1 (CA150))	1	
Telomeric repeat binding factor 2	1	
Translokín (FGF2 binding protein; microtubule associated)	2	1
Trbf2 (telomeric repeat binding factor 2, interacting protein)		1
TSC2 Rap1 GTPase activating protein)		1
Ttc23 (tetratricopeptide repeat domain 23)	1	
Ube2e2 (ubiquitin-protein ligase activity)	1	
Zfp128 (zinc finger protein 128)		1
Zfp295 (zinc finger protein 295)	2	
Zfp469 (zinc finger protein 469)	1	

RESULTATS

Vam trobar proteïnes associades a microtúbuls com MAP1A-LC2, que també havíem trobat a l'altra genoteca i que ja hem descrit anteriorment, o SCLIP, proteïna que pertany a la família de la *stathmin* i s'expressa en el sistema nerviós (Ozon et al., 1998). La tuberina o TSC2 ja descrita com a proteïna d'unió a ciclina D1 (Zacharek et al., 2005). La proteïna RalGDS-like factor (Rlf) que pertany a la família dels RalGEFs i té un domini d'unió a Ras (Wolthuis et al., 1996), i Ranbp9, una proteïna d'unió a la GTPasa Ran que ajuda al replegament d'altres proteïnes (Murrin and Talbot, 2007). Finalment, en aquesta genoteca també vam identificar la transloquina com a clar interactor de ciclina D1.

En la **figura 24** es mostra la comprovació per di-híbrid de la interacció entre les diferents proteïnes relacionades amb el citoplasma (Safb2, LC2, Ranbp9, SCLIP, transloquina, TSC2 i Rlg2) i la ciclina D1. Els llevats van ser crescuts en medi mínim amb glucosa sense histidina ni adenina, i amb 2 ó 10 mM d'aminotriazol (AT). Podem observar que totes les proteïnes excepte Ranbp9 necessiten la ciclina D1 com esquer per a donar un resultat positiu en el di-híbrid.

De totes aquestes proteïnes relacionades amb el citoplasma la transloquina ens va interessar especialment per la seva implicació en l'import al nucli del factor de creixement FGF2 (Bossard et al., 2003), sobretot tenint en compte que aquest factor (i no FGF1) causa un augment del senyal nuclear de ciclina D1 en cèl·lules quiescents. Transloquina s'associa al citoesquelet de tubulina, és capaç de multimeritzar i ha estat proposada com a una proteïna *bastida* que podria reclutar altres proteïnes amb el propòsit de regular i coordinar llur funció. D'altra banda, la superexpressió de transloquina causa una aturada del cycle cel·lular en G1 (Momotami et al., 2008) , suggerint una implicació funcional en el control de l'entrada al cycle cel·lular.

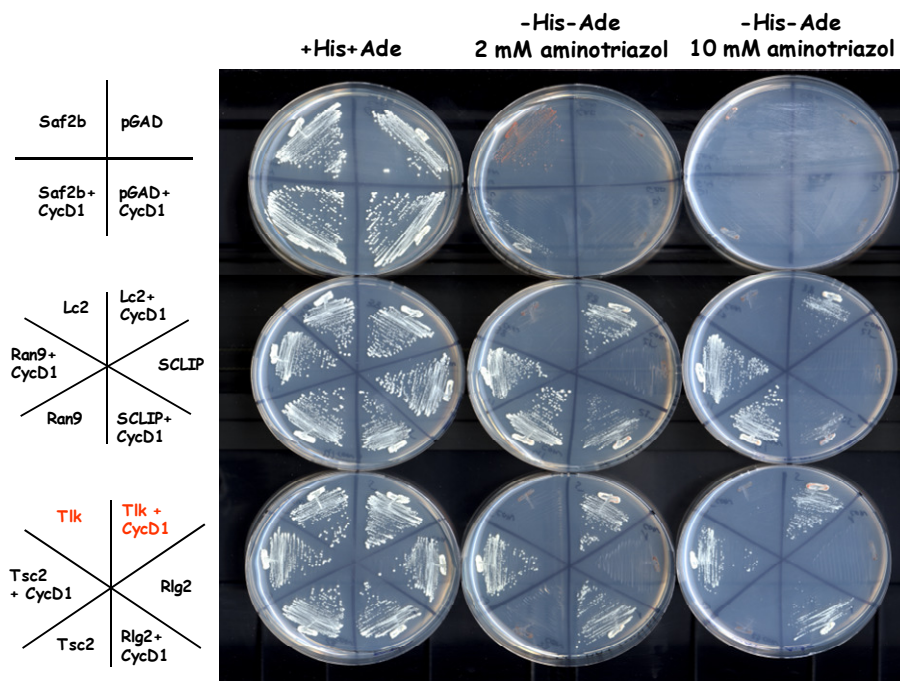


Figura 24. Anàlisi de diferents interactors de la ciclina D1 identificats per di-híbrid (Safb2, LC2, Ran9, SCLIP, Tik, TSC2 i Rlg2).

Cèl·lules de llevat de gemmació de la soca AH109 transformades amb les diferents fusions varen ser crescudes en medi mínim amb glucosa sense histidina ni adenina per comprovar les interaccions prèviament identificades per di-híbrid.

7. Dominis i interaccions de ciclina D1 i transloquina per di-híbrid

En l'anàlisi per di-híbrid vam obtenir la part C-terminal de la transloquina (residus 226-500) en tres clons independents, dos en la genoteca embrionària de ratolí i un en la de cervell de ratolí.

Primerament vam intentar determinar quin domini de ciclina D1 podria ser important per la interacció amb el domini C-terminal de la transloquina (TlkCter). En la **figura 25A** mostrem l'anàlisi per di-híbrid de

RESULTATS

les interaccions de diferents versions de ciclina D1 (*CycD1Δ1*, *CycD1Δ2*, *CycD1Δ3* i *CycD1Δ4*) amb TlkCter.

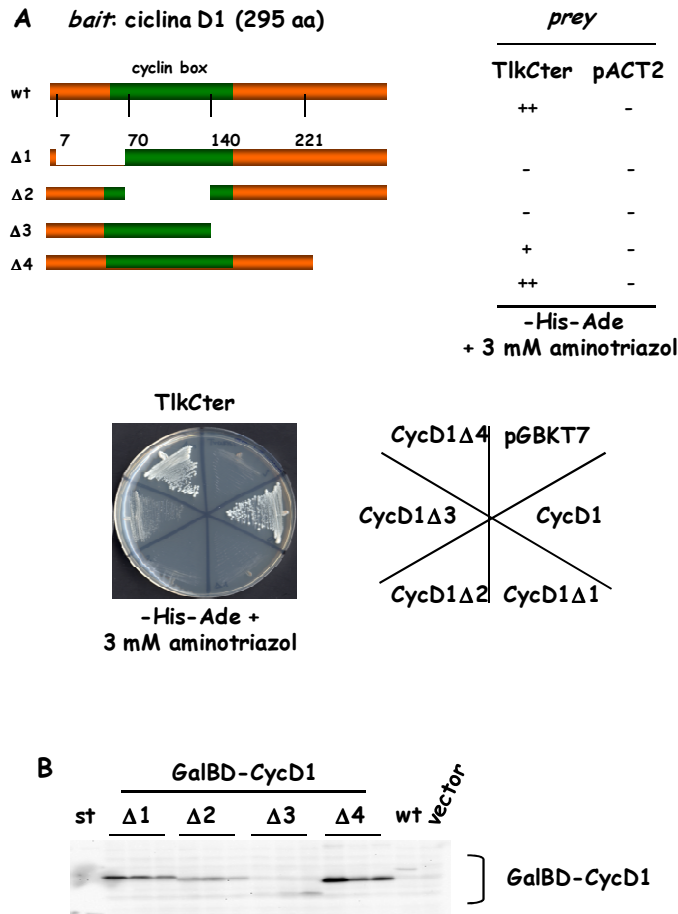


Figura 25. Interacció del domini C-terminal de transloquina amb diferents dominis de ciclina D1.

A. Comprovació per di-híbrid del domini de ciclina D1 necessari per la interacció amb el domini C-terminal de la transloquina en medi SC sense histidina ni adenina. pGBKT7 és el plasmidi control. *CycD1Δ1*: delecíó del residu 7 al 70; *CycD1Δ2*: delecíó del residu 70 al 140; *CycD1Δ3*: delecíó del residu 140 al 221; *CycD1Δ4*: delecíó del residu 221 al 295.

B. Comprovació per *western* del nivell d'expressió de les diferents construccions delecionades de ciclina D1.

Podem comprovar en el creixement en llevat que a 3 mM d'aminotriazol (condicions poc restrictives) no s'observa interacció de les formes CycD1 Δ 1 i CycD1 Δ 2 de ciclina D1 amb TlkCter. Així doncs, aquests dominis de ciclina D1, on hem deleccionat part de la caixa ciclina, podrien ser importants per la interacció amb TlkCter. En canvi, sembla que la part C terminal de ciclina D1 (CycD1 Δ 4) no seria important per la interacció amb TlkCter. Per *western* varem comprovar els nivells d'expressió de 3 clons independents de cada versió de ciclina D1 (**figura 25B**).

Per altra banda, també vam voler identificar quin domini de TlkCter podria ser important per la interacció amb ciclina D1. En la **figura 26A** es mostren les interaccions de les diferents delecions de TlkCter amb la ciclina D1. Tant a 3 mM com 30 mM aminotriazol s'observa un creixement limitat amb les delecions TlkCter Δ 2 i TlkCter Δ 4. En la **figura 26B** també es mostren els nivells d'expressió de 2 clons independents de les diferents delecions de TlkCter.

Cercant similituds entre diferents proteïnes que havíem trobat en el di-híbrid (transloquina, SCLIP, RalGDS, Tsc2 i Safb2) vàrem identificar una seqüència QAQLEKQ (196-202 en TlkCter) que podria ser un possible lloc comú d'interacció amb ciclina D1. Per tant, vam voler comprovar si una inserció dels aminoàcids GPPGG en aquesta regió o la seva delecio en la TlkCter eren importants per la interacció amb ciclina D1. Com mostra la **figura 26A** aquest motiu no és important ja que ni la inserció ni la delecio esmentades varen produir cap efecte en la interacció amb ciclina D1.

D'aquesta anàlisi de dominis de ciclina D1 i transloquina podem dir que la caixa ciclina tindria un paper important en la interacció amb la TlkCter mentre que, per altra banda, els dominis 2 i 4 de TlkCter jugarien un paper important en la interacció amb ciclina D1.

RESULTATS

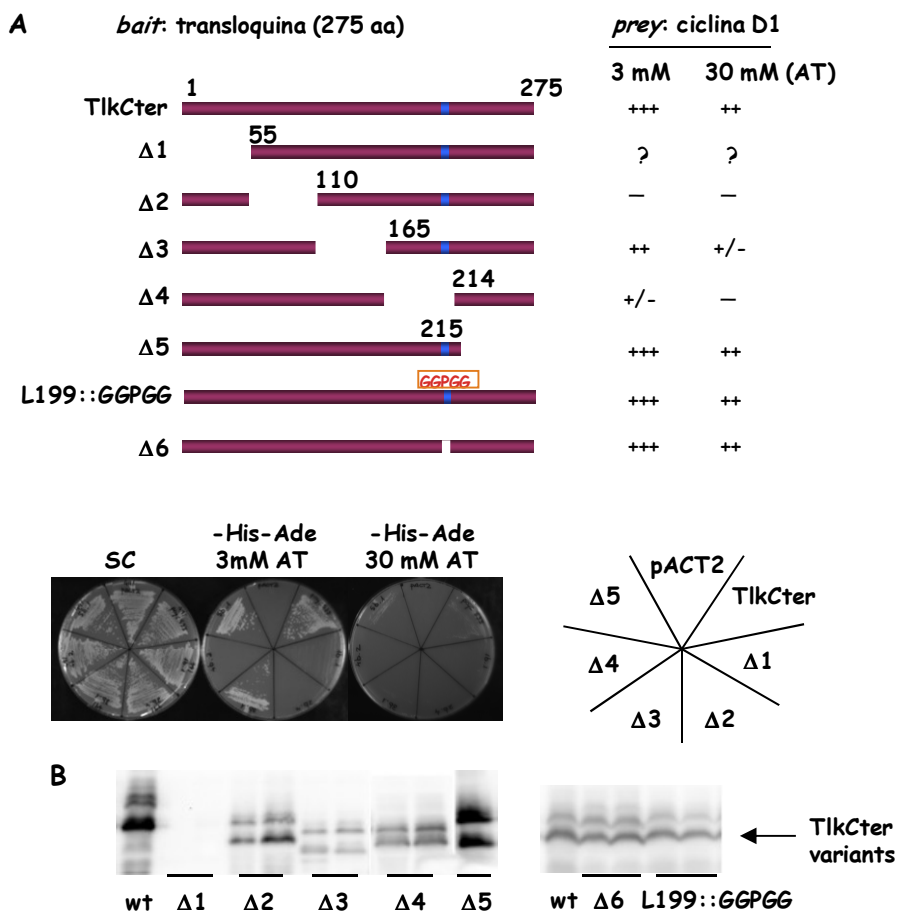


Figura 26. Comprovació per di-híbrid de les interaccions entre les versions delecionades del domini C terminal de la transloquina i la ciclina D1.

A. Comprovació per di-híbrid dels dominis C terminals de transloquina necessaris per la interacció amb la ciclina D1 a 3 i 30 mM d'aminotriazol (AT) en medi SC sense histidina ni adenina. Com a control es va utilitzar el vector pACT2. Es varen analitzar delecions seriades dels residus 1-55 (TlkCterΔ1), 50-100 (TlkCterΔ2), 105-165 (TlkCterΔ3), 160-214 (TlkCterΔ4) i 215-275 (TlkCterΔ5), així com una delecio dels residus 196-202 (TlkCterΔ6) i una inserció del pèptid GGPGG en L199 (TlkCterL199::GGPGG).

B. Anàlisi per *western* dels nivells d'expressió de les diferents versions de TlkCter.

8. Interacció de ciclina D1 i transloquina en MEFs i cèl·lules HEK293T

Després de definir per di-híbrid possibles dominis d'interacció entre ciclina D1 i TlkCter vam voler comprovar que la transloquina i la ciclina D1 interaccionen a nivell endogen en MEFs en condicions de quiescència. Tal com es mostra en la **figura 27**, varem poder detectar clarament la presència específica de transloquina en immunoprecipitats de ciclina D1, ambdues expressades pels respectius gens cromosòmics.

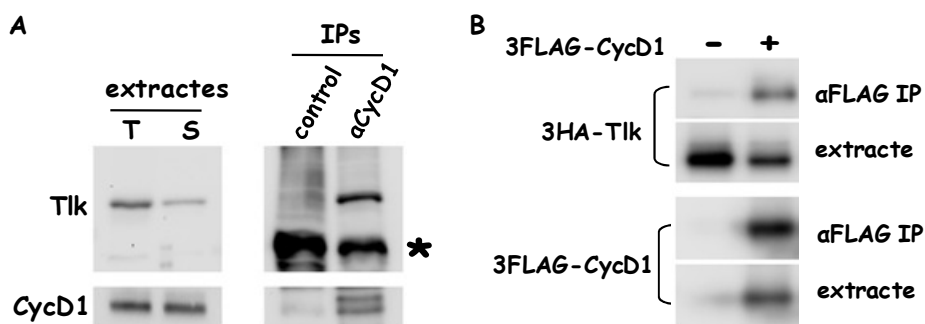


Figura 27. La ciclina D1 endògena interacciona amb la transloquina en MEFs quiescents i en cèl·lules HEK293T.

A. Els extractes cel·lulars els varem obtenir de MEFs quiescents per alta confluència i deprivació de sèrum. Per la immunoprecipitació es va utilitzar l'anticòs DCS-6 per la ciclina D1 i c-myc (control) com a control negatiu. Els extractes T i S corresponen al total i soluble respectivament. Les mostres van ser analitzades per *western-blot* amb anticossos policlonals α CycD1 i α Tlk. L'asterisc indica la posició de la cadena pesant IgG de l'anticòs.

B. Immunoprecipitació de la ciclina D1 amb transloquina en extractes tractats amb DSP. Les cèl·lules HEK293T van ser cotransfectades amb 3FLAG-CycD1 i 3HA-Tlk, i després d'immunoprecipitar la ciclina D1 amb reina α FLAG, les mostres van ser analitzades per *western-blot* amb anticossos α FLAG i α HA.

RESULTATS

Per tal de poder analitzar la importància dels diferents dominis de ciclina D1 i transloquina en un context cel·lular més proper als MEFs que el llevat de gemmació, varem decidir estudiar en cèl·lules HEK293T la interacció entre la Tlk sencera i la ciclina D1. Les cèl·lules van ser cotransfectades amb 3FLAG-CycD1 i 3HA-Tlk, i després d'immunoprecipitar la ciclina D1 utilitzant la reïna α FLAG vam determinar per *western* la presència de transloquina (**figura 27**). De la mateixa manera que per di-híbrid, vam estudiar si hi ha dominis de ciclina D1 importants per la interacció amb transloquina vam fer el mateix per immunoprecipitació en cèl·lules HEK293T. Sabent que la part C terminal de ciclina D1 és important per la seva localització, ja que el mutant de ciclina D1 Δ CT és molt nuclear, vam voler analitzar la interacció en cèl·lules HEK293T entre transloquina i aquest mutant.

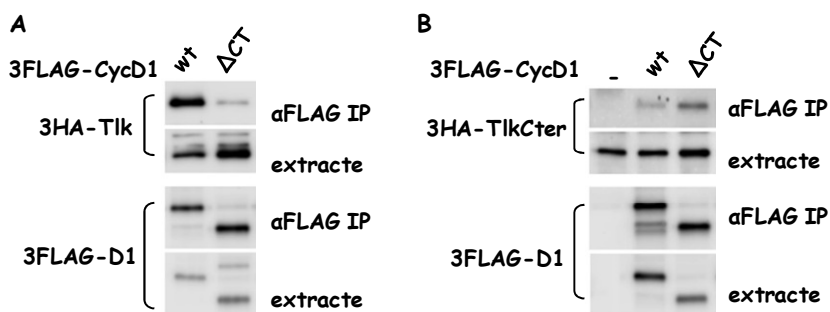


Figura 28. La seqüència C-terminal de ciclina D1 és important per la interacció amb transloquina.

A. Les cèl·lules HEK293T van ser cotransfectades amb 3HA-Tlk i 3FLAG-CycD1 o el mutant 3FLAG-CycD1 Δ CT, i els extrems cel·lulars es varen immunoprecipitar amb reïna α FLAG. La presència de transloquina en els immunoprecipitats es va analitzar amb anticòs α HA.

B. Les cèl·lules HEK293T van ser cotransfectades amb 3HA-TlkCter i 3FLAG-CycD1 o el mutant 3FLAG-CycD1 Δ CT, i els extrems cel·lulars es varen immunoprecipitar amb reïna α FLAG. La presència de transloquina en els immunoprecipitats es va analitzar amb anticòs α HA.

En la **figura 28A** les cèl·lules van ser cotransfectades amb 3HA-Tlk i 3FLAG-CycD1 o el mutant Δ CT, i es va determinar la presència de transloquina amb un anticòs α HA.

En la **figura 28B** mostrem les mateixes interaccions de ciclina D1 amb TlkCter. Observem que la part C-terminal de ciclina D1 és important en la interacció amb la transloquina completa ja que la deleció d'aquest fragment fa disminuir de forma important la interacció. En canvi, obtenim una interacció millor entre aquest dos mutants de ciclina D1 i TlkCter, de manera similar als resultats obtinguts en l'anàlisi per di-híbrid.

Aquests resultats en cèl·lules HEK293T i els obtinguts per di-híbrid ens suggereixen que mentre la part C-terminal de transloquina podria interaccionar amb la caixa ciclina, altres regions de la transloquina interaccionarien amb la part C terminal de la ciclina D1, essent aquestes darreres potser més importants *in vivo*.

Assumint que la formació del complex Cdk4-ciclina D1 es dona al citoplasma, que la transloquina es troba associada al citoesquelet i que per di-híbrid hem vist que la caixa ciclina interacciona amb el domini C-terminal de transloquina, vam analitzar la possibilitat que transloquina i Cdk4 poguessin competir per la unió a ciclina D1 (**figura 29**). En cèl·lules HEK293T vam cotransfectar la TlkCter, la ciclina D1 marcada amb l'epítip FLAG i Cdk4. Observem que amb la superexpressió de Cdk4 (**carril 2**) tenim una menor quantitat de transloquina unida a ciclina D1 que si només tenim Cdk4 endògena. En canvi, quan superexpressem un mutant de ciclina D1 que no pot unir-se a Cdk4 (3FLAG-CycD1K112E, **carril 3**), observem que tenim una major quantitat de transloquina immunopurificada. Podem proposar, per tant, que Cdk4 i transloquina podrien estar competint per unir-se a ciclina D1.

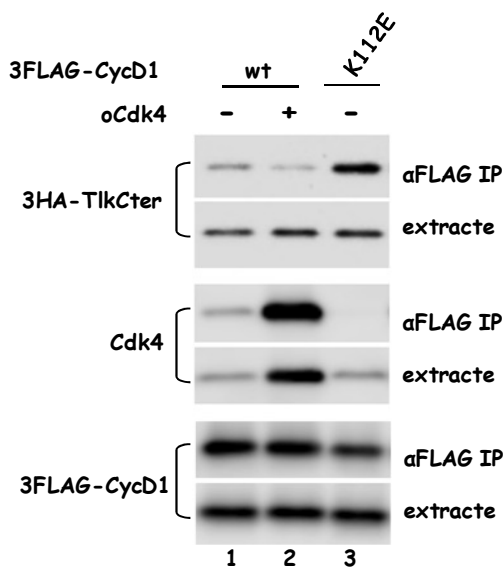


Figura 29. Cdk4 i transloquina podrien estar competint per la interacció amb ciclina D1.

Cèl·lules HEK293T van ser cotransfectades amb 3HA-TlkCter i bé 3FLAG-CycD1 i pcDNA3 (carril 1), 3FLAG-CycD1 i pMmCdk4 (carril 2) o 3FLAG-CycD1K112E i pcDNA3 (carril 3). Els extrems cel·lulars es varen immunoprecipitar amb reïna α FLAG. La presència de transloquina en els immunoprecipitats es va analitzar amb anticòs α HA, i per *western* es van determinar els nivells de transloquina, Cdk4 i CycD1.

Si aquesta proposta fos certa, i tenint en compte que la ciclina D1 necessita unir-se a Cdk4 per la seva translocació al nucli, la transloquina podria tenir un paper important com regulador de l'acumulació nuclear de la ciclina D1. Per tal de donar suport a aquests resultats en MEFs varem analitzar per immunopurificació la interacció entre aquestes proteïnes a nivells endògens. Per les immunoprecipitacions de ciclina D1, Cdk4 i transloquina es va utilitzar un anticòs monoclonal contra ciclina D1, un monoclonal i un policlonal per a Cdk4, un policlonal per a transloquina, i com a control es va utilitzar l'anticòs c-myc. En la **figura 30** es mostren els extractes i els immunoprecipitats obtinguts a partir de MEFs quiescents

analitzats per *western blot* per a detectar les proteïnes ciclina D1, Cdk4 i transloquina. Es pot observar que les parelles Cdk4-ciclina D1 i transloquina-ciclina D1 co-immunoprecipiten de forma recíproca, però ni es detecta transloquina en els immunoprecipitats de Ckd4 ni Cdk4 en els corresponents a transloquina.

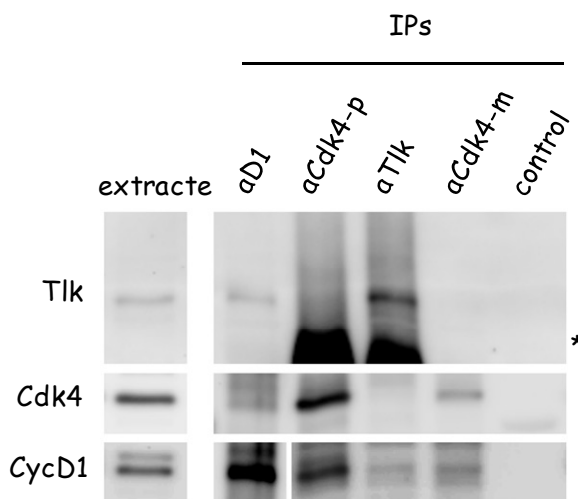


Figura 30. Cdk4 i transloquina coimmunoprecipiten de forma independent amb ciclina D1.

Els extractes cel·lulars es van obtenir a partir de MEFs quiescents i es van sotmetre a immunoprecipitació amb un anticòs monoclonal contra ciclina D1 (DCS-6), un policlonal 06-139 (α Cdk4-p) i un monoclonal DCS-35 (α Cdk4-m) per Cdk4, un policlonal Tlk-1045 (α Tlk) contra transloquina i un anticòs monoclonal c-myc com a control. Els extractes i els immunoprecipitats es van analitzar per *western-blot* per detectar la ciclina D1, Cdk4 i transloquina. L'asterisc indica la posició de la cadena pesant de IgG quan s'utilitza un anticòs policlonal.

Aquests resultats indicarien que Cdk4 i transloquina no co-existirien en complexos amb ciclina D1, i dóna suport a la idea que transloquina i Cdk4 podrien competir per la unió a ciclina D1.

9. La superexpressió de transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1

La transloquina interacciona amb FGF2 (però no amb FGF1) i és important per a translocar FGF2 al nucli, i nosaltres hem observat que FGF2 (però no FGF1) augmenta l'acumulació nuclear de ciclina D1 en cèl·lules quiescents. Per aquesta raó i l'esmentat en l'anterior apartat vam voler analitzar l'efecte que transloquina podia tenir en la localització de ciclina D1 en cèl·lules ciclant o quiescents. En la **figura 31** mostrem la immunofluorescència de ciclina D1 endògena i la transloquina de cèl·lules NIH3T3 transfectades amb 3HA-Tlk.

Com ja s'havia observat per altres autors, la superexpressió de transloquina marca un subconjunt d'estructures perinuclears de microtúbuls (Bossard et al., 2003; Momotami et al., 2008). Però de manera molt més rellevant pel nostre objectiu, el senyal nuclear de ciclina D1 va disminuir considerablement com es pot observar en la gràfica on representem el percentatge del senyal nuclear relatiu de ciclina D1 de les cèl·lules que presenten transloquina respecte les control (no transfectades). També en aquest efecte vam voler analitzar per immunofluorescència quin domini de transloquina podria ser important per la localització de ciclina D1. Com ja hem comentat abans, la interacció entre les dues proteïnes sembla dependre de diversos dominis.

Primerament, vam voler observar quina era la localització de la transloquina en cèl·lules NIH3T3 transfectades amb diferents versions de transloquina (Tlk, TlkCter, TlkNter i Tlk Δ 2) marcades amb l'epítip HA (**figura 32**). Mentre que transloquina es localitza en un subconjunt de microtúbuls (veure més amunt), la TlkCter és totalment nuclear en la majoria de les cèl·lules i perinuclear en algunes d'elles, la TlkNter és

citoplasmàtica sense distribució microtubular, i en el mutant $Tlk\Delta 2$ tenim tant senyal nuclear com citoplasmàtic sense localització microtubular.

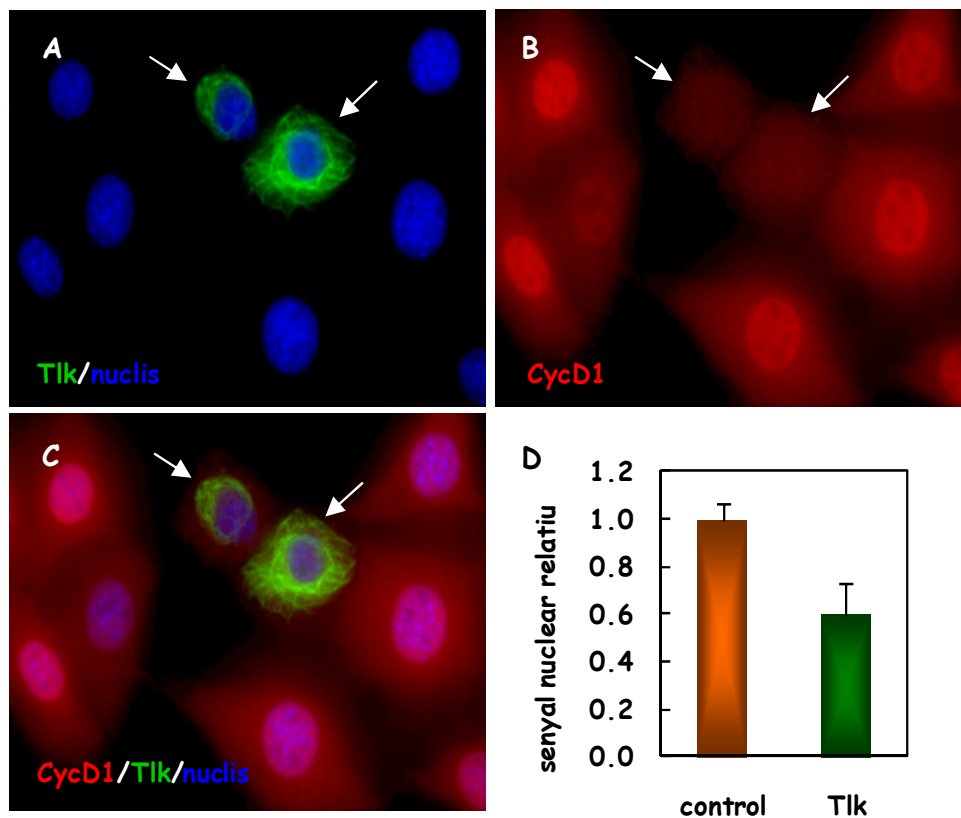


Figura 31. La transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1.

A. Cèl·lules NIH3T3 ciclant van ser transfectades amb 3HA-Tlk (Tlk) i per immunofluorescència es va detectar la transloquina amb un anticòs α HA. Les cèl·lules transfectades es marquen amb una fletxa. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Imatge d'immunofluorescència de la ciclina D1 endògena de les matèries cèl·lules que en A.

C. Combinació d'imatges en A i B.

D. En el gràfic es representa el percentatge del senyal nuclear relatiu de les cèl·lules transfectades amb transloquina (Tlk) respecte les cèl·lules no transfectades (control). Les barres inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

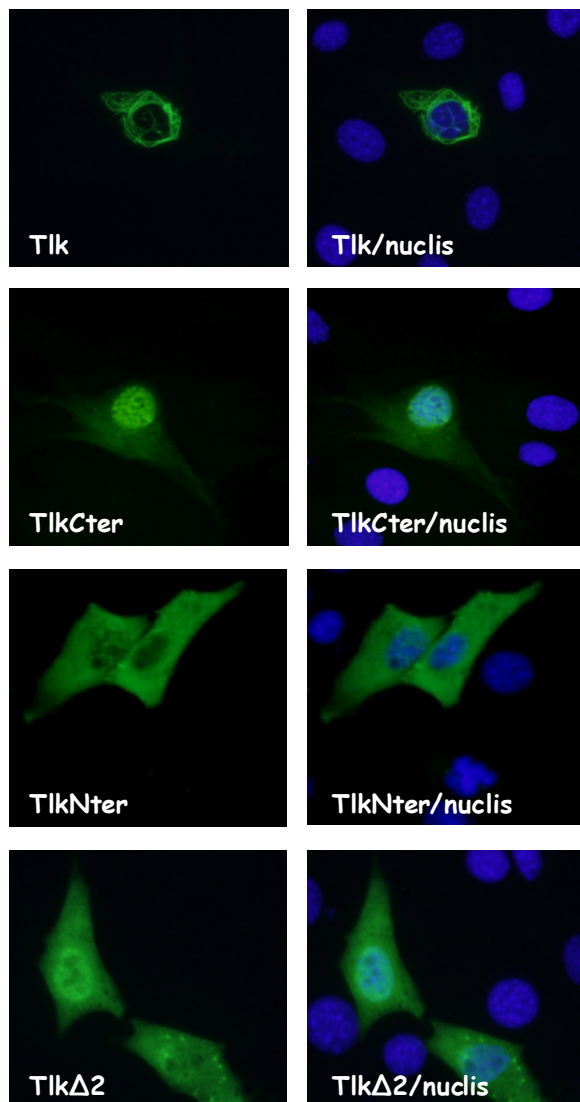


Figura 32. Localització de diferents variants de transloquina.

En la figura es mostra la localització de fusions 3HA de diferents variants de transloquina (Tlk, TlkCter, TlkNter, i TlkΔ2) en cèl·lules NIH3T3 ciclant.

Tot seguit vàrem analitzar la forma en que les diferents versions de transloquina afectaven a la localització de ciclina D1. En la **figura 33** tenim la

immunofluorescència de la ciclina D1 endògena i la transloquina transfectada en cèl·lules NIH3T3 ciclant, i en la **figura 34** mostrem les gràfiques on es quantifica el senyal nuclear de ciclina D1 de les cèl·lules transfectades amb les diferents versions de transloquina.

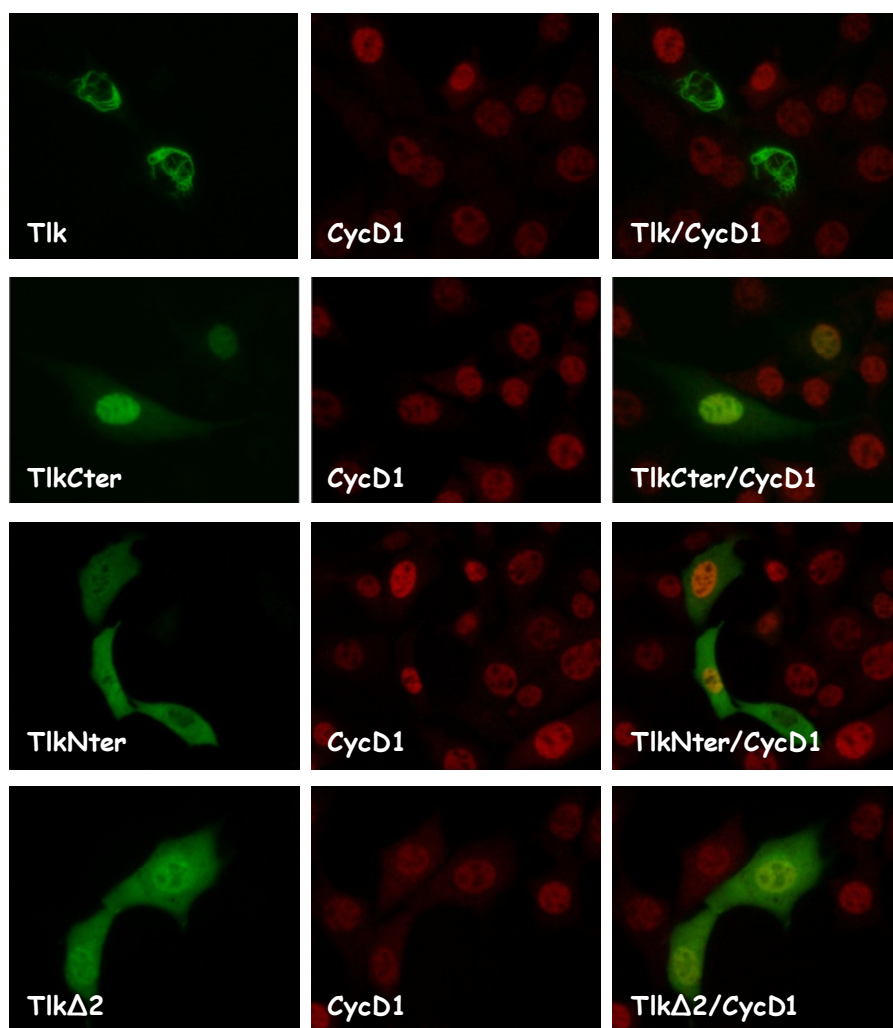


Figura 33. Inhibició de l'acumulació nuclear de ciclina D1 al superexpressar les diferents formes de transloquina.

Les cèl·lules NIH3T3 ciclant van ser transfectades amb fusions 3HA de diferents variants de transloquina (Tlk, TlkCter, TlkNter, i Tlk Δ 2) i per

RESULTATS

immunofluorescència es va detectar la ciclina D1 endògena i la transloquina exògena. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

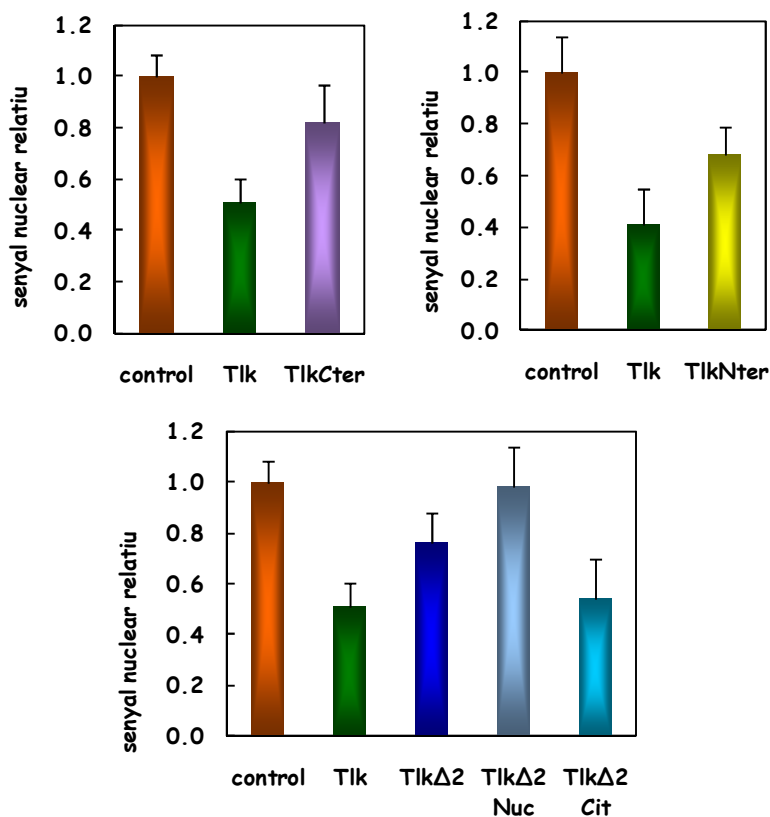


Figura 34. Inhibició de l'acumulació nuclear de ciclina D1 per diferents variants de la transloquina.

En els gràfics es representa el senyal nuclear relatiu de ciclina D1 en cèl·lules NIH3T3 ciclant i transfectades amb diferents variants de la transloquina (Tik, TikNter, TikCter i TikΔ2 total, nuclear o citoplasmàtica) en relació a les cèl·lules no transfectades (control). Les barres inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

Mentre que la TikCter no modifica significativament la localització de la ciclina D1, la TikNter causa una lleugera reducció del senyal nuclear de ciclina D1 respecte el control, però en tot cas molt menor que la transloquina

completa. Finalment, pel que fa al mutant TIK Δ 2 vam observar grans diferències en el senyal nuclear de ciclina D1 depenent de la localització de TIK Δ 2. En aquelles cèl·lules en que TIK Δ 2 era nuclear la ciclina D1 també era majoritàriament nuclear, comportant-se exactament igual que el control. En canvi, en les cèl·lules en que TIK Δ 2 era citoplasmàtica observàvem la mateixa forta reducció del senyal nuclear de ciclina D1 que amb la transloquina completa. Així doncs, ambdues regions N i C terminal de transloquina són essencials per inhibir l'acumulació nuclear de ciclina D1. Si en l'anàlisi de dominis que hem fet anteriorment hem vist que les interaccions entre transloquina i ciclina D1 no depenien d'un sol domini, és possible que també, per això, estiguin implicats diferents dominis de transloquina en la regulació de la localització de ciclina D1.

També vam comprovar en cèl·lules HEK293T les interaccions de les versions de transloquina TIKNter i TIK Δ 2 amb ciclina D1 (**figura 35**). Les cèl·lules van ser cotransfectades amb TIK, TIKNter o TIK Δ 2 marcades amb l'epítot HA i 3FLAG-CycD1. Com a control teníem cèl·lules transfectades només amb transloquina. Pot observar-se que tant TIKNter com el mutant TIK Δ 2 interaccionen amb menor eficiència amb ciclina D1 que la transloquina sencera, el que correlaciona en el mateix sentit amb la seva capacitat d'alterar la localització de ciclina D1.

10. La superexpressió de ciclina D1 afecta a la localització de la transloquina

Donat que la transloquina inhibeix la localització nuclear de ciclina D1 en cèl·lules ciclant ens vam voler preguntar si la ciclina D1 podria tenir algun efecte sobre la localització de transloquina. En la **figura 36** mostrem les cèl·lules NIH3T3 ciclant cotransfectades amb GFP-CycD1 i 3HA-TIK, emprant com a control cèl·lules transfectades amb GFP i 3HA-TIK.

RESULTATS

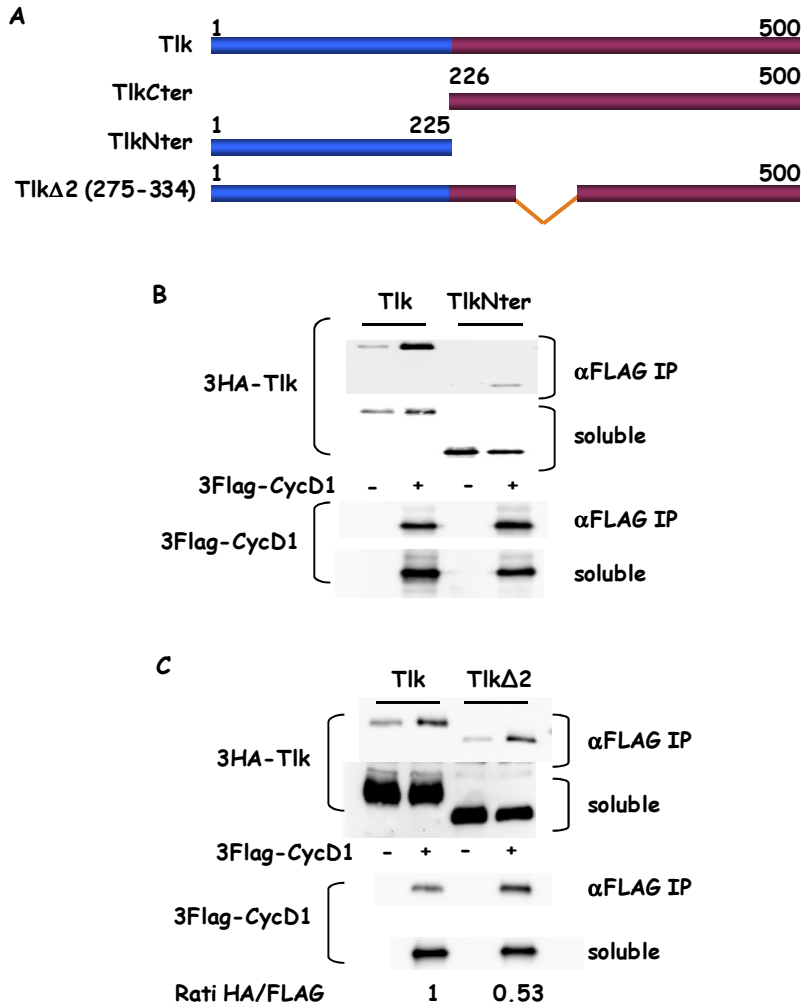


Figura 35. Interacció en cèl·lules HEK293T de TIKNter i TIKΔ2 amb ciclina D1.

A. Esquema de les variants de transloquina emprades.

B. Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb 3HA-TIK o 3HA-TIKNter en presència o no de 3FLAG-CycD1. Es va immunoprecipitar la ciclina D1 amb reina αFLAG i per *western* es van determinar els nivells de transloquina i CycD1.

C. Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb 3HA-TIK o 3HA-TIKΔ2 en presència o no de 3FLAG-CycD1. Es va immunoprecipitar la ciclina D1 amb reina αFLAG i per *western* es van determinar els nivells de transloquina i CycD1.

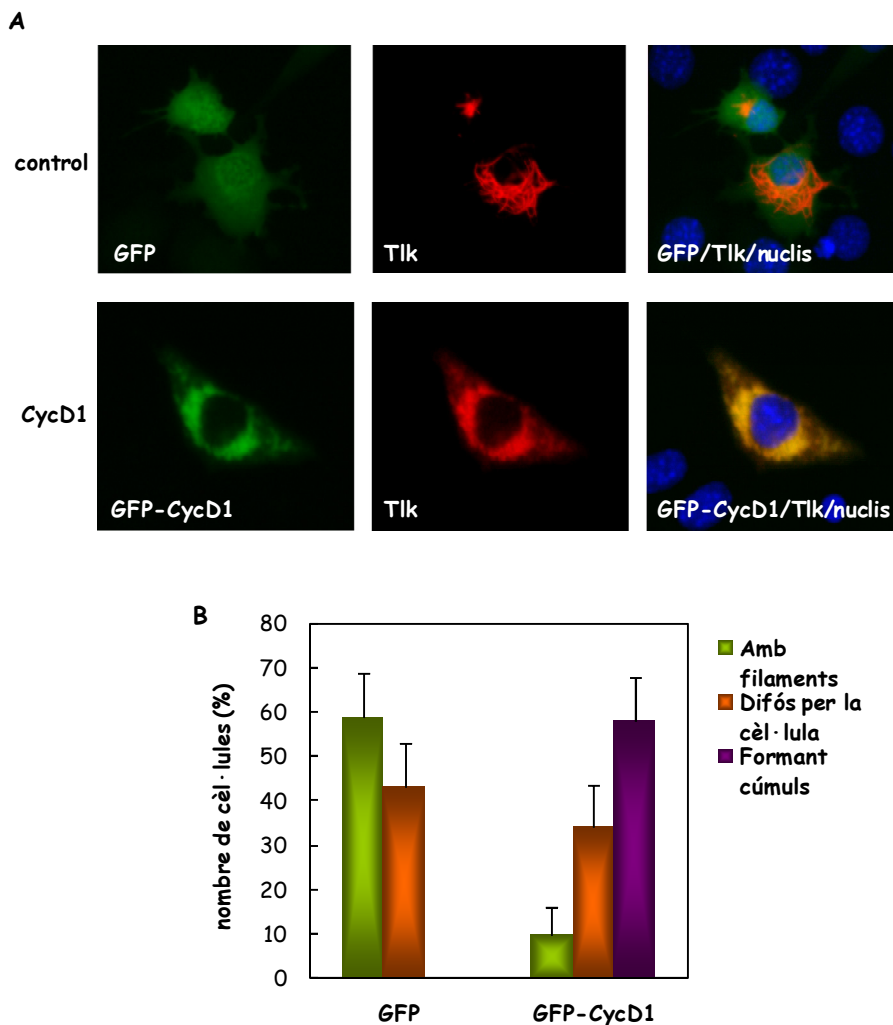


Figura 36. Efectes de la superexpressió de ciclina D1 en la localització de la transloquina.

A. Les cèl·lules NIH3T3 ciclant van ser cotransfectades amb 3HA-Ttk i bé GFP o GFP-CycD1, i per immunofluorescència es van detectar les diferents proteïnes amb anticossos α HA i α GFP. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. En la gràfica es representen el nombre de cèl·lules que varen mostrar les diferents formes que adopta la transloquina (filaments, difós per la cèl·lula i formant cúmuls) quan se superexpressa també la ciclina D1. Les barres inclouen el límit de confiança pels percentatges ($\alpha=0.05$).

RESULTATS

Mentre que en les cèl·lules control la transloquina es localitza en una subpoblació de microtúbuls, la superexpressió de ciclina D1 produeix un canvi molt clar en la seva localització. En la gràfica hem representat les tres diferents formes que adopta la transloquina quan superexplorem les dues proteïnes: (1) en filaments, (2) difós per la cèl·lula i (3) formant cúmuls perinuclears. Mentre que en la condició control forma filaments en la major part de cèl·lules, la transloquina apareix formant cúmuls en la majoria de les cèl·lules on se superexpresca la ciclina D1.

En resultats anteriors hem vist que la caixa ciclina és important per la interacció amb TlkCter i que a més podem tenir una possible competició entre TlkCter i Cdk4 per la unió a ciclina D1. En la **figura 37** es mostren els efectes dels mutants de CycD1 de la caixa ciclina (GFP-CycD1 Δ CB, GFP-CycD1K112E) en la localització de 3HA-Tlk en cèl·lules NIH3T3 ciclant, i en la **figura 38** es mostra la quantificació del nombre de cèl·lules amb les diferents formes que adopta la transloquina al superexpressar aquests mutants de ciclina D1. El mutant GFP-CycD1 Δ CB no interfereix tant com GFP-CycD1 en la formació de filaments de transloquina, donant suport al fet que la caixa ciclina sigui important per la interacció amb TlkCter. D'altra banda, el mutant K112E de ciclina D1 que no uneix Cdk4 (GFP-CycD1K112E) forma més cúmuls que CycD1 Δ CB, el que està d'acord amb l'observació que aquest mutant interacciona molt millor amb TlkCter.

El domini C-terminal de ciclina D1 és alhora important per la seva localització i per la interacció amb transloquina. Per això, vam decidir analitzar les formes que adopta la transloquina al superexpressar el mutant GFP-CycD1 Δ CT. Com ja s'havia descrit i es mostra en la **figura 19** i en la **figura suplementària S11**, aquest mutant de ciclina D1 és predominantment nuclear, i en la **figura 39** es mostra com es comporta aquest mutant GFP-CycD1 Δ CT quan se superexpresca 3HA-Tlk.

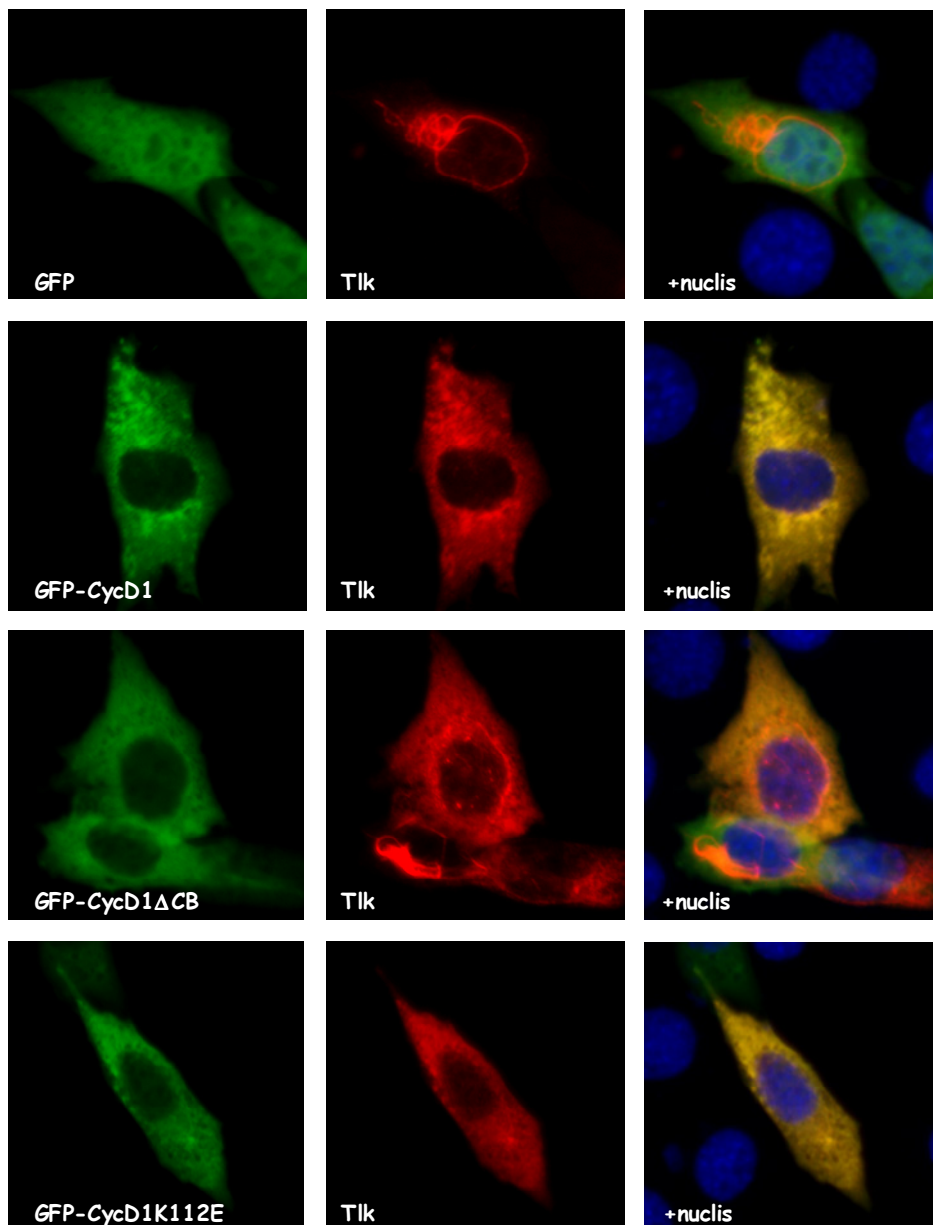


Figura 37. Efectes en la localització de transloquina al superexpressar la ciclina D1 i els mutants Δ CB i K112E.

Les cèl·lules NIH3T3 ciclant van ser cotransfectades amb 3HA-Tlk i bé GFP, GFP-CycD1, GFP-CycD1 Δ CB o GFP-CycD1 K112E, i per immunofluorescència es van detectar les diferents proteïnes amb anticossos α HA i α GFP. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

RESULTATS

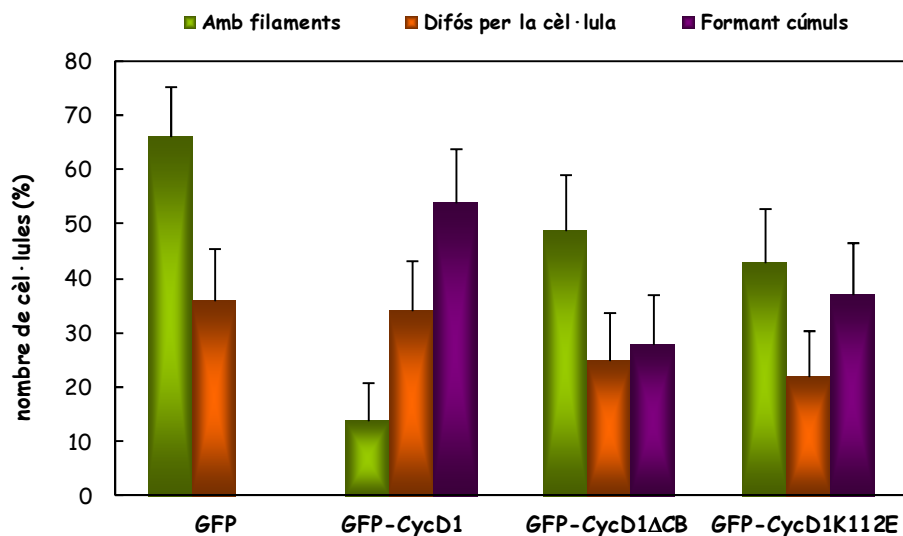


Figura 38. Quantificació dels efectes en la localització de transloquina al superexpressar la ciclina D1 i els mutants *CycD1ΔCB* i *CycD1K112E*.

Es representa el nombre de cèl·lules NIH3T3 ciclant que es varen observar amb les diferents formes que adopta la transloquina (filaments, difós per la cèl·lula i formant cúmuls) quan se superexpressa també la ciclina D1. Les barres inclouen el límit de confiança pels percentatges ($\alpha=0.05$).

En primer lloc s'observa que el mutant és essencialment citoplasmàtic quan també se superexpressa 3HA-Tlk, el que també es mostra en la quantificació de la **figura 39**. D'altra banda, i en relació a les formes que adopta la transloquina, el mutant *CycD1ΔCT* no és capaç d'alterar la formació de filaments per part de la transloquina. Aquestes observacions coincideixen amb les obtingudes per co-immunoprecipitació en suggerir que el domini C-terminal de la ciclina D1 jugui un paper molt important en la interacció amb la transloquina i, en conseqüència, el mutant de deleció mostri una localització molt alterada.

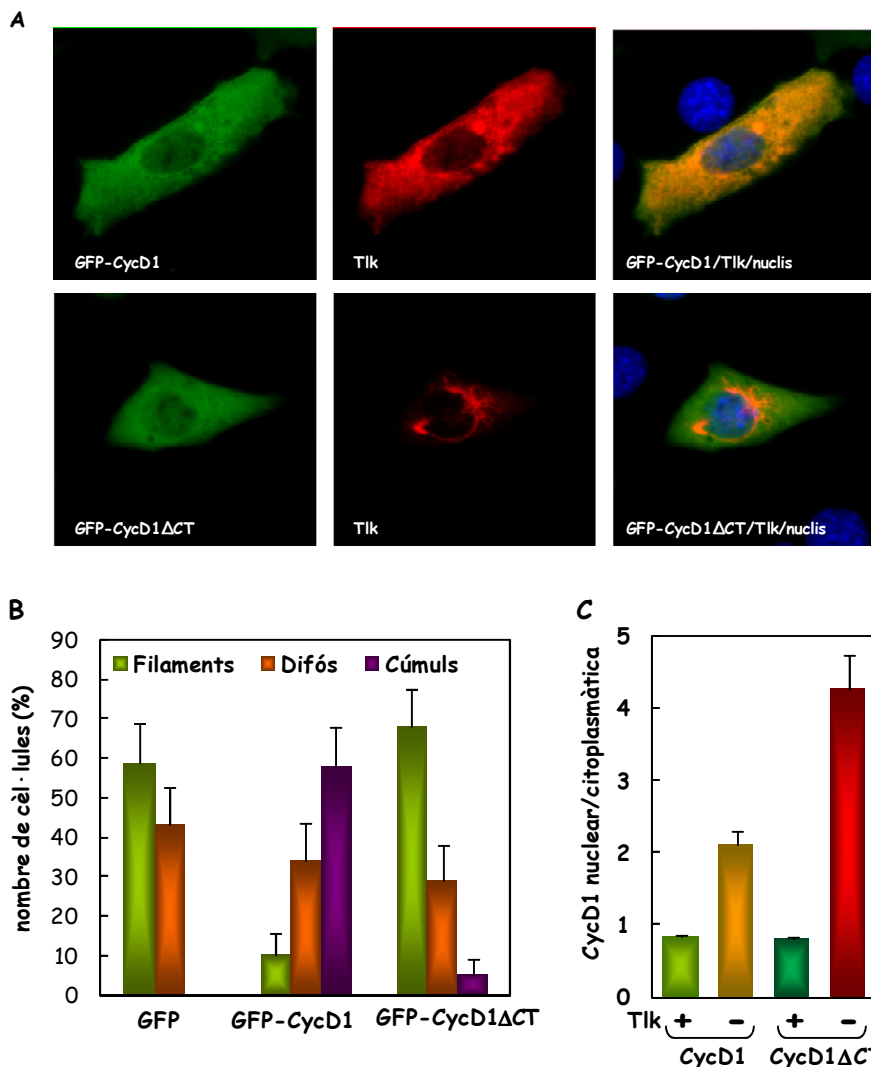


Figura 39. Efectes en la localització de transloquina al superexpressar la ciclina D1 i el mutant *CycD1ΔCT*.

A. Les cèl·lules NIH3T3 ciclant van ser cotransfectades amb 3HA-Tlk i GFP-CycD1 o GFP-CycD1ΔCT, i es va sotmetre a immunofluorescència amb anticossos α HA i α GFP. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Es representa el nombre de cèl·lules NIH3T3 ciclant que es varen observar amb les diferents formes que adopta la transloquina (filaments, difós i cúmuls) quan se superexpressa la ciclina D1 i el mutant *CycD1ΔCT*. Les barres inclouen el límit de confiança pels percentatges ($\alpha=0.05$).

C. Senyal nuclear relatiu de les variants esmentades de ciclina D1 en presència o absència de transloquina. Les barres inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

11. La interferència de transloquina causa una acumulació nuclear de ciclina D1

Donat que la superexpressió de transloquina disminueix el senyal nuclear de ciclina D1 en cèl·lules ciclant, vam plantejar la possibilitat que l'invers fora també cert, és a dir, que una inhibició de l'expressió de transloquina en cèl·lules quiescents afectés a la localització de ciclina D1.

En primer lloc vam comprovar per *western* els efectes d'un siRNA de transloquina ja descrit (Bossard et al., 2003). Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb 3HA-Tlk i el siRNA contra Tlk o un siRNA control, i vam mesurar la quantitat de proteïna per *western*. En la **figura 40A** es mostren els nivells de 3HA-Tlk emprant com a control de càrrega la tubulina, i on s'observa que el siRNA Tlk disminueix els nivells de transloquina unes 2-3 vegades respecte el control. A la **figura 40B** es mostra la immunofluorescència de ciclina D1 endògena en cèl·lules NIH3T3 quiescents i co-transfectades amb GFP i el siRNA Tlk, i seguidament es representa la quantificació de les immunofluorescències obtingudes (**figura 40C**). En el gràfic per punts es representa per a cada cèl·lula analitzada la intensitat del senyal nuclear vers el senyal citoplasmàtic de la ciclina D1 sota els efectes del siRNA Tlk i el siRNA control, mentre que en el gràfic de barres es representa la mitjana del valor nuclear relatiu per a ambdós siRNAs Tlk i control. Tant en la immunofluorescència com en els dos gràfics s'observa un augment significatiu del senyal nuclear de ciclina D1 quan s'inhibeix l'expressió de la transloquina en cèl·lules quiescents.

Per tal de confirmar els efectes produïts pel siRNA de Tlk en MEFs, i també per a obtenir comportaments més homogenis en el cultiu, vam decidir inhibir l'expressió de transloquina amb un shRNA expressat en un vector lentiviral. La **figura 41** mostra la immunofluorescència de ciclina D1

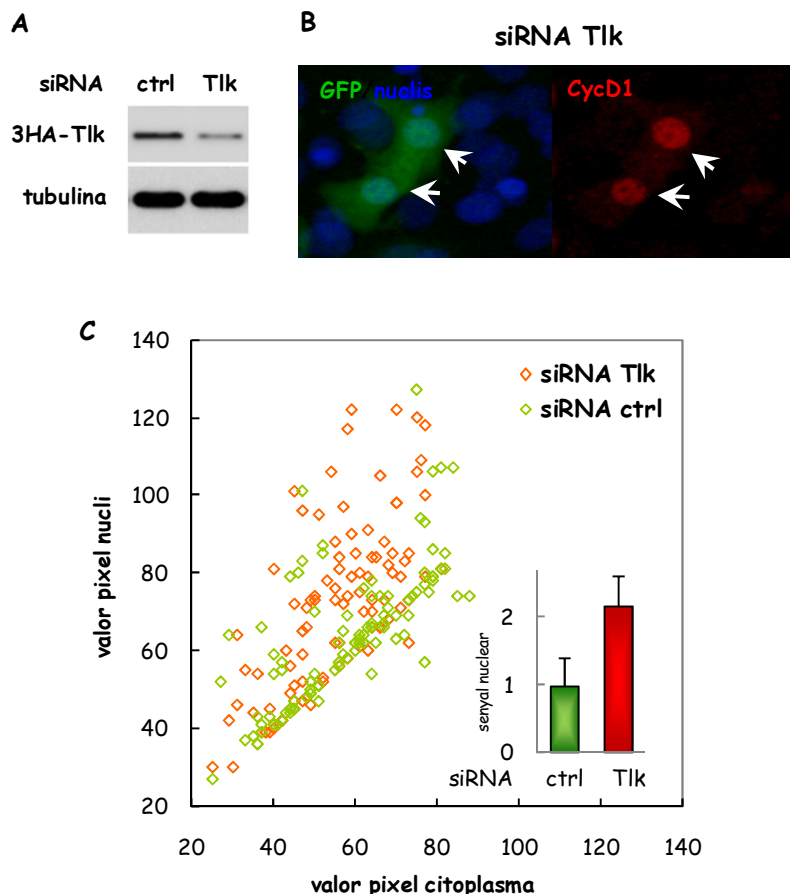


Figura 40. La inhibició de l'expressió de transloquina per siRNA incrementa l'acumulació nuclear de ciclina D1 en NIH3T3 quiescents.

A. Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb 3HA-TIk i un siRNA control o el siRNA TIK, i la inhibició de l'expressió de transloquina es va comprovar per *western* (α HA). La tubulina és un control de càrrega.

B. Les cèl·lules NIH3T3 van ser transfectades amb GFP i siRNA control o siRNA TIK, i sotmeses a quiescència. Es mostra la immunofluorescència de ciclina D1 endògena. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

C. En les dues gràfiques es representa l'augment del senyal nuclear de ciclina D1 a l'inhibir l'expressió de transloquina amb el siRNA TIK. En el gràfic per punts es representa per a cada cèl·lula analitzada la intensitat del senyal nuclear vers el senyal citoplasmàtic de la ciclina D1 sota els efectes del siRNA TIK i el siRNA control. La gràfica de barres ens indica les mitjanes del senyal nuclear relatiu amb el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

RESULTATS

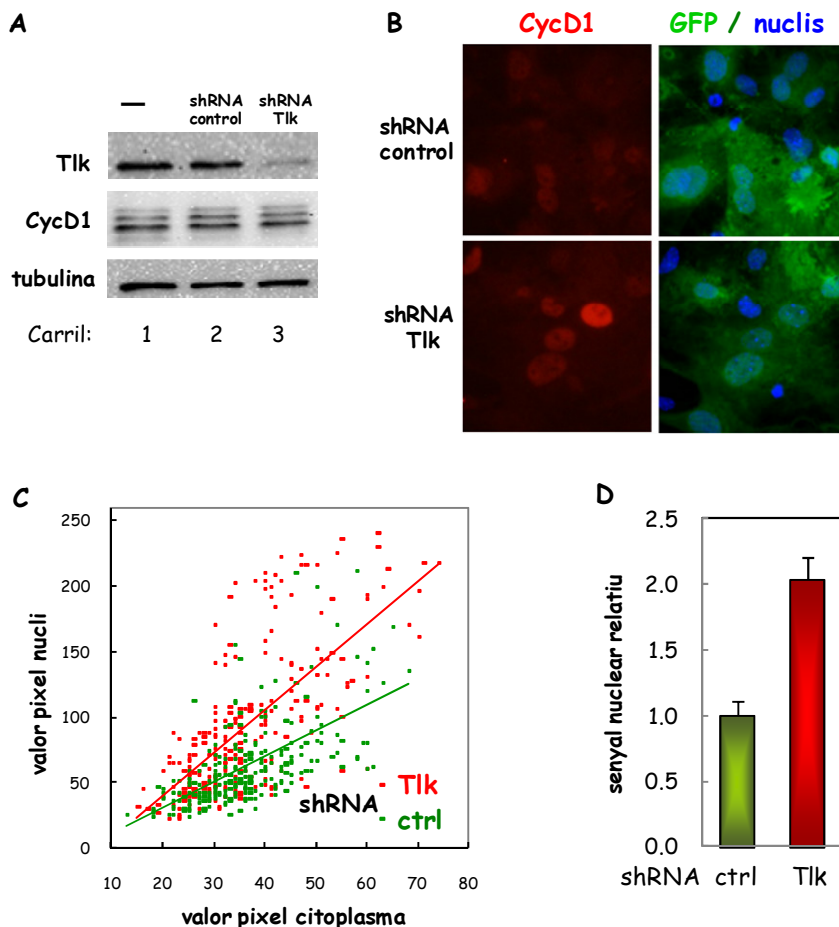


Figura 41. Acumulació nuclear de ciclina D1 per inhibició de l'expressió de transloquina amb shRNA en MEFs quiescents.

A. Els MEFs van ser infectats amb vectors lentivirals expressant un shRNA control o el shRNA Ttk, i després de sotmetre'ls a condicions de quiescència es van determinar per *western* els nivells de transloquina, ciclina D1, i la tubulina com a control de càrrega. El carril 1 correspon a cèl·lules no infectades.

B. La immunofluorescència es va fer contra la ciclina D1 endògena (D1-7213-G) i la GFP lentiviral (α GFP). Els nuclis van ser marcats amb Hoescht.

C. Es representa per a cada cèl·lula analitzada la intensitat del senyal nuclear vers el citoplasmàtic de ciclina D1 amb shRNA Ttk i shRNA control.

D. Senyal nuclear relatiu de ciclina D1 sota els efectes del shRNA Ttk i el shRNA control. La gràfica de barres ens indica les mitjanes del senyal nuclear relatiu amb el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

endògena en MEFs quiescents i infectats amb el shRNA TIK o un shRNA control, juntament amb la quantificació dels resultats obtinguts en la forma abans esmentada. Confirmant els resultats obtinguts per transfecció amb siRNAs, el senyal nuclear de ciclina D1 va augmentar significativament també en inhibir l'expressió de transloquina amb el shRNA emprat. Finalment, es van obtenir resultats també molt similars en analitzar la localització de 3HA-CycD1 expressada des d'un vector lentiviral, tant en MEFs com en cèl·lules NIH3T3 (resultats no mostrats). En la **figura 41** també es mostra l'anàlisi per *western* dels nivells de les proteïnes implicades per demostrar l'eficiència del shRNA emprat com inhibidor de l'expressió de transloquina, i que aquesta inhibició no comporta alteracions importants en els nivells de la ciclina D1 endògena.

En resum, els nostres resultats demostren que la transloquina juga un paper important en evitar l'acumulació nuclear de la ciclina D1 en condicions de quiescència per deprivació de factors tròfics i elevada confluència cel·lular.

12. La interferència de transloquina provoca un augment de la fosforilació de RB

Els efectes observats en la localització de la ciclina D1 per alteració en un o altre sentit dels nivells cel·lulars de transloquina suggereixen que aquesta proteïna associada al sistema de microtúbuls podria formar part del mecanisme que reté la ciclina D1 en el citoplasma i atura la cèl·lula en G1 sota condicions de baix suport tròfic i elevada confluència cel·lular. Per tal de determinar si aquest mecanisme podria venir mediat per canvis en el nivell d'expressió d'altres proteïnes relacionades en la transició G1/S vàrem determinar, com a primera aproximació, el seu nivell per *western* en condicions en que l'expressió de transloquina estigués disminuïda. La **figura**

RESULTATS

42 mostra que la inhibició de l'expressió de transloquina no va afectar els nivells de coneguts reguladors de la activitat i/o localització de ciclina D1 com Cdk4, p21, p27 o p57, així com tampoc va modificar els nivells de Cdk2 o ciclina E, que juguen un paper parcialment coincident amb Cdk4 i ciclina D1 en la inactivació de RB per fosforilació. Per tant, el mecanisme mediat per transloquina podria regular directament la capacitat del complex Cdk4-ciclina D1 en fosforilar RB.

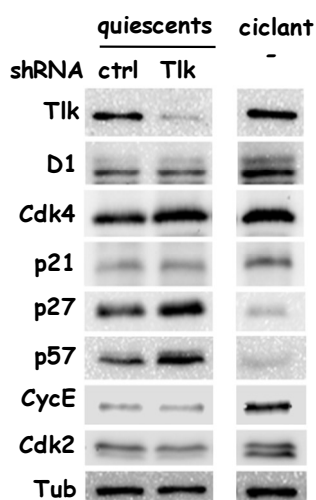


Figura 42. Nivells de Tlk, CycD1, Cdk4, p21, p27, p57, CycE, Cdk2 en inhibir l'expressió de transloquina en cèl·lules ciclant o quiescents.

Els MEFs van ser infectats amb el shRNA control i el shRNA Tlk. Després d'arribar a alta confluència i deprivar de factors tròfics durant 24 hores (quiescents) es van determinar per *western* els nivells de Tlk, CycD1, Cdk4, p21, p27, p57, CycE, Cdk2, i tubulina com a control de càrrega.

En la **figura 43** es mostren els nivells de fosforilació de RB per *western* quan s'inhibeix l'expressió de transloquina amb el shRNA abans descrit i expressat des d'un vector lentiviral. Com era d'esperar les cèl·lules ciclant van mostrar alts nivells de proteïna retinoblastoma fosforilada tant

en S780 (deguda a Cdk4-ciclina D) com en S608 (per Cdk2-ciclina E) (Kitagawa et al., 1996), mentre que aquestes fosforilacions van disminuir clarament en cèl·lules quiescents. Ara bé, la inhibició de l'expressió de transloquina en cèl·lules quiescents va produir un fort augment de l'estat de fosforilació de RB en S780 però no en S608, és a dir, de la fosforilació de RB atribuïda a Cdk4-ciclina D.

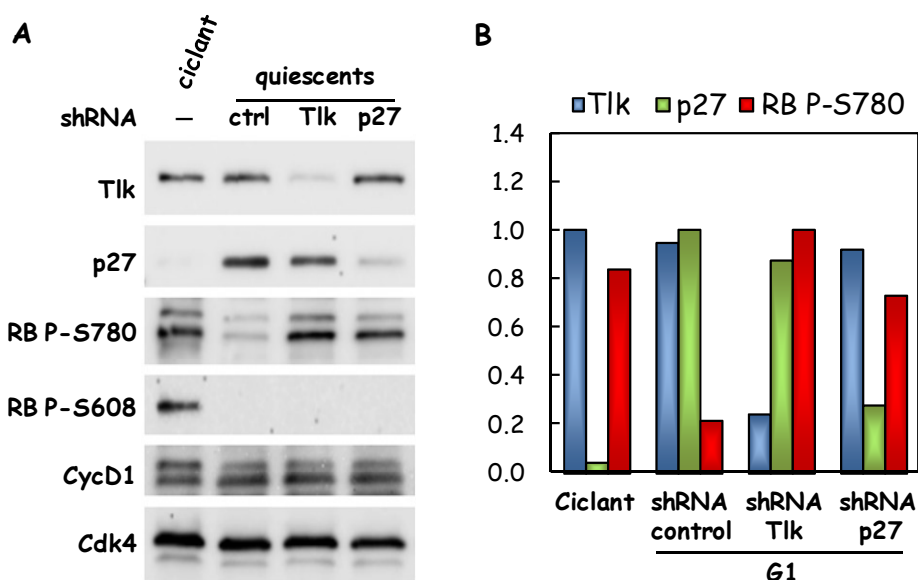


Figura 43. Augment de l'estat de fosforilació de RB en la S780 quan s'inhibeix l'expressió de Tlk o p27.

Els MEFs van ser infectats amb el shRNA control, shRNA Tlk i shRNA p27. Després d'arribar a alta confluència i deprivar de factors tròfics durant 24 hores (quiescents) es van determinar per *western* els nivells de les següents proteïnes: Tlk, p27, RB P-S780, RB P-S608, CycD1 i Cdk4. La gràfica mostra la quantificació dels nivells de proteïna de Tlk, p27 i RB P-S780 en les condicions emprades.

La inhibició de l'expressió de p27, a qui s'ha atorgat un paper clau en la inhibició dels complexos Cdk4-ciclina D durant la quiescència cel·lular

RESULTATS

(Larrea et al., 2008; Blain, 2008), va produir increments similars en la fosforilació de RB en S780 (**figura 43**), el que posa de relleu el paper de transloquina com regulador negatiu de Cdk4-ciclina D1 en quiescència.

Per immunofluorescència (**figura 44**) també vam observar un clar augment de l'estat de fosforilació de RB en S780 en inhibir l'expressió de transloquina en cèl·lules quiescents.

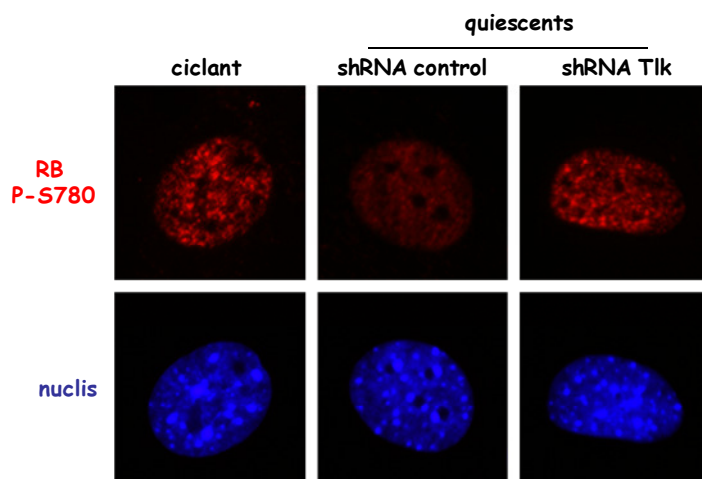


Figura 44. Augment de l'estat de fosforilació de RB en la S780 per immunofluorescència quan s'inhibeix l'expressió de transloquina.

MEFs ciclant o quiescents infectats amb els vectors lentivirals que expressen el shRNA control o shRNA Tlk. La immunofluorescència es va fer contra RB P-S780 endògena. Els nuclis van ser marcats amb Hoescht.

En la **figura 45A** es representa la distribució del senyal de RB fosforilat en S780 en cèl·lules ciclant i en cèl·lules quiescents tractades amb diferents shRNAs (control, Tlk o p27), que confirmen els resultats obtinguts per *western*. Finalment, en la **figura 45B** es comparen els valors del senyal de RB fosforilat en S780 amb el senyal de GFP i s'observa una

clara correlació entre ells, donant suport a que la transloquina inhibeix de forma dosi-dependent la fosforilació de RB en S780 per Cdk4-ciclina D1.

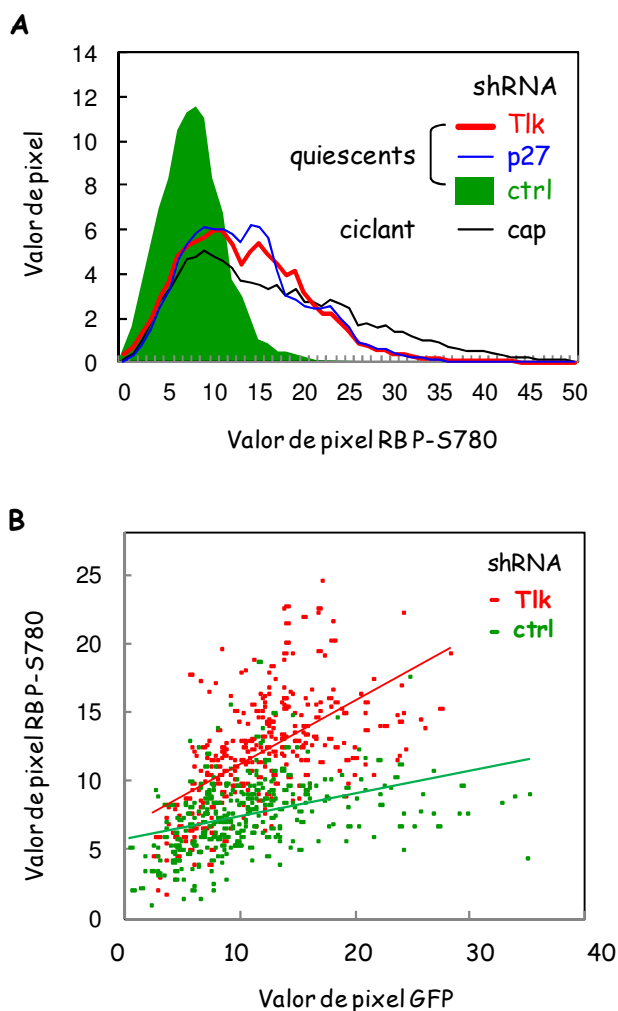


Figura 45. Quantificació de l'augment de l'estat de fosforilació de RB en S780 per immunofluorescència en inhibir l'expressió de transloquina.

A. Distribució del senyal de RB P-S780 en MEFs ciclant o quiescents sota l'expressió de shRNA ctrl, shRNA Tik i shRNA p27.

B. Comparació del senyal de RB P-S780 sota l'expressió de shRNA ctrl o shRNA Tik depenent dels nivells de l'expressió lentiviral (GFP).

RESULTATS

Aquests resultats impliquen funcionalment i de forma unívoca a la transloquina com a regulador negatiu de l'activitat dels complexos Cdk4-ciclina D1 i, tanmateix, corroboren la seva participació en un mecanisme de retenció citoplasmàtica de la ciclina D1 per tal d'aturar el cicle cel·lular en G1 en condicions de quiescència per baix suport tròfic i elevada confluència cel·lular.

DISCUSSIÓ

1. La ciclina D1 no s'acumula al nucli en condicions de quiescència

Les molècules que actuen de forma més primerenca durant l'entrada en el cicle cel·lular són els complexos Cdk4/6-ciclina D i es coneixen força dades de la seva regulació a nivell transcripcional, post-transcripcional i traduccional, però se'n tenen ben poques sobre el seu control a nivell de localització subcel·lular durant la fase G1 del cicle.

Es coneix que abans d'entrar en la fase S la ciclina D1 es localitza al nucli i ja en la fase S del cicle cel·lular és fosforilada en la T286, el que permet ser reconeguda per l'exportina CRM1 i exportada al citoplasma per a la seva degradació via proteasoma. (Diehl et al., 1998). En canvi, els mecanismes que assegurin l'import de ciclina D1 al nucli durant G1 no han estat ben caracteritzats, i les dades de que es disposa són sovint contradictòries.

En el nostre laboratori s'ha desvetllat un mecanisme de retenció citoplasmàtica de Cln3, l'homòleg de ciclina D en llevat, (Garí et al., 2001; Wang et al., 2004; Vergés et al., 2007), que opera durant la fase G1 i regula l'entrada en cicle per a coordinar creixement i proliferació cel·lular.

Fent ús d'aquests antecedents, el nostre treball es va basar en la hipòtesi que els complexos Cdk4-ciclina D es regulen també a nivell de localització subcel·lular.

El primer objectiu va ser demostrar tant a nivell endogen com exogen que la ciclina D1 es localitza al citoplasma en condicions de quiescència. En un principi va resultar difícil demostrar de forma unívoca la localització citoplasmàtica a nivell endogen per immunofluorescència, sobre tot degut al relatiu grau d'inespecificitat dels primers anticossos emprats. D'una banda varem emprar MEFs deficientes en ciclina D1 (CCND1^{-/-}) per a demostrar sense ambigüitats la localització citoplasmàtica de la ciclina D1 en MEFs wt en condicions de quiescència. D'una altra banda, utilitzant un

DISCUSSION

vector lentiviral hem demostrat també de forma clara que la ciclina D1 es localitza en el citoplasma en cèl·lules quiescents i, potser més important, hem demostrat que el rati nucli/citoplasma disminueix fortament en condicions de quiescència, ja que el vector emprat va ser capaç de mantenir els mateixos nivells d'expressió de la ciclina D1 en les cèl·lules ciclant i les quiescents.

En general està acceptat que en cèl·lules quiescents els nivells de ciclina D1 són baixos (Sherr et al., 1994; Klein and Assoian, 2008) i els nivells de les proteïnes KIP són més alts de manera que inhibeixen l'activitat residual dels complexos Cdk4-ciclina D1 que hi pugui haver en el nucli. Per altra banda, en cèl·lules quiescents o diferenciades com cardiomiòcits neonatals, neurones postmitòtiques, cèl·lules de neuroblastoma i altres línies cel·lulars, s'ha observat la ciclina D1 localitzada al citoplasma (Sumrejkanchanakij et al., 2003; Tamamori-Adachi et al., 2003; Alao et al., 2006). Mentre que aquests autors han utilitzat tècniques de fraccionament cel·lular per localitzar la ciclina D1. En canvi, la localització de la ciclina D1 ha estat tradicionalment analitzada per immunofluorescència i utilitzant com a fixador el metanol. D'aquí la possibilitat que les discrepàncies esmentades es poguessin deure a la metodologia emprada. En el nostre treball hem analitzat amb detall diferents paràmetres crítics del protocol de immunofluorescència, concloent que la ciclina D1 pot ser detectada al citoplasma també per immunofluorescència, sempre que s'eviti el tractament amb metanol i, en canvi, s'utilitzin detergents poc agressius com la saponina per a permeabilitzar les cèl·lules fixades amb paraformaldehid.

Després de caracteritzar el nostre model de treball en fibroblasts embrionaris de ratolí i d'analitzar diverses condicions que podrien estar involucrades en la localització de la ciclina D1, hem vist que sobretot la confluència i la deprivació de factors tròfics són molt importants en la

localització al citoplasma de la ciclina D1. De totes les altres possibles condicions en que l'acumulació nuclear de ciclina D1 podria estar compromesa només hem observat un clar efecte en condicions d'activació de la via UPR per taspigargina. En altres situacions com el creixement en suspensió o superexpressió de β -catenina podrien haver-hi certs efectes, però els nostres resultats no permeten assegurar que la disminució del senyal nuclear observada no fora una conseqüència d'una davallada en l'expressió de ciclina D1 o un increment de la seva inestabilitat.

S'ha demostrat que les xaperones tipus Hsp70 i Hsp40 estan implicades en la retenció i alliberament de la ciclina Cln3 (Garí et al., 2001; Wang et al., 2004; Vergés et al., 2007). En fibroblasts embrionaris de ratolí hem comprovat que les xaperones no estan implicades en la localització citoplasmàtica, tot i tenir un paper important com és el cas de Hsc70 per la formació del complex Cdk4-ciclina D1 (Diehl et al., 2003). La xaperona Hsp90 està implicada en el replegament i estabilització de Cdk4 (Stepanova et al., 1996), i la inhibició d'aquesta xaperona amb geldanamicina va produir una forta disminució dels nivells de proteïna ciclina D1 per *western*, suggerint l'absència d'efectes específics en la seva localització.

Es coneix que la integritat del citoesquelet i l'adhesió cel·lular són necessaris per la proliferació cel·lular (Böhmer et al., 1996; Huang and Inberg, 2002), i a més una alteració en el citoesquelet disminueix l'expressió de ciclina D1 i augmenta l'expressió de p27 (Fringer and Grinnell, 2001). Els nostres resultats suggereixen que, al menys en el model de fibroblasts embrionaris de ratolí, ni l'alteració del citoesquelet ni el creixement en suspensió tindrien efectes importants en la capacitat de la ciclina D1 d'acumular-se en el nucli en cèl·lules ciclant.

β -catenina té un paper important en l'adhesió cel·lular fent de pont físic entre la cadherina i el citoesquelet d'actina. Establint una clara

DISCUSSIÓ

connexió entre l'adhesió i la proliferació cel·lular, la translocació de β -catenina al nucli activa l'expressió de ciclina D1 (Shtutman et al., 1999). Observant els nostres resultats β -catenina no altera la localització de ciclina D1 en estat de quiescència. En canvi, en cèl·lules ciclant podria ser important la S37 de β -catenina per regular la localització de ciclina D1. Mentre que la mutació de la S37Y estabilitza β -catenina però no altera la localització de ciclina D1, la superexpressió de β -catenina produeix una lleugera disminució de l'acumulació nuclear de ciclina D1.

La via UPR està implicada en la traducció de ciclina D1 (Brewer et al., 1999) i hem pogut comprovar que també és important en la seva localització a l'induir la via UPR amb taspigargina, suggerint una connexió entre els mecanismes que regulen la localització de ciclina D1 i el reticle endoplasmàtic.

Els factors de creixement fibroblàstic activen les vies de senyalització de manera que tenen un paper important en una gran varietat de processos com la diferenciació, proliferació, etc. El factor de creixement FGF2 té la capacitat de mantenir les cèl·lules proliferant (Bikfalvi et al., 1998) en part degut a que FGF2 indueix l'expressió de ciclina D1. En aquest treball demostrem que FGF2 també té un paper important en l'acumulació nuclear de ciclina D1, indicant que, com a factor de creixement, FGF2 activaria la ciclina D1 a diferents nivells.

La localització citoplasmàtica de ciclina D1 en condicions de quiescència podria explicar-se a priori per un mecanisme de retenció citoplasmàtica o per modulació dels processos d'export/import. Mentre que la regulació de la localització de la ciclina D1 en fase S té lloc a nivell del procés d'export (Diehl et al., 1997; Diehl et al., 1998), els nostres resultats suggereixen que en cèl·lules quiescents el mecanisme seria diferent. En concret, ni la inhibició de GSK-3 β amb LiCl ni la inhibició de l'exportina

CRM1 amb leptomicina B no reverteixen l'acumulació nuclear de ciclina D1 en cèl·lules quiescents. Una situació similar es dona en cardiomiòcits quiescents, on Notch augmenta l'acumulació nuclear de ciclina D1 sense interferir amb el seu export (Campa et al., 2008). Endemés, mentre que un mutant de ciclina D1 que manca els darrers 37 aminoàcids de l'extrem C-terminal s'acumula en el nucli tant en cèl·lules ciclant com quiescents, l'addició de dues còpies en tàndem d'un senyal de localització heteròleg no va tenir el mateix efecte, suggerint que la regulació de la localització de la ciclina D1 per quiescència seria a un nivell diferent que els processos d'export/import, potser per un mecanisme de retenció similar al que el nostre grup a desvetllat per a Cln3, l'homòleg de llevat de la ciclina D1.

La ciclina D1, de la mateixa manera que Cln3, no se solubilitza amb Tritó X100 (Vergés et al., 2007) en cèl·lules quiescents. Endemés, quan la ciclina D1 es solubilitza amb Tween 20 hem observat que ho fa formant part de complexes que són de major tamany en condicions de quiescència, suggerint que l'absència de senyals tròfics i l'alta confluència empenyen la ciclina D1 a formar complexes específics i diferents als que tindrien lloc en condicions d'estimulació proliferativa. Aquests resultats donen força a l'idea d'un mecanisme de retenció, i en el moment d'obtenir-los varen conduir-nos a la cerca i identificació d'interactors que permetessin confirmar aquesta hipòtesi i, alhora, caracteritzar millor a nivell molecular les fases més primerenques d'entrada al cicle i llur regulació per factors externs.

2. La transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1 en cèl·lules quiescents

Cercant possibles interactors implicats en la localització dels complexes Cdk4-ciclina D1 utilitzant la tècnica del dihíbrid i la purificació

DISCUSSIÓ

per afinitat i espectrometria de masses vam identificar un limitat nombre de proteïnes relacionades amb funcions citoplasmàtiques. De totes elles, tanmateix, la transloquina va centralitzar ràpidament la nostra atenció, especialment per haver estat descrita com un regulador de l'acumulació nuclear de FGF2. Transloquina és una proteïna que s'expressa ubiquament i s'associa als microtúbuls del citoesquelet. A més interacciona amb FGF2, i no amb FGF1, facilitant el seu import al nucli (Bossard et al., 2003). La transloquina s'associa als microtúbuls al voltant del nucli de manera que facilita l'import de FGF2 cap al compartiment perinuclear (Andersen et al., 2003; Emanuele and Stukenberg, 2007; Momotani et al., 2007). En condicions de quiescència també hem observat en algunes ocasions una localització perinuclear de la ciclina D1 en MEFs, de la mateixa manera que es descriu en cardiomiòcits quiescents (Sumrejkanchanakij et al., 2003; Tamamori-Adachi et al., 2003), el que podria suggerir una co-localització d'aquestes proteïnes en l'entorn dels porus nuclears per tal de modular la seva associació al maquinari d'import nuclear.

L'anàlisi dels dominis implicats en la interacció entre ciclina D1 i transloquina va posar de manifest que aquestes proteïnes necessitaven més d'una interfase per a interaccionar eficaçment. Per di-híbrid vam establir que la caixa ciclina era important per la interacció amb la part C-terminal de transloquina. Per altra banda, l'anàlisi d'interaccions per co-immunoprecipitació va aportar una informació diferent, establint que la transloquina necessitaria sobretot els darrers 37 aminoàcids del domini C-terminal de la ciclina D1 per a interaccionar-hi fortament, coincidint amb el fet que el mutant de ciclina D1 que manca l'esmentat segment és fortament nuclear fins i tot en condicions de quiescència. Pel que fa als dominis de la transloquina, mentre que l'anàlisi per di-híbrid va desvetllar que la meitat C-terminal és suficient per interaccionar amb la caixa ciclina, l'anàlisi

d'interaccions per co-immunoprecipitació va posar de manifest que la transloquina també necessita seqüències de la meitat N-terminal per tal d'interaccionar de forma eficient amb la ciclina D1. Ara bé, ambdues aproximacions metodològiques van destacar la rellevància d'un segment de 50 aminoàcids dins del segment C-terminal per a una màxima interacció. Com a resum, podem dir de tots aquests resultats que les dues proteïnes interaccionarien emprant més d'una interfase molecular (**figura 46**).

Per formar el complex Cdk4-ciclina D1, la quinasa dependent de ciclina s'uneix al domini caixa ciclina. Aquest domini també és important per la unió de la transloquina, i la superexpressió de Cdk4 disminueix la interacció entre ciclina D1 i transloquina, suggerint una competició entre transloquina i Cdk4 per la unió a ciclina D1. D'acord amb això, tant la transloquina com Cdk4 es detecten en immunoprecipitats de ciclina D1 però, en canvi, quan s'immunoprecipita Cdk4 només es detecta ciclina D1, i quan s'immunoprecipita transloquina només es detecta ciclina D1 i no Cdk4, el que indica que la ciclina D1 no forma un complex trimèric amb Cdk4 i transloquina. Donat que ciclina D1 necessita formar complex amb Cdk4 per ser importada al nucli, els nostres resultats suggereixen que en condicions de quiescència la ciclina D1 es trobaria unida a transloquina mentre que l'activació per factors tròfics afavoriria la unió de ciclina D1 amb Cdk4 per formar el complex i ser importat al nucli.

El domini C-terminal de transloquina és el que es troba associat als microtúbuls, mentre que el domini N-terminal està implicat en la multimerització de la transloquina i la seva associació al centrosoma (Momotami et al., 2008). Tot i la clara definició de funcions en aquests dos dominis de transloquina, només la proteïna completa va ser capaç d'inhibir eficientment la localització nuclear de ciclina D1, probablement perquè cal més d'una interfase de contacte molecular per a una interacció eficient.

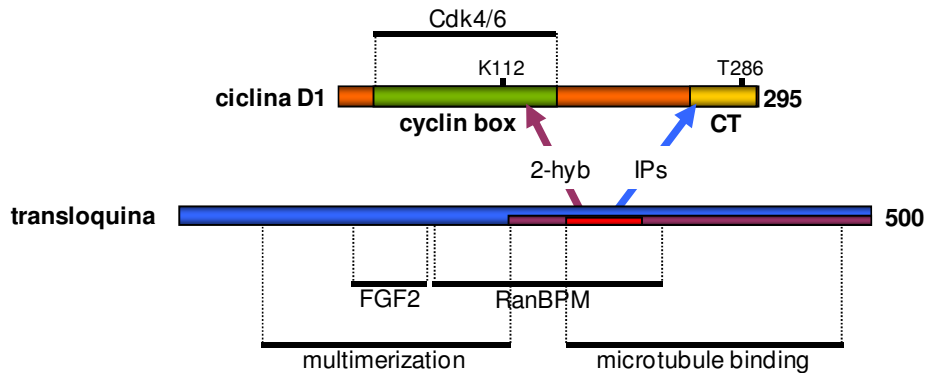


Figura 46. Dominis d'interacció entre ciclina D1 i transloquina, i relació amb altres dominis funcionals d'ambdues proteïnes. La caixa ciclina (en verd) de la ciclina D1 és important per a la interacció per di-híbrid (2-hyb) amb la meitat C-terminal de la transloquina (en lila). En les interaccions per immunoprecipitació (IPs) són importants els darrers 37 aminoàcids de l'extrem C-terminal (CT, en taronja) de la ciclina D1 mentre que per part de la transloquina (en blau) tant la meitat N-terminal com la C-terminal hi jugarien papers importants. En color vermell es remarca un segment important tant en les interaccions per di-híbrid com per immunoprecipitació. En negre es representen els segments importants en la interacció amb altres proteïnes com FGF2 i RanBPM (Meunier et al., 2009), o importants per a la capacitat de multimerització o la unió als microtúbuls (Momotani et al., 2008).

Endemés de mostrar una menor interacció amb ciclina D1, el mutant TlkΔ2 mostra localitzacions en dos comportaments, nuclear o citoplasmàtic, però mai en microtúbuls. Ara bé, en les cèl·lules en que es localitza al citoplasma s'observa el mateix efecte que amb la transloquina completa, és a dir, inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1. Aquests resultats indiquen que el mecanisme pel qual la superexpressió de transloquina inhibeix l'acumulació nuclear de ciclina D1 no necessita l'associació al citoesquelet. Només veiem la inhibició en les cèl·lules en que TlkΔ2 és al citoplasma, i això

coincidiria amb la proposta que transloquina podria inhibir l'entrada de ciclina D1 al nucli en impedir la formació del complex Cdk4-ciclina D1 al citoplasma com una condició indispensable prèvia a l'import nuclear.

A banda que la transloquina tingui un fort efecte sobre la ciclina D1 també podem dir que es dóna el mateix cas a l'inversa, és a dir, la ciclina D1 té un fort efecte sobre la localització de transloquina. La superexpressió de ciclina D1 inhibeix la localització microtubular de la transloquina, quedant les dues proteïnes al citoplasma, sovint formant cúmuls perinuclears. Ja hem dit que la caixa ciclina és necessària per la interacció amb la part C-terminal de la transloquina, que és alhora responsable de la interacció amb microtúbuls. Donant suport a aquest fet hem observat que el mutant ΔCB de ciclina D1 no afecta tant rigorosament a la localització microtubular de transloquina. En canvi, el mutant K112E de ciclina D1 (que no pot unir-se a Cdk4 però sí a transloquina) té un comportament més similar a la ciclina D1 en la localització de la transloquina. En qualsevol cas, només el mutant ΔCT de ciclina D1 és el que no té cap efecte en la localització microtubular de transloquina, que tot i ser fortament nuclear en condicions de quiescència, encara s'acumula al citoplasma quan se superexpressa transloquina. Aquests resultats corroboren la idea d'una competició entre Cdk4 i transloquina per ciclina D1, independentment de la capacitat d'associació als microtúbuls per part de la transloquina. Com ja hem comentat, el mutant ΔCT de ciclina D1 mostra una clara pèrdua d'interacció amb transloquina, i manca pràcticament els mateixos aminoàcids del seu extrem C-terminal que es troben deletats en la variant oncogènica ciclina D1b originada per *splicing* anòmal, suggerint que la transloquina podria jugar un paper important com a antioncogen.

Per tal d'analitzar la rellevància funcional del mecanisme proposat, varem inhibir l'expressió de transloquina de dues maneres: utilitzant un

DISCUSSIÓ

siRNA (descrit per Bossard et al., 2003) en cèl·lules NIH3T3 i un shRNA en MEFs. En els dos casos s'observa que, mentre els nivells de proteïna per *western* no s'afecten, l'acumulació nuclear de ciclina D1 augmenta de forma significativa, confirmant el paper negatiu de la transloquina en l'acumulació nuclear de ciclina D1 en condicions de quiescència.

La inhibició de l'expressió de transloquina no afecta als nivells d'altres reguladors de l'activitat del complex Cdk4-ciclina D1, però sí afecta als nivells de fosforilació de RB. Els resultats ens mostren un augment de l'estat de fosforilació de RB en la S780, de mode similar a l'estat que té en cèl·lules ciclant. A més observem que RB es troba més fosforilat com més alts són els nivells d'expressió del lentivirus que codifica el shRNA contra transloquina. En canvi, no es va alterar l'estat de fosforilació de RB en la posició S608, que es deu a Cdk2-ciclina E (Kitagawa et al., 1996). Això coincideix amb el fet que la inhibició de transloquina no provoca un augment de la incorporació de BrdU en cèl·lules quiescents, indicant que la cèl·lula no és capaç d'iniciar la fase S en aquestes condicions. Aquests resultats ens suggereixen que la transloquina podria afectar directament i específicament a funcions dependents del complex Cdk4-ciclina D1.

L'augment de l'estat de fosforilació en la S780 de RB en cèl·lules quiescents també s'observa quan s'inhibeix l'expressió de p27, un regulador negatiu del complex Cdk4-ciclina D1 en cèl·lules quiescents (James et al., 2008; Blain, 2008), el que indica que transloquina i p27 col·laborarien, mitjançant mecanismes moleculars molt diferents, en impedir la fosforilació de RB en S780 per part dels complexos Cdk4-ciclina D1, mantenint així la cèl·lula en un estat quiescent.

Tot i que l'estimulació de cèl·lules quiescents per a entrar en cicle només té lloc eficaçment per addició de sèrum, hem observat que la sola presència de FGF2 és capaç de subvertir la inhibició de l'acumulació nuclear

de ciclina D1 en cèl·lules deprivades de sèrum a alta confluència. Aquest efecte és específic de FGF2 i no de FGF1, de la mateixa manera que ho és la seva interacció amb transloquina, amb qui només pot interaccionar FGF2 (Bossard et al., 2003). Recentment s'han descrit altres molècules que interaccionarien amb transloquina i estarien implicades en el transport de FGF2 al nucli, com Snx6 i RanBPM (Meunier et al., 2009). Mentre que Snx6 podria participar en el procés de triatge vesicular després de la internalització de FGF2, RanBPM podria estar implicada en el reconeixement del maquinari d'import nuclear. Basant-nos en el potent efecte inductor que mostra FGF2 sobre la localització nuclear de ciclina D1, podríem proposar que, en cèl·lules quiescents, la ciclina D1 estaria retinguda en el citoplasma per unió a transloquina. En aquestes condicions, i donat que impliquen el mateix domini, la transloquina impediria a Cdk4 entrar en complexos amb ciclina D1, inhibint així el seu import nuclear. La retenció de ciclina D1 tindria lloc possiblement en estructures microtubulars al voltant del nucli, on la transloquina formaria multímers via regions N-terminals, mentre que utilitzaria les regions C-terminals per unir-se al citoesquelet de tubulina i associar-se a la ciclina D1 en monòmers del mateix multímer. En canvi, la presència de FGF2 com a factor estimulador de l'entrada en cicle podria desplaçar la transloquina de ciclina D1 i així, d'una banda, permetre la associació del complex FGF2/transloquina a RanBPM i l'import nuclear de FGF2 i, d'una altra banda, alliberar la ciclina D1 per a formar complex amb Cdk4 i també ser importada al nucli (**figura 47**). És especialment interessant el fet que RanBPM sigui l'última molècula implicada en el transport de FGF2 al nucli, i que aquesta proteïna i la ciclina D1 interaccionin amb transloquina en dominis solapats (Meunier et al., 2009), suggerint que RanBPM podria estar implicada en l'alliberament de ciclina D1. És a dir, que mentre ciclina D1 està unida a transloquina també s'hi podria

DISCUSSIÓ

unir FGF2, però, fins que no s'unís RanBPM a transloquina no es podria alliberar la ciclina D1 per a formar complex amb Cdk4 i entrar al nucli.

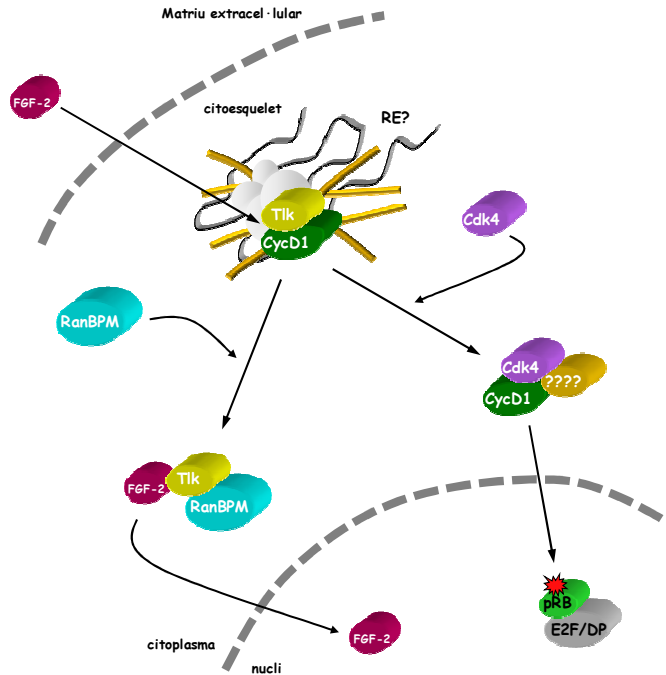


Figura 47. Model de regulació de la localització de ciclina D1 per transloquina i FGF2.

En aquest treball de tesi doctoral hem desvetllat i descrit un mecanisme de retenció citoplasmàtica de la ciclina D1 en fibroblasts embrionaris de ratolí, i hem identificat la transloquina com un interactor de la ciclina D1 que juga un paper important com a inhibidor de la seva acumulació nuclear en condicions de quiescència. També mostrem que la transloquina i Cdk4 s'uneixen i competeixen pel mateix domini de ciclina D1 i, donat que cal la formació prèvia del complex Cdk4-ciclina D1 per al seu import nuclear, aquest fet es constitueix en la base molecular del propi mecanisme de retenció citoplasmàtica.

3. Conclusions

1. La ciclina D1 es localitza en el citoplasma de fibroblasts embrionaris de ratolí quiescents.
2. La localització de ciclina D1 es regula per un mecanisme independent de l'export mediat per Crm1.
3. FGF2 promou l'acumulació nuclear de ciclina D1.
4. La transloquina, una proteïna involucrada en el transport de FGF2 al nucli, interacciona amb la ciclina D1.
5. La superexpressió de transloquina provoca una inhibició de l'acumulació nuclear de ciclina D1 en cèl·lules ciclant.
6. El mateix domini C-terminal que manca en formes oncogèniques de ciclina D1 és important per la interacció amb transloquina i localitzar la proteïna al citoplasma en cèl·lules quiescents.
7. Cdk4 i transloquina competeixen per la unió a la ciclina D1, el que permet establir un mecanisme molecular de retenció citoplasmàtica de ciclina D1.
8. La inhibició de l'expressió de transloquina produeix l'acumulació nuclear de ciclina D1 i la fosforilació de RB deguda a Cdk4 en cèl·lules quiescents.

Figures supplémentaires

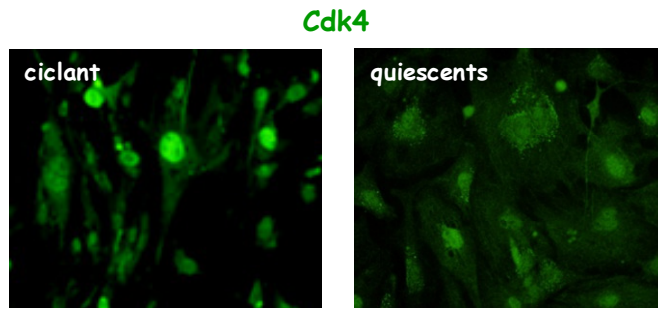


Figura suplementària S1. Localització intracel·lular de Cdk4 en MEFs.
Immunofluorescència de Cdk4 (policlonal α Cdk4) en cèl·lules ciclant i quiescents per inhibició per contacte i deprivació de sèrum (DMEM 0.5%) durant 36 h.

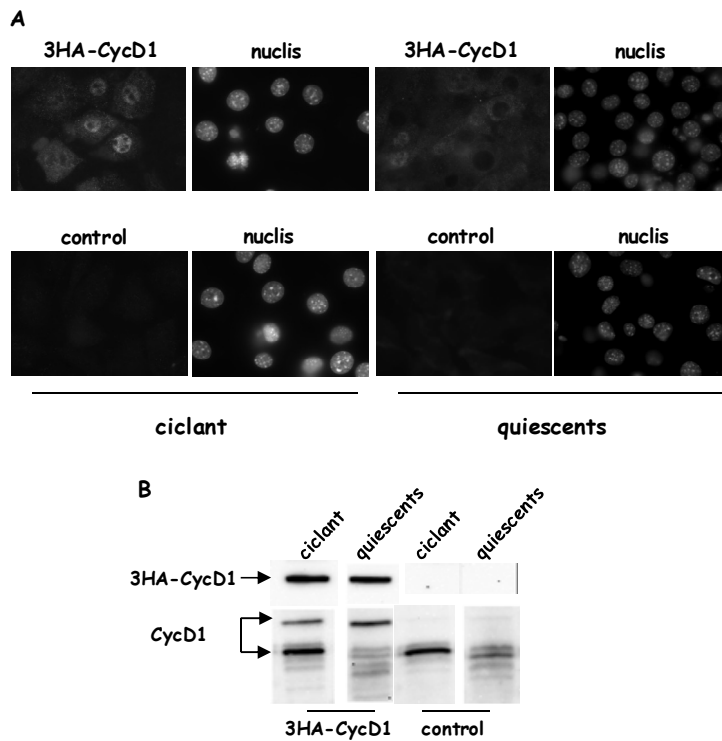


Figura suplementària S2. La ciclina D1 exògena mostra una localització similar a l'endògena en cèl·lules NIH3T3.

A. Immunofluorescència de 3HA-CycD1 (monoclonal α HA 3F10) de cèl·lules ciclant i quiescents infectades amb el vector lentiviral UBIp-3HA-CycD1. Es mostren també cèl·lules no infectades com a control. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Els nivells de ciclina D1 es van analitzar per western utilitzant l'anticòs contra l'epítop HA per observar la ciclina D1 exògena i un anticòs policlonal (α CycD1) per detectar tant l'endògena com l'exògena.

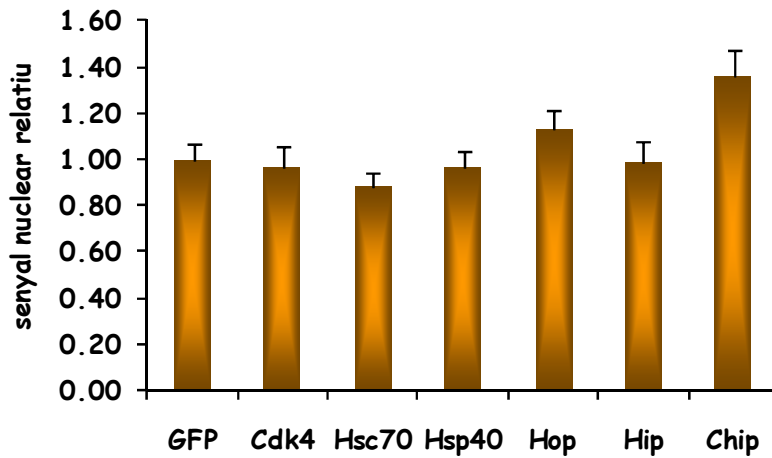


Figura suplementària S3. Efectes de la superexpressió de Cdk4, la xaperona Hsc70 i les co-xaperones Hsp40, Hop, Hip i Chip en la localització de ciclina D1.

Els MEFs van ser plantats en medi DMEM 10% de sèrum i passades 24 hores es van co-transfectar amb GFP i les diferents proteïnes (Cdk4, Hsc70, Hsp40, Hop, Hip i Chip). Després de realitzar la immunofluorescència per a ciclina D1 (D1-7213-G) i GFP (policlonal aGFP) es van quantificar el senyal nuclear de ciclina D1 de les cèl·lules GFP positives. En la gràfica es representa la mitjana del senyal nuclear de ciclina D1 respecte les cèl·lules control (només transfectades amb GFP).

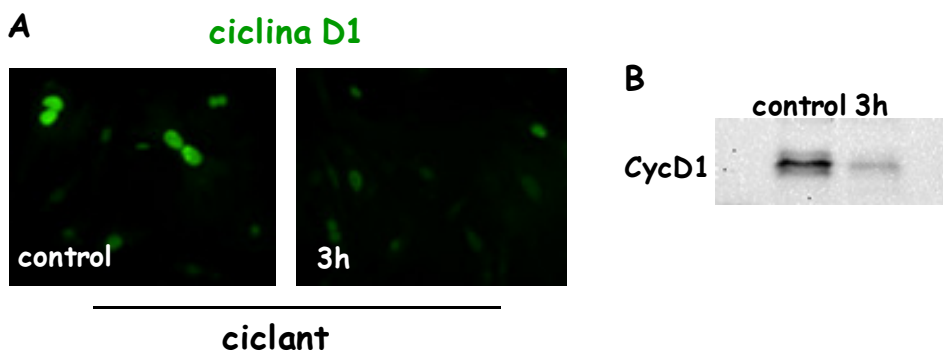


Figura suplementària S4. La inhibició de la xaperona Hsp90 amb geldanamicina afecta la síntesi de ciclina D1, però no la seva localització.

Els MEFs van ser plantats en medi DMEM 10% sèrum i passades 15 hores d'estimulació es van tractar amb 10 μ M geldanamicina durant 3 h.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 (D1-7213-G).

B. Mesura dels nivells de proteïna (CycD1) per western.

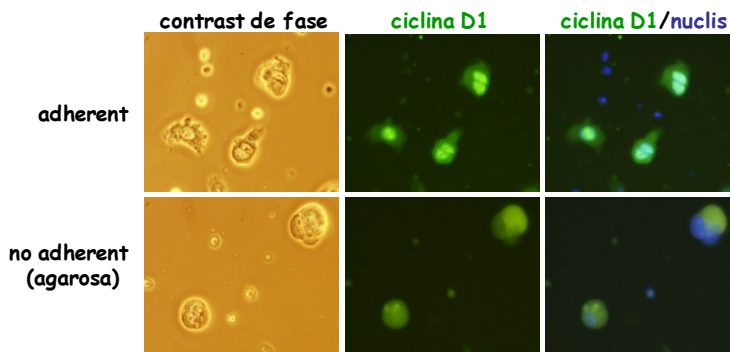


Figura suplementària S5. El cultiu en suspensió pot afectar la localització de ciclina D1. Immunofluorescència de ciclina D1 (D1-7213-G) de cèl·lules crescudes amb adherència o sense (en plaques d'agarosa) durant 15 h. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

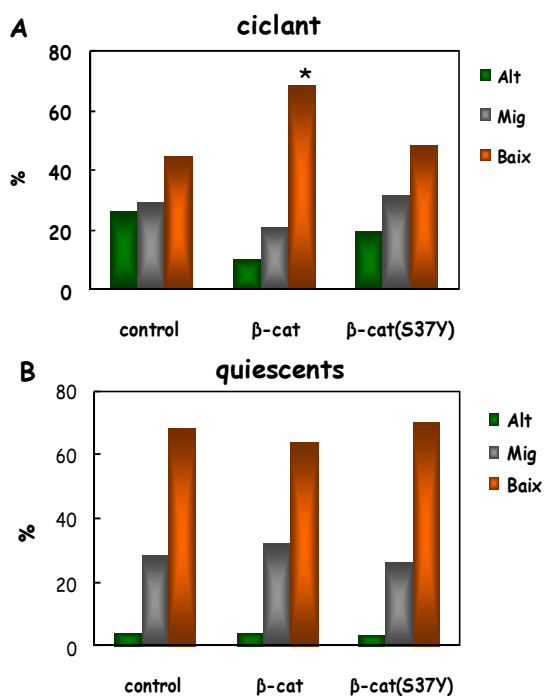


Figura suplementària S6. La localització de ciclina D1 es veu poc afectada al superexpressar β-catenina wt i el mutant (S37Y) en cèl·lules ciclant i aturades en G1. Tant les cèl·lules ciclant (A) com quiescents (B) van ser transfectades amb els següents plàsmids: GFP (control), GFP i β-catenina (β-cat), i GFP i el mutant S37Y (β-catS37Y). En les gràfiques es representa el percentatge de cèl·lules amb diferents nivells (alt, mig i baix) de senyal nuclear de la ciclina D1 en les cèl·lules GFP positives. L'asterisc indica una diferència significativa (α=0.05).

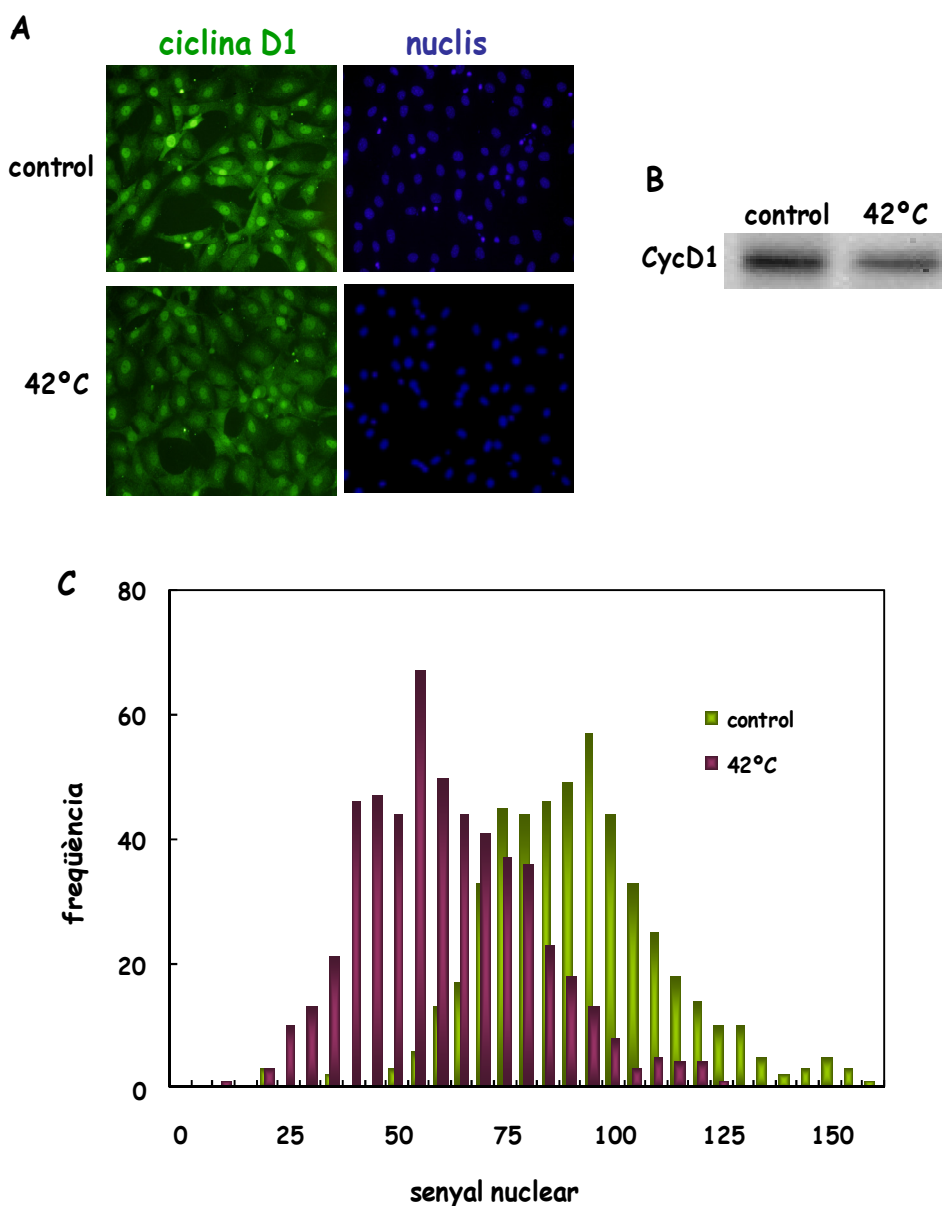


Figura suplementària S7. La localització nuclear de ciclina D1 en NIH3T3 està disminuïda després d'un xoc tèrmic.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 (D1-7213-G) en cèl·lules ciclant després d'un xoc tèrmic de 90 min a 42°C.

B. Els nivells de proteïna es van mesurar per western.

C. En la gràfica es representa la distribució de freqüències del senyal nuclear de ciclina D1 de les cèl·lules control i de les sotmeses al xoc tèrmic.

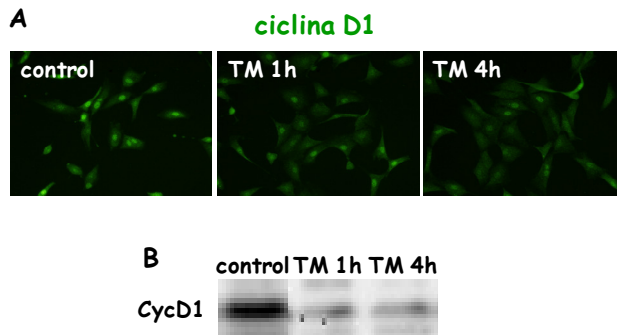


Figura suplementària S8. La tunicamicina (TM) afecta la síntesi de ciclina D1.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 (D1-7213-G) en cèl·lules NIH3T3 ciclant: no tractades (control) o tractades amb 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tunicamicina durant 1 o 4 hores.

B. Mesura dels nivells de proteïna ciclina D1 per western (CycD1).

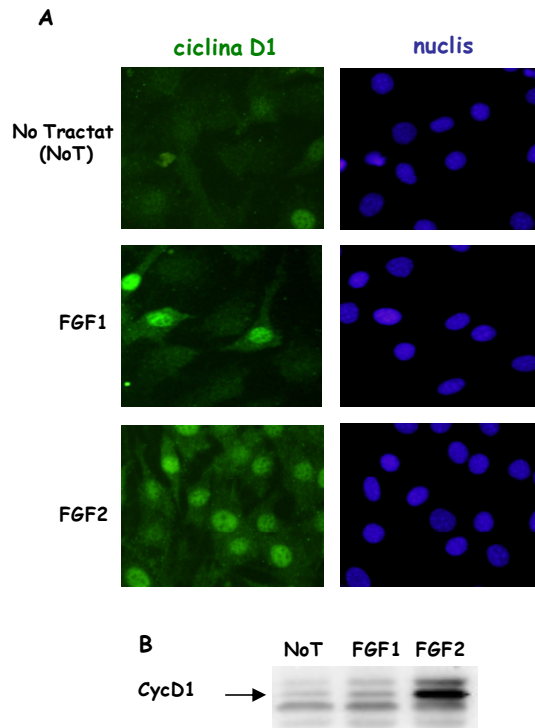


Figura suplementària S9. Augment del senyal nuclear de ciclina D1 endògena al tractar les cèl·lules NIH3T3 quiescents amb FGF2.

A. Immunofluorescència de ciclina D1 endògena (D1-7213-G). Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Per western-blot es va determinar la quantitat de ciclina D1 endògena (CycD1).

Figures suplementàries

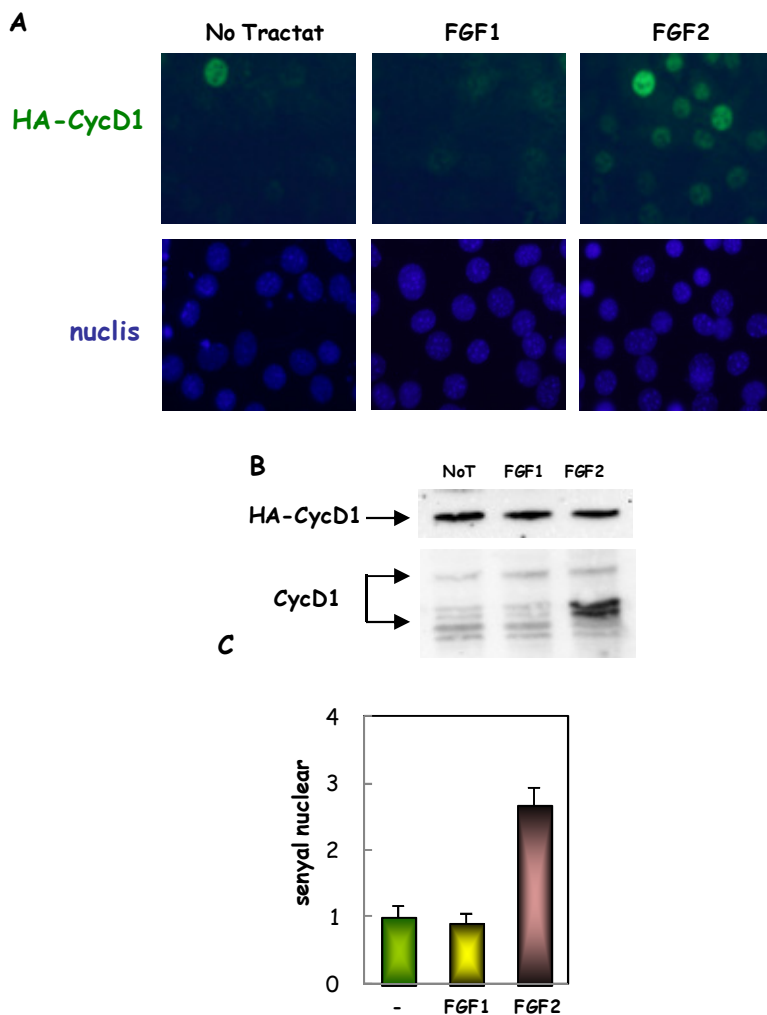


Figura suplementària S10. Augment del senyal nuclear de ciclina D1 exògena al tractar les cèl·lules NIH3T3 quiescents amb FGF2.

A. Les cèl·lules NIH3T3 van ser infectades amb un vector lentiviral que expressa 3HA-CycD1 i la immunofluorescència es va fer contra l'epítip HA (α HA 3F10). Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

B. Per western es va determinar la quantitat de proteïna tan per la ciclina D1 endògena (α CycD1) com per l'exògena (α HA).

C. En la gràfica es representa el senyal nuclear relatiu de ciclina D1 exògena en les diferents condicions. Les barres inclouen el límit de confiança de la mitjana ($\alpha=0.05$).

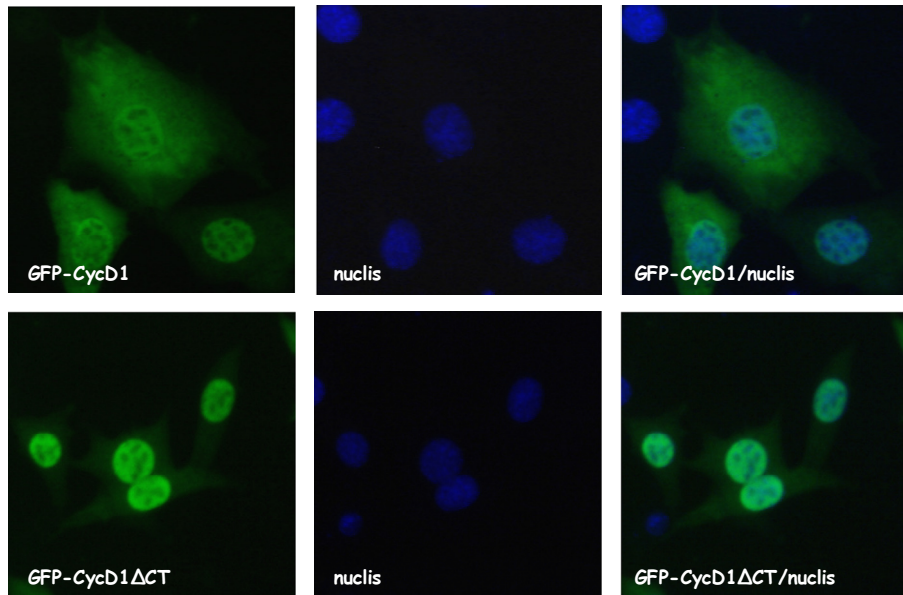


Figura suplementària S11. Localització de ciclina D1 i el mutant *CycD1ΔCT*.

Les cèl·lules NIH3T3 ciclant van ser transfectades amb *GFP-CycD1* o *GFP-CycD1ΔCT*, i les respectives proteïnes es varen detectar per immunofluorescència amb un anticòs α GFP. Els nuclis van ser marcats amb Hoechst.

Bibliografia

- A**dams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CN, Kaelin WG (1996) Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol*, 16:6623-33
- Adams PD, Li X, Sellers WR, Baker KB, Leng X, Harper JW, Taya J, Kaelin WG (1999) Retinoblastoma protein contains a Cterminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 19:1068-80
- Agami R, Bernards R (2000) Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell*, 102:55-66
- Aktas H, Cai H, Cooper GM (1997) Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the cdk inhibitor p27. *Mol Cell Biol*, 17:3850-57
- Alao JP, Gamble SC, Stavropoulou AV, Pomeranz KM, Lam EW, Coombes RC, Vigushin DM (2006a) The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. *Mol Cancer*, 5:7
- Alao JP, Stavropoulou AV, Lam EW, Coombes RC, Vigushin DM (2006b) Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A induces ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer*, 5:8
- Alao JP (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*, 6:24
- Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*, 270:23589-97
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:13742-47
- Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA (2000) Phosphorylation dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev*, 14:3102-14

Bibliografia

Alt JR, Gladden AB, Diehl JA (2002) p21(Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem*, 277:8517-23

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M (2003) Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 426:570-74

Assoian RK, Klein EA (2008) Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol*, 18:347-52

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987) Current protocols in molecular biology. Willey Interscience, New York

Bagui TK, Mohapatra S, Haura E, Pledger WJ (2003) p27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active cyclin D-cdk4 complexes. *Mol Biol Cell*, 23:7285-90

Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*, 7:812-21

Balmano K, Cook SJ (1999) Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene*, 18:3085-97

Barbash O, Lin DI, Diehl JA (2007) SCF Fbx4/alphaB-crystallin cyclin D1 ubiquitin ligase: a license to destroy. *Cell Div*, 2:2

Benzeno S, Diehl JA (2004) C-terminal Sequences Direct Cyclin D1-CRM1 Binding. *J Biol Chem*, 279:56061-66

Besson A, Gurian-West M, Chen X, Kelly-Spratt KS, Kemp CJ, Roberts JM (2006) A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev*, 20:47-64

Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J (1995) Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene*, 11:1005-11

Bikfalvi A, Savona C, Perollet C, Javerzat S (1998) New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. *Angiogenesis*, 1:155-73

Blain SW (2008) Switching Cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle*, 7:892-98

- Blain SW, Montalvo E, Massagué J (1997) Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p27 with cyclin A-cdk2 and cyclin D2-cdk4. *J Biol Chem*, 272:25863-72
- Bockstaele L, Coulonval K, Kookken H, Paternot S, Roger PP (2006) Regulation of CDK4. *Cell Div*, 1:25
- Bohmer RM, Scharf E, Assoian RK (1996) Cytoskeletal Integrity Is Required throughout the Mitogen Stimulation Phase of the Cell Cycle and Mediates the Anchorage-dependent Expression of Cyclin D1. *Mol Biol Cell*, 7:101-11
- Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A (2003) Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem*, 278:25752-57
- Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L, Meunier S, Zanibellato C, Prats H (2003) Translokín is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nature Cell Biol*, 5:433-39
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, 436: 660-65
- Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression (endoplasmic reticulum stress/cyclin-dependent kinases). *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:8505-10
- Brotherton DH, Dhanaraj V, Wick S, Brizuela L, Domaille PJ, Volyanik E, Xu X, Parisini E, Smith BO, Archer SJ, Serrano M, Brenner SL, Blundell TL, Laue ED (1998) Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature*, 395:244-50 Erratum in: *Nature* 1998, 396:390
- Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Garman EF, Wakatsuki S, Mitchell E, Rasmussen B, Hunt T, Johnson LN (1995) The crystal structure of cyclin A. *Structure*, 3:1235-47
- C**ampa VM, Gutiérrez-Lanza R, Cerignoli F, Díaz-Trelles R, Nelson B, Tsuji T, Barcova M, Jiang W, Mercola M (2008) Notch activates cell cycle reentry and progression in quiescent cardiomyocytes. *J Cell Biol*, 183: 129-41

Bibliografia

- Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:729-40
- Casanovas O, Miro F, Estanyol JM, Itarte E, Agell N, Bachs O (2000) Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J Biol Chem*, 275:35091-97
- Castano EY, Kleyner, Dynlacht BD (1998) Dual cyclin-binding domains are required for p107 to function as a kinase inhibitor. *Mol Cell Biol*, 18:5380-91
- Chan FKM, Zhang J, Chen L, Shapiro DN, Winoto A (1995) Identification of human/mouse p19, a novel CDK4/CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol*, 15:2682-88
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410:37-40
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436:725-30
- Cheng J, Saha P, Kornbluth S, Dynlacht BD, Dutta A (1996) Cyclin binding motifs are essential for the function of p21Cip1. *Mol Cell Biol*, 16:4673-82
- Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF (1998) Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl*, 95:1091-6
- Cheng M, Olivier P, DiehlJA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*, 18:1571-83
- Chu IM, Hengst L, Slingerland JM (2008) The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8:253-67
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A (2004) Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/Estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of Cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol*, 24:7260-74

- Classon M, Harlow E (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2:910-17
- Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, 272:877-80
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005) Tumor biology: senescence in premalignant tumors. *Nature*, 436: 636-7
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378:785-89

D'Amico M, Wu K, Fu M, Rao M, Albanese C, Russell RG, Lian H, Bregman D, White MA, Pestel RG (2004) The inhibitor of Cyclin-dependent kinase 4a/Alternative Reading Frame (INK4a/ARF) locus encoded proteins p16INK4a and p19ARF repress Cyclin D1 transcription through distinct cis elements. *Cancer Res*, 64:4122-30

- Day PJ, Cleasby A, Tickle IJ, O'Reilly M, Coyle JE, Holding FP, McMenamin RL, Yon J, Chopra R, Lengauer C, Jhoti H (2009) Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:4166-41
- De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 363:595-602
- Diehl JA, Sherr CJ (1997) A Dominant-Negative Cyclin D1 Mutant Prevents Nuclear Import of Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) and Its Phosphorylation by CDK-Activating Kinase. *Mol Cell Biol*, 17:7362-74
- Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ (1997) Inhibition of cyclin D phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, 11:957-72
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3b regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 12:3499-511

Bibliografia

Diehl JA, Yang W, Rimerman RA, Xiao H, Emili A (2003) Hsc70 Regulates Accumulation of Cyclin D1 and Cyclin D1-Dependent Protein Kinase. *Mol Cell Biol*, 23: 1764-74

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 275:661-5

Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SJ (1994) p53-Dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, 76:1013-23

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

Emanuele MJ, Stukenberg PT (2007) Xenopus Cep57 is a novel kinetochore component involved in microtubule attachment. *Cell*, 130:893-905

Feng Q, Sekula D, Muller R, Freemantle SJ, Dmitrovsky E (2007) Uncovering residues that regulate cyclin D1 proteasomal degradation. *Oncogene*, 26:5098-106

Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ (1994) Induction of cyclin D1 overexpression by activated Ras. *Oncogene*, 9:3627-33

Fisher RP, Jin P, Chamberlin HM, Morgan DO (1995) Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell*, 83:47-57

Fringer J, Grinnell F (2001) Fibroblast Quiescence in Floating or Released Collagen Matrices contribution of the ERK signaling pathway and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem*, 276:31047-52

Fukami-Kobayashi J, Mitsui Y (1999) Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp Cell Res*, 246:338-47

Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A (2001) The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol*, 3:321-4

- Garí E, Volpe T, Wang H, Gallego C, Futcher B, Aldea M (2001) Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin *CLN3* to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev*, 15:2803-08
- Gartel AL, Tyner AL (1999) Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res*, 246:280-289
- Germain D, Russell A, Thompson A, Hendley J (2000) Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *J Biol Chem*, 275:12074-79
- Gil J, Peters G (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:667-77
- Gladden AB, Diehl JA (2005) Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem*, 96:906-13
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L (2007) Cdk-inhibitory activity and stability of p27^{KIP1} are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*, 128:269-80
- Gu Y, Turek CW, Morgan DO (1993) Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, 366:707-10
- Gu J, Li G, Sun T, Su Y, Zhang X, Shen J, Tian Z, Zhang J (2008) Blockage of the STAT3 signaling pathway with a decoy oligonucleotide suppresses growth of human malignant glioma cells. *J Neurooncol*, 89:9-17
- Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y (1994) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p15INK4b/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes & Dev*, 8:2939-52
- Guo Y, Yang K, Harwalkar J, Nye JM, Mason DR, Garrett MD, Hitomi M, Stacey DW (2005) Phosphorylation of cyclin D1 at Thr 286 during S phase leads to its proteasomal degradation and allows efficient DNA synthesis. *Oncogene*, 24:2599-12
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 19:5785-579
- H**annon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371:257-61

Bibliografia

- Hara E, Tsurui H, Shinozaki A, Nakada S, Oda K (1991) Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 179:528-34
- Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G (1996) Regulation of p16CDKN2 expression and its implication for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, 16:859-67
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge S J (1993) The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75:805-16
- Harper JW, Elledge SJ (1998) The role of Cdk7 in CAK function a retro-retrospective. *Genes Dev*, 12:285-89
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25:585-621
- Hirai H, Roussel MF, Kato J, Ashmun JA, Sherr CJ (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, 15:2672-81
- Honda R, Lowe ED, Dubinina E, Skamnaki V, Cook A, Brown NR, Johnson LN (2005) The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J*, 24:452-63
- Huang S, Ingber DE (2002) A Discrete Cell Cycle Checkpoint in Late G1 That Is Cytoskeleton-Dependent and MAP Kinase (Erk)-Independent. *Exp Cell Res*, 275:255-64
- Huerta M, Munoz R, Tapia R, Soto-Reyes E, Ramirez L, Recillas-Targa F, Gonzalez-Mariscal L, Lopez-Bayghen E (2007) Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E Box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*, 18:4826-36
- L**avarone A, Massagué J (1997) Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*, 387:417-22
- Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Akram K, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T (2008) Novel role of Antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J Biol Chem*, 283:9157-67

- J**ames MK, Ray A, Leznova D, Blain SW (2008) Differential Modification of p27Kip1 Controls Its Cyclin D-cdk4 Inhibitory Activity. *Mol Cell Biol*, 28: 498-510
- Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT (2006) Stem-cell ageing modified by the cyclindependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443:421-6
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, 376:313-20
- Joyce D, Bouzahzah B, Fu M, Albanese C, D'Amico M, Steer J, Klein JU, Lee RJ, Segall JE, Westwick JK (1999) Integration of Rac dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274:25245-49
- K**ato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*, 7:331-42
- Kato JY, Matsuoka M, Strom DK, Sherr CJ (1994a) Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol*, 14:2713-21
- Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massagué J, Sherr CJ (1994b) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase-4 activation. *Cell*, 79:487-96
- Kerkhoff E, Rapp UR (1997) Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol*, 17:2576-86
- Kim WY, Sharpless NE (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127:265-75
- Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S, Taya Y (1996) The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J*, 15:7060-69
- Klein EA, Assoian RK (2008) Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*, 1:3853-7

Bibliografia

Knudsen KE (2006) The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks. *Cell Division*, 1:15

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

Kothapalli D, Flowers J, Xu T, Pure E, Assoian RK (2008) Differential activation of ERK and Rac mediates the proliferative and anti-proliferative effects of hyaluronan and CD44. *J Biol Chem*, 283:31823-9

Krieger S, Gauduchon J, Roussel M, Troussard X, Sola B (2006) Relevance of cyclin D1b expression and CCND1 polymorphism in the pathogenesis of multiple myeloma and mantle cell lymphoma. *BMC Cancer*, 6:238

Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE (2006) p16INK4a induces an agedependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 443:453-7

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134:657-67

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

Larrea MD, Liang J, Da Silva T, Hong F, Shao SH, Han K, Dumont D, Slingerland JM (2008) Phosphorylation of p27Kip1 Regulates Assembly and Activation of Cyclin D1-Cdk4. *Mol Cell Biol*, 28:6462-72

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*, 271:20608-16

Lee MH, Reynisdottir I, Massagué J (1995) Cloning of p57Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes&Dev*, 9:639-49

Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C (2006) Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of Transcription 3. *Cancer Res*, 66:2544-52

- Lin DI, Barbash O, Kumar KG, Weber JD, Harper JW, Klein-Szanto AJ, Rustgi A, Fuchs SY, Diehl JA (2006) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF (FBX4-alphaB crystallin) complex. *Mol Cell*, 24:355-66
- Lu D, Wolfgang CD, Hai T (2006) Activating Transcription Factor 3, a stress-inducible gene, suppresses ras-stimulated tumorigenesis. *J Bio Chem*, 281:10473-81
- Lu F, Gladden AB, Diehl JA (2003) An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res*, 63:7056-61
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375: 503-06
- M**Maehara K, Yamakoshi K, Ohtani N, Kubo Y, Takahashi A, Arase S, Jones N, Hara E (2005) Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol*, 168:553-60
- Mahony D, Parrry DA, Lees E (1998) Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells. *Oncogene*, 16:603-11
- Matecki J, Wesche J, Skjerpen CS, Wiedłocha A, Olsnes S (2004) Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Mol Biol Cell*, 15:801-14
- Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, Downward J, Pestell RG, Kanakura Y (1999) Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J*, 18:1367-77
- Matsuoka S, Edwards M, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes & Dev*, 9:650-62
- Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ (1991) Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 65:701-13

Bibliografia

- Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY (1994) D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 14:2066-76
- McConnell BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G (1999) Induced expression of p16INK4a inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol*, 19:1981-9
- Meunier S, García-Jove Navarro M, Bossard C, Laurell H, Touriol C, Lacazette E, Prats H (2009) Pivotal role of translokin/Cep57 in the unconventional secretion versus nuclear translocation of FGF-2. *Traffic*
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436:720-4
- Minamino T, Komuro I (2008) Vascular aging: insights from studies on cellular senescence, stem cell aging, and progeroid syndromes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Medical*, 5:637-48
- Mishra R, Das B (2005) Activation of STAT5-cyclin D1 pathway in chewing tobacco mediated oral squamous cell carcinoma. *Mol Bio Rep*, 32:159-66
- Mitra J, Dai CY, Somasundaram K, El-Deiry WS, Satyamoorthy K, Herlyn M, Enders GH (1999) Induction of p21WAF1/CIP1 and inhibition of Cdk2 mediated by the tumor suppressor p16INK4a. *Mol Cell Biol*, 19:3916-28
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ (2006) Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443:448-52
- Momotani K, Khromov AS, Miyake T, Stukenberg PT, Somlyo AV (2008) Cep57, a multidomain protein with unique microtubule and centrosomal localization domains. *Biochem J*, 412:265-73
- Morgan DO (1997) Cyclin dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell dev Biol*, 13:261-291
- Morgan DO (2007) The Cell Cycle, Principles of Control. *New Science Press*, London
- Murrin LC, Talbot JN (2007) RanBPM, a Scaffolding Protein in the Immune and Nervous Systems. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2:290-95

- N**ewman RM, Mobascher A, Mangold U, Koike C, Diah S, Schmidt M, Finley D, Zetter BR (2004) Antizyme targets cyclin D1 for degradation A novel mechanism for cell growth repression. *J Biol Chem*, 279:41504-11
- Noda A, Ning Y, Venable SY, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, 211:90-8
- Norbury C, Nurse P (1992) Animals cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, 61:441-70
- Nourse J, Firpo E, Flanagan MW, Meyerson M, Polyak K, Lee MH, Massagué J, Crabtree GR, Roberts JM (1994) Rapamycin prevents IL-2-mediated elimination of the cyclin-CDK kinase inhibitor, p27Kip1. *Nature*, 372:570-73
- O**baya AJ, Kotenko I, Cole MD, Sedivy JM (2002) The protooncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27kip1 to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G1 phase progression. *J Biol Chem*, 277:31263-69
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot T J G, Stinson J A, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks A D, Peters G, Hara E (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*, 409:1067-70
- Ohtani N, Mann DJ, Hara E (2009) Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci*, 100:792-7
- Okabe H, Lee SH, Phuchareon J, Albertson DG, McCormick F, Tetsu O (2006) A Critical Role for FBXW8 and MAPK in Cyclin D1 Degradation and Cancer Cell Proliferation. *PLoS ONE*, 1:e128
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2002) Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *BBA* 1602:73-87
- Ozon S, Byk T, Sobel A (1998) SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J Neurochem*, 70:2386-96

- P**agano M, Theodoras AM, Tam SW, Draetta GF (1994) Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev*, 8:1627-39
- Passegué E, Wagner EF (2000) JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J*, 19:2969-79
- Peeper DS, Upton TM, Ladha MH, Neuman E, Zalvide J, Bernards O, Coqueret R, DeCaprio JA, Ewen ME (1997) Ras signalling linked to the cell cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature*, 386:177-81
- Pei XH, Xiong Y (2005) Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene*, 24:2787-95
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM (1994a) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, 8:9-22
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J (1994b) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78:59-66
- Proweller A, Tu L, Lepore JJ, Cheng L, Lu MM, Seykora J, Millar SE, Pear WS, Parmacek MS (2006) Impaired Notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res*, 66:7438-44
- Q**uelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev*, 7:1559-71
- R**ampalli S, Pavithra L, Bhatt A, Kundu TK, Chattopadhyay S (2005) Tumor suppressor SMAR1 mediates Cyclin D1 repression by recruitment of the SIN3/Histone Deacetylase 1 complex. *Mol Cell Biol*, 25:8415-29
- Ray A, James MK, Larochelle S, Fisher RP, Blain SW (2009) p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. *Mol Cell Biol*, 29:986-99
- Reed SI (1992) The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu Rev Cell Biol*, 8:529-61

- Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*, 14:1669-79
- Roberts JM (1999) Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 98:129-32
- Ruas M, Peters G (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1378:115-77
- Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich N (1996) Structural basis of cyclin dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, 3:696-700
- S**adot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, Kam1 Z, Ben-Ze'ev1 A, Geiger1 B (1997) Regulation of S33/S37 phosphorylated b-catenin in normal and transformed cells. *JCC*, 115:2771-80
- Santra MK, Wajapeyee N, Green MR (2009) F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature*, 459:722-25
- Schoenfeld TA, Obar RA (1994) Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol*, 151:67-137
- Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massagué J (2001) TGFβ influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15^{INK4b}. *Nat Cell Biol*, 3:400-08
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366:704-7
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic *ras* Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88:593-602
- Serrano M, Blasco MA (2001) Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol*, 13:748-53
- Sharpless NE, DePinho RA (2002) p53: good cop/bad cop. *Cell*, 110:9-12
- Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20:2390-2400

Bibliografia

- Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*, 196:33-9
- Shen Q, Uray IP, Li Y, Krisko TI, Strecker TE, Kim HT, Brown PH (2007) The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene*, 27:366-77
- Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, 73:1059-65
- Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79:551-55
- Sherr CJ (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*, 20:187-190
- Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 9:1149-63
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13:1501-12
- Sherr CJ, Roberts JM (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 18:2699-2711
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:5522-27
- Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, Senderowicz AM, Conti CJ, Knudsen ES (2003) Cyclin D1 splice variants: Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem*, 278:30339-47
- Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J, Koff A (1996) Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ*, 7:135-146
- Stahl M, Ge C, Shi S, Pestell RG, Stanley P (2006) Notch1-induced transformation of RKE-1 cells requires up-regulation of Cyclin D1. *Cancer Res*, 66:7562-70
- Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW (1996) Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev*, 10:1491-1502
- Stevaux O, Dyson NJ (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*, 14:684-91

Sugimoto M, Nakamura T, Ohtani N, Hampson L, Hampson IN, Shimamoto A, Y Furuichi, K Okomura, S Niwa, Y Taya, E Hara (1999) Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34(SEI-1). *Genes Dev*, 13:3027-33

Sumrejkanchanakij P, Tamamori-Adachi M, Matsunaga Y, Eto K, Ikeda MA (2003) Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene*, 22:8723-30

Takahashi M, Kojima M, Nakajima K, Suzuki-Migishima R, Takeuchi T (2007) Functions of a jumonji-cyclin D1 pathway in the coordination of cell cycle exit and migration during neurogenesis in the mouse hindbrain. *Dev Biol*, 303:549-60

Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T (2007) GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. *Cell Signalling*, 20:581-9

Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda MA (2003) Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res*, 92:12-9

Tan Y, Yoshida Y, Hughes DE, Costa RH (2006) Increased expression of hepatocyte Nuclear Factor 6 stimulates hepatocyte proliferation during mouse liver regeneration. *Gastroenterology*, 130:1283-1300

Taulés M, Rius E, Talaya D, López-Girona A, Bachs O, Agell N (1998) Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-Cdk4 during G1. *J Biol Chem*, 273:33279-86

Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398:422-26

Thoms HC, Dunlop MG, Stark LA (2007) p38-mediated inactivation of cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 stimulates nucleolar translocation of RelA and apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res*, 67:1660-69

Townson SM, Dobrzycka KM, Lee AV, Air M, Deng W, Kang K, Jiang S, Kioka N, Michaelis K, Oesterreich S (2003) SAFB2, a new scaffold attachment factor homolog and estrogen receptor corepressor. *J Biol Chem*, 278:20059-68

Bibliografia

Toyoda M, Shirato H, Nakajima K, Kojima M, Takahashi M, Kubota M, Suzuki-Migishima R, Motegi Y, Yokoyama M, Takeuchi T (2003) Jumonji downregulates cardiac cell proliferation by repressing cyclin D1 expression. *Dev Cell*, 5:85-97

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

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD 1997 Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*, 22:267-72

Vergés E, Colomina N, Garí E, Gallego C, Aldea M (2007) Cyclin Cln3 Is Retained at the ER and Released by the J Chaperone Ydj1 in Late G1 to Trigger Cell Cycle Entry. *Mol Cell*, 26:649-62

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36:131-149

Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B (1996) Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J*, 15:6595-6604

Wang D, Liu Z, Li Q, Karpurapu M, Kundumani-Sridharan V, Cao H, Dronadula N, Rizvi F, Bajpai AK, Zhang C, Müller-Newen G, Harris KW, Rao GN (2007) An essential role for gp130 in neointima formation following arterial injury. *Circ Res*, 100:807-816

Wang H, Garí E, Vergés E, Gallego C, Aldea M (2004) Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-CDK complex to late G1. *EMBO J*, 23:180-190

Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ (1997) Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D in G1 phase. *Biochem J*, 326:61-8

Weiner MP, Costa GL (1994) Rapid PCR site directed mutagenesis *Genome research*, 4:S131-S136

Winston JT, Coats SR, Wang Y-Z, Pledger WJ (1996) Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene*, 12:127-34

Wolthuis RM, Bauer B, van 't Veer LJ, de Vries-Smits AM, Cool RH, Spaargaren M, Wittinghofer A, Burgering BM, Bos JL (1996) RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene*, 13:353-62

Wright WE, Shay JW (2000) Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med*, 6:849-51

Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991) Human D-type cyclin. *Cell*, 65: 691-99

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366:701-04

Yan Y, Frisen J, Lee MH, Massagué J, Barbacid M (1997) Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev*, 11:973-983

Yan YX, Nakagawa H, Lee MH, Rustgi AK (1997) Transforming growth factor-alpha enhances cyclin D1 transcription through the binding of early growth response protein to a cis-regulatory element in the cyclin D1 promoter. *J Biol Chem*, 272:33181-90

Zacharek SJ, Xiong Y, Shumway SD (2005) Negative regulation of TSC1-TSC2 by mammalian D-type cyclins. *Cancer Res*, 65:11354-60

Zambetti GP (2007) The p53 mutation 'gradient effect and its clinical Implications. *J Cell Physiol*, 213:370-3

Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ (1997) Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, 387:151-158

Zhu X, Ohtsubo M, Böhmer RM, Roberts JM, Assoian RK (1996) Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclinE-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol*, 133:391-403

Bibliografia

- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ (1997) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 15:203-211
- Zou Y, Ewton DZ, Deng X, Mercer SE, Friedman E (2004) Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *J Biol Chem*, 279:27790-98
- Zwicker J, Brusselbach S, Jooss KU, Sewing A, Behn M, Lucibello FC, Muller R (1999) Functional domains in cyclin D1: pRb-kinase activity is not essential for transformation. *Oncogene*, 18:19-25