

TESI DOCTORAL

**REGULACIÓ DEL COMPLEX CICLINA A-CDK2
PER L'ACETILASA PCAF**

FRANCESCA MATEO GONZÁLEZ



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Barcelona, Abril 2009

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

Programa de Doctorat en Biologia i Patologia Cel·lular

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Bienni 2003-2005

REGULACIÓ DEL COMPLEX CICLINA A-CDK2 PER L'ACETILASA PCAF

Memòria presentada per

Francesca Mateo González

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Doctor Oriol Bachs i Valldeneu al Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

**Als meus pares
i mon germà**

Al Marc

AGRAÏMENTS

*If I have seen further than others,
it is by standing
upon the shoulders of giants*
Isaac Newton

“And now, the end is near, and so I face the final curtain...” Així és com comença la cançó “My way” del Frank Sinatra i m’ha semblat una manera original de començar els agraïments; què us sembla? Doncs sí, s’acosta el final de la meva tesi i ja només queda la lectura, quins nervis!!! Aquests anys han estat un temps molt especial, d’aquells que un recorda després quan és gran i li diu als néts: “Doncs quan jo feia la tesi....!” Han estat intensos, plens de pujades i baixons emocionals (és lo que té aquesta feina!); però per sobre de tot crec que he après moltíssim tant de la “biologia de la cèl·lula” com de la vida mateixa, i en això tots els que esteu en aquest departament hi heu col·laborat i us ho vull agrair en aquest escrit.

En primer lloc et vull agrair a tu, Oriol, el meu jefe, que em donessis l’oportunitat de fer la tesi aquí. Jo venia rebotada d’un grup en el que la jefa encara “no havia pixat la Coca-Cola” i gràcies a tu vaig descobrir que és possible treballar a gust i disfrutar de la ciència. Moltes gràcies per l’ajut, la guia, els consells, la discussió científica i sobre tot pels ànims. Els teus mítics “venceremos!” m’acompanyaran sempre. En penso fer difusió allà on vagi!

Núria Canela: moltes gràcies per tot! Gràcies perquè sempre he pogut recórrer a tu quan he necessitat un cop de mà i per donar-me suport sempre; per donar-me l’oportunitat de sortir en el teu article i per les cartes de recomanació. Com t’he trobat a faltar d’ençà que vas marxar! Et vull dir una cosa perquè la tinguis ben present: ets una gran persona i una gran científica, i segur que t’ho reconeixeran allà on vagis, no en tinc cap dubte.

També vull agrair a la Montse Jaumot la paciència que has tingut amb mi. Gràcies pels ànims i per escoltar-me quan he estat en moments complicats. Tinc molt presents els consells del Xavier Guix (encara que a vegades em costi seguir-los) i algun dia coneixeré l’Oriol i la Mary (qui sap, potser fins i tot ens trobem en un del seus cursos?) =) Espero que disfrutis molt d’aquesta nova etapa que has començat com a profe; segur que els alumnes estaran ben contents!

A la Xus, la Neus, el Carles, la Rosa i el Siscu us agraeixo molt el fet que sempre estigueu disposats a resoldre dubtes i a ajudar. A més, crec que la vostra dedicació i entusiasme per aquesta feina és una font d'inspiració per a tots els qui estem fent la tesi.

Moltíssimes gràcies Eulàlia per tot el que fas. La teva feina, tot i que és silenciosa, és molt important; no sé què seria del laboratori sense tu! I gràcies als tècnics: l'Alba F. i la Maria per facilitar-nos la feina, i al Jaumet, que a part de facilitar-nos la feina ens alegra el dia amb alguna de les seves ;-). Sònia Brun, ets una persona molt dolça i molt maca; gràcies per l'ajut, els ànims i les anècdotes del Dalmau i la Natàlia que m'han divertit molt.

Pel que fa al grup Oriol's, he de començar obligatòriament donant les gràcies a la Doctora Mireia Ventura per ser la millor companya de poiata que podria tenir. Gràcies per escoltar sempre i per valorar-me tant que fins i tot em feies posar vermella! No n'hi ha gaires com tu, noia, i no sóc pas l'única que ho pensa; has deixat la teva empremta en molta gent d'aquest laboratori. Ara que ja has començat la teva vida professional de ple, et desitjo molta sort en tots els teus projectes, i que no perdem el contacte! Ignasi Salaet: gràcies pel temps que vam treballar plegats, quan compartíem berenars de donuts de xocolata i ens rèiem dels teus "Duboyas" amb la Mireia. Tens una gran capacitat i estic segura que tot t'anirà molt bé i tiraràs endavant aquest nou projecte que tens entre mans. Molts ànims, xiquet! Niña Patri: gracias por ser siempre tan honesta y natural, y tan buena gente. Sé que en los últimos tiempos he estado irritable con la escritura de la tesis y los artículos y no siempre te he tratado tan bien como te mereces. Espero que me sepas perdonar, y deseo que tengas mucha suerte en esta nueva etapa que ahora empiezas. Y ya sabes dónde estoy para lo que necesites, ok? Miriam: moltes gràcies per l'ajut que m'has donat durant aquest últim any de tesi. Esperem que fruit de tota aquesta feina finalment ens compensin amb publicacions, eh?! Ets una persona encantadora, no deixis que només ho gaudeixin uns pocs. I molts ànims per continuar amb el teu propi projecte! Sàpigues que pots comptar amb mi pel que necessitis. I finalment, hey! Albert Lu, gràcies per donar un cop de mà sempre, ja sigui obrint ampolles impossibles d'obrir o carregant rotors que pesen un munt ;-). Espero que et vagi molt bé la nova aventura que començaràs a San Francisco; t'ho mereixes!

Ara els toca a les nenes Neus. Gràcies Neus Abella per ser tan maca, i desitjo que la vida et porti moltes coses bones, que després de patir tant, t'ho mereixes! I gràcies Blanca per les cèl·lules, la Lipofectamina, etc. Ets una crack, i estic segura que t'anirà molt bé facis el que facis. Sandra Guaita, amb lo d'estar un any a Londres i ara l'embaràs no hem coincidit molt de

temps, però ets l'alegria «de la huerta» i que per molts anys sigui així; continua fent que l'ambient de treball sigui molt agradable a base de cantar cançons de la Marta Sánchez o l'Antonio Molina! A la nova generació, és a dir a l'Alba Ll. i el Carles: molts ànims i no perdeu mai l'entusiasme que demostreu per aquesta feina. I de manera molt especial vull donar les gràcies a la Noelia per ser companya i amiga, pels passejos rambla avall perquè ens doni l'aire després d'un mal dia i pels menta-poleos que hem compartit. No et pots imaginar lo contenta i agraïda que estic de que formis part de la meva vida. No sé si et passarà quan llegeixis això, però jo ja m'he posat sensible! Va, i molts ànims per acabar el tram de doctorat que et queda. Espero que aviat pugui anar jo a la lectura de tesi de la Doctora Salvador!

Nenes Pombe: que maques i quina bona gent! Moltes gràcies per les converses a l'hora de dinar i per estar sempre disposades a ajudar en el que calgui. Nat i Alba G.: molts ànims i molta sort amb la tesi! Sou un parell de currantes, segur que us aniran bé les coses! Estic molt contenta d'haver-vos conegut. Eva, ets la dolçor personificada, és un goig treballar al costat de gent com tu. Espero que l'etapa que començaràs ara després de la tesi et vagi molt rebé. I finalment Marta, la nova incorporació, aprofita't de les teves companyes, que són genials. Que tinguis molta sort!

A la gent del lab Carles, no he arribat a conèixer a tots els nous i molts dels que coneixia ja han marxat, però us vull donar les gràcies en general a tots perquè sempre que he necessitat alguna cosa de vosaltres m'heu ajudat. Ara que escric això me n'adono que realment ha estat una sort treballar en aquest departament perquè tot i que a vegades puguin sortir tibantors, en general treballar ha estat molt fàcil, ja que ningú no es nega a donar un cop de mà a qui el necessita. No sé si això passa en altres feines, però seria la canya si fos així!

I no em voldria descuidar els proteòmics i les microscopistes! Moltes gràcies a tots: Josep Maria, Maria José, Eva, Fran, Mariona, Maria Calvo, Anna Lladó i Anna Bosch. Moltes gràcies pel vostre ajut i la vostra paciència!

Finalment, hi ha unes quantes persones de fora del laboratori que mereixen els agraïments més importants i més sentits, perquè sense elles en alguns moments m'hauria estat molt difícil "sobreviure" a la tesi. Gràcies Montse i Roser, per curar-me el cos i l'ànima a base de massatges per les contractures i Flors de Bach. Moltes gràcies Roser per les converses, per escoltar sempre i per ensenyar-me tantes coses. Tant de bo fos jo més bona alumna!

I gràcies als meus pares per aguantar estoicament els meus nervis i mals humors. Gràcies per donar-m'ho tot, per animar-me i estar sempre de la meva part. Gràcies papa, perquè l'únic que t'importa és que els teus fills siguin feliços. I gràcies mama, per intentar ajudar-me per tots els mitjans possibles, fins i tot donant-me vitamines o posant espelmes als sants. També gràcies a tu, Petet, per defensar sempre la teva germana.

Per acabar, moltíssimes gràcies, Marc, perquè ets coautor moral d'aquesta tesi. Perquè ets la persona que millor em comprèn, i per rescatar-me sempre dels mals tràngols. Per estar sempre al meu costat i estimar-me.

Paki

Yo soy yo.

Tú eres tú

*Yo no estoy en este mundo
para llenar todas tus expectativas.*

*Y sé que tú no estás en este mundo
para llenar todas la mías.*

Porque yo soy yo

y tú eres tú.

Y cuando tú y yo nos encontramos es hermoso.

Y, cuando encontrándonos,

no nos encontramos,

no hay nada que hacer.

L'oració gestàltica de Fritz Perls, segons Jorge Bucay

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ

1. EL CICLE CEL·LULAR	3
2. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR	4
2.1. Maquinària del cicle cel·lular: les CDKs i la seva regulació.....	4
2.2. Substrats de les CDKs.....	8
2.3. Regulació del cicle pel sistema ubiquitina-proteasoma.....	9
2.4. Control de qualitat del cicle cel·lular: <i>restriction point</i> i <i>checkpoints</i>	12
2.5. Un nou model de cicle cel·lular: el que ens ensenyen els ratolins <i>knockout</i>	13
3. EL COMPLEX CICLINA A-CDK2	16
3.1. La ciclina A.....	16
3.2. CDK2.....	20
3.3. Funcions del complex ciclina A-CDK2.....	22
3.4. Ciclina A-CDK2 i tumorigènesi.....	30
3.5. Teràpies contra el càncer que tenen com a diana complexes ciclina-CDK.....	32
3.6. Funcions del complex ciclina A-CDK2 a banda del cicle cel·lular: regulació de l'activitat del receptor de progesterona.....	34
3.7. Activació de CDK2 per altres proteïnes	36
4. ACETILACIÓ	38
4.1. Generalitats.....	38
4.2. Mecanismes de regulació de les acetilases.....	42
4.3. Efectes de l'acetilació.....	42
4.4. Acetilases i malaltia.....	43
OBJECTIUS	47

MATERIALS I MÈTODES

TÈCNIQUES GENERALS

1. CULTIUS CEL·LULARS	51
1.1. Models cel·lulars.....	51
1.2. Manteniment de les cèl·lules en cultiu	51
1.3. Medis i suplementos.....	52
1.4. La sembra de les cèl·lules.....	53
1.5. Congelació i descongelació.....	53
1.6. Transfecció de les cèl·lules.....	54

1.7. Sincronització de cèl·lules.....	54
1.8. Obtenció de lisats cel·lulars.....	55
1.9. Quantificació de proteïnes.....	56
2. CULTIUS BACTERIANS.....	58
2.1. Soques i medis de cultiu.....	58
2.2. Transformació bacteriana.....	58
2.3. Obtenció i purificació de DNA.....	59
2.4. Expressió i purificació de proteïnes en <i>E. coli</i>	61
3. ELECTROFORESI, TRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ.....	64
3.1. Electroforesi de proteïnes en una dimensió.....	64
3.2. Tinció dels gels d'electroforesi.....	66
3.3. <i>Western blot</i>	67
TÈCNiques ESPECÍFIQUES	
4. ANÀLISI DE L'ACETILACIÓ DE PROTEÏNES.....	71
4.1. Acetilació d'histones.....	71
4.2. Acetilació de substrats no-histona.....	72
4.3. <i>Spot-mapping</i>	73
4.4. Acetilació <i>in vivo</i>	74
5. GENERACIÓ DE MUTANTS.....	75
6. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES.....	75
6.1. <i>Pull down</i>	75
6.2. Immunoprecipitació.....	77
6.3. Assajos amb BIAcore.....	80
7. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA.....	82
8. DETERMINACIÓ DE LA VIDA MITJA.....	83
9. ANÀLISI DE LES FASES DEL CICLE CEL·LULAR.....	84
10. IMMUNOCITOQUÍMICA PER A MICROSCÒPIA ÒPTICA O CONFOCAL.....	84
11. MESURA DE LA SÍNTESI DE DNA.....	85
11.1. Incorporació de BrdU.....	85
11.2. Immunocitoquímica per detectar PCNA.....	86
12. UBIQUITINITZACIÓ DE PROTEÏNES.....	87
12.1. Ubiquitinització <i>in vitro</i>	87
12.2. Detecció de la ubiquitinització <i>in vivo</i>	88

RESULTATS

1. ACETILACIÓ DE PROTEÏNES DE CICLE CEL·LULAR.....	91
1.1. <i>Screening</i> inicial d'acetilació de proteïnes de cicle cel·lular.....	91
1.2. Acetilacions <i>in vitro</i>	93
2. L'ACETILACIÓ DE CICLINA A.....	96
2.1. Acetilació <i>in vivo</i> de ciclina A.....	96
2.2. PCAF acetila la ciclina A <i>in vitro</i>	98
2.3. PCAF acetila la ciclina A <i>in vivo</i>	99
2.4. Anàlisi de la interacció de ciclina A amb PCAF.....	100
2.5. Identificació dels residus de lisina que s'acetilen.....	103
2.6. Estudi de l'efecte de l'acetilació de la ciclina A.....	105
2.7. Interacció de ciclina A amb Histona Deacetilases (HDACs).....	118
3. LA RELACIÓ ENTRE PCAF I CDK2.....	120
3.1. PCAF i CDK2 interaccionen <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	120
3.2. PCAF inhibeix l'activitat quinasa dels complexos formats per CDK2.....	122
3.3. La sobreexpressió de PCAF altera el cicle cel·lular.....	129
3.4. Paper de la interacció entre CDK2 i PCAF en la regulació de la resposta a progesterona.....	135
3.5. CDK2 és un substrat acetilable per PCAF <i>in vitro</i>	138

DISCUSSIÓ

1. L'acetilasa PCAF.....	149
2. PCAF interacciona amb la ciclina A i l'acetila.....	152
3. L'acetilació afecta l'estabilitat de la ciclina A.....	153
4. L'acetilació afecta la interacció de ciclina A amb altres proteïnes i l'activitat de complexos ciclina A-CDK.....	156
5. PCAF interacciona amb CDK2 i inhibeix la seva activitat quinasa.....	157
6. La sobreexpressió de PCAF atura el cicle cel·lular a través de CDK2.....	158
7. CDK2 és acetilada per PCAF.....	160
8. En resum.....	161
9. Importància des del punt de vista terapèutic.....	162
10. Perspectives de futur.....	163

CONCLUSIONS.....	169
-------------------------	------------

ABREVIATURES

AA	Aminoàcids
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome</i>
ATP	Adenosina Trifosfat
BSA	<i>Bovine serum albumina</i> , albúmina sèrica bovina
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
Cdc20	<i>Cell division cycle 20</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i> , quinasa dependent de ciclina
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> , immunoprecipitació de cromatina
CHX	Cicloheximida
CKI	<i>CDK Inhibitor</i> , inhibidor de CDKs
D-box	<i>Destruction box</i>
DCS	<i>Donor Calf Serum</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , àcid desoxiribonucleic
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i> , sèrum boví fetal
G₁	Fase « <i>gap</i> » 1 del cicle cel·lular
G₂	Fase « <i>gap</i> » 2 del cicle cel·lular
GCN5	<i>General control non derepressible 5</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutatió-S-Transferasa
h	Hores
HAT	Histona Acetil Transferasa
HDACs	Histona Deacetilases
IH	Immunohistoquímica
IP	Immunoprecipitació
IR	<i>Ionizing Radiation</i> , radiació ionitzant
K	Lisina
M	Mitosi
MCM	<i>MiniChromosome Maintenance</i> , complex proteic amb activitat helicasa
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> , fibroblasts embrionaris de ratolí
min	Minuts
mQ	Mil·li Q
mRNA	RNA missatger

NaB	Butirat sòdic
OD	Densitat òptica
ORC	<i>Origin Recognition Complex</i> , complex de reconeixement dels orígens de replicació
p300	<i>E1A-associated 300 kDa protein</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesi de gels d'acrilamida
PCAF	<i>p300/CBP Associated Factor</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF	Fluorofenilmetilsulfonil
PR	<i>Progesterone Receptor</i> , receptor de progesterona
pRb	Proteïna Retinoblastoma
PSA o APS	Persulfat d'amoni
Q	Glutamina
R	Arginina
RLU	<i>Relative Luciferase Units</i> , unitats relatives de luciferasa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , àcid ribonucleic
S	Fase de síntesi del cicle cel·lular
SCF	Complex ubiquitina lligasa format per Skp1-Cul1-Fbox
SD	Desviació estàndard
SDS	Dodecil Sulfat Sòdic
SE	Error estàndard
seg	Segons
siRNA	<i>small interference RNA</i> , RNA petit d'interferència
Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SRC-1	<i>Steroid Receptor Coactivator-1</i>
TAF	<i>TBP-Associated Factor</i>
Tip60	<i>TAT-interactive protein 60 kDa</i>
TSA	Tricostatina A
U	Unitat de mesura de l'activitat enzimàtica
UPS	<i>Ubiquitin Proteasome System</i> , sistema ubiquitina proteasoma
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i> , dit sobre un gen o proteïna salvatge
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Venceremos!

Oriol Bachs

Yes, we can!

Barak Obama

INTRODUCCIÓ

1. EL CICLE CEL·LULAR

Entenem per cicle cel·lular el conjunt d'esdeveniments ordenats a través dels quals una cèl·lula es divideix donant lloc a dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. La divisió cel·lular requereix dos processos consecutius: la replicació del DNA i la segregació dels cromosomes replicats en dues cèl·lules separades.

Inicialment es va dividir el cicle cel·lular en dues fases: la Mitosi (que és el procés de divisió nuclear) i la Interfase (o l'interludi entre dues mitosis). A mesura que es va anar aprofundint en l'estudi del cicle cel·lular es va veure que la mitosi consta de diferents estadis (profase, prometafase, metafase, anafase, telofase i citocinesi), i la interfase també (fases G_1 , S i G_2) (revisat a (Norbury and Nurse, 1992)).

La replicació del DNA té lloc durant la fase S o de síntesi. Aquesta fase és precedida per un espai de temps o "gap" anomenat G_1 , durant el qual les cèl·lules es preparen per a la síntesi del DNA, i va seguida per un altre "gap" anomenat G_2 durant el qual la cèl·lula es prepara per a la mitosi. Així doncs, G_1 , S, G_2 i M són les subdivisions tradicionals d'un cicle cel·lular normal (figura 1). També és possible que les cèl·lules en G_1 en lloc de preparar-se per la replicació del DNA entrin en un estat de quiescència anomenat G_0 . De fet, la majoria de cèl·lules no proliferants del cos humà es troben aturades a G_0 .

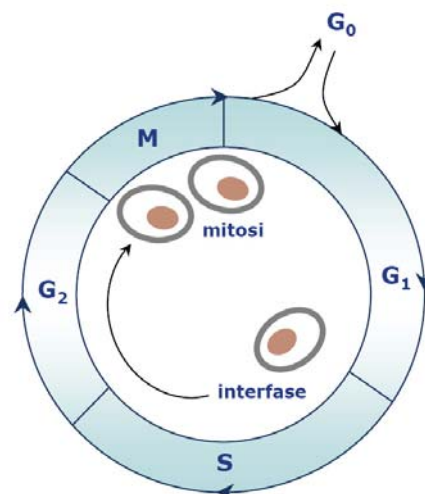


Figura 1. Fases del cicle cel·lular.

2. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

2.1. Maquinària del cicle cel·lular: les CDKs i la seva regulació

La transició d'una fase del cicle a una altra ocorre d'una manera ordenada i és regulada per un seguit de proteïnes cel·lulars entre les quals es troben les CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*), que tenen un paper clau en aquesta regulació (revisat a (Vermeulen et al., 2003)). Es tracta d'una família de serina/treonina quinases que són activades en punts específics del cicle cel·lular. Fins ara han estat identificades 11 CDKs (revisat a (Malumbres and Barbacid, 2005)), i d'aquestes, les que s'ha vist que tenen una major importància durant el cicle cel·lular són les següents: CDK4, CDK6 i CDK2 durant el G_1 , CDK2 durant S, i CDK1 durant G_2 i M. La CDK7 en combinació amb la ciclina H té la funció de fosforilar i activar les altres CDKs (també rep el nom de CAK, *CDK Activating Kinase*) (Fisher and Morgan, 1994). Quan són activades, les CDKs desencadenen tot un seguit de processos cel·lulars a través de la fosforilació dels seus substrats (Morgan, 1995; Pines, 1995). A part de les que hem esmentat, la resta de CDKs no semblen tenir un paper crucial en la progressió del cicle cel·lular (Rickert et al., 1996) (taula 1).

Existeixen diferents nivells de regulació de l'activitat de les CDKs per tal d'assegurar la correcta progressió del cicle, i els presentem a continuació:

◆ Interacció amb ciclina

Les ciclines són les proteïnes activadores de les CDKs. En contrast amb els nivells de les proteïnes CDKs, que són estables al llarg del cicle, els nivells de ciclines varien (d'aquí el seu nom) i d'aquesta manera activen periòdicament les CDKs (Evans et al., 1983; Pines, 1991) (figura 2). Diferents ciclines actuen a diferents fases del cicle cel·lular (taula 1). Per a l'entrada a G_1 són essencials els complexos CDK-ciclina D, formats per les tres ciclines D (ciclina D1, D2 i D3) unides a CDK4 i/o CDK6 (Sherr, 1994). Al contrari de les altres ciclines, les ciclines D no s'expressen periòdicament, sinó que són sintetitzades sempre i quan hi hagi presents factors de creixement en el medi que envolta la cèl·lula (Assoian and Zhu, 1997). La ciclina E s'associa amb CDK2 per regular la progressió de G_1 a S (Ohtsubo et al., 1995), i durant la fase S i principi de G_2 actua el complex ciclina A-CDK2 (Girard et al., 1991; Walker and Maller, 1991). Cap al final de G_2 i fins a principis de M actuen els complexos ciclina A-CDK1, que promouen l'entrada a la mitosi. Finalment, la mitosi és regulada pel complex ciclina B-CDK1 (Arellano and Moreno,

1997; King et al., 1994). Actualment es coneixen unes trenta ciclines, però com en el cas de les CDKs, no totes fan funcions relacionades amb el cicle cel·lular (revisat a (Malumbres and Barbacid, 2005)).

Per tal que aquestes proteïnes siguin destruïdes cap al final de la fase del cicle en la que actuen, cal que presentin unes seqüències específiques necessàries per interaccionar amb el sistema de degradació ubiquitina-proteasoma. És el cas de la "Destruction box" de les ciclines A i B, o la seqüència "PEST" de les ciclines D i E (Glotzer et al., 1991; Rechsteiner and Rogers, 1996).

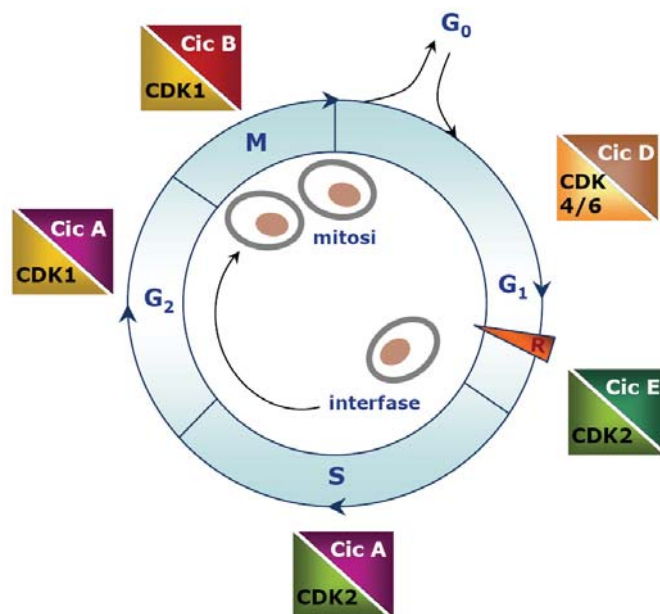


Figura 2. Maquinària reguladora del cicle cel·lular. R, punt de restricció.

Taula 1. Complexes CDK-ciclina i les seves funcions al llarg del cycle cel·lular (adaptat de (Malumbres and Barbacid, 2005)).

CDK	Ciclina principal a la que s'uneix (altres ciclines)	Funció a la cèl·lula
CDK1	A1, A2, B1, B2 (E, B3)	Cicle (G_2 -M)
CDK2	A1, A2, E1, E2 (D1, D2, B1, B3)	Cicle (G_1 -S)
CDK3	E1, E2, A1, A2, C	Cicle (G_0 - G_1 -S)
CDK4	D1, D2, D3	Cicle (G_1 -S)
CDK5	p35, p39 (ciclines tipus D, E i G)	Senescència, neurones post-mitòtiques
CDK6	D1, D2, D3	Cicle (G_1 -S)
CDK7	H	Activació de CDKs, transcripció
CDK8	C (K?)	Transcripció
CDK9	T1, T2, K	Transcripció
CDK10	desconeguda	Transcripció, cicle (G_2 -M)
CDK11	L1, L2 (D)	Transcripció, cicle (M)

◆ Fosforilació/defosforilació de CDKs

Per tal que siguin completament actives, les CDKs han de ser fosforilades en uns residus conservats. Per exemple, la CDK1 ha de ser fosforilada per CDK7-ciclina H a la treonina 161 (Thr172 a CDK4 i Thr160 a CDK2). Aquestes fosforilacions indueixen canvis conformacionals que augmenten la unió amb la ciclina (Jeffrey et al., 1995; Paulovich and Hartwell, 1995). Les quinases Wee1 i Myt1 fosforilen la CDK1 (i altres CDKs) a la tirosina 15 i/o treonina 14, tot inactivant la CDK. La defosforilació d'aquests residus per la fosfatasa Cdc25 és necessària per l'activació de CDK1 i la progressió del cycle (figura 3) (Lew and Kornbluth, 1996).

◆ Interacció amb CKIs

Les CKIs (*CDK Inhibitors*) són unes proteïnes que es poden unir a la CDK sola o al complex CDK-ciclina, inhibint-lo (figura 3). Es coneixen dues famílies de CKIs, la família INK4 i la família Cip/Kip (Sherr and Roberts, 1995). Els membres de la família INK4 són p15 (INK4a), p16 (INK4b), p18 (INK4c) i p19 (INK4d). La seva funció consisteix en inhibir específicament les CDKs de la fase G_1 (CDK4 i CDK6) tot unint-se amb la CDK abans que aquesta pugui associar-se amb la ciclina D (Carnero and Hannon, 1998). La família Cip/Kip inclou p21 (Waf1, Cip1), p27 (Kip1) i p57 (Kip2). Aquests inhibidors fan la seva funció a través d'unir-se i inactivar complexos ciclina-CDK ja formats durant la fase G_1 (Harper et al., 1995; Lee et al., 1995; Polyak et al., 1994), tot i

que també poden inhibir, encara que menys, complexos ciclina B-CDK1 (Hengst and Reed, 1998). Estudis recents, però, indiquen que no sempre que p27 està unida a complexos ciclina-CDK està realitzant una funció inhibidora. Quan p27 no està fosforilada inhibeix l'activitat quinasa dels complexos ciclina-CDK, però quan és fosforilada a les tirosines 74 i 88 per tirosina quinases de la família Src, pot continuar unida a aquests complexos sense inhibir-los. Això permet que posteriorment p27 sigui fosforilada per la CDK al residu T187, i això comportarà la seva degradació via SCF-Skp2 (Chu et al., 2007; Grimmmler et al., 2007). La p21, per una altra banda, pot inhibir la síntesi de DNA tot unint-se i inhibint PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Pan et al., 1995b; Waga et al., 1997).

Les CKIs són regulades per senyals internes i externes, com ara el gen supressor de tumors p53 (el qual regula l'expressió de p21) (el-Deiry et al., 1993) o TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) que estimula l'expressió i activació de p15 i p27 (Hannon and Beach, 1994; Reynisdottir et al., 1995).

◆ Localització subcel·lular

La localització subcel·lular de les proteïnes reguladores del cicle també contribueix a la correcta progressió del cicle cel·lular. La ciclina B conté una senyal d'exclusió nuclear i és exportada activament del nucli fins l'inici de la profase. Les quinases inhibidores de CDKs Wee1 i Myt1 es localitzen respectivament al nucli i al complex de Golgi, i protegeixen la cèl·lula d'una mitosi prematura (Heald et al., 1993; Liu et al., 1997). Les proteïnes del grup 14-3-3 regulen el trànsit intracel·lular de moltes proteïnes. Durant la interfase, la fosfatasa activadora de CDKs Cdc25 és retinguda al citoplasma per les proteïnes 14-3-3. Aquestes proteïnes també segresten el complex CDK1-ciclina B al citoplasma quan es produeix dany al DNA (Peng et al., 1997; Yang et al., 1999).

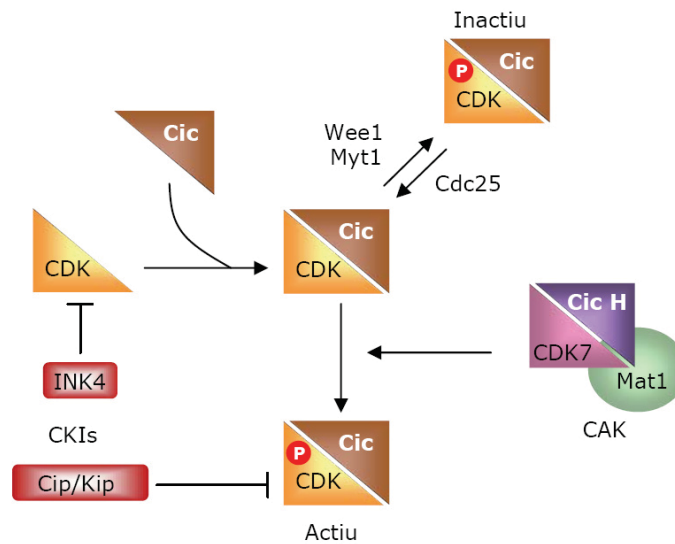


Figura 3. Regulació de l'activitat dels complexos CDK-ciclina. Adaptat de (Malumbres and Barbacid, 2005).

2.2. Substrats de les CDKs

Els complexos CDK-ciclina actius fosforilen proteïnes fisiològicament rellevants per a la progressió del cicle. Al principi de G_1 CDK4/6-ciclina D fosforila la proteïna retinoblastoma (pRb). Això comporta la disrupció del complex que formava pRb amb histona deacetilases (HDACs) i així queden alliberats els factors de transcripció E2F-1 i DP-1, que estimulen la transcripció de gens els productes dels quals són importants per a la progressió al llarg de la fase S, com ara la ciclina A, ciclina E i Cdc25 (figura 4) (Brehm et al., 1998; Buchkovich et al., 1989; Kato et al., 1993). CDK2-ciclina E s'encarrega de mantenir pRb hiperfosforilat, i a la transició G_1/S fosforila l'inhibidor p27, induint la seva degradació via proteasoma (Hinds et al., 1992; Montagnoli et al., 1999). També CDK2-ciclina E fosforila NPAT (*Nuclear Protein mapped to the ATM locus*), la qual és important per a l'entrada a S (Zhao et al., 2000), i la histona H1 (aquesta activitat sembla ser important per a la condensació de cromosomes requerida durant la replicació del DNA). La histona H1 també és un substrat de CDK1-ciclina B (Bradbury et al., 1974). Els complexos ciclina A-CDK regulen l'inici de la replicació mitjançant la fosforilació de la DNA polimerasa α primasa (Voitenleitner et al., 1997). Altres substrats de les CDKs inclouen Wee1, Cdc25 i proteïnes citoesquelètiques com les de la làmina nuclear, dels microtúbuls i la vimentina, que es requereixen per a una correcta mitosi (Blangy et al., 1995; Courvalin et al., 1992; Heald and McKeon, 1990; Hoffmann et al., 1993).

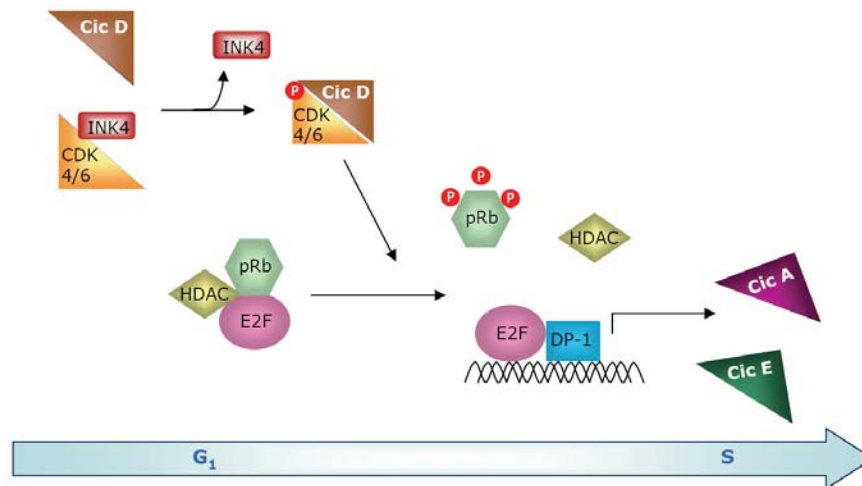


Figura 4. Esquema dels esdeveniments que tenen lloc a la transició G₁/S.

2.3. Regulació del cicle pel sistema ubiquitina- proteasoma

El control del cicle cel·lular és un procés complex. Els fenòmens essencials del cicle, és a dir, la síntesi de DNA i la segregació dels cromosomes són controlats qualitativament per fosforilació. La progressió del cicle depèn de l'activitat de les CDKs, les quals són bàsicament activades per les ciclines i antagonitzades per les CKIs. Però encara hi ha un altre nivell de regulació: els nivells de ciclines, CKIs i altres reguladors del cicle cel·lular són quantitativament controlats pel sistema ubiquitina-proteasoma (*Ubiquitin Proteasome System, UPS*) (revisat a (Nakayama and Nakayama, 2006)). El UPS comprèn els següents passos: 1) la unió covalent de múltiples molècules d'ubiquitina a la proteïna substrat i 2) la degradació de la proteïna ubiquitinitzada pel complex 26S proteasoma. El primer pas és realitzat per almenys tres enzims: un enzim activador de la ubiquitina (E1), un enzim conjugador d'ubiquitines (E2) i una ubiquitina lligasa (E3). Les ubiquitina lligases (E3) són les responsables del reconeixement de les proteïnes substrat i es creu que en podrien existir unes mil de diferents. Es divideixen en quatre classes en funció de la seva estructura: tipus HECT, tipus RING-finger, tipus U-box i tipus PHD-finger (figura 5). La família de les E3 tipus RING-finger és la més gran, i alhora es divideix en subfamílies. La subfamília basada en la proteïna "cullina" té set membres, entre els quals s'hi troben el complex SCF (Skp1-Cul1-F-box) (Nakayama and Nakayama, 2005) i el complex APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) (Castro et al., 2005; Harper et al., 2002). Aquests complexos són responsables de la proteòlisi de components clau de la maquinària del cicle cel·lular.

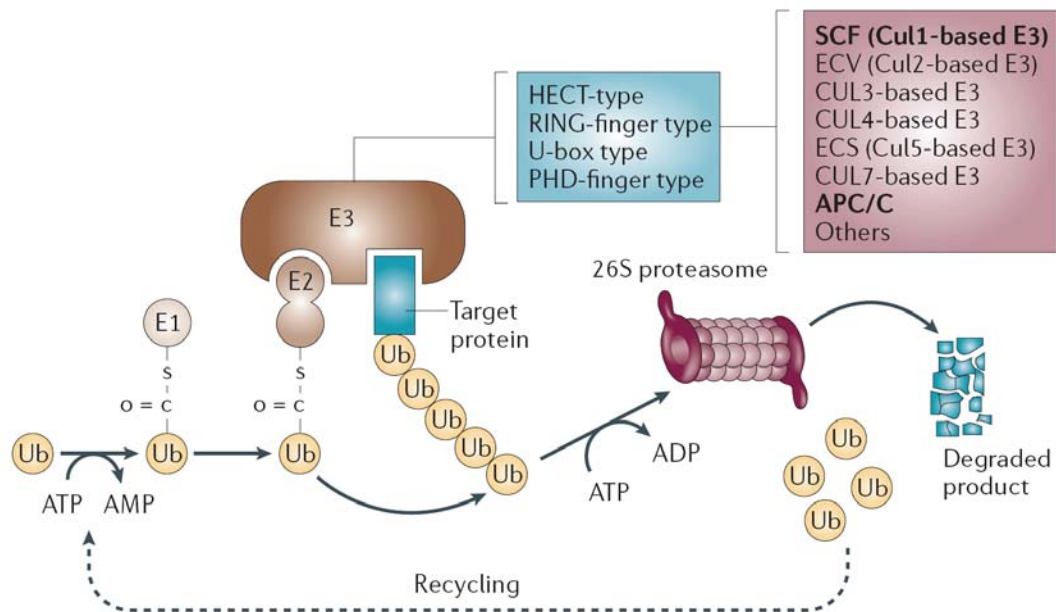


Figura 5. Funcionament del sistema de degradació ubiquitina-proteasoma (Nakayama and Nakayama, 2006).

Els complexos SCF i APC/C són similars en estructura. Tots dos estan formats per unes subunitats comunes i una subunitat variable que és responsable del reconeixement del substrat (les proteïnes F-box en el cas del complex SCF, i els activadors del complex APC/C). Fins ara sembla que les subunitats variables més importants en el control del cicle cel·lular són, en el cas del complex SCF, les proteïnes F-box Skp2 (*S phase kinase-associated protein 2*), Fbw7 (*F-box and WD-40 domain protein 7*) i β -Trcp (*β -transducin repeat-containing protein*); en el cas d'APC/C són importants dos activadors: Cdc20 (*cell division cycle 20*) i Cdh1 (també coneguda com HCT1).

Tot i les semblances estructurals i bioquímiques, les funcions cel·lulars dels complexos SCF i APC/C són diferents perquè actuen en moments diferents del cicle. El complex APC/C és actiu des de l'anafase fins al final de G_1 , mentre que el complex SCF és actiu des de la part final de G_1 fins el principi de la mitosi (figura 6) (Bashir et al., 2004; Guardavaccaro et al., 2003; Margottin-Goguet et al., 2003; Wei et al., 2004). Alguns dels substrats regulats per aquests complexos són els següents:

- Skp2 porta a degradar reguladors negatius del cicle, com ara p27, p21 i p57, permetent la progressió durant les fases S i G_2 ;

- Fbw7 indueix la degradació de reguladors positius del cicle com ara Myc, Jun, ciclina E i Notch;
- β -Trcp reconeix molts reguladors del cicle cel·lular, com ara Emi1/2, Wee1a i Cdc25A/B, a més de la β -catenina i I κ B;
- Cdc20 porta a degradar les ciclins mitòtiques i la securina, i per tant promou la separació de les cromàtides germanes. Cdc20 és un element crucial del *checkpoint* de fus mitòtic, que comentarem més endavant.
- Cdh1 facilita la sortida de la fase M i manté la fase G₁ mitjançant la degradació de les ciclins mitòtiques i alguns reguladors de la formació de complexos pre-replicatius.

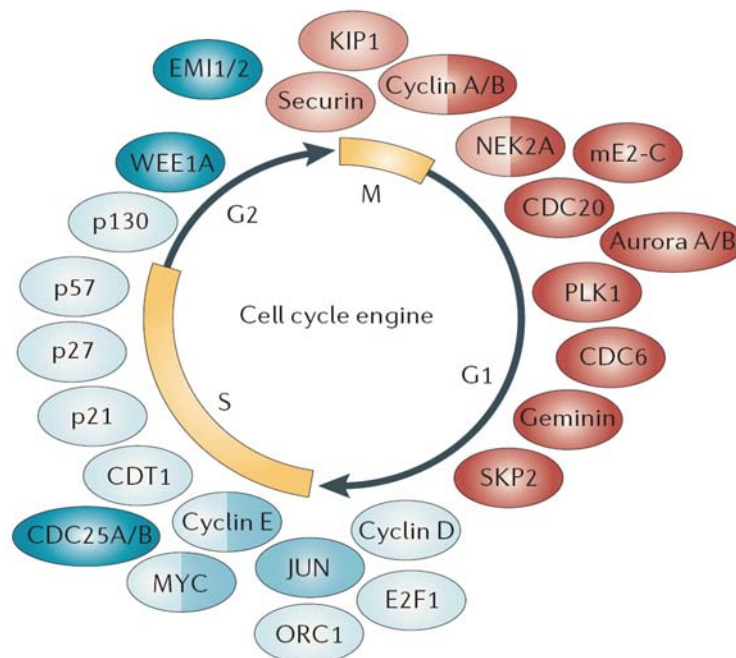


Figura 6. Control del cicle cel·lular pels complexos SCF i APC/C. Les proteïnes en vermell són substrats d'APC/C, i les proteïnes en blau són substrats del complex SCF. El to vermell clar indica ubiquitinització per Cdc20, i vermell fosc indica ubiquitinització per Cdh1. El to blau més clar indica els substrats ubiquitinitzats per SCF associat a Skp2, un to més fosc correspon als ubiquitinitzats per SCF associat a Fbw7, i el blau més fosc correspon als substrats ubiquitinitzats per SCF unit a β -Trcp (Nakayama and Nakayama, 2006).

2.4. Control de qualitat del cicle cel·lular: *restriction point* i *checkpoints*

◆ *Restriction point*

El “*Restriction point*” o punt de restricció és un moment dins la fase G_1 a partir del qual no hi ha tornada enrere: la cèl·lula es veu compromesa a continuar el cicle cel·lular independentment de la presència de factors de creixement en el medi que l’envolta. Experiments realitzats per (Pardee, 1974) demostren que les cèl·lules que es troben en un medi de deprivació abans de passar el punt de restricció entren en quiescència (G_0), mentre que si les cèl·lules es troben un medi deprivat de factors de creixement després de passar el punt de restricció, continuen el cicle cel·lular i es divideixen.

A part del punt de restricció, existeixen altres punts de control al llarg del cicle o “*checkpoints*”, que controlen que els esdeveniments del cicle cel·lular es donin d’una manera correcta i ordenada (Hartwell and Weinert, 1989). Alguns del més importants els presentem a continuació:

◆ *Checkpoint de G_1*

En aquest punt, l’aturada del cicle en resposta a dany al DNA és dependent de la proteïna p53. Les proteïna quinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) i ATR (*Ataxia and Rad3 Related*) reconeixen les lesions produïdes al DNA i, en resposta, fosforilen p53. La p53 fosforilada és més estable i estimula la transcripció de diferents gens, entre ells p21, que és capaç de bloquejar el cicle a través de la inhibició de complexos CDK-ciclina (Siliciano et al., 1997).

◆ *Checkpoint de fase S*

Els mecanismes d’aquest *checkpoint* es basen en la supressió de les fases d’iniciació i elongació que es donen durant la replicació del DNA (Painter, 1986; Paulovich and Hartwell, 1995). Sembla que la fosforilació de NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*), entre d’altres, es requereix per induir l’aturada en la fase S. Més endavant ho explicarem més detalladament.

◆ Checkpoint de G₂

Quan el dany ocorre en aquesta fase les cèl·lules poden aturar el cicle en presència o absència de p53. ATM i ATR fosforilen i activen les proteïna quinases Chk1 i Chk2, les quals al seu torn fosforilen i inactiven Cdc25, de manera que el complex ciclina B-CDK1 queda inactiu i retingut al citoplasma, impedit així l'entrada a mitosi (Sanchez et al., 1997; Zeng et al., 1998). Per la seva banda, p53 provoca un augment de l'expressió de p21 i de la proteïna 14-3-3σ, la qual és responsable d'excloure activament la ciclina B del nucli. p53 també provoca la dissociació de CDK1-ciclina B a través de la inducció de GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage inducible gene*) (Hermeking et al., 1997; Taylor and Stark, 2001).

◆ Checkpoint de fus mitòtic

El fus mitòtic està format per microtúbuls i té els cromosomes units durant la metafase. En aquest punt del cicle cel·lular es controla que els cromosomes estiguin correctament alineats a la placa metafàsica, i si no és així, el cicle s'atura. Les proteïnes Mad (*Mitotic arrest deficient*) i Bub (*Budding uninhibited by benomyl*) s'activen en aquest cas i inhibeixen la subunitat Cdc20 del complex APC/C, de manera que queda aturada la transició metafase-anafase (Amon, 1999; Fang et al., 1998).

2.5. Un nou model de cicle cel·lular: el que ens ensenyen els ratolins *knockout*

El model de cicle cel·lular presentat fins ara es basa en molts experiments realitzats en diferents sistemes (cèl·lules humanes, de ratolí, *Xenopus*, *Drosophila*, etc.), tots ells *in vitro*. A partir dels anys 90 es va disposar dels coneixements i la tecnologia necessaris per a fer estudis amb models de ratolins *knockout*, en els quals es deleciona un determinat gen i se'n poden estudiar les funcions associades. Els *knockout* són models *in vivo*, que ens proporcionen una informació més completa i fiable sobre el cicle cel·lular que la que ens poden proporcionar les línies cel·lulars tumorals o immortalitzades.

Inicialment es creia que la deleció de gens que codifiquen reguladors de cicle cel·lular provocaria fenotips letals embrionaris. Sorprenentment, però, molts d'aquests ratolins

knockout són viables i presenten fenotips específics (revisat a (Berthet and Kaldis, 2007)). Per exemple, l'any 1995 dos grups van publicar el fenotip dels ratolins ciclina D1^{-/-}, els quals només presenten defectes específics de teixit (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). De manera similar a l'ablació de ciclina D, la pèrdua de CDK4 o CDK6 tampoc no impedeix la progressió del cicle (Malumbres et al., 2004; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Els ratolins CDK4^{-/-} són viables i tenen una mida corporal petita, esterilitat parcial i desenvolupen diabetis espontàniament. Els CDK6^{-/-} també són viables i presenten una disminució d'alguns tipus cel·lulars hematopoètics. Es creu que el principal motiu pel qual els CDK4^{-/-} són viables és perquè CDK6 és capaç de compensar la seva pèrdua. Aquest fet va ser confirmat en fer el doble *knockout* CDK4^{-/-}CDK6^{-/-}, el qual mor *in utero*.

Una sorpresa encara més gran va ser el descobriment que els ratolins CDK2^{-/-} són viables i virtualment normals, excepte pel fet que són estèrils (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003). Fins aleshores es considerava que CDK2 tenia un paper crucial en el cicle, i per tant aquest resultat no es podia explicar segons el model tradicional de cicle cel·lular. Per afegir encara més confusió, es va veure que el doble *knockout* ciclina E1^{-/-} ciclina E2^{-/-} és letal embrionari (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). La diferència entre aquests dos fenotips és difícil d'explicar, però en ratolins CDK2^{-/-} no es detecta activitat de ciclina E (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003), i per tant es va especular que la ciclina E devia tenir funcions essencials no catalítiques, o bé es devia unir a una altra quinasa diferent de CDK2 i amb una altra especificitat de substrat. Posteriorment, (Aleem et al., 2005) van aportar una altra explicació pel fenotip dels ratolins CDK2^{-/-}: tot i que en els ratolins CDK2^{-/-} no es detecta activitat ciclina E, aquesta activitat sí que es detecta en ratolins CDK2^{-/-}p27^{-/-}. Per tant, el motiu pel qual no es detecta activitat ciclina E a ratolins CDK2^{-/-} és per la presència de p27, que és un potent inhibidor dels complexos que tenen ciclina E. També van demostrar que CDK1 s'uneix a la ciclina E i forma un complex actiu que permet que les cèl·lules progressin cap a la fase S. Per tant, CDK1 pot substituir a CDK2 en la transició G₁/S. En canvi, CDK2 no pot compensar la pèrdua de CDK1, tot i que també s'ha vist que CDK2 es pot unir a la ciclina B (Aleem et al., 2005; Martin et al., 2005).

Recentment s'ha descrit que p27 també actua com a regulador negatiu del cicle durant la transició G₂/M (Nakayama et al., 2004). En mutants Skp2^{-/-} els nivells de p27 són molt alts, ja que no pot ser degradada per la ubiquitina-lligasa Skp2, i s'ha vist que pot unir-se i inhibir tant CDK2 com CDK1. La inhibició de CDK1 fa que les cèl·lules no puguin entrar en mitosi (Nakayama et al., 2000). Tot plegat ha portat a suggerir un nou model de regulació del cicle

cel·lular en el que p27 té un paper central com a inhibidor, ja que regula les activitats tant de CDK2 acomplexada amb ciclina A, E o B, com de CDK1 unida a les ciclins A, E o B, controlant per tant la maquinària de les fases S i M (Kaldis and Aleem, 2005).

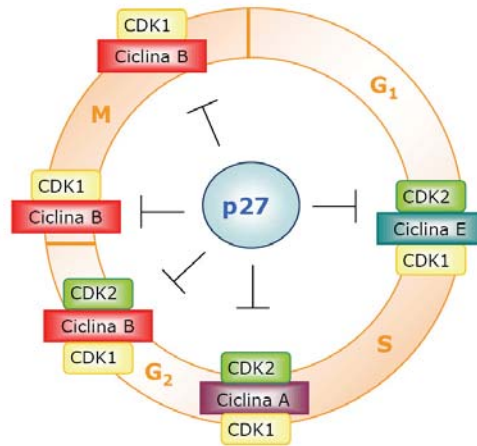


Figura 7. Esquema revisat del cicle cel·lular proposat per (Kaldis and Aleem, 2005).

Els estudis que s'han fet fins ara amb ratolins *knockout* ens porten a la conclusió que, almenys de moment, sembla que les ciclins indispensables per al cicle cel·lular són les ciclins A i B. De tots els membres de la família de les ciclins tipus D/E/A/B, només la deleció de la ciclina A2 (Murphy et al., 1997) i de la B1 (Brandeis et al., 1998) provoquen letalitat embrionària, i fins i tot cal afegir que els embrions deficientes en ciclina A2 arriben a l'estadi de blastocist i els deficientes en ciclina B1 arriben fins a la meitat de la gestació, de manera que almenys els primers cicles embrionaris poden tenir lloc en absència de ciclina A2 i B1. A més a més, recentment han estat caracteritzats uns ratolins que tenen delecionades totes les CDKs de la interfase (CDK2, 3, 4 i 6) (Santamaria et al., 2007). Els embrions experimenten l'organogènesi i sobreviuen fins la meitat de la gestació. En aquest model s'ha vist que CDK1 es pot unir a totes les ciclins, provocant la fosforilació de pRb i donant lloc a la transcripció de gens dependents d'E2F. En canvi, en absència de CDK1, els embrions no poden arribar a l'estadi de mòrula i de blastocist. Tot plegat confirma el paper central de CDK1 en el cicle cel·lular, ja que per sí sola pot fer progressar el cicle unint-se a totes les ciclins. Aquest descobriment ha confirmat la sospita de que el cicle cel·lular de mamífer podria ser comparable al de llevat, on ja havia estat descrit que la CDK1 pot fer progressar el cicle tota sola.

3. EL COMPLEX CICLINA A-CDK2

3.1. La ciclina A

La ciclina A és una proteïna codificada per un gen que es troba al cromosoma 4, en la posició 4q25-q31. El gen té una longitud d'uns 1299 parells de bases codificants que es tradueixen en una proteïna de 432 aminoàcids, la qual presenta una regió anomenada “*cyclin box*” d'uns 100 aminoàcids de llargada i que adopta un plegament tipus α -hèlix, que és el tret comú de les proteïnes que pertanyen a la família de les ciclines (Brown et al., 1995; Jeffrey et al., 1995). Aquesta regió és necessària per a la unió i l'activació de les CDKs (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). A part de la primera *cyclin box* (que va dels aminoàcids 208 al 306), la ciclina A presenta una altra regió que té poca homologia de seqüència amb les *cyclin box* però adopta un plegament similar (aminoàcids 310 al 397). La regió N terminal de la ciclina A conté elements reguladors, com ara la “*Destruction box*” (o D-box) i la “*extended destruction box*” per on interacciona amb el sistema ubiquitina-proteasoma; aquests elements abarquen els aminoàcids 47 al 57 i 58 al 72, respectivament (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001)). També presenta un lloc de fosforilació per CDK (S154) (figura 8).

Els nivells de ciclina A oscil·len al llarg del cicle cel·lular. En cèl·lules en cultiu, la ciclina A és sintetitzada i destruïda després de la ciclina E, i una mica abans de la ciclina B durant la prometafase (Erlandsson et al., 2000; Pines and Hunter, 1990). Al llarg del cicle s'associa amb CDK2 i CDK1, de manera que té funcions durant la fase S i la mitosi (Pagano et al., 1992). En els complexos ciclina A-CDK, la ciclina és la subunitat activadora (provoca un canvi estructural en la CDK2 que fa que el seu centre catalític quedi exposat (Morgan, 1997)), i a més fa la funció de reconeixement de substrats, ja que presenta una zona hidrofòbica que permet el reconeixement de proteïnes que tenen el motiu ZRXL (basic/Cys-Arg-bàsic-Leu); és el cas d'E2F-1, p107, p130, Cdc25A i p21.

Alguns organismes com ara *Drosophila* presenten una sola forma de ciclina A, però humans, ratolins i *Xenopus* tenen dues isoformes d'aquesta proteïna: A1 i A2. La ciclina A1 només s'expressa durant la meiosi i en els primers estadis del desenvolupament embrionari. En ratolins *knockout* s'ha vist que aquesta isoforma només és essencial per l'espermatogènesi. La forma A2 es troba a cèl·lules somàtiques i proliferants, i la seva disrupció en ratolins és letal

embrionària (Murphy et al., 1997). Durant la resta del text ens referirem a la ciclina A2 com “ciclina A”.

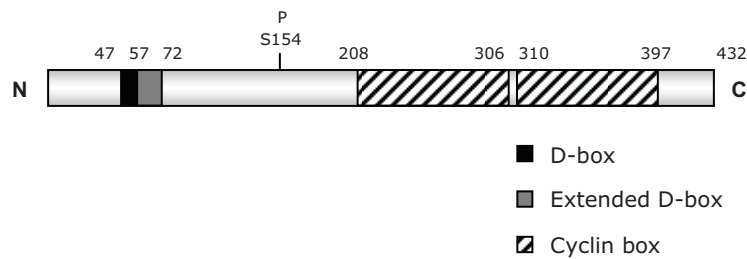


Figura 8. Representació esquemàtica dels dominis de la ciclina A (Yam et al., 2002)

◆ Síntesi

El mRNA de la ciclina A es comença a acumular durant la fase S i disminueix a la mitosi, una mica abans que el de la ciclina B (Pines and Hunter, 1990). El paper d'E2F en la regulació de la transcripció de la ciclina A està molt ben caracteritzat, i se sap que durant el G_1 E2F està reprimint a través de la unió amb proteïnes de la família de pRb hipofosforilades. La fosforilació de pRb per part dels complexos CDK-ciclina D/E permet l'alliberació d'E2F, que aleshores és capaç d'activar la transcripció dels gens responsables de la progressió al llarg de la fase S (entre ells, el de la ciclina A; figura 4). El promotor del gen de la ciclina A2 està reprimint durant les fases G_0/G_1 i és activat a l'entrada de la fase S (Henglein et al., 1994). La repressió de la transcripció de la ciclina A2 durant G_0/G_1 s'atribueix a l'ocupació d'un element repressor que es troba en el promotor del gen de la ciclina A i que s'anomena CCRE (*Cell-Cycle Responsive Element*) (Huet et al., 1996; Zwicker et al., 1995). Quan hi ha una mutació al CCRE es perd la regulació de la transcripció de la ciclina dependent de cicle. El CCRE conté un lloc d'unió a E2F, i la unió de p107 (però no pRb) a E2F reprimeix el promotor (Schulze et al., 1995; Soucek et al., 1997). Les ciclines sintetitzades durant el G_1 poden estimular la transcripció de ciclina A a la fase S; per exemple, la ciclina D activa la transcripció de la ciclina A i també pot restablir la transcripció de la ciclina A en situacions en què es perd l'adhesió al substrat (Schulze et al., 1996). Per una altra banda, el complex ciclina E-CDK2 s'uneix directament als complexos E2F/p107 situats al promotor de la ciclina A i n'activa la transcripció (Zerfass-Thome et al., 1997). A més, com hem esmentat abans, E2F pot interaccionar a través del seu domini RXL amb un petit domini hidrofòbic situat a prop de l'extrem N terminal de la ciclina A, de manera

que el complex ciclina A-CDK2 fosforila E2F i inactiva la seva activitat transcripcional. D'aquesta manera la ciclina A limita la seva pròpia transcripció (Xu et al., 1994). Encara existeix un altre element important per a la repressió de la transcripció de la ciclina A durant G_0/G_1 que es troba sis nucleòtids més enllà del CCRE i que s'anomena CHR (*Cell cycle genes Homology Region*). En aquest cas s'han trobat poques proteïnes que s'uneixin a aquest element repressor, i no estan relacionades amb E2F (Philips et al., 1999).

A banda d'E2F, es coneixen altres factors de transcripció que regulen l'expressió de la ciclina A. És el cas de TAF_{II}250, una subunitat del TFIID, que estimula la transcripció de la ciclina A a través de l'element activador de la transcripció o *enhancer* TSRE (Wang et al., 1997). També MDM2 es pot unir a TAF_{II}250 i potenciar la transcripció de ciclina A (Leveillard and Wasylyk, 1997). p53 regula negativament la transcripció de la ciclina A (Yamamoto et al., 1994). Finalment, l'AMP cíclic (cAMP) activa la transcripció i el TGF- β la reprimeix a través d'una regió del promotor anomenada ATF/CREB (Desdouets et al., 1995; Yoshizumi et al., 1997).

A part de la regulació transcripcional, l'estabilitat del mRNA de la ciclina A també està regulada pel cicle cel·lular: el mRNA de la ciclina A té una vida mitja molt curta al principi de G_1 , i més llarga a partir de la transició G_1/S i fins a G_2/M (Maity et al., 1997).

◆ Degradació

La degradació de la ciclina A comença al principi de la prometafase i és completada a la metafase (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001). La destrucció de les ciclines mitòtiques requereix una seqüència propera a l'extrem N terminal anomenada "*Destruction box*", que actua com a senyal per induir la degradació de la proteïna pel sistema ubiquitina-proteasoma (Glotzer et al., 1991). La ubiquitina lligasa més important que actua durant la mitosi és APC/C. El complex APC/C és regulat per fosforilació i s'activa a través de la unió amb les subunitats Cdc20 i Cdh1, que són les responsables del reconeixement dels substrats. Al final de la fase S i fins la mitosi, s'activa la transcripció de Cdc20 i aquesta proteïna s'acumula (Prinz et al., 1998). Els complexos APC/C^{Cdc20} requereixen de la fosforilació per ciclina B-CDK1 i Plk per induir la degradació dels seus substrats (Kotani et al., 1998). Al final de la mitosi té lloc la degradació de Cdc20, la D-box de la qual és reconeguda per la pròpia APC/C. Després de la degradació de Cdc20, l'APC/C s'uneix a Cdh1 i d'aquesta manera manté la seva activitat des del

final de la mitosi fins les acaballes del G₁. Des de la fase S fins al principi de la mitosi, la interacció de Cdh1 amb APC/C és inhibida per fosforilació (ciclina A-CDK2 fosforila Cdh1) (Lukas et al., 1999).

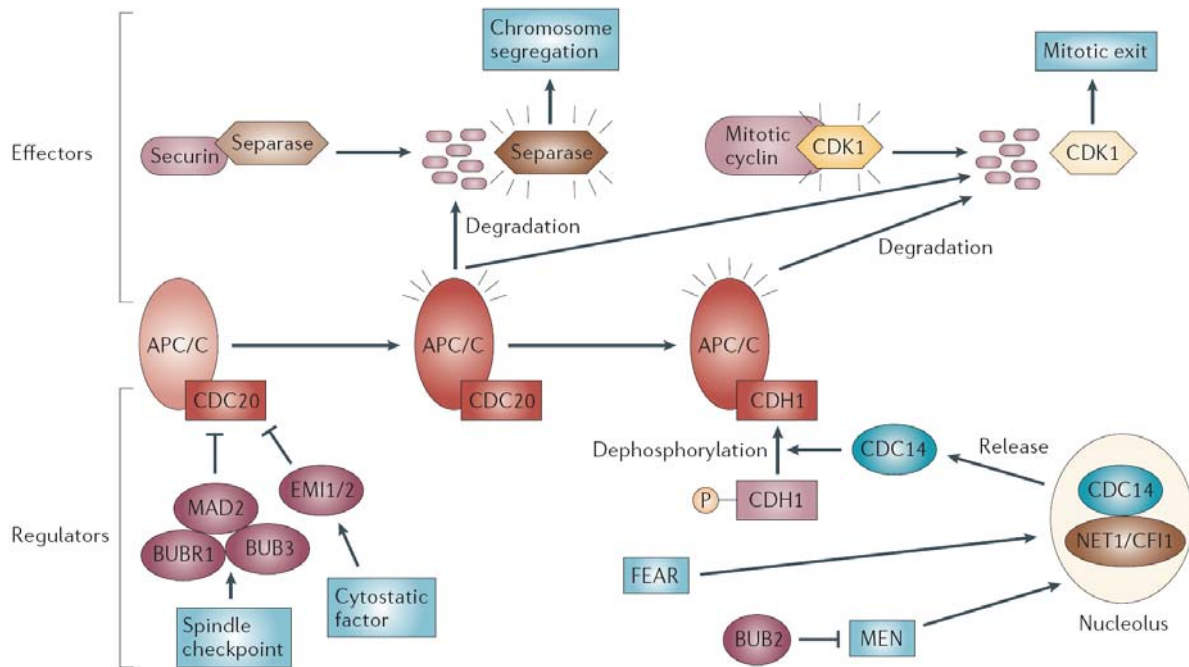


Figura 9. Regulació i funcions del complex promotor de l'anafase/ ciclosoma (APC/C). Fins que tots els cromosomes no s'hagin unit al fus mitòtic durant la metafase, Cdc20 és inhibida per la unió a Mad2, BubR1 i Bub3; aquest sistema és el que s'anomena "checkpoint de fus mitòtic". A la meiosi, els oòcits són aturats a la metafase pel *Cytostatic factor* (CSF), el qual activa Emi2, que és essencial per inhibir la proteòlisi dependent de Cdc20. L'alliberament del checkpoint de fus mitòtic o de l'aturada dependent de CSF activa APC/C^{Cdc20}, que promou la proteòlisi de la securina, de manera que s'allibera la separasa i aquesta degrada la cohesina, permetent la separació dels cromosomes. APC/C^{Cdc20} també promou la degradació de les ciclines mitòtiques. Al final de la mitosi, Cdc20 és substituïda per Cdh1. Cdh1 s'uneix a APC/C després d'haver estat defosforilada per la fosfatasa Cdc14, la qual resta segrestada al nuclèol pel seu inhibidor NET1/CFI1 durant la major part del cicle. Cdc14 és alliberada del seu inhibidor per MEN (*Mitotic Exit Network*) i FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) (Nakayama and Nakayama, 2006).

La ciclina A és degradada via APC/C^{Cdc20}, de manera similar a la ciclina B1. No obstant, existeixen algunes diferències en el comportament d'aquestes ciclines. En primer lloc, la ciclina A és degradada abans que la ciclina B. En segon lloc, l'activació del checkpoint de fus mitòtic inhibeix la degradació de la ciclina B, però no la de la ciclina A (Hunt et al., 1992; Whitfield et al., 1990). A més a més, la D-box de la ciclina A es comporta diferent de la de ciclina B, en el sentit que no actua com un mòdul de degradació independent quan és clonada en altres

proteïnes. Per exemple, si se substitueix la D-box de la ciclina A de *Xenopus* per la de ciclina B, la proteïna es degrada; en canvi, si se substitueix la D-box de la ciclina B per la de ciclina A, aquesta proteïna no es degrada (Hunt et al., 1992; King et al., 1996). En cèl·lules humanes, la D-box de la ciclina A no és suficient per portar-la a degradar, i es requereix una seqüència addicional (“*extended D-box*”, figura 8) (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001). A *Drosophila*, que té una regió N terminal de la ciclina A força diferent a la d’altres organismes, la correcta destrucció d’aquesta proteïna requereix dues D-box i dues KEN box a l’extrem N terminal (Kaspar et al., 2001; Ramachandran et al., 2007).

Pel que fa al paper de la subunitat CDK del complex ciclina A-CDK1/2 en la degradació de la ciclina, s’ha vist que a *Xenopus* la degradació de la ciclina A, però no de la ciclina B1, requereix de la unió a CDK (Stewart et al., 1994). No obstant, també s’ha descrit que mutants de la ciclina A humana que no es poden unir a CDK són destruïts *in vivo*, tot i que més tard que la ciclina A salvatge (den Elzen and Pines, 2001). La ciclina A pot ser fosforilada per les seves companyes CDK1 i CDK2 a la serina 154 (Yam et al., 2000), però això no afecta la seva degradació (al contrari del cas de la ciclina E, que és fosforilada per la CDK2 a la treonina 380, i això és important per la seva degradació pel sistema ubiquitina-proteasoma).

3.2. CDK2

La CDK2 és una proteïna codificada per un gen que es troba al cromosoma 12, concretament a 12q13, i que té 897 parells de bases codificants. Està formada per 298 aminoàcids i té un pes molecular aproximat de 33 kDa. Té activitat quinasa i pot fosforilar aminoàcids serina i treonina en els seus substrats. De fet, la CDK2 és la subunitat catalítica dels complexos ciclina-CDK formats per la ciclina E i la ciclina A. L’activitat de CDK2 es regula a diferents nivells, tal i com es va explicar a l’apartat 2.1. El mecanisme primari d’activació és la unió a una subunitat ciclina. Per aconseguir una activació completa, la CDK2 ha de ser fosforilada pel complex ciclina H-CDK7 a la treonina 160. El complex actiu pot ser inactivat per diversos mecanismes: unió a CKIs o bé fosforilació dels residus T14 i Y15 per part de Wee1 i Myt1 (figura 3).

La cristal·lització de CDK2 va permetre l’estudi detallat de la seva estructura (De Bondt et al., 1993; Morgan, 1996) (figura 10). Com altres proteïna quinases, CDK2 conté un lòbul N

terminal dominat per una làmina beta i una hèlix PSTAIRE, i un lòbul C terminal majoritàriament helicoidal. Entre els dos lòbuls hi ha una fissura on es troba enfonsat el centre catalític, que té llocs d'unió específics per l'ATP i els substrats fosforilats per la quinasa. La base hidrofòbica de l'ATP s'introdueix en una zona hidrofòbica de dins la fissura, deixant els fosfats orientats cap enfora. Quan la quinasa es troba en la seva conformació activa, la proteïna substrat s'uneix a la superfície del lòbul que queda per sobre de l'entrada del centre catalític, de manera que queda enfrontada amb el γ -fosfat de l'ATP. Els residus del voltant catalitzen l'atac nucleofílic fet per l'oxigen hidroxil que hi ha al grup γ -fosfat de l'ATP i la proteïna substrat queda fosforilada. La forma inactiva de la CDK2 no és capaç de fer la reacció de transferència del grup fosfat per causa de dos mecanismes (De Bondt et al., 1993): en primer lloc, una estructura anomenada *T-loop* sorgeix del lòbul C terminal i bloqueja la unió de substrats a l'entrada del centre catalític; en segon lloc, alguns residus involucrats en la unió a ATP no es troben correctament posicionats per causa d'una petita hèlix propera al centre actiu (hèlix 12), que altera la posició de l'hèlix PSTAIRE del lòbul superior.

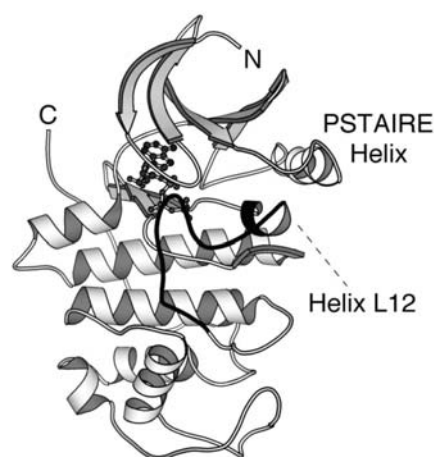


Figura 10. Estructura de la CDK2 humana unida a ATP (Morgan, 1997). El lòbul N terminal, que conté làmines beta i l'hèlix PSTAIRE es mostra per sobre del lòbul C terminal, més gran. El centre catalític està situat entre els lòbuls i conté una molècula d'ATP (representada per boletes i pals). El *T-loop* (residus 146-170) està ressaltat en negre.

3.3. Funcions del complex ciclina A-CDK2

Ciclina A i CDK2, cadascuna per la seva banda, poden formar diferents complexos ciclina-CDK. El complex ciclina E-CDK2 està implicat en la superació del punt de restricció i l'inici de la replicació. El complex ciclina A-CDK2 és important per la progressió de les fases S i G₂. Des de G₂ i fins la metafase actuen els complexos ciclina A-CDK1.

◆ Superar el punt de restricció

Durant la quiescència (G₀), l'activitat de CDK2 i CDK1 es manté baixa gràcies a l'acció de tres sistemes de control: les proteïnes *pocket* (pRb, p107 i p130), Cdh1 i els inhibidors de CDKs (CKIs). Les proteïnes *pocket*, com ja hem vist, inhibeixen la família de factors de transcripció E2F, els quals indueixen la transcripció de molts reguladors positius del cicle, entre ells les ciclins de tipus E, A i B (que són els activadors de CDK2 i CDK1), i les fosfatases Cdc25 (Yamasaki and Pagano, 2004). Cdh1 activa el complex APC/C i promou la degradació de reguladors positius de la fase S i de la mitosi, com ara les ciclins A i B, i Cdc25A (Ang and Harper, 2004). Cdh1 també degrada Skp2, un activador dels complexos que tenen CDK2 o CDK1 (Kurland and Tansey, 2004). Skp2 és una subunitat d'un complex SCF ubiquitina lligasa i reconeix i indueix la ubiquitinització de les CKIs p21 i p27 (Cardozo and Pagano, 2004). La degradació de Skp2 per APC/C^{Cdh1} contribueix a incrementar els nivells de CKIs a la cèl·lula, i per tant, al manteniment de la quiescència.

Els estímuls mitogènics provoquen l'entrada en el cicle cel·lular. Per tal de fer això, els mitògens han d'inhibir tots els reguladors de G₀. Aquesta inhibició és el producte de complexos vies de senyalització que comencen a la membrana i porten a l'activació de CDK2 i CDK1, les qual seran actives des del final de G₁ fins l'anafase (Guardavaccaro and Pagano, 2006). Bàsicament, els complexos ciclina D-CDK4/6 comencen per fosforilar les proteïnes *pocket*, portant a l'alliberament d'E2F i la transcripció de les ciclins E i A. A partir d'aquí els complexos ciclina E/A-CDK2 fosforilaran i inactivaran la resta de reguladors del G₀. La fosforilació de Cdh1 fa que es dissociï d'APC/C, i així aquesta ubiquitina lligasa queda inactiva. La fosforilació de p21 i p27 promou la seva degradació via SCF^{Skp2}. Tots aquests esdeveniments generen *loops* d'autoamplificació, de manera que CDK2 i CDK1 són cada cop més actives.

Una conseqüència important de l'activació d'E2F és la transcripció d'Emi1, un inhibidor d'APC/C (Hsu et al., 2002). A més a més, APC/C contribueix a la seva pròpia inactivació mitjançant la degradació del seu propi activador Cdh1 i el seu enzim conjugador d'ubiquitines Ubc10 (Lukas and Bartek, 2004). Per tant, almenys tres senyals cooperen per mantenir APC/C^{Cdh1} inactiva des de G₁/S fins al final de la mitosi: CDKs, Emi1 i la pròpia APC/C^{Cdh1}, indicant que és molt necessari per les cèl·lules inhibir aquest complex durant el temps que les CDKs han de ser actives.

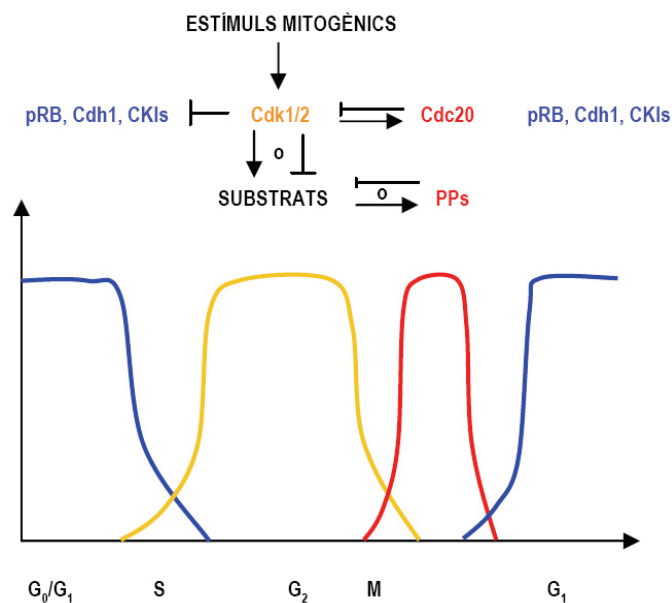


Figura 11. En resposta a senyals mitogèniques, les CDKs esdevenen actives i fosforilen i inactiven proteïnes *pocket*, Cdh1 i CKIs. Això genera *loops* d'autoamplificació que fan que les CDKs siguin cada cop més actives a mesura que la cèl·lula progressa de G₁/S cap a mitosi. L'activitat de les CDKs està programada per acabar al final de la mitosi. Per exemple, CDK1 promou l'activació d'APC/C^{Cdc20} a través de fosforilar algunes subunitats d'APC/C i induir la degradació d'Emi1. Al seu torn, APC/C^{Cdc20} causa la degradació de les ciclines amb la conseqüent inactivació de CDK1. Al final del cicle, Cdc14 i altres fosfatases (PPs) defosforilen molts dels substrats fosforilats per les CDKs (Guardavaccaro and Pagano, 2006).

◆ Replicació

Els mecanismes d'iniciació de la replicació del DNA a cèl·lules eucariotes han estat molt ben descrits a *S. cerevisiae*, i els resultats obtinguts amb oòcits de *Xenopus* i cèl·lules humanes semblen indicar que aquests mecanismes estan conservats al llarg de l'escala evolutiva. El model actual de replicació del DNA implica els complexos ciclina E/A-CDK2 en la iniciació i en limitar l'inici de la replicació a un sol cop per cicle cel·lular.

Per començar, als orígens de replicació s'hi uneixen unes proteïnes que formaran el complex de reconeixement de l'origen de replicació (*ORC, Origin Recognition Complex*). L'ORC és format per sis proteïnes que es mantenen unides als orígens de replicació al llarg del cicle en el cas dels llevats. A *Xenopus*, l'ORC es dissocia de la cromatina a la fase M (Coleman et al., 1996; Romanowski et al., 1996). L'ORC s'associa amb altres factors addicionals durant el G₁ com ara Cdc6, Cdt1 i membres de la família MCM (*MiniChromosome Maintenance*) per formar els complexos pre-replicatius (revisat a (Bell and Dutta, 2002)). Un cop es donen les senyals necessàries per iniciar la replicació del DNA, els complexos pre-replicatius són fosforilats per DBF4-Cdc7 i complexos ciclina E/A-CDK2. Això porta a l'associació de Cdc45 amb el complex pre-replicatiu i l'activació de l'origen. L'activació del complex pre-replicatiu implica el desplegament de la cromatina de l'origen de replicació i que es carreguin sobre el DNA de cadena senzilla les proteïnes RPA i DNA polimerasa α (figura 12).

L'expressió de Cdc6 és suficient per induir el carregament de les proteïnes MCM a la cromatina (Cook et al., 2002). Cdc6 presenta homologia de seqüència amb el *clamp loader* eucariòtic i procariòtic, i podria ser el factor que carregués les proteïnes MCM al voltant del DNA (Neuwald et al., 1999). La proteïna Cdt1 s'uneix al complex pre-replicatiu format per ORC-Cdc6 i és essencial pel carregament posterior de proteïnes MCM (Maiorano et al., 2000; Riolland et al., 2002). Cap al final de G₁, E2F activa la transcripció dels gens que codifiquen per les sis proteïnes de la família MCM (MCM 2-7) (Ohtani et al., 1999). Aquestes proteïnes tenen activitat helicasa i participarien en l'inici de la replicació tot desenrotllant la doble cadena del DNA (Ishimi, 1997). La proteïna quinasa Cdc7 és activa quan s'uneix a DBF4, i aquest complex fosforila els components de MCM i activa el complex pre-replicatiu. De manera similar a les CDKs, els nivells de Cdc7 són constants al llarg del cicle, però és activada durant les fases S i G₂ per DBF4, la qual es troba sota el control transcripcional d'E2F (Jiang et al., 1999; Kumagai et al., 1999; Yamada et al., 2002). El complex Cdc7-DBF4 actiu fosforila principalment MCM2, però sembla que la fosforilació prèvia dels membres del complex MCM per part de ciclina E/A-CDK2 facilitaria la fosforilació posterior per Cdc7-DBF4. També s'ha suggerit que els complexos ciclina-CDK podrien fosforilar un residu de treonina de Cdc7 tot activant-la, de manera similar a l'efecte de la fosforilació de la treonina 160 del *T-loop* de CDK2 (Masai et al., 2000). A llevats, Dbf4p és destruïda durant el G₁ per un mecanisme dependent d'APC/C similar a les ciclins, en el que hi està implicada una seqüència de destrucció de la pròpia proteïna Dbf4p (Ferreira et al., 2000).

Cal destacar que pRb inhibeix la replicació del DNA no tan sols pel seu paper en la repressió de la transcripció dependent d'E2F, sinó també perquè és capaç d'associar-se directament amb el complex pre-replicatiu a través de MCM7 i les proteïnes ORC (Bosco et al., 2001). Els complexos ciclina D-CDK4 actius alliberen pRb dels complexos pre-replicatius, permetent que aquests siguin competents durant el G₁ (Gladden and Diehl, 2003).

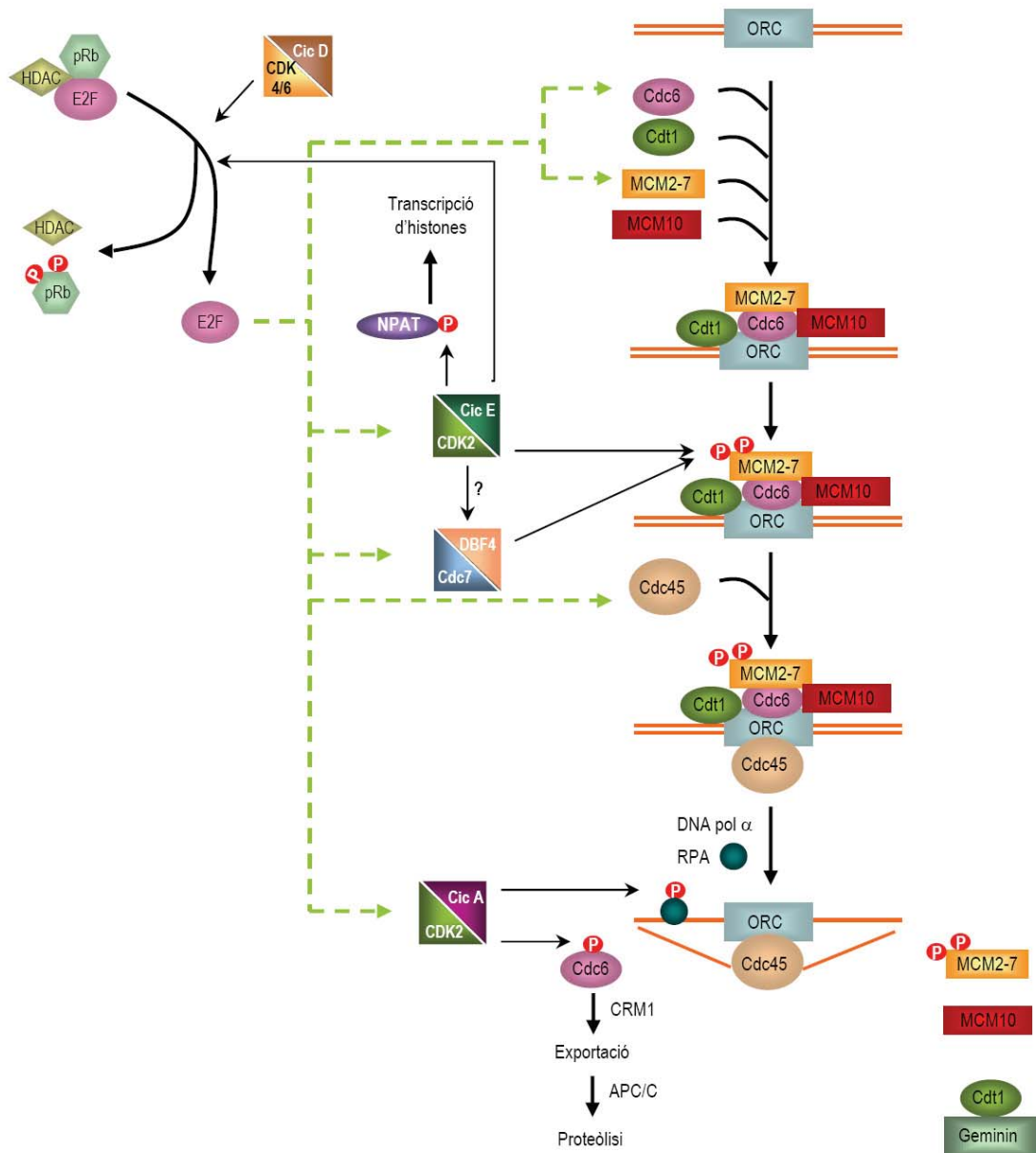


Figura 12. La via de replicació del DNA a mamífers (adaptat de (Woo and Poon, 2003)). Nota: estudis posteriors indiquen que les helicases MCM2-7 es mantenen unides al DNA mentre es replica ja que van obrint la doble cadena de DNA perquè avanci la forqueta de replicació. Un cop la forqueta ha acabat de replicar un fragment, les proteïnes MCM2-7 marxen del DNA (Blow and Dutta, 2005).

Cdc45 és un factor essencial en la regulació de la replicació, que interacciona amb el complex pre-replicatiu i indueix el carregament de RPA i DNA polimerasa α sobre l'origen. Com molts altres components implicats en l'inici de la replicació, Cdc45 també és una diana transcripcional d'E2F (Arata et al., 2000). La seva interacció amb els orígens de replicació a la transició G_1/S depèn de ciclina E/A-CDK2 i Cdc7-DBF4 (Jares and Blow, 2000; Mimura and Takisawa, 1998; Zou and Stillman, 2000). Per tal que Cdc45 s'uneixi al complex pre-replicatiu cal que abans s'hi hagi unit MCM10 (Wohlschlegel et al., 2002). A *S. pombe*, Cdc23p (l'homòleg de MCM10) estimula la fosforilació del complex MCM per l'homòleg de Cdc7-DBF4 (Lee et al., 2003). A *S. cerevisiae* Mcm10p també interacciona amb Cdc45p i les DNA polimerases δ i ϵ , que es requereixen per l'elongació de la replicació, suggerint que Mcm10p podria estar implicada tant en l'activació dels orígens com en l'elongació (Kawasaki et al., 2000). Durant G_2/M , MCM10 es dissocia de la cromatina i està hiperfosforilada (probablement per ciclina-CDK) (Izumi et al., 2001).

Després de la unió de Cdc45, el DNA queda desplegat a l'origen de replicació, amb RPA unida a les cadenes senzilles, estabilitzant-les (Walter and Newport, 2000). RPA pot ser fosforilada per ciclina A-CDK2/1, però encara no es coneix el significat funcional d'aquesta fosforilació, ja que RPA fosforilada i no fosforilada són igualment actives sobre el DNA (Dutta and Stillman, 1992; Henricksen and Wold, 1994; Pan et al., 1995a). RPA (*Replication Protein A*) de fet és un heterotrímer, i es creu que la seva fosforilació podria separar l'heterotrímer o bé afectar la interacció de RPA amb altres proteïnes, com ATM i DNA polimerasa α (Oakley et al., 2003; Treuner et al., 1999).

La ciclina A s'associa amb el DNA que s'està replicant i colocalitza amb els focus de replicació (Cardoso et al., 1993; Sobczak-Thepot et al., 1993). El complex ciclina A-CDK2 s'uneix i fosforila alguns components de la maquinària replicativa, com la DNA polimerasa α (Nasheuer et al., 1991), DNA polimerasa δ (Zeng et al., 1994) i el PCNA (Prosperi et al., 1994). A més, l'elongació feta per la DNA polimerasa δ requereix de l'activitat de ciclina A-CDK (Bashir et al., 2000).

◆ Bloqueig de la re-replicació

Limitar la replicació a un sol cop per cicle és un element clau perquè la divisió cel·lular es doni de manera correcta. Les CDKs i altres proteïnes estan implicades en el bloqueig de la re-replicació, fent que els complexos pre-replicatius es formin només un cop cada cicle. En cèl·lules humanes, Cdc6 se sintetitza durant el G_1 sota el control transcripcional d'E2F (Hateboer et al., 1998). Es troba al nucli durant el G_1 i roman al citoplasma a partir de la fase S (Petersen et al., 1999; Saha et al., 1998), on és ubiquitinitzada per APC/C^{Cdh1} i es degrada via proteasoma (Petersen et al., 2000). Ciclina A-CDK2 s'uneix a Cdc6 a través del motiu ZRXL que Cdc6 presenta cap al seu extrem N terminal, i la fosforila. Aleshores, Cdc6 fosforilada és exportada cap al citoplasma per CRM-1 (Coverley et al., 2000).

Pel que fa a Cdt1, és inhibida a través de la unió a geminina, un inhibidor de la replicació que inicialment es va identificar com a substrat de l'APC/C cap al final de la mitosi (McGarry and Kirschner, 1998). Cdt1 només s'expressa a G_1 i S, mentre que la geminina està present a S i G_2 ; d'aquesta manera és com Cdt1 queda inhibida per la geminina durant S i G_2 , assegurant que els complexos pre-replicatius només es formen al G_1 (Wohlschlegel et al., 2000). La sobreexpressió de Cdt1, conjuntament amb Cdc6 i ciclina A-CDK2 promou la re-replicació a cèl·lules humanes (Vaziri et al., 2003). No obstant, la re-replicació només té lloc a cèl·lules que no tenen p53, suggerint que existeix un altre mecanisme dependent de p53 que impedeix la re-replicació.

Durant la replicació les proteïnes MCM marxen de la cromatina quan la forqueta de replicació a la què acompanyen ha acabat de replicar un fragment de DNA, de manera que els orígens que ja s'han replicat no ho poden tornar a fer (Labib et al., 2000; Pacek and Walter, 2004). Els components de MCM, com ara MCM4, poden ser fosforilats per ciclina B-CDK1 *in vitro*, i aquesta fosforilació podria ser responsable de la dissociació de MCM de la cromatina durant la mitosi (Fujita et al., 1998; Hendrickson et al., 1996). A més, ciclina A-CDK2 pot fosforilar MCM4 en el complex MCM4-MCM6-MCM7, tot inhibint l'activitat DNA helicasa d'aquestes proteïnes (Ishimi et al., 2000). A llevat, els complexos ciclina-CDK també promouen l'exportació de les proteïnes MCM fora del nucli (Nguyen et al., 2000). Així doncs, sembla que el procés de replicació està marcat per dues onades de fosforilació; la primera durant el G_1 , on ciclina E/A-CDK2 i Cdc7-DBF4 promouen la formació de complexos pre-replicatius, i la segona un cop començada la fase S, on ciclina A-CDK2/1 i ciclina B-CDK1 inhibeixen la re-replicació.

◆ El *checkpoint* de fase S

El *checkpoint* de fase S impedeix la replicació de DNA malmès. La resposta a la generació de talls de doble cadena de DNA com a conseqüència de l'exposició a radiació ionitzant (*Ionizing Radiation*, IR) és un dels exemples més estudiats. Com que CDK2 és un regulador clau de la fase S, els esdeveniments que tenen lloc quan s'activa aquest *checkpoint* tenen l'objectiu d'inactivar-la. Tot i que altres insults al DNA diferents de la IR poden actuar sobre dianes diferents, els principis bàsics dels *checkpoints* que desencadenen són molt similars.

El *checkpoint* de fase S comporta una ràpida però transitòria disminució del ritme de síntesi de DNA (Painter and Young, 1980). A nivell dels orígens de replicació, es produeix una inhibició de l'inici de la replicació, però l'elongació del DNA no queda afectada (Larner et al., 1999). Aquests esdeveniments són independents del supressor de tumors p53 (Xie et al., 1998).

Quan es produeix dany al DNA durant la fase S, la proteïna ATM ho detecta i senyalitza a través de dues vies paral·leles (Falck et al., 2002). Una d'elles inclou Chk2, Cdc25A i CDK2. A l'altra hi és important el complex trimèric MRE11-NBS1-RAD50. En resposta a la IR, ATM fosforila Chk2, i també 53BP1, BRCA1 i MDC1. Totes aquestes proteïnes formen complexos als llocs on s'ha produït un trencament del DNA, anomenats focus. La interacció de Chk2 fosforilada amb les altres proteïnes estimula la seva activitat, i al seu torn fosforila Cdc25A, portant a la seva ràpida degradació (Falck et al., 2001). Aquest fet impedeix que la CDK2 inactiva i fosforilada a la treonina 14 i tirosina 15 pugui ser defosforilada per Cdc25A, i per tant queda inhibida la progressió de la fase S (Costanzo et al., 2000). Pel que fa a la via paral·lela a aquesta, ATM fosforila NBS1 en resposta a IR (Lim et al., 2000). NBS1 fosforilada interacciona amb MRE11 i RAD50 i aquestes proteïnes també formen focus sobre els llocs de trencament del DNA, però la manera com aquests complexos redueixen el ritme de síntesi de DNA no és ben conegut.

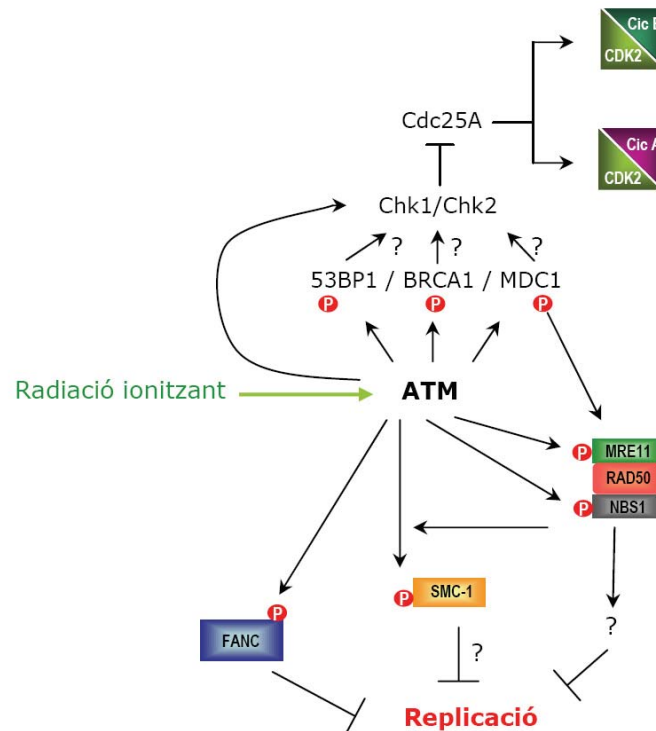


Figura 13. El *checkpoint* de replicació. Adaptat de (Woo and Poon, 2003).

◆ Mitosi

El paper dels complexos ciclina A-CDK durant la mitosi no està gaire ben definit, però alguns estudis demostren que al principi de la mitosi ciclina A està implicada en l'inici de la condensació dels cromosomes, la duplicació dels centrosomes i el trencament de la membrana nuclear (Furuno et al., 1999; Gong et al., 2007; Meraldi et al., 1999).

La degradació de la ciclina A comença al principi de la prometafase i es completa a la metafase (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001). Perquè pugui tenir lloc cal que hi hagi APC/C^{Cdc20} activa a la cèl·lula. Això s'aconsegueix a través de la fosforilació d'Emi1 pels complexos ciclina B-CDK1 i per Plk1 (*Polo-like kinase 1*). Emi1 és un inhibidor de l'APC/C, que en ser fosforilat a la prometafase passa a ser degradat via β -Trcp (Guardavaccaro et al., 2003; Margottin-Goguuet et al., 2003). Aquest esdeveniment permet tenir APC/C^{Cdc20} activa a la cèl·lula, i ciclina B-CDK1 encara fosforila algunes subunitats d'aquest complex perquè sigui totalment actiu. Malgrat això, només quan tots els cromosomes estan units al fus mitòtic l'APC/C^{Cdc20} assolix la seva màxima activitat i permet que tingui lloc la transició metafase-

anafase, a través d'induir la degradació de la securina tot promovent la separació de les cromàtides germanes (Reed, 2003). Després de la degradació de la ciclina A té lloc la degradació de la ciclina B, també induïda per l'APC/C^{Cdc20}. D'aquesta forma queda inhibida l'activitat CDK1 i es completa el cicle cel·lular, donant lloc a dues cèl·lules filles que es trobaran en G₁.

3.4. Ciclina A-CDK2 i tumorigènesi

La desregulació d'elements reguladors del cicle com ara la ciclina A contribueix a la generació de tumors. De fet, hi ha molts tipus de càncer on s'ha detectat un augment de l'expressió de la ciclina A. La majoria d'aquests estudis, però, es basen en la detecció immunohistoquímica de la ciclina A en cèl·lules tumorals en comparació amb les cèl·lules sanes del voltant, de manera que una qüestió important és si aquest augment de la ciclina A és causa o conseqüència de la pròpia proliferació tumoral. Tot i aquestes limitacions, sembla que l'expressió de la ciclina A en molts tipus de càncers podria tenir un valor pronòstic (taula 2). El cas del carcinoma hepatocel·lular (HCC) és un exemple de desregulació de la ciclina A. La sobreexpressió de la ciclina A és causada per una combinació d'amplificació gènica i mecanismes post-transcripcionals i post-traduccionals (Chao et al., 1998).

La sobreexpressió de ciclina A en diferents sistemes ens dóna idees sobre les conseqüències de tenir massa ciclina A a la cèl·lula. Els ratolins transgènics que sobreexpressen la ciclina A a les glàndules mamàries presenten hiperplàsia i anormalitats nuclears, cosa que suggereix alteracions preneoplàsiques (Bortner and Rosenberg, 1995). A cèl·lules de mamífer, nivells alts de ciclina A provoquen un retard en l'inici de la metafase i l'anafase (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001). D'altra banda, la sobreexpressió de mutants de la ciclina A no degradables a *Drosophila* atura el cicle cel·lular a la metafase (Sigrist et al., 1995); i cèl·lules de *Drosophila* en l'estadi de gàstrula que són sotmeses a dany al DNA retarden l'entrada en metafase i això correlaciona amb l'estabilització de la ciclina A. A més a més, les cèl·lules on s'ha deplecionat la ciclina A no són capaces de retardar l'entrada en mitosi, i entren a l'anafase amb un nombre elevat de cromosomes mal alineats (Su and Jaklevic, 2001). Això implica la ciclina A en el *checkpoint* de dany al DNA, i suggereix que una disminució d'aquesta proteïna podria jugar un paper en tumorigènesi, mentre que un augment podria simplement reflectir un increment de la proliferació un cop el tumor s'ha desenvolupat. A part de desregular el cicle

cel·lular directament, és possible que els complexos formats per ciclina A-CDK també contribueixin a la tumorigènesi a través de fosforilar altres oncoproteïnes i supressors de tumors.

Taula 2. Sobreexpressió de ciclina A en càncer (adaptat de (Yam et al., 2002)). Alguns tumors humans, mètodes de detecció de la ciclina A (WB, *Western Blot*; IH, immunohistoquímica; PCR, *polymerase chain reaction*), i correlacions amb alguns factors clínics.

Tumor	Mètode	Correlacions
Astrocitoma	IH	Estadi del tumor, proliferació
Càncer de mama	IH/citometria de flux	Aneuploïdia, proliferació, mal pronòstic
Càncer de cèrvix	IH	Proliferació
Càncer colorectal	IH	Mal pronòstic
Càncer gàstric	IH	Mal pronòstic
Leucèmia i limfoma	WB/mRNA	Proliferació, mal pronòstic
Càncer hepàtic	WB/Southern/PCR/mRNA	Proliferació, mal pronòstic
Càncer de pulmó	IH	Proliferació, mal pronòstic, millor resposta a quimioteràpia
Melanoma	WB/IH	Gruix i estadi del tumor, mal pronòstic
Càncer esofàgic	IH	Estadi del tumor, mal pronòstic
Càncer oral	IH	Proliferació
Osteosarcoma	IH	Mal pronòstic
Càncer ovàric	IH	Estadi del tumor, proliferació, mal pronòstic, millor resposta a quimioteràpia
Càncer de pròstata	IH	Estadi del tumor
Càncer renal	IH	Estadi del tumor, proliferació, mal pronòstic
Càncer de musculatura llisa	WB/IH	Mal pronòstic
Sarcoma de teixit tou	IH	Estadi del tumor, mal pronòstic, millor resposta a quimioteràpia
Càncer testicular	IH	Proliferació

3.5. Teràpies contra el càncer que tenen com a diana complexes ciclina-CDK

L'activitat de ciclines i CDKs es troba desregulada en molts càncers. Les causes són diverses: amplificació de gens que codifiquen ciclines o CDKs, sobreexpressió d'aquestes proteïnes per altres mecanismes, deleció de gens o silenciament epigenètic de gens que codifiquen inhibidors de CDKs, o mutacions de les CDKs que les fan resistents a CKIs. Tots aquests mecanismes han estat àmpliament documentats en càncers humans, portant a la hiperactivació de complexos ciclina-CDK en cèl·lules canceroses (revisat a (Malumbres and Barbacid, 2001)); per tant, sembla que la inhibició de complexos ciclina-CDK podria ser un objectiu terapèutic en aquests casos. No obstant, bloquejar l'activitat d'aquests complexos podria provocar no tan sols l'aturada del cicle en les cèl·lules tumorals, sinó també en cèl·lules normals. Ara bé, fins fa poc CDK2, CDK4 i CDK6 eren considerades elements essencials de la maquinària de cicle, però la generació de ratolins *knockout* d'aquestes proteïnes ha demostrat que en la seva absència el cicle cel·lular es pot donar de manera normal. Els ratolins *knockout* de CDK2, CDK4 i CDK6 són viables i presenten poques anomalies en teixits molt concrets. Fins i tot els dobles *knockout* CDK6 i CDK2, CDK4 i CDK6 o CDK4 i CDK2 són viables, o bé es desenvolupen fins estadis avançats de l'embriogènesi, cosa que demostra que hi ha molta redundància entre les CDKs. Aquestes dades semblen indicar que els inhibidors de les CDKs podrien actuar específicament contra les cèl·lules tumorals, molt dependents de l'activitat CDK, mentre que les cèl·lules sanes no quedarien afectades.

Alguns tipus de càncers són més dependents de l'activitat d'una CDK determinada que de les altres. Per exemple, un estudi de (Du et al., 2004) demostra que les cèl·lules de melanoma necessiten CDK2 per proliferar, ja que el tractament amb shRNA anti-CDK2 bloqueja la proliferació cel·lular. En canvi, un altre estudi de (Tetsu and McCormick, 2003) indica que l'activitat de CDK2 no és necessària per la proliferació de cèl·lules de càncer de colon, de manera que en aquest cas la CDK2 no és una bona diana terapèutica. En aquest mateix treball Tetsu i McCormick van observar que la inhibició de l'activitat de CDK4/6 tenia un gran efecte sobre totes les línies tumorals amb alteracions a retinoblastoma (pRb), indicant que en aquests casos CDK4 i 6 podrien ser bones dianes. Per tant, caldria fer un estudi detallat dels diferents càncers humans i veure quina és la seva susceptibilitat a la inhibició d'una CDK o altra a l'hora de dissenyar fàrmacs específics contra les CDKs.

Els inhibidors de CDKs que han estat sintetitzats fins ara fonamentalment actuen competint amb l'ATP per la unió al centre actiu de la CDK (Knockaert et al., 2002). Alguns d'aquests compostos són inespecífics i inhibeixen diverses quinases amb una potència similar; és el cas del Flavopiridol, un inhibidor general de les CDKs, que a més inhibeix la transcripció de la ciclina D1 (Carlson et al., 1999), i també inhibeix GSK3, ERK1, el receptor d'EGF i la proteïna quinasa C (Sedlacek, 2001). Un altre grup d'inhibidors és format per molècules dirigides preferencialment contra CDK2, CDK1 i CDK5, com ara la roscovitina, olomoucina i purvalanol B. Finalment, hi ha un altre grup d'inhibidors molt específics de CDK4 i CDK6, que fins i tot demostren diferents afinitats per combinacions particulars de ciclina D-CDK. Per exemple, la Fascaplisina inhibeix ciclina D1-CDK4 amb una eficàcia 300 cops superior a la que té inhibint ciclina D2-CDK4.

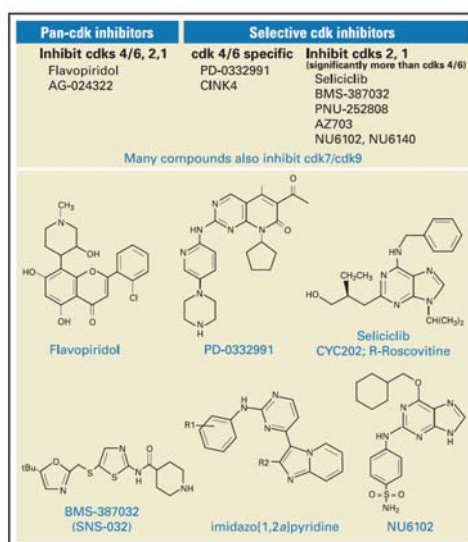


Figura 14. Exemples d'inhibidors de CDKs (Shapiro, 2006).

Els inhibidors de CDKs també podrien ser utilitzats per tractar altres malalties a part del càncer. Per exemple, la glomerulonefritis és una malaltia autoimmunitària que afecta els ronyons i va acompanyada de la proliferació de cèl·lules mesangials. En els models experimentals de glomerulonefritis en rata, s'ha vist que l'administració de roscovitina bloqueja aquest procés i millora la funció renal (Pippin et al., 1997). La inoculació d'adenovirus que expressen l'inhibidor de CDKs p16^{INK4a} en cor de rata inhibeix la hipertrofia cardíaca (Nozato et al., 2001). Molts trastorns neurodegeneratius es caracteritzen per presentar una activitat anormal de CDK5; és el cas de la malaltia d'Alzheimer, l'esclerosi lateral amiotròfica o la malaltia de Parkinson. Els pacients afectats per aquestes malalties es podrien beneficiar dels efectes de la

inhibició de l'activitat CDK5. De fet, en el model de ratolí de la malaltia de Parkinson s'ha observat que l'administració d'un inhibidor general de CDKs atenua la pèrdua de neurones dopaminèrgiques (Smith et al., 2003). Finalment, estudis recents donen evidències de que els complexos ciclina-CDK són mediadors de la mort cel·lular induïda per certs estímuls, com ara la irradiació. Per exemple, la infusió d'oligonucleòtids *anti-sense* de CDKs dins els ventricles cerebrals suprimeix l'apoptosi neuronal induïda per l'administració sistèmica d'àcid kaïníc en els animals (Ino and Chiba, 2001). De la mateixa manera, la infusió de Flavopiridol en els ventricles cerebrals fa que es redueixi la mort neuronal causada per la isquèmia (Osuga et al., 2000). Totes aquestes observacions subratllen la necessitat de desenvolupar inhibidors específics de les CDKs, els quals podrien, per sí sols o en combinació amb altres drogues, representar unes eines terapèutiques valuoses en determinats tipus de càncers i altres malalties (Lee and Sicinski, 2006).

3.6. Funcions del complex ciclina A-CDK2 a banda del cicle cel·lular: regulació de l'activitat del receptor de progesterona

El receptor de la progesterona (*Progesterone Receptor*, PR) és un membre de la superfamília dels receptors d'hormones esteroidees i mediatitza l'acció de la progesterona, la qual té un paper important en la regulació de la funció reproductiva femenina (Conneely et al., 2003; Graham and Clarke, 1997). El PR humà presenta dues isoformes, A i B, i a la primera li falten els primers 164 aminoàcids de la segona. La isoforma B actua generalment com a activador transcripcional, mentre que la isoforma A reprimeix la transcripció del PR-B i dels receptors d'estrògens, andrògens, glucocorticoides i mineralocorticoides (McDonnell et al., 1994; Vegeto et al., 1993). A més, les isoformes A i B regulen l'expressió de diferents grups de gens (Richer et al., 2002). L'anàlisi de ratolins *knockout* de cada isoforma ha demostrat que l'absència de PR-A provoca alteracions en les funcions ovàriques i uterines i la manca de PR-B provoca un desenvolupament de la glàndula mamària defectuós durant l'embaràs (Mulac-Jericevic et al., 2003; Mulac-Jericevic et al., 2000).

En el model clàssic d'acció del PR, les progestines difonen a través de la membrana cel·lular i s'uneixen al PR, que es troba al citoplasma (figura 15). La unió del lligand amb el receptor indueix un canvi conformacional en el receptor, de manera que aquest s'allibera de les chaperones que tenia associades, dimeritza i es transloca al nucli. Dins del nucli, els dímers

de PR s'uneixen a elements de resposta a progesterona situats a les regions reguladores dels seus gens diana. Aquí els dímers de PR recluten molècules coactivadores i altres components de la maquinària transcripcional, donant lloc a la reorganització de l'estructura de la cromatina i l'inici de la transcripció.

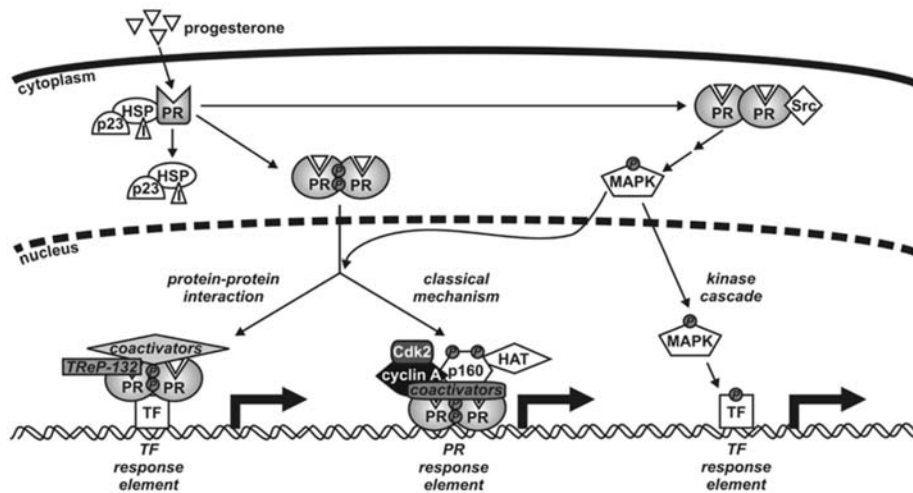


Figura 15. Model de les accions del PR (Moore et al., 2007).

A part de la interacció amb hormones esteroidees, l'activitat del PR també es regula per vies de senyalització. El PR i els seus coactivadors són fosforilats per quinases com CDK2, MAPK, la proteïna quinasa dependent de cAMP, l'àcid okadaïc (inhibidor de les fosfatases 1 i 2a), i el tetradecanoil 12-forbol 12-acetat (un activador de la proteïna quinasa C), de manera que la seva activitat en presència de lligand es veu augmentada (Narayanan et al., 2005a; Rowan et al., 2000). A diferència d'altres receptors d'esteroides, l'activació del PR independent de lligand a través de cascades de fosforilació no s'ha observat de manera consistent (Weigel and Zhang, 1998). D'altra banda, les progestines i PR localitzats al citoplasma o la membrana cel·lular poden induir ràpidament cascades de senyalització, com la via Src/MAPK, que porta a la fosforilació de diverses proteïnes que poden estar implicades o no en transcripció (Boonyaratankornkit and Edwards, 2004; Watson and Lange, 2005).

El complex ciclina A-CDK2 fosforila el PR almenys a vuit residus de serina i treonina. Existeixen diversos estudis on es demostra que CDK2 estimula l'activitat del PR dependent de lligand (Narayanan et al., 2005a; Pierson-Mullany and Lange, 2004). A més, el complex ciclina A-CDK2 actua durant la fase S del cicle cel·lular, i també s'ha vist que hi ha un pic en l'activitat

del PR en aquesta fase (Narayanan et al., 2005b). Malgrat això, també hi ha estudis que demostren que el complex ciclina A-CDK2 provoca un augment de l'activitat del PR independentment de la seva capacitat de fosforilar-lo, ja que mutants del PR que no poden ser fosforilats no perden la capacitat de coactivació. De fet, quan el PR recluta ciclina A-CDK2, aquesta quinasa interacciona directament i fosforila elements del complex transcripcional associat al PR, com ara SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator 1*), la histona H1 i l'acetilasa CBP (*CREB-binding protein*) (Bhattacharjee et al., 2001; Narayanan et al., 2005a). Aquestes dades suggereixen que, a part dels efectes directes que podria tenir ciclina A-CDK2 sobre el PR, també té efectes indirectes sobre altres proteïnes que influencien l'activitat del PR. Aquest mecanisme contrasta amb el funcionament del receptor d'estrògens, l'activitat del qual depèn de la fosforilació de les serines 104 i 106 per ciclina A-CDK2 (Rogatsky et al., 1999). També s'ha caracteritzat el paper de CDK2 en la regulació de l'activitat del PR a través d'estudis on s'utilitzava la roscovitina com a inhibidor de CDK2. En aquests experiments es va veure que la roscovitina inhibeix completament l'activitat del PR dependent de lligand. La roscovitina no és un inhibidor específic de CDK2, ja que també inhibeix CDK1 i CDK5; així doncs es van fer estudis on es deplecionava específicament CDK2 i també indiquen que com a conseqüència es produeix una substancial inhibició de l'activitat del PR. D'altra banda, s'ha vist que un mutant de la ciclina A que no interacciona amb CDK2 no estimula l'activitat del PR, indicant que la interacció de ciclina A amb CDK2 és essencial per a la transactivació.

3.7. Activació de CDK2 per altres proteïnes

La CDK2 (i altres CDKs) poden ser activades per altres proteïnes a part de les ciclines. És el cas de certes proteïnes virals que tenen homologia amb les ciclines i de les proteïnes RINGO/Speedy, que no tenen seqüències similars a les ciclines, i que van ser identificades inicialment com a reguladors del cicle meiótic a oòcits de *Xenopus* (revisat a (Nebreda, 2006)).

Els herpes-virus i d'altres virus tenen un gen que codifica una proteïna que presenta una modesta homologia de seqüència amb la regió de la *cyclin box* de les ciclines cel·lulars. Una de les ciclines virals més ben caracteritzades la presenta el Kaposi sarcoma herpes virus (KSHV); és homòloga a la ciclina D, rep el nom de ciclina K o ciclina v i contribueix a la carcinogènesi viral (Cannell and Mitnacht, 1999; Verschuren et al., 2004). S'associa fonamentalment amb CDK6 i CDK4 i pot fosforilar tant els substrats de ciclina D-CDK4/6, com els de les ciclines A/E-CDK2.

Recentment s'ha descobert que la ciclina viral codificada pel γ -herpes virus 68 murí (γ HV68) interacciona amb CDK2 i CDK1. Com en el cas de la ciclina K, la ciclina γ HV68 confereix una major especificitat de substrat a la CDK que l'acompanya, i els complexos γ HV68-CDK poden fosforilar *in vitro* la histona H1, pRb, p27, p21, Bcl-2 i p53 (Upton et al., 2005).

Les proteïnes RINGO/Speedy van ser identificades inicialment a *Xenopus* com a uns nous reguladors del cycle cel·lular capaços d'activar CDK2 i CDK1 independentment de la unió a ciclines (Ferby et al., 1999). No se n'han trobat homòlegs a llevat, *Drosophila*, *C. elegans* ni plantes, però sí a mamífers i també a la branca més primitiva dels cordats (*Ciona intestinalis*) (Cheng et al., 2005; Dinarina et al., 2005). La manca d'homologia de seqüència amb les ciclines fa que presentin diferències en el mecanisme d'activació de les CDKs (figura 16). Bàsicament, l'activació de CDK2 i CDK1 per RINGO/Speedy no requereix la fosforilació a la treonina 160 (en el cas de CDK2) o 161 (en el cas de CDK1), la qual és essencial perquè les ciclines activin les CDKs. A més, els complexos RINGO/Speedy-CDK2/1 són menys susceptibles a la inhibició per la CKI p21 o per la quinasa inhibidora Myt1. Finalment, sembla que els complexos RINGO/Speedy tindrien una especificitat de substrat més àmplia que els complexos ciclina-CDK.

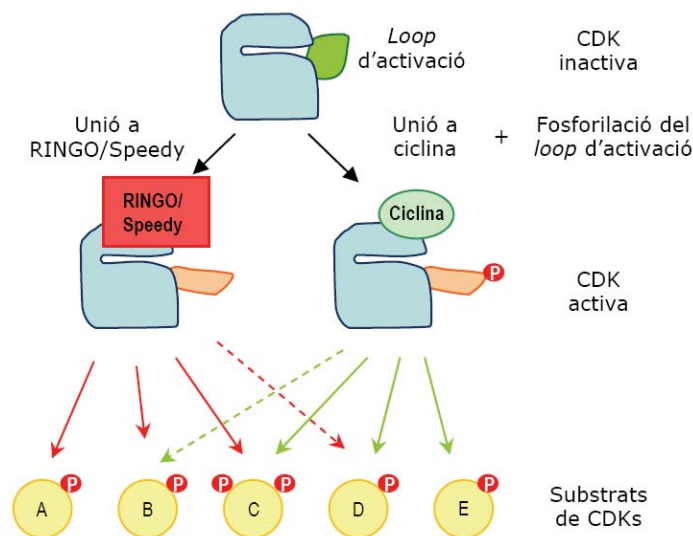


Figura 16. Activació de CDKs per RINGO/Speedy i ciclines. L'activació de CDK1 i CDK2 per ciclines requereix de la fosforilació en el *loop* d'activació del domini quinasa. Per contra, la unió amb RINGO/Speedy estableix una conformació activa del *loop* d'activació de la CDK en absència de fosforilació. Les CDKs activades per RINGO/Speedy podrien tenir com a diana llocs de fosforilació diferents (en els mateixos o en diferents substrats) de les CDKs activades per ciclines. Les línies discontinües indiquen reaccions de fosforilació que podrien ocórrer amb menys eficiència. Adaptat de (Nebreda, 2006).

Com que les proteïnes RINGO/Speedy utilitzen un mecanisme alternatiu per activar les CDKs, podria ser que els complexos RINGO/Speedy-CDK siguin actius en situacions en què els complexos ciclina-CDK estan inhibits. També és probable que les proteïnes RINGO/Speedy canviïn l'especificitat de substrat de les CDKs. A més el fet que aquestes proteïnes només s'hagin trobat a vertebrats podria ser indicatiu de la seva participació en funcions especialitzades, com ara el control fi de les respostes cel·lulars al medi que les envolta, més que no pas en el control bàsic del cicle cel·lular.

4. ACETILACIÓ

L'acetilació de proteïnes consisteix en l'addició d'un grup acetil a un o més aminoàcids de la seqüència proteica. Existeixen dos tipus d'acetilació: l'acetilació dels grups α -amino de residus N-terminals, i la dels grups ϵ -amino dels residus de lisina. La primera és una modificació que es produeix simultàniament a la traducció de les proteïnes i és generalment irreversible. La segona és una modificació post-traduccional reversible, gràcies a l'equilibri dinàmic entre les acetilases i les deacetilases presents a la cèl·lula. En aquest treball ens hem centrat en l'estudi de l'acetilació de grups ϵ -amino dels residus de lisina de proteïnes de cicle cel·lular, i per això ara procedirem a explicar les característiques d'aquesta modificació.

4.1. Generalitats

Cap als anys 1960s es va descobrir que les histones presentaven residus de lisina acetilats, i aquesta modificació semblava estar relacionada amb la cromatina transcripcionalment activa (Allfrey et al., 1964). L'any 1997 es va descobrir que la proteïna supressora de tumors p53 podia ser acetilada en residus de lisina específics del seu domini regulador C-terminal (Gu and Roeder, 1997). El descobriment de que altres proteïnes a banda de les histones podien ser modificades per acetilació va ser crucial i va desencadenar molts estudis per trobar quines altres proteïnes cel·lulars podien estar acetilades. A més, recentment s'ha vist que aquesta modificació no tan sols es dona en cèl·lules eucariotes, sinó que també està present a eubacteris i arquees (Bell et al., 2002; Starai et al., 2003; Zhao et al., 2003), de manera que ens trobem davant d'un mecanisme de modificació de les proteïnes conservat al llarg de l'evolució. Actualment es coneixen més de trenta factors de transcripció modificats per acetilació, i també co-reguladors transcripcionals, proteïnes remodeladores de la cromatina, etc. Els mateixos

enzims que tenen activitat acetilasa en alguns casos poden autoacetilar-se (com en el cas de PCAF i TFIIF). Finalment, també hi ha proteïnes no relacionades amb la cromatina que són acetilades, com MCM3 o α -tubulina. A la taula 3 es presenta una llista de les proteïnes modificades per acetilació conegudes fins l'any 2004, a la qual es podrien afegir algunes més descobertes en anys posteriors.

Taula 3. Tipus de proteïnes modificades per acetilació de lisines (Yang, 2004).

Tipus de proteïna	Conseqüència funcional de l'acetilació
Histones	
H2A	Relaxació de cromatina/activació gènica
H2B	Relaxació de cromatina/activació gènica
H3	Relaxació de cromatina/activació gènica
H4	Relaxació de cromatina/activació gènica
Proteïnes associades a cromatina	
HMG14 i HMG17	Inhibeix la unió a nucleosomes
Factors de transcripció d'unió a DNA	
p53, ELKF, HMG1(Y), TCF, NF- κ B, MyoD, GATA1, E2F1, HNF4 i més	Alteració de la interacció amb DNA o amb co-reguladors, ubiquitinització, estabilitat, localització nuclear
Co-reguladors transcripcionals	
ATCR	Inhibeix l'associació del coactivador
CIITA	Acumulació nuclear i ubiquitinització
β -Catenina	Activació del gen c-Myc
pRB	Inhibeix la fosforilació i incrementa l'associació amb MDM2
RIP140	Bloqueja l'associació amb CtBP
Factors de transcripció generals	
TFIIE	No determinada
TFIIF	No determinada
TFIIB	Estimula associació amb TFIIF i activació transcripcional
Autoacetilació de HAT (histona acetil transferases)	
PCAF	Promou la localització nuclear
p300, CBP, MOZ, MORF, etc	No determinada
Remodelador de cromatina: Brm	Bloqueig de l'activació transcripcional i inhibició del creixement
Factor de replicació del DNA: MCM3	Inhibeix la replicació del DNA
Proteïna de cohesió de cromàtides: Cohesina	No determinada
Enzims del metabolisme del DNA	
Flap endonucleasa-1	Inhibeix la unió al DNA i l'activitat nucleasa
Timina DNA glicosilasa	Bloqueja la interacció amb l'endonucleasa reparadora

Werner DNA helicasa	APE
Regulador de senyalització: Smad7	Augment de la translocació cap als focus nuclears
Proteïna citoesquelètica: α -tubulina	Impedeix la ubiquitinització i degradació via proteasoma
Proteïna de trànsit nucleocitoplasmàtic: Importina α	Increment de la motilitat cel·lular
Proteïnes virals	No determinada
HIV Tat	Regula la unió a RNA, interacció amb co-reguladors i activació transcripcional
E1A adenoviral	Inhibeix l'associació amb CtBP i estimula l'acumulació nuclear
Antigen T gran	Estimula la replicació del DNA
Proteïna de cromatina d'arquees: Alba	Inhibeix l'oligomerització i la unió al DNA
Proteïnes bacterianes	
Acetil-CoA sintetasa	Inhibeix l'activitat enzimàtica
CheY	Regula la resposta quimiotàctica

Els enzims que acetilen els residus de lisina reben el nom genèric de HATs (Histona Acetil Transferasa). La primera HAT es va descobrir a l'any 1995; es tracta de HAT1 (Kleff et al., 1995). Posteriorment es va veure que molts coactivadors transcripcionals presentaven activitat HAT, com ara GCN5 (*General control non-derepressible 5*, (Brownell et al., 1996)), PCAF (*p300/CBP associated factor*, (Yang et al., 1996)) p300 (*E1A-associated 300 kDa protein*, (Ogryzko et al., 1996)), CBP (*CREB-binding protein*, (Bannister and Kouzarides, 1996)) i TAF_{II}250 (*TBP-associated factor of 250 kDa*, (Mizzen et al., 1996)). A la taula 4 es presenta una llista de les acetiltransferases identificades fins l'any 2004.

Taula 4. Classificació de lisina acetiltransferases (adaptat de (Yang, 2004)).

Família	HAT	Organisme	Substrat	Funció
Hat1	Hat1	<i>S. cerevisiae</i> a mamífers	H4	Deposició d'histones, silenciament de gens, organització de cromatina
Gcn5/PCAF	Gcn5	<i>S. cerevisiae</i>	H4/H2B	Coactivador transcripcional
	PCAF	Mamífers	H3/H4, TFs ^a , E1A, TAT	Coactivador transcripcional
	GCN5L	Cucs a mamífers	H3/H4, TFs	Coactivador transcripcional
p300/CBP	CBP	<i>C.elegans</i> a mamífers	Histones, TFs, E1A	Coactivador transcripcional
	p300	Mamífers	Histones, TFs, E1A, TAT	Coactivador transcripcional i E4 ubiquitina lligasa de p53

MYST	Sas2	<i>S. cerevisiae</i>	H4 K16	Silenciament gènic	
	Sas3	<i>S. cerevisiae</i>	H3	Elongació transcripcional	
	Esa1	<i>S. cerevisiae</i>	H4/H2A	Coactivador transcripcional, control de cicle cel·lular	
	Mof	<i>Drosophila</i>	H4 K16	Compensació de la dosi gènica	
	Chameau	<i>Drosophila</i>		Silenciament gènic dependent de CpG	
	Enok	<i>Drosophila</i>		Proliferació de neuroblasts	
	Tip60	Mamífers	H3/H4, receptor d'andrògens	Co-regulador transcripcional, reparació de DNA i apoptosi	
	MOF	Mamífers	H4	Coactivador transcripcional	
	HBO1	Mamífers	H3/H4	Replicació del DNA, co-repressor transcripcional	
	MOZ	Mamífers	H3/H4	Coactivador transcripcional	
	MORF	Mamífers	H3/H4	Coactivador transcripcional	
	p160	SRC-1	Mamífers	H3/H4	Coactivador transcripcional
		ACTR	Mamífers	H3/H4	Coactivador transcripcional
	CIITA	CIITA	Mamífers	H4	Coactivador transcripcional
ATF2	ATF2	Mamífers	H4/H2B	Activador transcripcional	
TAF _{II} 250	TAF _{II} 230	<i>Drosophila</i>	H3/H4	Inici de la transcripció	
	TAF _{II} 250	Mamífers	H3/H4	Inici de la transcripció, quinasa i ubiquitina lligasa	
TFIIIC	subunitats	<i>S. cerevisiae</i> fins	H3/H4	Inici de la transcripció	
	TFIIIC	mamífers			
Nut1	Nut1	<i>S. cerevisiae</i>	H3/H4	Inici de la transcripció	
Elp3	Elp3	<i>S. cerevisiae</i> fins mamífers	Histones	Elongació de la transcripció, lisina demetilasa?	
CDY	CDY	Humans	H4		
	CDYL	Mamífers	H4	Transició histona a protamina durant l'espermatogènesi	
Hpa2	Hpa2	<i>S. cerevisiae</i>	H3/H4	Desconeguda	
	Hpa3	<i>S. cerevisiae</i>		Desconeguda	
TFIIB	TFIIB	<i>S. cerevisiae</i> fins mamífers	TFIIB	Inici de la transcripció	
MCM3AP	MCM3AP	Mamífers	MCM3	Inici de la replicació del DNA	
Eco1	Eco1	Mamífers	Subunitats de la cohesina	Cohesió de cromàtides germanes	
ARD1	ARD1	Mamífers	HIF1 α	Associació amb pVHL, ubiquitinització i degradació	

TF^a, factor de transcripció

4.2. Mecanismes de regulació de les acetilases

Hi ha múltiples mecanismes implicats en la regulació de la funció dels enzims amb activitat acetilasa. En primer lloc, l'acetil-CoA és un cofactor essencial per moltes acetiltransferases, i en alguns casos com PCAF i GCN5, contribueix a estabilitzar aquestes proteïnes. En segon lloc, la formació de complexos estequiomètrics amb múltiples subunitats modula les activitats específiques i l'especificitat de substrat d'algunes HATs. D'altra banda, les activitats enzimàtiques de PCAF, p300 i CBP són regulades per interacció amb factors de transcripció com ara p/CIP, Twist o les proteïnes HOX; la ubiquitina lligasa MDM2, la proteïna quinasa RSK2, o proteïnes virals com ara E1A, E1B, l'antigen T i Tat. A més les HATs poden patir modificacions covalents com fosforilació, acetilació, ubiquitinització i sumoilació. Les HATs són degradades per caspases, calpaïnes i per la via ubiquitina-proteasoma. La compartimentació subcel·lular també és un mecanisme important de regulació de les HATs; per exemple certes senyals condueixen al segrest de Tip60 al citoplasma. Per acabar, algunes acetilases tenen "PHD fingers" (és el cas de p300, CBP, MOZ i MORF). Aquestes estructures estan implicades en la unió a fosfoinositols i poden participar en vies de transducció de senyal cap al nucli, de manera que les activitats d'aquestes acetilases podrien estar regulades per la senyalització nuclear.

4.3. Efectes de l'acetilació

L'acetilació del grup ϵ -amino dels residus de lisina neutralitza la seva càrrega positiva i per aquest motiu pot quedar afectada la interacció d'aquests residus amb DNA, RNA i proteïnes. De fet se sap que l'acetilació d'histones afecta l'estructura dels nucleosomes (Bauer et al., 1994; Garcia-Ramirez et al., 1995).

Els residus de lisina acetilats tampoc no poden formar ponts d'hidrogen i això pot tenir conseqüències importants. Per exemple, quan la lisina 11 de l'enzim Alba d'arquees és acetilada, no pot oligomeritzar, de manera que l'acetilació condueix a la pèrdua de funció d'aquesta proteïna (Bell et al., 2002). En el cas de l'Acetil-CoA sintetasa de *S. enterica* l'acetilació de la lisina 609 provoca la inhibició de l'activitat enzimàtica, ja que aquesta lisina es troba al centre catalític de l'enzim (Starai et al., 2002).

A eucariotes el grup ϵ -amino dels residus de lisina també pot ser modificat per metilació, ubiquitinització, sumoïlació i neddilació. Aquestes modificacions són mútuament excloents en el sentit que no es poden donar alhora en un mateix residu i, per tant, podrien competir entre sí. Per exemple, l'acetilació i la metilació de la lisina 9 de la histona H3 tenen conseqüències funcionals oposades, ja que l'acetilació està associada amb la cromatina transcripcionalment activa, mentre que la metilació ho està amb l'heterocromatina o cromatina inactiva (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2002).

D'altra banda, l'addició d'un grup acetil als residus de lisina crea una nova superfície per l'associació amb altres proteïnes que presentin bromodominis. Els bromodominis són mòduls estructurals que reconeixen específicament regions amb lisines acetilades (Dhalluin et al., 1999; Hassan et al., 2002). No obstant, l'acetilació també pot estimular l'associació amb proteïnes que no necessàriament presenten bromodominis (Soutoglou et al., 2000).

4.4. Acetilases i malaltia

Hi ha diferents línies d'evidència que semblen indicar que les acetiltransferases podrien estar implicades en la generació de tumors. Per exemple, l'oncoproteïna viral E1A interacciona amb p300, CBP, PCAF i TRRAP (una subunitat de molts complexos multiproteïcs amb activitat acetilasa). p300, CBP i PCAF també s'associen i modifiquen molts factors de transcripció importants en el control de diferents programes cel·lulars, com ara p53, pRb, E2F i HIF α . A més, els gens que codifiquen per CBP, p300, MOZ i MORF pateixen rearranjaments en algunes anormalitats cromosòmiques associades amb leucèmies, i algunes de les proteïnes de fusió resultants podrien ser oncogèniques (Lavau et al., 2000). Tip60 s'associa amb el receptor d'andrògens i sembla estar implicada en el desenvolupament del càncer de pròstata (Halkidou et al., 2003).

Algunes acetiltransferases han estat associades amb malalties neurodegeneratives. És el cas de Tip60, que interacciona i modula la funció del domini citoplasmàtic de la proteïna APP, un regulador important de la malaltia d'Alzheimer (Baek et al., 2002; Cao and Sudhof, 2001). En el cas de la malaltia de Huntington i altres malalties relacionades amb l'acumulació de poliglutamines s'ha vist que les cues de poliglutamines afecten l'activitat acetiltransferasa de CBP (Hughes, 2002; McCampbell and Fischbeck, 2001).

A més, l'acetilació de lisines afecta la funció d'algunes proteïnes que tenen un paper important en certes malalties. Per exemple, l'acetilació de la proteïna Tat del virus VIH és essencial per a la regulació de la producció de virus.

En conclusió, les acetiltransferases juguen un paper important en la patogènesi d'algunes malalties i per aquest motiu s'està explorant l'ús de petites molècules inhibidores i activadores d'histona deacetilases per al tractament del càncer i altres malalties humanes (Lau et al., 2000; Marks et al., 2001). Actualment més de trenta inhibidors de deacetilases es troben en estudis clínics com a agents terapèutics per malalties hematològiques i tumors sòlids (Egger et al., 2004). El compost SAHA (*suberoylanilide hidroxamic acid*) és l'inhibidor de deacetilases que es troba en la fase clínica més avançada, i afecta el creixement cel·lular, diferenciació i apoptosi preferencialment d'un ampli espectre de cèl·lules transformades, però no pas cèl·lules normals (Kelly et al., 2003).

Nothing shocks me. I'm a scientist.
Harrison Ford com Indiana Jones

OBJECTIUS

PRECEDENTS

La proteïna p27^{Kip1} interacciona amb l'acetiltransferasa PCAF i n'és un substrat.

OBJECTIU GENERAL DEL PROJECTE

Buscar altres proteïnes de cicle cel·lular que puguin ser modificades per acetilació i determinar l'efecte de l'acetilació sobre el cicle.

OBJECTIUS CONCRETS DE L'ESTUDI

- Identificació de proteïnes de cicle cel·lular modificades per acetilació.
- Identificació de l'acetilasa responsable i dels residus de lisina acetilats.
- Conseqüències funcionals de l'acetilació.

*Things should be made
as simple as possible,
but not any simpler.*

Albert Einstein

MATERIALS I MÈTODES

▣ TÈCNIQUES GENERALS

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1 Models cel·lulars

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

- ▣ **HeLa.** Línia tumoral procedent de càncer de cèrvix humà.
- ▣ **HCT-116.** Línia tumoral procedent de càncer colorectal humà.
- ▣ **HEK 293T.** Línia immortalitzada procedent de ronyó embrionari humà.
- ▣ **COS-1.** Cèl·lules de ronyó de mico.
- ▣ **NIH3T3.** Línia immortalitzada de fibroblasts de ratolí.
- ▣ **NIH3T3 amb expressió induïble de PCAF.** Aquestes cèl·lules van ser generades al laboratori per la Dra. Mireia Ventura amb la col·laboració de l'Ignasi Salaet.
- ▣ **MEFs WT (*Mouse Embryonic Fibroblasts*).** Línia immortalitzada de fibroblasts embrionaris de ratolins (normals o *wild type* (WT)). Les cèl·lules van ser cedides pel Dr. Marcos Malumbres (CNIO).
- ▣ **MEFs *CDK2*^{-/-}.** Línia immortalitzada de fibroblasts embrionaris de ratolins *knockout* per CDK2. Aquesta línia també va ser cedida pel Dr. Marcos Malumbres (CNIO).

1.2 Manteniment de les cèl·lules en cultiu

Les diferents línies s'han mantingut en un incubador a 37°C i a una pressió parcial de CO₂ del 5%. A l'interior de l'incubador, com a desinfectant per prevenir contaminacions bacterianes i fúngiques, s'hi manté una safata amb 1,5 l de clorur de benzalconi (Roccal) al 10% que cal renovar periòdicament.

Totes les manipulacions s'han realitzat en condicions estèrils en una campana de flux laminar i tot el material ha estat prèviament esterilitzat. Els medis i condicions de cultiu que s'han utilitzat per a cada línia són els següents:

- *HCT-116*: es mantenen en una barreja de DMEM:HAM F12 (1:1), que es suplementa amb 2 mM L-Glutamina, 1% aminoàcids no essencials, 1 mM d'àcid pirúvic, antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50 µg/ml d'estreptomicina) i 10% de FCS.
- *HeLa*, *293T*, *COS-1*, *MEFs*: es fan créixer en medi DMEM suplementat amb 2 mM L-Glutamina, 1% aminoàcids no essencials, 1mM d'àcid pirúvic, antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50 µg/ml d'estreptomicina) i 10% de FCS.
- *NIH3T3*: s'han cultivat sempre en condicions subconfluents per impedir que es transformessin, en medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementat amb 2 mM L-Glutamina, 1% aminoàcids no essencials, 1 mM d'àcid pirúvic, antibiòtics (50 unitats/ml de penicil·lina, 50 µg/ml de estreptomicina) i 10% de DCS. Les línies amb expressió induïble de PCAF es cultiven en presència de l'antibiòtic tetraciclina (1 µg/ml).

1.3 Medis i suplementes

El sèrum fetal boví i les solucions concentrades d'antibiòtics, la L-Glutamina i l'àcid pirúvic es conserven a -20°C; els aminoàcids no essencials i els medis es conserven a 4°C. El sèrum fetal boví s'inactiva abans de suplementar els medis mitjançant una incubació a 56°C durant 20-30 min. Els suplementes es passen per un filtre de 0,2 µm abans de ser afegits al medi, per tal de mantenir l'esterilitat. Les cases comercials d'on procedeixen els productes utilitzats són les següents:

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*. Biological Industries.
- *HAM F12*. Biological Industries.
- *L-Glutamina*. Merck.
- *Antibiòtics (penicil·lina i estreptomicina)*. Biological Industries.
- *Tetraciclina*. Sigma.
- *Àcid pirúvic*. Sigma.
- *Aminoàcids no essencials*. Biological Industries.
- *Sèrum boví (FCS, foetal calf serum)*. Biological Industries.
- *Sèrum boví (DCS, donor calf serum)*. Biological Industries.
- *Tripsina-EDTA*. Gibco, BRL.
- *Filtres de 0,2 µm*. Ultrafreee-MC, Millipore.

- El PBS utilitzat per rentar les cèl·lules en cultiu té la composició següent (cal filtrar-lo (0,2 µm) o autoclavar-lo): 7,65 g/l NaCl, 0,21 g/l KH₂PO₄ pH 7.2, 0,9 g/l Na₂HPO₄·2H₂O.

1.4 La sembra de les cèl·lules

S'efectua utilitzant tripsina per tal de disgregar les cèl·lules i desenganxar-les del suport plàstic on es cultiven (flascons i plaques de diferents grandàries, TPP). El protocol que se segueix és el següent:

1. Escalfament previ a 37°C del PBS, la solució de tripsina-EDTA 1x i el medi de cultiu.
2. Treure el medi i fer un rentat amb PBS.
3. S'afegeix el volum de tripsina necessari per cobrir la superfície de cultiu i s'incuba a 37°C fins que les cèl·lules es desenganxen.
4. Es neutralitza la tripsina tot afegint el mateix volum de medi al 10% de FCS.
5. Es realitza la dilució adient per al subcultiu o la preparació de l'experiment. Les dilucions de subcultiu oscil·len entre 1/6 i 1/8.

1.5 Congelació i descongelació

■ La **congelació** de cèl·lules es fa a partir de cultius subconfluents en creixement exponencial. El protocol de congelació és el següent:

1. Es tripsinitzen les cèl·lules i posteriorment es neutralitza la tripsina amb medi suplementat.
2. Es compten les cèl/ml utilitzant la càmera de Neubauer.
3. La suspensió de cèl·lules es centrifuga 5 min a 2500 rpm, a temperatura ambient i es descarta el sobrenedant.
4. Es ressuspenen les cèl·lules amb el medi necessari per a fer alíquotes d'entre 1-1,5·10⁶ cèl/ml (en el cas de MEFs 3·10⁶ cèl/ml), tenint en compte que a cada criotub hi posarem 800 µl de medi i 200 µl de DMSO 50% (10% concentració final).
5. Afegim el DMSO gota a gota i amb agitació constant. El DMSO és un crioprotector tòxic per les cèl·lules a temperatura ambient, per tant, s'han de congelar ràpidament a -80°C.

- Finalment, els vials de cèl·lules es mantenen durant 2-3 dies a -80°C i posteriorment s'emmagatzemen en N_2 líquid fins que sigui requerida la seva descongelació.

■ El mètode de **descongelació** utilitzat és el següent:

- En primer lloc, escalfem a 37°C 25 ml de medi de cultiu suplementat per a cada criotub de cèl·lules a descongelar.
- Es posa l'aliquota de cèl·lules en neu carbònica.
- S'afegeixen uns μl de medi escalfat al criotub i es van passant les cèl·lules que es descongelen al tub on tenim els 25 ml de medi. Es repeteix el procés fins que tot el contingut del criotub ha passat al tub amb medi.
- Es centrifuga a 2500 rpm a temperatura ambient durant 5 min.
- Finalment es ressuspèn el *pellet* amb medi suplementat (10% FCS) i es passa a un flascó de cultiu F25.

1.6 Transfecció de cèl·lules

La transfecció de cèl·lules ens permet expressar una determinada proteïna en una línia cel·lular concreta. Les tècniques que hem utilitzat per dur a terme les transfeccions es basen en la inclusió del DNA plasmídic que codifica per la proteïna desitjada dins de liposomes que, en fusionar-se amb la membrana plasmàtica, lliuren l'àcid nucleic a l'interior de la cèl·lula. S'han utilitzat els sistemes Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen) per a la transfecció de cèl·lules HCT-116, HeLa, 293T i NIH3T3, i el sistema Effectene[®] (Qiagen) per a transfectar les cèl·lules COS-1. En general hem seguit les instruccions aportades pels fabricants, però en el cas de la Lipofectamina en alguns casos hem variat la relació DNA (μg): lipofectamina (μl) per optimitzar la transfecció.

1.7 Sincronització de cèl·lules

Per a molt estudis fisiològics i bioquímics és important tenir la població cel·lular en un creixement homogeni. Podem aturar el cicle cel·lular en diferents punts. En els nostres experiments ho hem fet a l'inici de la fase S o a la metafase utilitzant timidina o nocodazol.

■ Doble bloqueig amb Timidina

Per aturar les cèl·lules al principi de la fase S hem fet servir la tècnica del doble bloqueig amb timidina. Les cèl·lules són cultivades durant 16 h en medi suplementat amb 2 mM timidina (Sigma), després es fa un canvi de medi sense timidina durant 8 h, i finalment es tornen a tractar amb 2 mM timidina durant 16 h més. La timidina és un deoxinucleòtid que forma part de les cadenes de DNA, però en excés provoca una aturada de la replicació i per tant el cicle cel·lular queda parat a la transició G1/S.

■ Bloqueig amb Nocodazol

Per aturar les cèl·lules a la fase M hem fet servir nocodazol (Sigma). El nocodazol és una droga que impedeix la polimerització de microtúbuls i com a conseqüència atura la mitosi a la metafase (ja que els cromosomes no es poden alinear a la placa metafàsica). En els nostres experiments hem tractat les cèl·lules durant 16 h amb 50-100 ng/ml de nocodazol.

1.8 Obtenció de lisats cel·lulars

Partint de la quantitat de cultiu necessari segons el tipus d'experiment a realitzar, el protocol a seguir és el següent:

1. Retirem el medi i fem 2 rentats amb PBS.
2. Afegim el mínim volum de PBS necessari per a cobrir la superfície de cultiu. Col·locar la placa o flascó sobre gel i rascar amb un *scraper* fins a desenganxar totes les cèl·lules.
3. Recollir les cèl·lules en tubs mantinguts en gel.
4. Centrifugar a 2500 rpm a 4°C durant 5 min, i eliminar el sobrenedant.
5. Congelar els *pellets* a -80°C si no els hem d'utilitzar en aquest moment.
6. Si la mostra que obtenim és per a realitzar assajos de *western blot*, podem ressuspènere els *pellets* o bé recollir les cèl·lules directament amb Tampó de Lisi. Com que aquest tampó conté un alt percentatge de SDS, la mostra ja queda desnaturalitzada i la podem guardar a -20°C. Si en lloc de fer *western blot* hem de sotmetre les mostres a altres tècniques, com ara immunoprecipitació, el tampó de lisi a utilitzar serà diferent.

● *Tampó de Lisi*: 80 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS.

1.9 Quantificació de proteïnes

Per a la valoració de la concentració de proteïna total procedent d'una purificació o bé d'un extracte cel·lular, hem utilitzat dos mètodes: el mètode de Bradford i el mètode de Lowry. El més utilitzat és el de Bradford per la seva sensibilitat, senzillesa en la preparació i rapidesa en la obtenció dels resultats. Tot i això, aquest mètode té certes limitacions, perquè està influït per diversos components que sovint estan presents en les solucions on tenim dissoltes les proteïnes (>0,1% SDS, etc). En aquests casos utilitzem el mètode de Lowry, que no es veu distorsionat per aquests components. Ambdós mètodes es basen en la quantificació de l'absorbància a una determinada longitud d'ona del canvi de color que experimenta un reactiu químic en reaccionar amb les proteïnes. La determinació de la concentració es fa per comparació amb una recta patró de concentracions creixents conegudes de proteïna, que generalment és l'albumina sèrica bovina (BSA, Sigma).

■ El mètode de Bradford (Bradford, 1976)

Es basa en la mesura del canvi en l'espectre d'absorció d'un colorant (el Reactiu de Bradford) quan reacciona amb les proteïnes de la mostra. La coloració és mesurable a 595 nm. Mitjançant la concentració coneguda d'una proteïna es prepara una recta patró des d'on es podrà extrapolar la concentració de les mostres.

1. La recta patró es prepara amb diferents concentracions de BSA (de 2 a 20 mg/ml) fins a un volum final de 800 µl en aigua mQ. Les mostres a quantificar es preparen de la mateixa manera, agafant de 2 a 10 µl de mostra. Els punts de la recta patró i de les mostres es preparen per duplicat.
2. S'hi afegeix 200 µl de reactiu de Bradford.
3. Es barreja i s'incuba 10 min a temperatura ambient.
4. Es llegeix en un espectrofotòmetre a 595 nm.
5. La concentració de la mostra s'obté per la interpolació en la recta patró a partir del valor de l'absorbància.

Taula 1. Corba estàndard per al mètode de Bradford.

Concentració de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	BSA (μl) (0,1 mg/ml)	Tampó de lisi (μl)	H ₂ O(μl)	Reactiu de Bradford(μl)
0	0	X	800-X	200
2	20	X	780-X	200
4	40	X	760-X	200
8	80	X	720-X	200
16	160	X	640-X	200
20	200	X	600-X	200
Mostra	X	-	800-X	200

● *Bio-Rad Protein Assay dye Reagent Concentrate*. Bio-Rad.

● *Albúmina sèrica bovina 0,1 mg/ml (BSA)*. Sigma.

■ El mètode de Lowry (Lowry et al., 1951)

És similar a l'anterior, però canvien els reactius i la mesura de l'absorbància és a 750 nm:

1. La recta patró es prepara amb diferents concentracions de BSA (de 5 a 40 mg/ml) fins a un volum final de 500 μl en aigua mQ. Les mostres a quantificar es preparen de la mateixa manera, agafant de 2 a 10 μl de mostra. Els punts de la recta patró i de les mostres es preparen per duplicat.
2. S'hi afegeix 2,5 ml de solució A. Es barreja i s'incuba 10 min a temperatura ambient.
3. S'hi addicionen 250 μl de solució B, es barreja i s'incuba 30 min a temperatura ambient.
4. Es llegeix en un espectrofotòmetre a 750 nm.
5. La concentració de la mostra s'obté per la interpolació en la recta patró a partir del valor de l'absorbància.

Taula 2. Corba estàndard per al mètode de Lowry.

Concentració de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	BSA (μl) (0,1 mg/ml)	Tampó de lisi (μl)	H ₂ O(μl)
0	0	X	500-x
5	50	X	450-x
10	100	X	400-x
20	200	X	300-x
40	400	X	100-x
Mostra	X	X	500-x

- *Solució 1:* 2% Na₂CO₃ + 0,1 N NaOH.
- *Solució 2:* 0,5% CuSO₄.
- *Solució 3:* 1% Tartrat Sòdic.
- *Reactiu del fenol:* segons Folin-Ciocalteau (Merck).
- *Solució A:* es barregen les solucions 1, 2 i 3 amb la proporció 48:1:1.
- *Solució B:* dilució del reactiu de fenol (1:1) amb aigua.

2. CULTIUS BACTERIANS

2.1 Soques i medis de cultiu

Hem utilitzat les següents soques bacterianes:

- *E. coli* DH5α per a l'obtenció de DNA plasmídic.
- BL21pLys per a sobreexpressar proteïnes.

Per a fer créixer els bacteris s'ha utilitzat el medi ric LB (Luria-Bertani), tant en cultius líquids com sòlids. En el cas dels cultius sòlids s'hi afegeix 15 g/l d'agar.

- *Composició del medi LB:* 10 g/l Triptona, 5 g/l extracte de llevat, 5 g/l NaCl. Antibiòtic 1 mg/ml (Ampicilina, Kanamicina o Cloramfenicol, segons el tipus de plàsmid que contenen els bacteris).

2.2 Transformació bacteriana

El procés de transformació es basa en la incorporació d'un DNA plasmídic dins de cèl·lules bacterianes competents.

1. Descongelem els bacteris competents en gel.
2. S'afegeixen uns 0,5 µg de DNA plasmídic (0,5-1 µl), a 100 µl de cèl·lules competents, i s'incuba en gel 30 min.
3. Es sotmet a un xoc tèrmic de 45 seg a 42°C, i seguidament es deixa 2 min en gel.
4. S'afegeix 1 ml de medi ric LB sense antibiòtics, i s'incuba 1 h a 37°C, en agitació.

5. Es centrifuga 1 min a 5000 rpm i es descarten 900 µl del sobrenedant. Amb la resta de medi es ressuspenen les cèl·lules i es plaquegen en plaques de LB amb antibiòtic. S'incuba tota la nit a 37°C.

2.3 Obtenció i purificació de DNA

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

Taula 3. Construccions de cDNA emprades en aquesta tesi.

cDNA	Vector	Dianes de clonatge	Origen
Ciclina A WT	pGEXKG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
Ciclina A WT	pGEX6P1	?	Dra. Núria Canela
Ciclina A WT	pGEX2T	?	Comú lab
Ciclina A WT	pEF-HA	BamHI-XhoI/Sall	Aquesta tesi
Ciclina A WT	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
Ciclina A WT	pEGFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/Sall	Aquesta tesi
Ciclina A WT	pECFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/Sall	Aquesta tesi
Fragment 4R	pUC57	SmaI-MfeI	Sintetitzat per GenScript
Ciclina A 4R	pGEXKG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
Ciclina A 4R	pEF-HA	BamHI-XhoI/Sall	Aquesta tesi
Ciclina A 4R	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
Ciclina A 4R	pECFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/Sall	Aquesta tesi
Fragment 4Q	pUC57	SmaI-MfeI	Sintetitzat per GenScript
Ciclina A 4Q	pGEXKG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
Ciclina A 4Q	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
Ciclina A 4Q	pECFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/Sall	Aquesta tesi
CDK2 WT	pGEXKG	BamHI-HindIII	Comú lab
CDK2 WT	pGEX6P1	?	Dra. Núria Canela
CDK2 1-106	pGEX	?	Dra. Núria Canela
CDK2 106-213	pGEX	?	Dra. Núria Canela
CDK2 214-298	pGEX	?	Dra. Núria Canela
CDK2 WT	pUHD-P1-FLAG	?	Dr. Randy Poon
CDK2 WT	pECFP-C1	BamHI/BglII-HindIII	Aquesta tesi
CDK2 K33R	pGEX2T	?	Dr. Randy Poon
CDK2 K33R	pUHD-P1-FLAG	?	Dr. Randy Poon

CDK2 K33Q	pGEX2T	?	Aquesta tesi
CDK2 K33Q	pUHD-P1-FLAG	?	Aquesta tesi
PCAF	pGEX2TKP	BamHI/BglII-XhoI	Dra. MA. Martínez-Balbás
PCAF	pcDNA3-FLAG	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
PCAF	pEYFP	?	María Pérez
PCAF Cterm WT (352-832)	pGEXKG	?	Dra. Sonia Brun
PCAF Cterm WT (352-832)	pcDNA3-GFP-FLAG	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
PCAF Cterm Δ HAT (352-832, Δ 527-547)	pGEX2TKP	BamHI/BglII-XhoI	Dra. MA. Martínez-Balbás
PCAF Cterm Δ HAT (352-832, Δ 527-547)	pcDNA3-GFP-FLAG	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
HAT (352-658 de PCAF)	pGEX2TKP	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
CBP	pGEX2TKP	BamHI/BglII-XhoI	Dra. MA. Martínez-Balbás
Tip60	pGEX2T?	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
GCN5	pGEX4T1	BamHI-EcoRI	Aquesta tesi
GCN5	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Miriam Vidal
HDAC1	pME1 8S-FLAG	EcoRI-XhoI	Dr. Alexander Brehm
shRNA anti-PCAF	pLKO.1-puro	?	Sigma
shRNA anti-GCN5	pLKO.1-puro	?	Sigma
Ciclina D3	pGEX	?	Comú lab
Ciclina E	pGEX	?	Comú lab
Ciclina B1	pGEX	?	Comú lab
CDK1	pGEX	?	Comú lab
p27	pGEX	?	Comú lab
Cdh1	pcDNA3.1-HA	?	Dr. Michele Pagano
Cdc20	(?) FLAG	?	Dr. Michele Pagano
Ubiquitina	(?) HA	?	Dr. Michele Pagano
Cks1	pcDNA3-HA	?	Dr. Rob Wolthuis
Cks2	pcDNA3-HA	?	Dr. Rob Wolthuis
PR-B	pSR α	?	Dr. Albert Jordán
MMTV-Luciferasa	?	?	Dr. Albert Jordán
Renilla	pRL-CMV	?	Dra. Marta Bosch

2.4 Expressió i purificació de proteïnes en *E. coli*

El procediment que fem servir està extret de (Smith and Johnson, 1988) i (Frangioni and Neel, 1993). En molts dels experiments realitzats en aquest treball ha estat de gran utilitat poder disposar de proteïnes recombinants aïllades i purificades en solució. Així doncs, hem obtingut les proteïnes reguladores de cicle CDK2, CDK1, ciclina A, ciclina E, ciclina D3, p27 i altres.

L'expressió de proteïnes recombinants o de fragments de proteïnes en *E. coli* es va fer amb el sistema de proteïnes de fusió amb glutatió S-Transferasa (GST). Aquest sistema d'expressió utilitza els vectors pGEX, i permet una purificació ràpida de les proteïnes fusionades amb GST gràcies a l'afinitat d'aquest enzim per un dels seus substrats, el glutatió reduït. Així doncs, s'utilitza glutatió reduït unit covalentment a boletes de sefarosa com a resina per a la purificació de la proteïna de fusió i, un cop unida, l'elució es realitza afegint glutatió reduït lliure en excés, per tal de desfer la unió de GST a les boletes de sefarosa. La cua de GST es pot eliminar utilitzant proteases (com la Trombina) amb un lloc de tall específic entre el GST i la proteïna que volem purificar, ja sigui quan la proteïna de fusió encara està retinguda a la columna o un cop ja ha estat eluïda.

Aquest mètode d'expressió és un dels més utilitzats perquè presenta un alt rendiment en l'expressió de proteïnes de mida petita i mitjana (1 a 80 kDa) i una puresa elevada de la proteïna purificada.

El primer pas que cal fer és la clonació del cDNA de la proteïna que vulguem expressar en un vector pGEX. Aquests plàsmids estan dissenyats per obtenir uns alts nivells d'expressió intracel·lular de gens fusionats amb GST de manera induïble per IPTG.

Els plàsmids de proteïnes de fusió amb GST es van transformar en la soca bacteriana BL21pLys perquè és defectiva en certes proteases i té una paret poc resistent i, a més, expressa lisozim (pel fet de tenir integrat el plàsmid pLys), la qual cosa facilita la seva lisi i la fiabilitat per a la purificació de proteïnes recombinants.

Una vegada els bacteris estan transformats, se'n fan créixer cultius grans, seleccionant-los amb ampicilina i cloramfenicol (el pGEX confereix resistència a l'ampicilina, i el pLys dels bacteris al cloramfenicol).

■ Inducció de l'expressió

Per a la inducció de l'expressió s'utilitza l'Isopropil- β -D-tiogalactopirinosid (IPTG), i el protocol següent és el següent:

1. Picar una de les colònies (o varies) i inocular-la en un volum de 5 ml de LB amb ampicilina i cloramfenicol. Fer-ho créixer fins a saturació a 37°C i en agitació (200 rpm).
2. Amplificar el cultiu fins al volum desitjat. Normalment de 0,5 a 1 litre.
3. Créixer fins a la fase exponencial (OD_{600nm} 0,8) i induir l'expressió del plàsmid pGEX-proteïna amb l'addició de 0,5 mM d'IPTG (aquesta concentració es pot optimitzar). Ho deixem incubant 4 h a temperatura ambient, o a 30°C o 37°C (cal optimitzar les condicions).
4. Per comprovar la inducció prèviament a la purificació, podem separar una fracció (15 μ l) del cultiu de bacteris induïts i sense induir en gels de SDS-poliacrilamida, i visualitzar per tinció amb *Coomassie blue* o per *western blot* si la proteïna d'interès s'ha expressat i a quins nivells. En cas afirmatiu, podem procedir a la seva purificació.

■ Purificació

1. Recollir els bacteris per centrifugació a 5000 rpm durant 10 min a 4°C; en aquest punt podem congelar a -80°C el precipitat de cèl·lules si no ens interessa fer a continuació la purificació.
2. Lisi dels bacteris en tampó NETN. Es fan diversos cicles de congelació i descongelació i es sonica en gel, 4 x 10 seg.
3. Es clarifica el lisat per centrifugació durant 15 min en un rotor ss-34 a 15000 rpm, i es guarda el sobrenedant.
4. La purificació la fem per cromatografia d'afinitat. Barregem el lisat amb la resina de glutatió-sefarosa (*Glutathione-Sepharose-4B*). Utilitzem 1 ml de glutatió-sefarosa per cada 5 mg de proteïna de fusió, que equivalen aproximadament a 0,5-1 litres de cultiu inicial bacterià (teòricament). Ho incubem durant 1 hora a 4 °C, mantenint-ho en agitació.

5. Fer 3 rentats exhaustius amb tampó NETN (volum final de 10 ml).
6. Afegir 2-5 ml de tampó d'elució i incubar-ho 30 min a 4°C en rotació.
7. Recollir la proteïna eluïda per centrifugació (5 min a 3000 rpm).
8. La proteïna purificada se sol dialitzar amb el tampó adequat per a l'assaig en el que la vulguem emprar. Es guarda aliquotada a -80°C.

Eliminació del GST

En moltes ocasions hem procedit a l'eliminació del GST per a poder realitzar els assaigs d'interès amb la proteïna recombinant sense les interferències del fragment de GST. Els plàsmids pGEX presenten una seqüència de tall específica per la trombina entre la seqüència codificant pel GST i la zona de múltiple clonatge, on s'insereix la seqüència de la proteïna a expressar. La trombina es pot eliminar posteriorment, amb una resina específica. El procediment detallat és el següent:

1. Abans de procedir a l'elució de la proteïna, després de l'últim rentat de la resina de glutatió-sefarosa amb el tampó NETN, es fa un rentat addicional amb 20 ml de PBS, i es passa la resina a un tub eppendorf de 1,5 ml.
2. Incubar la resina amb el mateix volum d'una solució (95:5) de PBS/trombina (*stock*: 1 U/ μ l, en PBS) durant 16 h a temperatura ambient en rotació.
3. Centrifugació a 3000 rpm durant 1 min i recuperem el sobrenedant.
4. Per eliminar la trombina, s'incuba el sobrenedant 10 min a temperatura ambient en rotació amb 75 μ l de la resina de para-aminobenzamidina (que haurem pre-rentat amb PBS) per cada 6 U de trombina.
5. Centrifugar 5 min a 3000 rpm per a recuperar el sobrenedant, on hi ha la proteïna purificada sense GST i sense trombina.
6. Podem dialitzar la proteïna amb el tampó més adient per a posteriors assajos.
7. Per comprovar la digestió es poden carregar 5 μ l del sobrenedant en un gel SDS-PAGE i fer una tinció amb *Coomassie blue*.
8. En cas que es necessiti que la proteïna sigui estèril es pot filtrar amb un filtre de 0,22 μ m.

- *Isopropil- β -D-tiogalactopirinosid (IPTG)*. Genaxis Biotechnology.
- *Gluthatione-Sepharose-4B*. Amersham Pharmacia Biotech.
- *Trombina*. Amersham Pharmacia Biotech.

- *p-aminobenzamidine*. Sigma.
- *Filtres de 0,2 μm*. Ultrafree-MC, Millipore.
- *Medi de cultiu LB (Luria-Bertani)*: 1% Triptona, 0,5% Extracte de llevat, 0,5% NaCl, en aigua pH 7.5 (autoclavar).
- *Plaques de cultiu LB/agar*: Agar bacteriològic 1,5% en medi LB (autoclavar).
- *NETN*: 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40 (Igepal[®], Sigma), inhibidors de proteases (1 mM PMSF, 1 μg/ml Aprotinina, 10 μg/ml Leupeptina).
- *Tampó d'elució*: 50 mM Tris pH 9.6, 120 mM NaCl, 20 mM Glutatió reduït.

3. ELECTROFORESI, TRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ

3.1 Electroforesi de proteïnes en una dimensió

La separació de proteïnes en funció del seu pes molecular es realitza mitjançant gels de SDS-poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) segons el mètode de Laemmli (Laemmli et al., 1970). El dodecil sulfat sòdic o SDS és un detergent aniònic que desnaturalitza les proteïnes i els confereix una càrrega neta negativa. Això fa que les proteïnes de la mostra migrin cap al pol positiu quan se'ls aplica un camp elèctric. Aquesta migració té lloc a través d'una matriu porosa inert de poliacrilamida. La velocitat de migració de les proteïnes en el gel és inversament proporcional a la seva mida, és a dir, les proteïnes de major pes molecular es mouen més lentament que les de pes molecular menor.

■ Preparació del gel

El gel consta de dues fases. A la part superior hi ha el *gel empaquetador*, que té un pH lleugerament àcid de 6.8 i un 3,6% d'acrilamida, i que permet l'empaquetament inicial de les mostres. A la part inferior s'hi troba el *gel resolutiu*, amb un pH bàsic de 8.8 i un percentatge d'acrilamida que pot variar entre un 6% fins a un 20%, en funció de la mida de les proteïnes que vulguem separar. Així, si ens interessa separar proteïnes de pes molecular petit utilitzem gels amb un alt contingut d'acrilamida on les proteïnes grans migraran amb dificultat, i per a les proteïnes d'elevat pes molecular utilitzem gels amb poca acrilamida. Per fer l'electroforesi preparem minigels i hi apliquem un camp elèctric en cubetes Miniprotein[®] (Bio-Rad).

1. Primer es prepara el gel resolutiu (segons la taula 4). Una vegada barrejats els components, la solució resolutiva s'aboca entre els vidres del muntatge.
2. Per sobre del gel s'hi afegeix aigua o isopropanol per evitar el contacte entre el gel i l'oxigen de l'aire, fet que dificulta la polimerització. Es deixa polimeritzar.
3. Quan ha polimeritzat, i abans d'aplicar el gel empaquetador, es decanta l'aigua o l'isopropanol.
4. Es prepara el gel empaquetador i s'aboca a sobre del resolutiu.
5. Abans que polimeritzi, es col·loca una pinta que permetrà la formació dels pous on després es carregarà la mostra. Es deixa polimeritzar.
6. Una vegada ja està polimeritzat es treu la pinta i es col·loca el gel en una cubeta, on afegim el tampó electròlit.
7. Es carreguen les mostres, que contenen 30-50 µg de proteïna total per a *western blot* (tot i que depenent de la sensibilitat de l'anticòs la quantitat pot ser fins i tot menor) i uns 10–20 µg per a tinció. Un dels pous es reserva per carregar l'estàndard de proteïnes de pes molecular conegut (el marcador de pes molecular).
8. Finalment apliquem un camp elèctric per resoldre les mostres. Normalment es corre a 35 mA d'amperatge màxim. Es comença amb un voltatge baix entre 80-100 V per facilitar l'empaquetament de les mostres, i quan ja han entrat al gel resolutiu s'augmenta el voltatge fins a 120-150 V.

Taula 4: Elaboració dels gels resolutius (a diferents percentatges d'acrilamida) i del gel empaquetador.

GEL RESOLUTIU	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %	GEL EMPAQUETADOR	
Solució1 (ml)	5	5	5	5	5	Solució 3 (ml)	0,36
Solució 2 (ml)	2,4	2,8	3,4	4	5	Solució 2 (ml)	1,5
H ₂ O (ml)	2,6	2,2	1,6	1	-	H ₂ O (ml)	1,2
TEMED (µl)	14	14	14	14	14	TEMED (µl)	7,5
PSA 13% (µl)	50	50	50	50	50	PSA13% (µl)	30
TOTAL (ml)	10	10	10	10	10	TOTAL (ml)	3

- *Solució 1:* 0,75 M Tris-HCl pH 8.8 + 0,2% SDS.
- *Solució 2:* 30% Acrilamida + 0,8% Bis-acrilamida.
- *Solució 3:* 0,25 M Tris-HCl pH 6.8 + 0,2 % SDS.
- *Tampó electròlit:* 0,025 M Tris-HCl pH 8 + 0,192 M Glicina + 0,1% SDS.

L'Acrilamida i la Bis-acrilamida són els polímers que formen el gel, el PSA és l'agent polimeritzador i el TEMED és l'agent catalitzador de la reacció.

■ Preparació de les mostres

Primer cal quantificar-les amb algun dels dos mètodes explicats a anteriorment. A continuació es fa el següent:

1. S'agafa el volum necessari per a tenir la quantitat de mostra desitjada i s'hi afegeix el tampó de mostra. Aquest tampó normalment l'utilitzem concentrat quatre vegades i en posem una quarta part del volum final. Conté SDS per desnaturalitzar, ditiotreitòl (DTT) per trencar els ponts disulfur, glicerol per a conferir densitat i el colorant blau de bromofenol.
 2. Una vegada afegit el tampó, bullim les mostres 5-10 min i les centrifuguem 10 seg a 14000 rpm. Ara ja estan a punt per ser carregades al gel.
- *Tampó de mostra 4x* (Laemmli et al., 1970): 40 mM NaP_i pH 7.0, 40% Glicerol, 10% SDS, 2 mg/ml DTT, 0,67 mg/ml Blau de Bromofenol.

3.2 Tinció dels gels d'electroforesi

Després de separar les proteïnes en els gels de poliacrilamida es pot estudiar el patró de bandes de cada mostra mitjançant una tinció. En aquesta tesi hem utilitzat principalment la tinció amb blau de Coomassie per la seva senzillesa i rapidesa:

1. Una vegada finalitzada l'electroforesi, s'incuba el gel amb la solució de tinció durant 10-20 min, en agitació i a temperatura ambient.
2. A continuació es procedeix a destenyir el gel per tal d'extreure l'excés de colorant amb destenyidor, en agitació a temperatura ambient, fins que es puguin veure bé les bandes.

- *Solució de Tinció*: 2,5 mg/ml *Coomassie Brilliant Blue*, 45% Metanol, 10% Àcid acètic.
- *Destenyidor*: 50% Metanol, 10% Àcid acètic.

3.3 Western blot

Quan l'interès de l'estudi rau en l'anàlisi de proteïnes específiques en una mostra procedent d'un extracte cel·lular, és d'utilitat la tècnica de *Western Blot* (WB). Consisteix en dos passos: electrotransferència i immunodetecció. La transferència s'aconsegueix posant el gel de poliacrilamida i una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF en contacte directe i sotmetent-los a un camp elèctric en el qual les proteïnes del gel, desnaturalitzades amb SDS (per tant carregades negativament), migraran cap al pol positiu on hi ha la membrana i hi quedaran retingudes. Llavors s'apliquen tècniques d'immunodetecció, les quals s'aprofiten de l'especificitat antígen-anticòs per tal de determinar la presència de proteïnes específiques a la mostra.

■ Electrotransferència

El suport on es transfereixen les proteïnes procedents del gel SDS-PAGE és en el nostre cas membranes de nitrocel·lulosa (Trans-Blot® Transfer Medium, Bio-Rad).

1. En primer lloc, cal hidratar la membrana de nitrocel·lulosa amb aigua.
2. La membrana i el gel s'incuben uns min amb tampó de transferència.
3. La transferència es fa utilitzant una *Mini Transblot Cell* (Bio-Rad). Es munten les plaques de transferència (*sandwich*) tal com indica la figura 1 i es col·loquen dins de la *Mini Transblot Cell*, tot afegint tampó de transferència.
4. S'aplica un voltatge de 60 V durant 2h o de 20 V durant tota la nit, sempre a 4°C. Tanmateix, les condicions de transferència poden variar en funció de les característiques de la proteïna que vulguem detectar. Per proteïnes petites (<20 kDa) o molt àcides es disminueix el temps fins a la meitat, i per proteïnes grans (>100 kDa) es pot augmentar el voltatge i el temps de transferència.
5. Una vegada transferides les proteïnes, s'asseca la membrana, i es pot guardar a temperatura ambient. Per comprovar si la transferència a anat bé, mullem la membrana amb una solució de *Red Ponceau* i així podrem veure les proteïnes transferides.

- **Tampó de Transferència:** 0,025 M Tris-HCl pH 8.3, 0,192 M Glicina, 0,02% SDS, 20% Metanol/Etanol.



Figura 1. Muntatge del *sandwich* per a la transferència de proteïnes.

■ Immunodetecció

La detecció de proteïnes específiques d'una mostra es pot fer utilitzant anticossos contra la proteïna d'interès (antigen), aprofitant l'especificitat d'unió entre els anticossos i els seus antigens. El *western blot* és una tècnica indirecta, és a dir, l'anticòs que s'uneix a la proteïna o anticòs primari no està marcat. Per a visualitzar-lo s'empra un anticòs secundari, específic contra les immunoglobulines de l'espècie on s'ha produït el primari, que porta unit un enzim. L'activitat d'aquest enzim és la que permet la detecció.

El protocol de *western blot* pot variar en funció de quins siguin els anticossos utilitzats, normalment els canvis es produeixen en les dilucions dels anticossos primaris i els temps de les incubacions, però en general el procediment seria el següent:

1. S'incuba la membrana amb la Solució de Bloqueig durant 1 h, a temperatura ambient i en agitació. D'aquesta manera s'impedeix la unió inespecífica dels anticossos.
2. Es realitzen tres rentats de 10 min amb TBST.
3. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari diluït en Solució d'Anticossos. El temps d'incubació pot variar des d'una hora a temperatura ambient fins a tota la nit a 4°C, però tant la dilució de l'anticòs com el temps d'incubació es poden modificar en funció de l'afinitat de cada anticòs pel seu antigen.
4. Es realitzen tres rentats de 10 min amb TBST.

5. S'incuba la membrana amb l'anticòs secundari, que reconeixerà i s'unirà al primari. La dilució de l'anticòs secundari pot variar (quan està acoblat a peroxidasa generalment es dilueix 1:2000 – 1:10000) i es fa amb TBST i 5% de llet en pols.
6. Es fan tres rentats de 10 min amb TBST.
7. Finalment es procedeix al revelat, que ens permetrà visualitzar la proteïna d'interès. En aquest treball hem utilitzat sempre anticossos secundaris acoblats a l'enzim peroxidasa.

■ Revelat amb peroxidasa (ECL)

Quan afegim el substrat de l'enzim peroxidasa es produeix luminescència, que podem detectar mitjançant la impressió en films fotogràfics i revelant-ho a continuació.

1. Primer s'incuba la membrana amb una barreja a parts iguals de les solucions 1 i 2 d'ECL, durant un min.
2. Es retira l'excés de líquid i es col·loca la membrana dins d'un plàstic transparent. Es posa en contacte directe amb un film d'autoradiografia dins un *cassette* de revelar, protegit de la llum. Normalment es proven diferents temps d'exposició i finalment es revela el film.

- *EZ-ECL*. Biological Industries.
- *Super RX Fuji medical X-ray film*. Fujifilm.
- *TBS*: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl
- *TBST*: TBS + 0,05% Tween 20.
- *Solució de Bloqueig*: 5% llet en pols en TBST.
- *Solució d'Anticossos*: 1% BSA, 0,5% llet en pols, 0,1% azida sòdica en TBS.

Taula 5. Relació dels anticossos utilitzats en aquesta tesi. WB, *western blot*; IP, immunoprecipitació; AK, assaig quinasa; ICQ, immunocitoquímica.

Antigen	Casa comercial	Referència	Tècnica
Acetil-lisina	Cell Signaling	9441	WB
Acetil-lisina	Abcam	ab193	WB
Acetil-lisina	Chemicon	AB3879	WB
Acetil-lisina	Abcam	ab409	WB
APC3/Cdc27	Abcam	ab10538	WB
Cdc20 p55CDC	Santa Cruz	sc-8358 (H175)	WB
Cdh1	Zymed	34-2000	WB
CDK2	Santa Cruz	sc-6248 (D-12)	WB, IP

CDK2	Santa Cruz	sc-163 (M2)	WB, IP, AK
Ciclina A	Santa Cruz	sc-751 (H-432)	WB, IP, AK
Ciclina A	Santa Cruz	sc-239 (BF683)	WB
Ciclina A	Santa Cruz	sc-239 AC	IP, AK
Cks1/2	Santa Cruz	sc-6238 (FL-79)	WB
CUL1	Zymed	71-8700	WB
FLAG	Sigma	F7425	WB, IP
FLAG	Sigma	A2220	IP
H3P (Ser 28)	Cell Signaling	9713	WB, ICQ
HA	Roche	12C5A	ICQ
HA	Sigma	H6908	WB
HA	Sigma	A2095	IP
HDAC1	Abcam	ab7028	WB, IP
HDAC2	Abcam	ab7029	WB, IP
Histones	Chemicon	MAB052	WB
p27	Santa Cruz	sc-1641 (F-8)	WB, IP
p27	Santa Cruz	sc-528 (C-19)	WB, IP
PCAF	Sigma	P7493	WB, IP
PCAF	Santa Cruz	sc-13124 (E-8)	WB, IP
PCAF	Santa Cruz	sc-8999 (H-369)	WB
Skp1	Santa Cruz	sc-7163 (H-163)	WB
Skp2	Zymed	51-1900	WB

■ TÈCNIQUES ESPECÍFIQUES

4. ANÀLISI DE L'ACETILACIÓ DE PROTEÏNES

4.1 Acetilació d'histones

És un assaig totalment *in vitro* en el que mesurem la capacitat que tenen els enzims acetilasa que purifiquem d'incorporar grups acetil a un substrat, en aquest cas les histones. Com a acetilases hem utilitzat: PCAF o el seu domini catalític (HAT), CBP i Tip60, expressades en bacteris com a proteïnes de fusió amb GST. Com a substrats utilitzem la barreja d'histones H2A, H2B, H3 i H4 (Sigma).

1. Posem en contacte en un tub *eppendorf* 0,5 µl de la barreja d'histones (*stock*: 20 mg/ml) amb volums creixents de l'acetilasa purificada i 0,05 µCi d'acetilCoA³H. Afegim a la barreja de reacció tampó HAT fins arribar a un volum final de 30 µl.
2. Ho incubem un mínim de 30 min a 30°C.
3. Un cop finalitzada la incubació, transferim les reaccions a un quadrat de 2 cm x 2 cm de paper Whatman P-81. Aquest paper està carregat amb càrregues negatives i permet l'adhesió de les histones de la reacció, ja que són unes proteïnes altament positives.
4. Es realitzen tres rentats de 10 min amb una solució de 50 mM NaHCO₃ pH 9.
5. Un rentat curt amb acetona, i els papers es deixen assecar a l'aire.
6. Es posen els papers en vials, s'hi afegeix 10 ml de líquid de centelleig i es mesuren les cpm amb un comptador d'escintil·lació líquida Wallac 1409.

- *Barreja d'histones*. Sigma.
- *AcetilCoA³H*. TRK924-50 µCi Amersham Pharmacia.
- *Tampó HAT (també anomenat IpH)*: 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA pH 8, 5% glicerol.

4.2 Acetilació de substrats no-histona

Per tal de comprovar si certes proteïnes poden ser substrat de diferents acetilases es realitzen experiments d'acetilació *in vitro*. Si utilitzem com a substrat de les reaccions proteïnes recombinants amb GST, hem d'afegir un control negatiu de les reaccions que serà GST purificat. A més, cal quantificar les proteïnes mitjançant el mètode de Bradford per tal de comparar molaritats iguals de diferents proteïnes. El procediment és el següent:

1. Es prepara una barreja que contindrà 3 µl del tampó HAT (10x), el volum necessari d'enzim per a obtenir una activitat detectable en histones i 0,02 µCi d'acetilCoA¹⁴C.
2. S'afegeix a cada eppendorf 3-6 µM del substrat que es vol estudiar, la barreja preparada anteriorment i PBS fins a un volum final de 30µl.
3. S'incuba a 30°C durant 30 min en un bany sec. S'atura la reacció afegint 10 µl de tampó de mostra 4x.
4. Aquestes mostres es resolen en un gel de SDS-acrilamida del percentatge adequat, en funció del pes molecular de les proteïnes utilitzades.
5. Es realitza la transferència d'aquestes proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa, a 70 V, durant 1 hora i 15 min a 4°C.
6. Es deixa assecar la membrana de nitrocel·lulosa i després s'enganxa dins d'un *cassette* de revelar. Es necessita una pantalla amplificadora per a poder detectar la senyal del ¹⁴C, que és poc intensa. La pantalla amplificadora es posa en contacte amb la membrana, i un film d'autoradiografia es posa en contacte amb la pantalla amplificadora. A continuació es tanca el *cassette*, es protegeix de la llum amb bosses de plàstic opaques, i finalment es deixa exposant a -80°C un mínim de 24 h.

Quan revelem el film, les bandes que hi apareixen corresponen a proteïnes que s'acetilen, ja que han pogut incorporar acetil¹⁴C.

- *AcetilCoA¹⁴C*. NEC31310UC Perkin Elmer.
- *Pantalla amplificadora*. Kodak BioMax, Transcreen LE [Low Energy] Intensifying Screen.
- *Films d'autoradiografia*. Kodak BioMax MS.

4.3 *Spot-mapping*

Aquesta tècnica s'utilitza normalment per a l'estudi de l'eficiència de reconeixement d'un antigen per un anticòs, tot i que també s'ha utilitzat amb altres finalitats com l'estudi de fosforilació de pèptids concrets per una quinasa. La tècnica es basa en acoblar pèptids sintètics a una membrana de cel·lulosa- β -alanina. Aquests pèptids, de 10-12 aminoàcids, s'uneixen a la membrana pel seu extrem carboxi. Estan acetilats per l'extrem amino terminal per augmentar-ne l'estabilitat i evitar-ne la degradació.

En aquest treball la tècnica de *spot-mapping* l'hem utilitzat per estudiar quines lisines de les proteïnes ciclina A i CDK2 són acetilades per l'acetilasa PCAF. A partir de les seqüències de les proteïnes es van dissenyar pèptids formats per 10 o 11 aminoàcids que contenien un o dos residus de lisina cap a la part central. Els pèptids ja acoblats a la membrana van ser proveïts per Sigma-Genosys (les seqüències es detallen a l'apartat de resultats). El primer pèptid correspon sempre a una seqüència de la histona H3, acetilable per PCAF, i serveix com a control positiu de la reacció.

Un dels inconvenients d'aquesta tècnica és que la cel·lulosa on estan acoblats els pèptids pot acetilar-se. Per aquest motiu, la reacció s'ha de fer amb un tampó de reacció amb un elevat contingut en sals que bloqueja l'acetilació química inespecífica. El procediment seguit és el següent:

1. Abans de començar la reacció, s'ha de fer una corba d'acetilació d'histones amb l'acetilasa PCAF per a determinar el volum d'enzim necessari per obtenir una acetilació detectable.
2. Per iniciar la reacció d'acetilació de pèptids es posa la membrana en un recipient que s'ajusti a la seva mida per tal de poder utilitzar el mínim volum de tampó de reacció possible. En el nostre cas el recipient escollit va ser una caixa de cobreobjectes (només calen 3 ml de líquid per cobrir la seva superfície).
3. Es prepara la solució d'acetilació i s'incuba amb ella la membrana.
4. Es posa la caixeta amb la membrana al forn a 30°C durant 30 min. Es va agitant cada 5 min. Passats els 30 min de la reacció es treu la solució d'acetilació i es fan 6 rentats de 10 min amb tampó HAT.

5. Per tal de veure les traces de radioactivitat presents al primer i el sisè rentats, es recullen i s'hi afegeix líquid de centelleig. D'aquesta manera sabrem si la membrana ha quedat prou neta.
6. Es deixa assecar la membrana de nitrocel·lulosa i s'enganxa a dins d'un *cassette* de revelar. A continuació, a sobre de la membrana s'hi col·loquen la pantalla amplificadora i un film d'autoradiografia, es tanca el *cassette*, es protegeix de la llum amb bosses de plàstic opaques, i finalment es deixa exposant a -80°C un mínim de 24 h.

● *Solució d'acetilació (3 ml):*

Aprox. 3 ml Tampó HAT (50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM KCl, 0,1 mM EDTA pH 8, 5% glicerol)

Aprox. 75 μl AcetilCoA¹⁴C (NEC313, Perkin Elmer)

Aprox. 40 μl GST-HAT (depèn de la purificació i la corba d'activitat)

Inhibidors de proteases (1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinina, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptina)

4.4 Acetilació *in vivo*

Per detectar l'acetilació *in vivo* de proteïnes hem seguit dues aproximacions: la immunoprecipitació de proteïnes concretes seguit de l'anàlisi per *western blot* utilitzant anticossos anti-acetil-lisina, o bé la incorporació d'acetat de sodi³H. El procediment per detectar l'acetilació de proteïnes mitjançant la incorporació d'acetat de sodi³H és aquest:

1. Sembrar i transfectar les cèl·lules normalment, amb Flag-PCAF i HA-ciclina A (en el cas dels nostres experiments).
2. Incubació de 1 a 4 h amb:
 - medi calent (0,2-0,4 mCi/ml d'acetat de sodi³H; cal evaporar prèviament l'etanol on ve dissolt l'acetat de sodi)
 - 10 mM Butirat Sòdic i/o 330 pM TSA (inhibidor de HDACs)
 - 100 mg/ml cicloheximida (inhibidor de la síntesi de proteïnes)
3. Lisi amb tampó HAT i immunoprecipitació amb anti-HA (2 h a 4°C).
4. Electroforesi + transferència a membrana de nitrocel·lulosa.
5. Exposició amb film d'autoradiografia a -80°C durant 3-7 setmanes!

● *Butirat sòdic. Sigma*

- *Cicloheximida*. Sigma
- *Acetat de sodi* ³H. NET003H Perkin Elmer

5. GENERACIÓ DE MUTANTS

Per tal de generar els mutants de ciclina A 4R i 4Q es van sintetitzar fragments de DNA amb la seqüència de la ciclina A que comprèn els 4 codons que codifiquen les lisines 54, 68, 95 i 112 (GenScript). En el cas del mutant 4R aquests codons van ser mutats per altres que codifiquen per arginines (R), i en el del mutant 4Q van ser substituïts per codons que codifiquen per glutamines (Q). Es van aprofitar dues dianes de restricció internes de la ciclina A per introduir aquestes seqüències de DNA amb les mutacions: SmaI i MfeI.

En el cas del mutant CDK2 K33Q, es va generar seguint el protocol del *kit QuickChange*[®] *Site-directed mutagenesis* de Stratagene. Les seqüències dels *primers* utilitzats per fer aquest procés són les següents:

Forward

5' GGAGAGGTGGTGGCGCTT**CAG**AAAATCCGCCTGGACACTGAG

Reverse

5' CTCAGTGTCCAGGCGGATTTT**CTG**AAGCGCCACCACTCTCC

6. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES

6.1 *Pull down*

Aquesta tècnica ens permet determinar si dues proteïnes interaccionen. Es basa en tenir una de les proteïnes unida covalentment a una resina o columna, mentre que l'altra es troba purificada en solució o bé es tracta d'un extracte cel·lular. En el primer cas aquesta tècnica ens permetrà esbrinar si es produeix una interacció directa entre les proteïnes, mentre que en el segon no sabrem si la interacció que es produeix és directa o indirecta. En aquesta tesi, els assajos de *pull down* s'han fet posant en contacte una proteïna purificada unida a *beads* de sefarosa i un extracte proteic de cèl·lules HCT-116.

🧪 Preparació de la columna de CNBr sefarosa-proteïna

La *CNBr-activated-Sepharose[®]-4B* (Amersham. Pharmacia) és un gel on s'hi immobilitzen lligands amb amines primàries gràcies al seu recobriment amb Bromur de Cianogen.

1. La proteïna que volem unir-hi ha d'estar dissolta en un tampó bàsic, que no presenti cap component amb grups amino susceptibles d'unir-se a la resina. Normalment hem utilitzat el Tampó Bicarbonat, amb un alt contingut de sals que eviten la formació d'agregats.
2. Pesem la quantitat de resina seca necessària per a unir la proteïna, tenint en compte que 1 g de resina seca equival a 3,5 ml de resina inflada, i que a 1 ml d'aquesta s'hi pot unir 1 mg de proteïna.
3. Ressuspenem la resina amb 1 mM de HCl, i s'infla ràpidament. Realitzem 2 rentats de 15 min amb HCl 1 mM. L'excés de clorhídric l'eliminem per filtració amb un embut Buchner connectat al buit.
4. Es ressuspèn la resina amb el tampó bicarbonat (15 ml) i s'incuba amb la proteïna durant 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C, en rotació molt suau.
5. Per eliminar l'excés de lligand es fa un rentat amb 10 volums de tampó bicarbonat respecte al volum de la resina emprada.
6. Es bloquegen els grups actius restants tot incubant la resina durant 2 h a temperatura ambient o tota la nit a 4°C amb Tampó de Bloqueig, mantenint-ho en rotació suau.
7. Es realitzen tres cicles de rentats alternant dos tampons amb pH diferents: Tampó de Rentat Àcid seguit de Tampó de Rentat Bàsic. Aquests canvis de pH asseguruen que no quedi cap lligand lliure unit iònicament a la proteïna que hem unit covalentment a la resina.
8. Per conservar la columna en bones condicions la ressuspenem en PBS i 0,1% d'azida sòdica a 4°C.

● *Tampó Bicarbonat:* 0,1 M NaHCO₃ pH 8.3, 0,5 M NaCl.

● *Tampó de Bloqueig:* 0,1 M Tris-HCl pH 8.2

● *Tampó de Rentat Àcid:* Acetat 0,1 M pH 4, NaCl 0,5 M.

● *Tampó de Rentat Bàsic:* 0,1 M Tris-HCl pH 8.2, NaCl 0,5 M.

📌 Protocol del *pull down*

1. Durant 2-4 h a 4°C i en agitació suau, s'incuben uns 25 µl de la resina conjugada amb proteïna amb un extracte cel·lular (200 µg) en 300 µl finals del tampó de lisi de les cèl·lules (en els nostres experiments vam utilitzar el tampó HAT suplementat amb inhibidors de proteases). També podem incubar 25 µl de la resina amb proteïnes o fragments proteics purificats (4 µg) en 50 µl finals de Tampó d'Unió.
2. En el cas que es formin complexos es poden recuperar amb una senzilla centrifugació, perquè les boletes de sefarosa ens precipitaran arrossegant la proteïna que estudiem i la (o les) proteïnes que s'hi associïn. Al sobrenedant s'hi troba fracció no unida, i a la resina hi ha la fracció unida.
3. Fem tres rentats de la fracció unida amb 1 ml de Tampó d'Unió o amb el tampó de lisi de les cèl·lules.
4. Afegim Tampó de Mostra desnaturalitzant (Laemmli) tant a la fracció unida com a la no-unida.
5. Correm un gel de poliacrilamida i el tenyim amb blau de Coomassie (en el cas del *pull down* amb proteïnes purificades) o bé fem un *western blot* per detectar si s'ha produït la interacció de la proteïna conjugada amb la resina i una altra proteïna concreta.

- **Tampó d'Unió:** 50 mM Tris-HCl pH 8, 150-300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1-1% Tritó X-100, Inhibidors de proteases. La força iònica del tampó i la proporció de detergent es poden variar en el rang indicat per tal d'afavorir la unió de determinades proteïnes.

6.2 Immunoprecipitació

La immunoprecipitació és una tècnica que ens permet aïllar complexos proteics a partir d'extractes cel·lulars. S'utilitzen anticossos específics contra la proteïna d'estudi i, si aquesta forma complexos amb altres proteïnes presents en el lisat i la unió de l'anticòs no els distorsiona, es podran aïllar i analitzar la seva composició i/o la seva activitat enzimàtica. L'immunocomplex es pot recuperar amb Proteïna A, G o A/G unida covalentment a una matriu de sefarosa. La utilització de Proteïna A o G vindrà donada per l'espècie i l'isotipus de l'anticòs utilitzat, ja que presenten diferents afinitats:

Taula 6. Afinitat de la Proteïna A i la proteïna G per anticossos de diferents isotipus i espècies.

Espècie	Proteïna A	Proteïna G
Humana	++++	++++
Ratolí, IgG ₂	++	-
Ratolí, altres IgG	-	++
Rata	+/-	++
Conill	++++	+++
Cabra	-	++
Ovella	+/-	++

Les condicions durant tot el procés hauran de ser prou permissives per a no trencar les unions dels complexos. El tampó d'extracció s'ha d'assemblar el màxim possible a les condicions intracel·lulars per tal d'obtenir els complexos tal i com estaven dins de les cèl·lules i per evitar que no es trenquin ni se'n formin de nous amb agregats insolubles. La immunoprecipitació d'alguns complexos requereix variacions en el contingut del tampó per facilitar la recuperació d'un complex determinat; n'és un exemple la immunoprecipitació del complex quinasa actiu CDK4-Ciclina D.

Immunoprecipitació i anàlisi dels complexos

1. Les cèl·lules es lisen durant 30 min a 4°C amb el Tampó de Lisi d'Immunoprecipitació corresponent (el volum dependrà de la quantitat de cèl·lules de partida).
2. Clarificar l'extracte per centrifugació a 14000 rpm, 10 min, 4°C.
3. Es recupera el sobrenedant i es valora la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford.
4. S'incuben 0,2-2 mg de mostra amb 2-4 µg d'anticòs (tot i que aquestes proporcions poden variar) durant 2 a 16 h a 4°C, en agitació. Com a control negatiu en el cas d'anticossos policlonals s'empra sèrum normal de conill, i quan utilitzem anticossos monoclonals fem servir una IgG de ratolí.
5. S'afegeixen 15-30 µl de proteïna A-Sepharose[®] (Pierce) o proteïna G-Sepharose[®] (Sigma) i s'incuba durant 1 hora a 4°C, en agitació.
6. Es centrifuga uns 10 seg a 14000 rpm a 4°C.
7. Es renten les boletes de sefarosa 3 vegades amb el mateix tampó amb el que hem lisat les cèl·lules (si es tracta del tampó HAT, s'hi afegeix KCl fins a 150 mM).

8. Finalment afegim 70 µl de tampó de mostra (Laemmli) 1x i bullim les mostres 5-10 min. Després se separen electroforèticament les proteïnes de la mostra en un gel desnaturalitzant de poliàcrilamida, es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa i es realitza un *western blot* per analitzar la composició dels complexos.

- *Immuno Pure Immobilized Protein A* (Pierce).
- *Immuno Pure Immobilized Protein G* (Sigma).
- *Anticossos* que hem utilitzat per fer immunoprecipitacions. (vegeu taula 5 secció “Materials i Mètodes”).

Tampons de Lisi d'Immunoprecipitació (en tots dos casos, al moment s'afegeixen els inhibidors de proteases, fosfatases i deacetilases: 1 mM PMSF, 0,1 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina, 0,5 mM NaF, 3,3 µM TSA):

- *Tampó RIPA*: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0,5% deoxicolat sòdic, 0,1% SDS.
- *Tampó HAT*: 50 mM Tris-HCl pH 8, 50mM KCl, 0,5% NP-40, 0,1 mM EDTA, 5% glicerol.

■ Immunoprecipitació i assaig quinasa

En algunes ocasions ens ha interessat analitzar l'activitat enzimàtica de les proteïnes dels immunoprecipitats, que en el nostre cas eren complexos amb activitat quinasa. Per assajar l'activitat quinasa de complexos CDK2-ciclina seguim aquest procediment:

1. S'immunoprecipiten 100-250 µg de lisat amb 1-2 µg d'anticòs anti-CDK2 o amb anti-ciclina A. També incloem un control negatiu (IgG), i es segueix el procediment descrit per la immunoprecipitació i l'anàlisi de complexos.
2. Un cop finalitzats els 3 rentats amb el tampó de lisi d'immunoprecipitació, s'efectua un rentat addicional amb el Tampó Quinasa 1x (veure apartat 7 “Materials i Mètodes”).
3. A continuació es retira el sobrenedant i s'afegeix el substrat (2 µg d'histona H1) a cada mostra.
4. S'afegeix la barreja de reacció que haurem preparat al moment. El volum final és de 30 µl.
5. S'incuba durant 30 min a 30 °C.
6. La reacció s'atura afegint 10 µl de tampó de mostra 4x.
7. Es procedeix a la separació electroforètica de les mostres en un gel del 12% d'acrilamida.

8. Una vegada finalitzada l'electroforesi, es tenyeix el gel amb blau de Coomassie per comprovar la càrrega i s'asseca 2 h a 80°C.
9. Finalment, el gel s'exposa amb plaques Kodak BIOMAX i es revela amb un aparell de tipus PhosphorImager (BioRad). Per a la quantificació de les bandes s'utilitza el *software* *Quantity One*® (BioRad).

- *Barreja de reacció*: 1 μCi [γ - ^{32}P]ATP, 12,5 μM ATP, 2 mM DTT, Tampó quinasa 10x.
- *Histona H1*. Boehringer Mannheim.
- *ATP*. Sigma.
- [γ - ^{32}P]ATP. Amersham, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml.

6.3 Assajos amb BIAcore

Per tal de determinar si dues proteïnes interaccionen directament hem fet servir un aparell biosensor anomenat BIAcore T100 (Biomolecular Interaction Analysis). Aquest instrument utilitza el fenomen òptic de la ressonància del plasmó en superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) per a monitoritzar interaccions moleculars. La detecció depèn dels canvis que es produeixen en la concentració de macromolècules en una matriu específica.

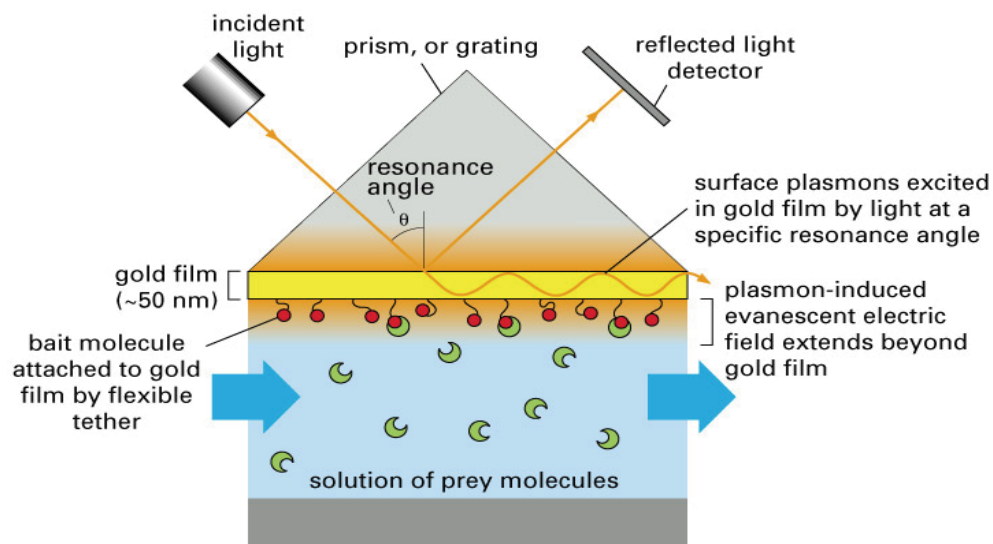


Figura 2. Principis bàsics del funcionament del BIAcore (1a part). Extret del llibre *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition.

El funcionament és el següent: una molècula A s'uneix a la matriu d'un xip (existeixen diferents tipus de matrius i de sistemes d'acoblament de proteïnes), i a continuació s'injecta una solució que passa per sobre de la matriu i que conté una proteïna B (que volem saber si interacciona amb A). Si hi ha interacció entre A i B es produirà un canvi en la concentració de molècules que hi ha a la matriu que pot ser detectat pel sistema òptic de l'aparell. Els canvis en la concentració de molècules que hi ha sobre la matriu es representen en un sensograma, on apareixen els canvis en les unitats de ressonància respecte al temps.

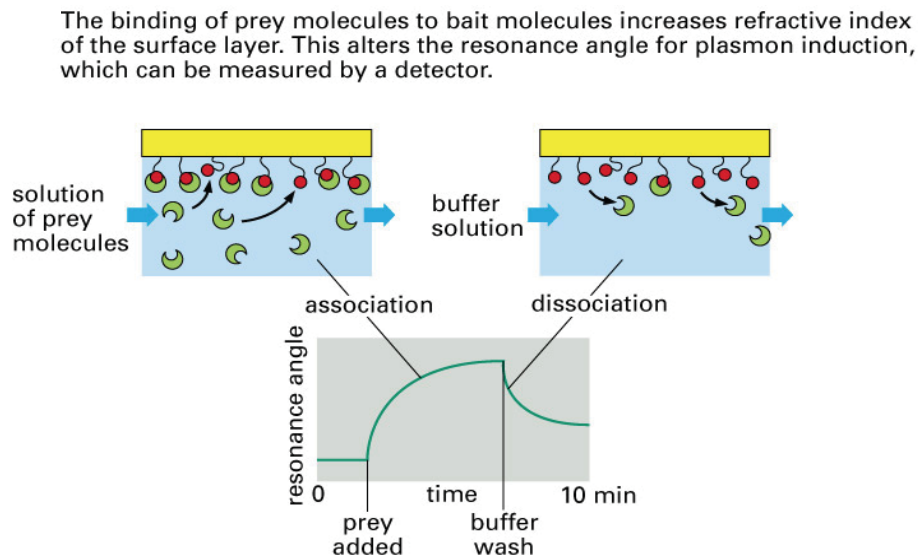


Figura 3. Principis bàsics del funcionament del BIAcore (2a part). Extret del llibre *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition.

En els nostres experiments hem unit la proteïna PCAF recombinant produïda a *E. coli* (a la qual havíem tallat prèviament el *tag* GST) a un xip tipus CM5, que conté una matriu de dextrans carboximetilats. La unió la vam fer pel mètode d'amines, i va caldre ressuspènere la proteïna PCAF en tampó maleat pH 8.5. També vam fixar un carril que faria de blanc (control negatiu) pel mateix mètode.

Tot seguit vam injectar una solució que contenia la proteïna GST-ciclina A en tampó HBS-EP (BIAcore International AB) i la vam fer passar pels carrils control i amb PCAF. El sensograma resultant és la diferència de les RU (*Resonance Units*) detectades a cada carril. Quan es detecta interacció les RU van augmentant progressivament, i quan es deixa d'injectar la molècula en solució es produeix la dissociació de les molècules, la qual es manifesta a través de la

disminució paulatina de les RU. Com més ràpid es produeix la dissociació, menys afí és la interacció entre les proteïnes.

El pas següent consisteix a fer proves de regeneració, és a dir, trobar les condicions per extreure tota la ciclina A que estigui unida a la PCAF de manera que el xip quedi disponible per fer altres assajos amb altres proteïnes. Les proves de regeneració es fan amb diferents substàncies; nosaltres vam provar Glicina 10 mM pH 2.5, 50 mM NaOH, diferents percentatges de SDS i 1,5 M KCl. En les nostres condicions, 0,05% SDS ens permetia regenerar correctament el xip sense deixar-lo malmès.

Amb aquesta tècnica podem detectar si hi ha o no una interacció directa entre dues proteïnes, i quina és l'afinitat de la interacció, ja que podem seguir la cinètica de la unió en temps real.

● *Tampó BIAcore (HBS-EP):* 0,01 M Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA

7. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA

Es tracta d'una tècnica amb la que es pot valorar quantitativa i qualitativament l'activitat d'una proteïna quinasa sobre un determinat substrat, en una reacció totalment *in vitro*. S'incuben la quinasa i el substrat en presència de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ i té lloc la transferència d'un fosfat radioactiu a la proteïna substrat per l'acció catalítica de la quinasa. Després es detecta la incorporació de radioactivitat amb gels SDS-PAGE i autoradiografia. Com a quinasa i/o substrat se solen utilitzar proteïnes recombinants purificades o proteïnes immunoprecipitades d'un extracte cel·lular.

🧪 A partir de proteïnes recombinants

1. Barregem dins un tub la quantitat del complex quinasa (la ciclina i la CDK), per tantes reaccions com vulguem fer. Normalment posem 400 nM de concentració final de cadascuna. Ho incubem uns 10 min a temperatura ambient. Després ho repartim en el nombre de tubs corresponents al nombre de reaccions que vulguem fer.

2. En el cas de voler estudiar l'efecte d'algun inhibidor o activador de la reacció l'afegim en aquest moment.
3. Finalment hi afegim la barreja de reacció fins a un volum final de 30 μ l, i ho incubem 30 min a 30°C. Com a substrat utilitzem normalment la histona H1.
4. Acabem la reacció afegint a cada tub 10 μ l de tampó de mostra 4x.
5. Carreguem les mostres en un gel de SDS-PAGE del 12%. El tenyim amb blau de Coomassie.
6. S'asseca el gel i detectem la radioactivitat per autoradiografia o amb un aparell tipus PhosphorImager (BioRad).

● *Barreja de reacció:* 2 μ g Histona H₁, 12,5 μ M ATP, Tampó quinasa 10x, 1 μ Ci [γ -³²P] ATP, 2 mM DTT (l'afegim al moment de l'assaig), H₂O mQ fins a 30 μ l.

● *Tampó quinasa:* 25 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MgCl₂.

■ **A partir d'immunoprecipitació** (vegeu apartat 6.2, "Materials i Mètodes").

8. DETERMINACIÓ DE LA VIDA MITJA

Per a determinar la vida mitja de la ciclina A hem tractat les cèl·lules amb 10 μ g/ml de cicloheximida i hem recollit mostres a diferents temps, de 0 a 8 h post-incorporació de la cicloheximida. Aquest producte és un inhibidor de la síntesi proteica, de manera que a partir del moment en què la incorporem en el medi podrem seguir la velocitat de degradació de proteïnes concretes.

La cicloheximida (Sigma) es prepara fent un *stock* 1000x en etanol absolut que es guarda a -20°C. Després d'incorporar-la al medi de cultiu, recollirem les mostres a diferents temps tot fent un parell de rentats amb PBS i afegint a continuació Tampó de Lisi (80 mM Tris-HCl pH 6.8 + 2% SDS). Posteriorment les mostres es processen i es realitza *western blot* amb anticossos dirigits contra la proteïna que volem estudiar.

9. ANÀLISI DE LES FASES DEL CICLE CEL·LULAR

Per determinar el percentatge de cèl·lules en cadascuna de les fases del cicle es pot fer una tinció del DNA amb l'odur de Propidi o bé TOPRO-3, seguit de l'anàlisi per **citometria de flux**. El procediment és el següent:

1. Les cèl·lules es tripsinitzen, i després es neutralitza la tripsina afegint el mateix volum de medi suplementat.
2. Es centrifuguen a 2000 rpm a temperatura ambient durant 5 min.
3. Es descarta el sobrenedant i es fa un rentat amb PBS.
4. Es torna a centrifugar i es ressuspenen les cèl·lules en 0,5 ml PBS + 4,5 ml etanol al 70% (fred, -20°C). A continuació s'han de mantenir a 4°C com a mínim durant 2 h abans de continuar el procés, per tal que la fixació s'esdevingui de manera correcta.
5. Es centrifuguen les cèl·lules per eliminar la solució de fixació i tot seguit es fa un rentat amb PBS.
6. El *pellet* es ressuspen en una solució que conté 20 µg/ml de l'odur de Propidi (o bé 2 µM TOPRO-3), 200 µg/ml de RNAsa A lliure de DNAsa (aquesta última prèviament inactivada a 100°C durant 15 min) i 0,1% Tritó X-100. Les mostres s'incuben 30 min a temperatura ambient o bé 15 min a 37°C i finalment s'analitzen amb l'aparell Becton Dickinson FACS Calibur o bé el FACS Cantoll. La interpretació dels resultats es pot fer amb diferents programes. Nosaltres hem utilitzat el WinMDi 2.9.

10. IMMUNOCITOQUÍMICA PER A MICROSCOPIA ÒPTICA O CONFOCAL

Mitjançant aquesta tècnica es poden detectar i localitzar proteïnes específiques dins d'una cèl·lula, a través de la unió d'anticossos específics contra aquestes proteïnes acoblats a sistemes de detecció que podem visualitzar al microscopi. En alguns dels nostres experiments, però, vam transfectar les cèl·lules amb plàsmids que codificaven per una proteïna acoblada a un *tag* fluorescent (GFP, CFP, YFP), de manera que no calia utilitzar cap anticòs per a detectar-la. En qualsevol cas, el procediment que hem utilitzat per realitzar preparacions immunocitoquímiques ha estat el següent:

1. Fer créixer les cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre.
2. Realitzar les transfeccions oportunes. 24 h post-transfecció cal treure el medi de les cèl·lules i fer dos rentats amb PBS.
3. Fixació tot incubant les cèl·lules durant 15 min a temperatura ambient amb una solució al 4% de paraformaldehid en PBS.
4. En els casos en què hem volgut detectar proteïnes que no estaven marcades amb *tags* fluorescents, hem realitzat un bloqueig i permeabilització alhora (1% BSA, 0,1% Tritó X-100 en PBS) durant 15 min a temperatura ambient.
5. Incubació amb l'anticòs primari diluït en una solució de 1% BSA en PBS, durant 1 h a 37°C en una cambra humida (els anticossos anti-HA 12C5A de Roche i anti-H3P van ser utilitzats a una concentració 1:200).
6. 3 rentats amb PBS.
7. Incubació amb l'anticòs secundari diluït en una solució de 1% BSA en PBS, durant 45 min a 37°C en una cambra humida (l'anticòs secundari d'Alexa 594 el diluïm 1:500 i el 488 1:250).
8. 3 rentats amb PBS. En aquest moment, si cal, fem la tinció dels nuclis amb DAPI diluït 1:10000 en PBS, durant 5 min a temperatura ambient.
9. Finalment, cal rentar amb PBS i muntar els cubres sobre portaobjectes afegint uns 5 µl de medi de muntatge *Mowiol*[®] (Calbiochem). Quan s'hagi assecat el medi de muntatge podem procedir a l'observació de les mostres amb el microscopi òptic de fluorescència o confocal. En el cas que només vulguem detectar proteïnes amb *tags* fluorescents, podem passar directament del punt 3 al punt 9.

11. MESURA DE LA SÍNTESI DE DNA

11.1 Incorporació de BrdU

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

1. Fer créixer les cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre.

2. Incorporació de BrdU (*stock*: 3 mg/ml), fent una dilució 1:1000 en el medi de cultiu. El temps d'incorporació pot variar segons el que vulguem determinar. Per saber si la majoria de cèl·lules d'una població assincrònica ha passat per la fase S, caldria incubar-les amb BrdU unes 18-20 h; però si tenim un cultiu sincrònic només farà falta incorporar la BrdU de 2 a 3 h a partir del moment que considerem l'inici de la fase S.
3. Una vegada ha transcorregut el temps d'incubació, cal treure el medi de les cèl·lules i fer dos rentats amb PBS.
4. Fixar les cèl·lules amb etanol-acètic glacial (95:5) durant 30 min a temperatura ambient.
5. Fer 3 rentats amb PBS.
6. Una vegada ja hem fixat les cèl·lules es procedeix al bloqueig amb 8% de BSA en PBS durant 30 min a temperatura ambient. Després fem 3 rentats amb PBS.
7. Incubació amb l'anticòs primari anti-BrdU (Amersham) durant 1 hora a 37°C en cambra humida. En acabat, fer 3 rentats amb PBS.
8. Incubació amb l'anticòs secundari també durant 1 hora a 37°C en cambra humida. El diluïm en una solució de 1% de BSA en PBS (1:500 en el cas dels anticossos conjugats amb FITC (Sigma)).
9. Finalment, fer 3 rentats amb PBS i muntar els cubres sobre portaobjectes afegint uns 5 µl de medi de muntatge *Mowiol*[®].

11.2 Immunocitoquímica per detectar PCNA

La proteïna PCNA també és un bon marcador de la fase S del cicle cel·lular i la trobarem associada al DNA durant la replicació. El protocol per a detectar aquesta proteïna per immunocitoquímica és el següent:

1. Fixació de les cèl·lules amb paraformaldehid 4% diluït en PBS durant 30 min a temperatura ambient.
2. Rentar amb PBS i tot seguit tractar amb metanol fred durant 4 min a -20°C.
3. Rentar amb PBS i bloquejar amb 1% BSA en PBS durant 1 hora.
4. Incubació amb l'anticòs primari anti-PCNA (sc-25280 (F-2) Santa Cruz, dilució 1:50) durant 1 hora a 37°C en cambra humida.
5. Fer rentats amb PBS i incubar amb anticòs secundari (1:500 en el cas d'Alexa-Fluor 594 (Invitrogen)) durant 45 min a 37°C.

- Finalment, fer rentats amb PBS i muntar els cubres sobre portaobjectes afegint uns 5µl de medi de muntatge *Mowiol*[®].

12. UBIQUITINITZACIÓ DE PROTEÏNES

12.1 Ubiquitinització *in vitro*

Aquests assajos permeten determinar si una proteïna pot ser ubiquitinitzada per una ubiquitina lligasa determinada. La proteïna substrat de la ubiquitinització s'obté per un procés de traducció *in vitro* utilitzant el kit de Promega *TnT*[®] *Quick Coupled Transcription/Translation System*. Per a que això sigui possible cal que el plàsmid que conté el gen que codifica per aquesta proteïna presenti els promotors T7 o Sp6. A més, cal afegir a la reacció metionina marcada amb ³⁵S per tal que la proteïna quedi marcada radioactivament i puguem veure les formes poliubiquitinitzades per autoradiografia. En els nostres experiments, la ubiquitina lligasa Cdh1 també la vam obtenir per un procés de traducció *in vitro*, però en aquest cas no la vam marcar radioactivament per tal de no confondre la seva senyal amb la de la proteïna substrat. El procediment per a realitzar la ubiquitinització *in vitro* és el següent:

- Cal tenir purificades la ubiquitina lligasa i també la proteïna substrat (aquesta última marcada amb metionina³⁵S), seguint el protocol del kit *TnT*[®] *Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega).
- En el cas de que vulguem recollir mostres de 9 µl a dos temps diferents d'incubació, posem en contacte 2 µl de la proteïna substrat amb 4 µl de la ubiquitina lligasa i 6,2 µl de la mix d'ubiquitinització. Hi afegim aigua fins arribar a un volum final de 20 µl. Guardem una mostra control del marcatge del substrat (1 µl de proteïna + 10 µl de tampó de mostra 1x (Laemmli)).
- Incubem les mostres a 30°C i recollim alíquotes de 9 µl a diferents temps, a les quals afegim tampó de mostra.
- Les mostres es carreguen en un gel al 7% d'acrilamida d'1 mm de gruix.
- Posteriorment el gel es fixa 30 min amb Solució de Fixació i després es tracta amb *Amplify*[®] (Amersham) durant 10 min.
- Assequem el gel 1 hora a 80°C i l'exposem unes 16 h dins un *cassette* amb un film d'autoradiografia a -80°C.

● *Mix d'ubiquitinització* (per a una reacció amb volum final 10 µl)

0,5 µl Tris 1M pH 7,6

0,05 µl MgCl₂ 1M

0,05 µl Àcid okadaïc 200 µM

0,2 µl ATP 60 mg/ml (sempre fresc)

0,3 µl E1 2,5 µM

0,4 µl Ubch10

0,5 µl Ubiquitina aldehyd 20 µM

1 µl Ubiquitina 25 µg/µl

0,1 µl MG-132

● *Ubiquitin Activating Enzyme (E1)* E-302 rabbit 25 mg. Boston Biochemicals.

● *His6 Ubch10* E2-650 human recombinant 50 mg. Boston Biochemicals.

● *Ubiquitin Aldehyde* U-201 human recombinant 50 mg. Boston Biochemicals.

● *Ubiquitin* U6253. Sigma.

● *ATP Adenosine-5'-triphosphate* 10 127 523 001, 5 g. Roche.

● ³⁵S *Methionine*- Amersham AGQ0080 65 MBq, 7,15 mCi.

12.2 Detecció de la ubiquitinització *in vivo*

Per tal de detectar formes poliubiquitinitzades de proteïnes *in vivo*, es van tractar les cèl·lules durant 16 h amb 100µM ALLN (Calbiochem). L'ALLN és un inhibidor del proteasoma, i quan l'incorporem al medi impedim que certes proteïnes siguin degradades per aquesta via. Per tal de veure les formes poliubiquitinitzades d'una proteïna cal fer una immunoprecipitació seguida de *western blot* amb anticossos dirigits contra la proteïna que volem detectar si es poliubiquitinitza o bé contra la ubiquitina. És important tenir en compte que per tal de veure les formes poliubiquitinitzades cal preparar gels amb un baix percentatge d'acrilamida (6-7%). En ocasions els anticossos anti-proteïna no són prou sensibles per a detectar les formes ubiquitinitzades; en aquests casos és recomanable transfectar les cèl·lules amb la construcció HA-ubiquitina, i després de fer la immunoprecipitació contra la proteïna detectarem les formes poliubiquitinitzades amb anticossos anti-HA.

The most beautiful thing we can experience is the mysterious.

It is the source of all true art and all science.

*He to whom this emotion is a stranger,
who can no longer pause to wonder and stand rapt in awe,*

is as good as dead:

his eyes are closed.

Albert Einstein

RESULTATS

1. ACETILACIÓ DE PROTEÏNES DE CICLE CEL·LULAR

1.1. *Screening* inicial d'acetilació de proteïnes de cicle cel·lular

Per tal de perseguir el primer objectiu d'aquest estudi es van realitzar experiments d'immunoprecipitació (IP) de les proteïnes de cicle presents en extractes de cèl·lules HCT-116. Tot seguit es va fer l'anàlisi de l'estat d'acetilació d'aquestes proteïnes per *western blot* (WB) utilitzant anticossos anti-acetil-lisina.

Com es pot observar a la figura 1, es va aconseguir immunoprecipitar les proteïnes indicades, però en fer l'anàlisi del seu estat d'acetilació amb anticossos anti-acetil-lisina (ab193, Abcam) només es va detectar clarament l'acetilació de la proteïna p27 (ja descrita pel grup anteriorment), i en el cas de les ciclines D2, D3 i E s'intueix una possible banda d'acetilació. No es va detectar aquesta modificació a la resta de proteïnes analitzades mitjançant aquest sistema.

Els anticossos anti-acetil-lisina majoritàriament es generen utilitzant com a immunògens pèptids derivats d'histones acetilades. Per aquest motiu és possible que la seva capacitat de reconèixer residus de lisina acetilats en proteïnes que no siguin histones sigui limitada, i que aquesta sigui la causa de que no haguem trobat gaire proteïnes acetilades en el nostre estudi.

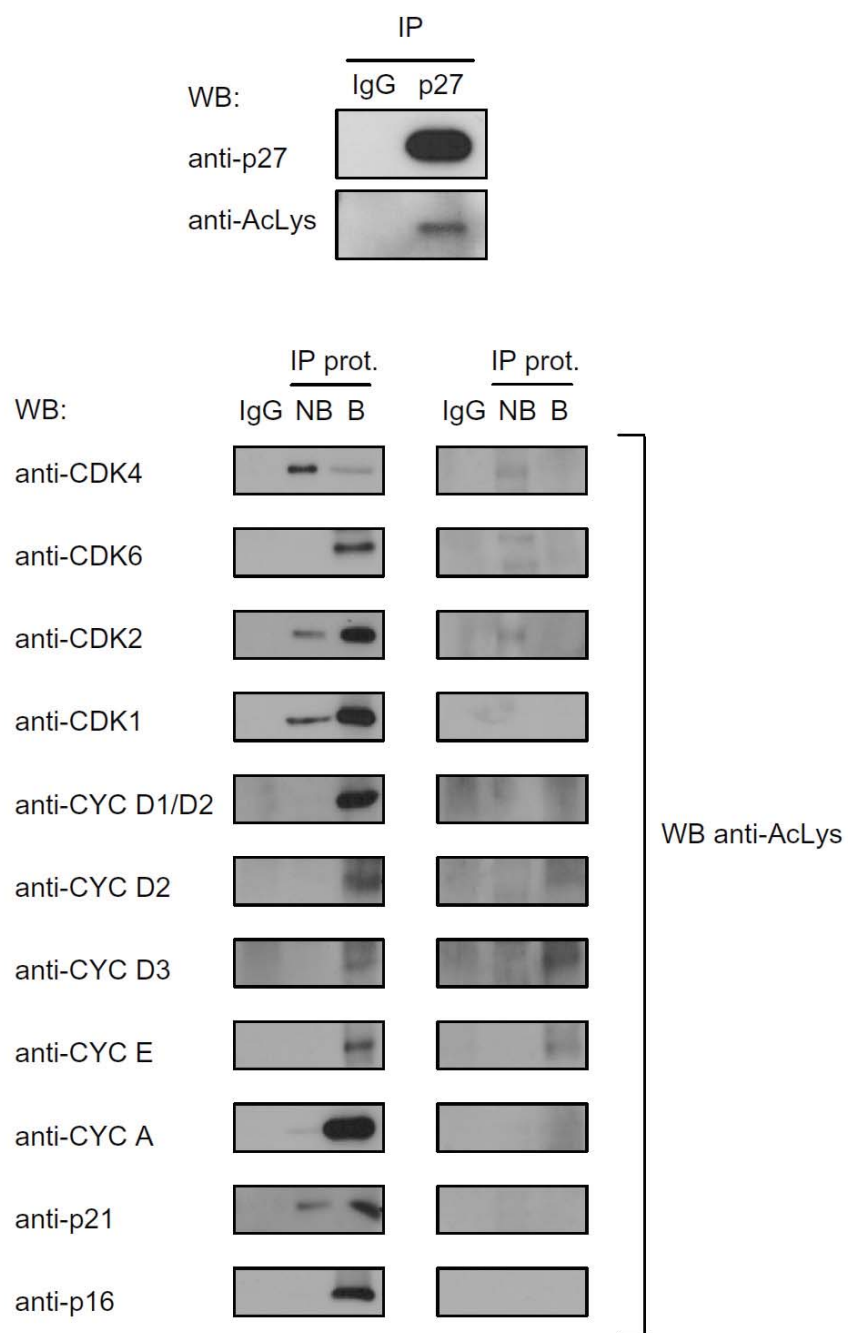
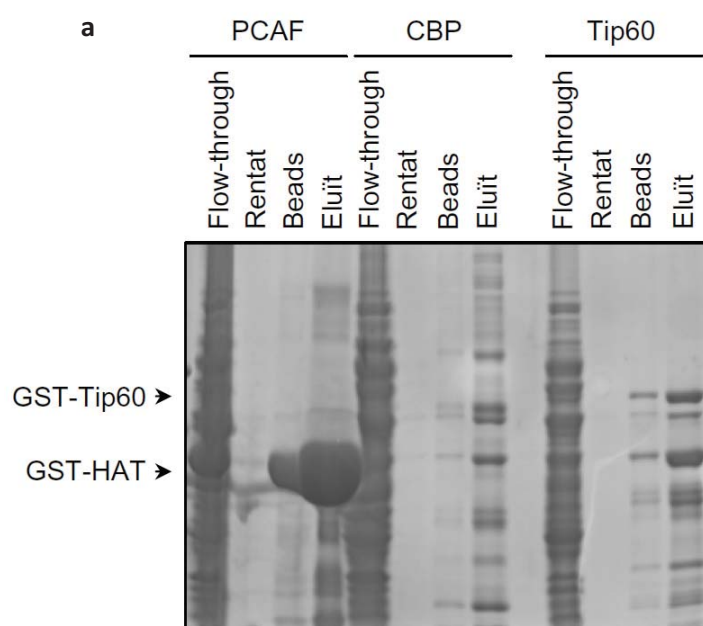


Figura 1. Screening d'acetilació de proteïnes de cicle. A partir d'extractes de cèl·lules HCT-116 es van realitzar IPs de proteïnes de cicle cel·lular amb anticossos específics o bé amb IgGs com a control negatiu. Per confirmar que s'havien immunoprecipitat les proteïnes de cicle es van realitzar WBs amb anticossos específics contra aquestes proteïnes (esquerra de la imatge). L'anàlisi de l'acetilació es va realitzar amb anticossos anti-acetil-lisina (AcLys) (dreta).

1.2. Acetilacions *in vitro*

Una altra manera d'estudiar si una proteïna pot ser modificada per acetilació és a través de les tècniques d'acetilació *in vitro*. Disposem d'un seguit d'acetiltransferases recombinants fusionades amb GST: PCAF (proteïna sencera i també només domini catalític (HAT)), CBP, Tip60, GCN5, p300 i TAF_{II}250. De totes aquestes proteïnes, hem aconseguit expressar en bacteris i purificar amb èxit PCAF, HAT (PCAF), CBP i Tip60. També disposem de molts gens que codifiquen proteïnes de cicle cel·lular clonats en vectors d'expressió en bacteris, entre ells: ciclines A, B1, D3 i E, CDK1, CDK2 i p27. Amb tot aquest material ens vam disposar a dur a terme aquest tipus d'experiments.

En primer lloc, cal que les acetilases que purifiquem siguin actives. Per mesurar l'activitat de les acetiltransferases es fan assajos acetilasa on posem en contacte la proteïna, una barreja d'histones (com a substrat acetilable) i acetilCoA marcat radioactivament amb ³H. A la figura 2 s'observa com, a mesura que incrementem el volum (i per tant la quantitat) d'acetilasa, incrementa l'acetilació de les histones mesurada com la quantitat de ³H incorporat. Per a fer els assajos d'acetilació *in vitro* posteriors, utilitzem el mínim volum d'acetilasa que presenti una activitat detectable (en situacions òptimes aquesta activitat oscil·la entre 5000 i 10000 cpm, però quan l'activitat se situa entre 1000 i 2000 cpm encara es pot detectar acetilació *in vitro*).



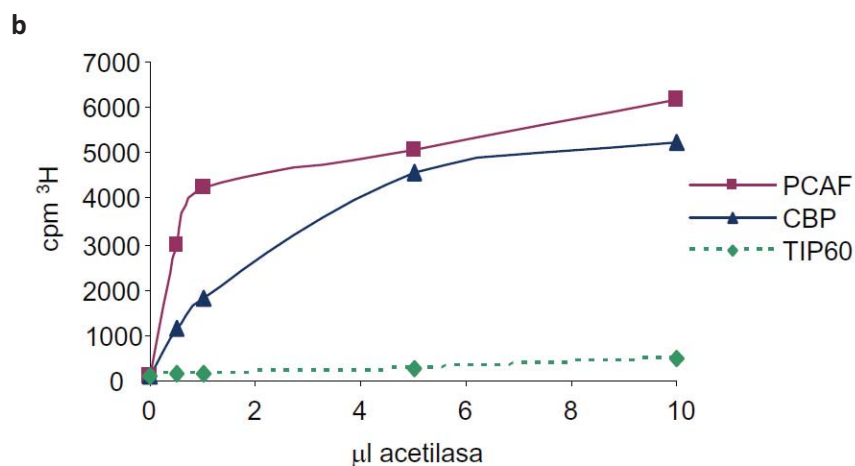


Figura 2. Purificació i determinació de l'activitat acetilasa. (a) Purificació de les acetilases PCAF (domini catalític HAT), CBP i Tip60. Mostres dels diferents passos de la purificació van ser resoltes en un gel de SDS-acrilamida i visualitzades amb la tinció de blau de Coomassie. En el cas de CBP, el seu elevat pes molecular (>200 kDa) fa que la proteïna es degradi molt i majoritàriament quedi retinguda a la part alta del gel (*stacking*). (b) Gràfica de l'activitat acetilasa (mesurada com a cpm de ³H incorporat per les histones) corresponent a diferents volums de les acetiltransferases purificades.

Els assajos d'acetilació *in vitro* consisteixen en posar en contacte una acetilasa amb una proteïna candidata a ser-ne el substrat. Com a cofactor es fa servir acetilCoA marcat radioactivament amb ¹⁴C. Si l'enzim acetila el substrat, li transferirà un grup acetil aportat per l'acetilCoA que estarà marcat radioactivament, i ho podem detectar per autoradiografia. A la figura 3 es presenten els resultats de diversos experiments d'acetilació *in vitro* utilitzant com acetilases CBP o el domini catalític HAT de PCAF. L'autoacetilació del domini HAT de PCAF i l'acetilació de p27 van ser utilitzats com a controls positius d'aquests experiments, mentre que els controls negatius són per una banda el GST (perquè la majoria de proteïnes utilitzades estaven fusionades amb GST, i havíem de comprovar que la seva acetilació no fos deguda a l'acetilació d'aquest *tag*) i per una altra banda, la pròpia proteïna incubada amb acetilCoA¹⁴C però sense acetilasa, per tal de descartar que la proteïna es pogués autoacetilar. D'aquests experiments podem concloure que la ciclina A i CDK2 són clarament acetilades per PCAF (figura 3b i c), i CDK1 i ciclina E també podrien ser substrat d'aquesta acetilasa (figura 3e). A més, a l'apartat (d) observem que si posem en contacte ciclina A, CDK2 i p27, totes tres són acetilades per PCAF, tot i que amb diferents eficiències. Per una altra banda, les ciclines D3 i B1 no són acetilades *in vitro* per PCAF ni per CBP (figura 3a).

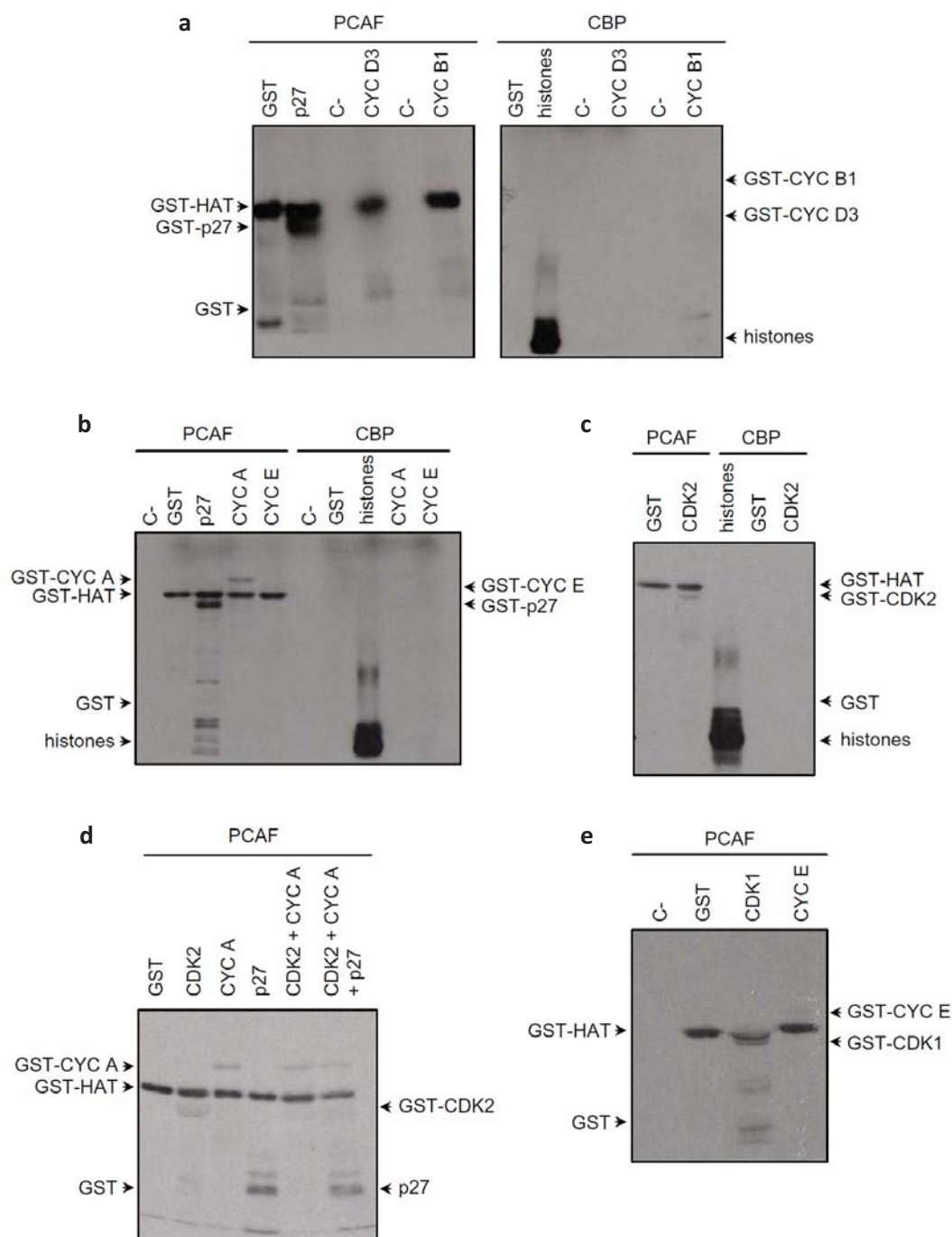


Figura 3. Assajos d'acetilació *in vitro*. Totes les imatges que es mostren són autoradiografies. **(a)** Acetilació de ciclina D3 i ciclina B1 per PCAF i CBP. L'autoacetilació de PCAF és un control de que la proteïna és activa. En el cas de CBP, el control de la seva activitat ve donat per l'acetilació d'histones. La p27 va ser utilitzada com a control positiu de la reacció. Després de les reaccions d'acetilació, les mostres van ser resoltes en un gel de SDS-acrilamida, transferides a una membrana de nitrocel·lulosa i analitzades per autoradiografia. **(b)** Acetilació de ciclina A i ciclina E per PCAF i CBP. **(c)** Acetilació de CDK2. **(d)** Acetilació per PCAF de ciclina A, CDK2 i p27 combinades. **(e)** Acetilació de CDK1 i ciclina E per PCAF.

Ciclina A i CDK2 formen un complex proteic *in vivo* que pot ser inhibit per p27. El fet que aquestes tres proteïnes s'acetilin *in vitro* per PCAF és molt interessant i ens va animar a perseguir la detecció de l'acetilació *in vivo* de ciclina A i CDK2 i la rellevància funcional d'aquesta modificació.

2. L'ACETILACIÓ DE CICLINA A

2.1. Acetilació *in vivo* de ciclina A

Anteriorment havíem provat de detectar l'acetilació de la ciclina A a través de la IP de la proteïna endògena seguida de WB amb anticossos anti-acetil-lisina. Davant el poc èxit d'aquests experiments, vam intentar optimitzar les condicions: vam incrementar la quantitat d'extracte proteic per fer les IPs (2-7 mg), vam canviar d'anticòs anti-acetil-lisina (#9441, Cell Signaling) i vam sincronitzar cèl·lules HCT-116 a la fase G₂/M del cicle cel·lular, quan els nivells de ciclina A són més alts, mitjançant un doble bloqueig de timidina seguit de l'alliberació en medi normal durant 5 h. Com es pot veure a la figura 4a, amb aquestes noves condicions vam aconseguir detectar l'acetilació de la ciclina A endògena. També vam provar de veure si podíem detectar l'acetilació d'una ciclina A ectòpica clonada en un vector pEF-HA quan la transfectàvem en cèl·lules HCT-116. En aquest cas, sense necessitat de sincronitzar les cèl·lules, només fent IP amb anticossos anti-HA o IgG com a control seguit de l'anàlisi per WB vam detectar novament la ciclina A acetilada (figura 4b).

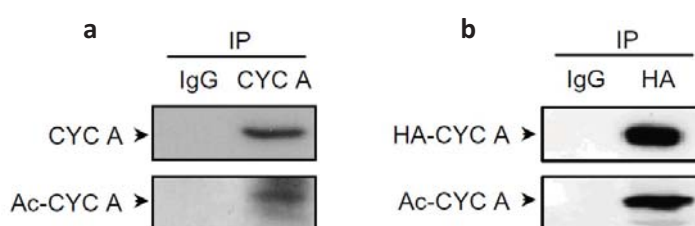


Figura 4. La ciclina A es troba acetilada *in vivo*. (a) Acetilació de la ciclina A endògena procedent d'extractes de cèl·lules HCT-116 sincronitzades a G₂/M. (b) Acetilació de la ciclina A ectòpica (HA-CYC A).

Una altra manera de detectar l'acetilació *in vivo* d'una proteïna consisteix en realitzar experiments d'incorporació d'acetat de sodi marcat amb ^3H . En aquesta ocasió, cèl·lules HCT-116 van ser transfectades amb HA-ciclina A i Flag-PCAF i posteriorment van ser tractades durant 4 h amb un medi de cultiu que contenia acetat de sodi ^3H (que aportaria grups acetil radioactius que marcarien les proteïnes acetilades), inhibidors de deacetilases (TSA i/o butirat sòdic, per evitar la deacetilació) i cicloheximida (per inhibir la síntesi de proteïnes noves i per tant la $\text{N}\alpha$ -acetilació que afecta la majoria de proteïnes de nova síntesi). Tot seguit es va procedir a la lisi de les cèl·lules i la IP utilitzant anticossos anti-HA. Finalment, les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida, es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa i es van analitzar per autoradiografia, donant lloc al resultat observat a la figura 5.

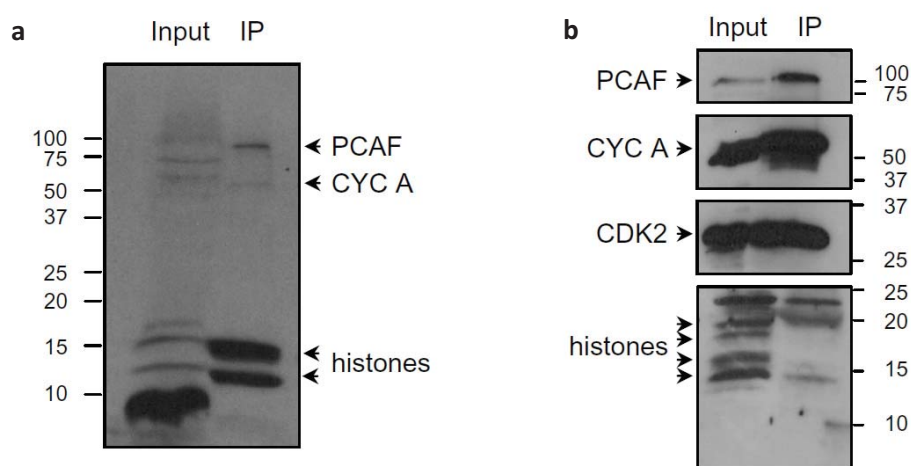


Figura 5. Experiment d'acetilació amb acetat de sodi ^3H . Cèl·lules HCT-116 van ser transfectades amb HA-ciclina A i Flag-PCAF i seguidament van ser incubades durant 4 h en un medi amb acetat de sodi ^3H (i altres components explicats al text). Després es van lissar i es van realitzar IPs amb anti-HA. Les mostres van ser resoltes per SDS-PAGE, transferides a membranes de nitrocel·lulosa i finalment analitzades per autoradiografia **(a)** o per WB **(b)**.

Al WB control de la immunoprecipitació (apartat b) veiem que hem immunoprecipitat HA-ciclina A, la qual coprecipita amb PCAF, CDK2 i algunes histones (possiblement la histona H1 (20 kDa) i les histones H2A i H2B i/o H3 (fan 14.10, 14.03 i 15.2 kDa, respectivament)). A l'autoradiografia (apartat a) es veuen bandes d'acetilació a l'alçada de la ciclina A, PCAF i les histones més petites (H2A/B, H3), però no a l'alçada de CDK2.

2.2. PCAF acetila la ciclina A *in vitro*

A l'apartat 1 de la secció de resultats hem explicat com vam detectar per primer cop l'acetilació *in vitro* de la ciclina A. Després de confirmar *in vivo* que la ciclina A s'acetila, vam repetir els assajos d'acetilació *in vitro* de manera més acurada i afegint una altra acetilasa més, Tip60, com es pot veure a la figura 6. Amb aquests experiments vam tornar a confirmar que la ciclina A és acetilada *in vitro* per PCAF, i no per CBP ni per Tip60.

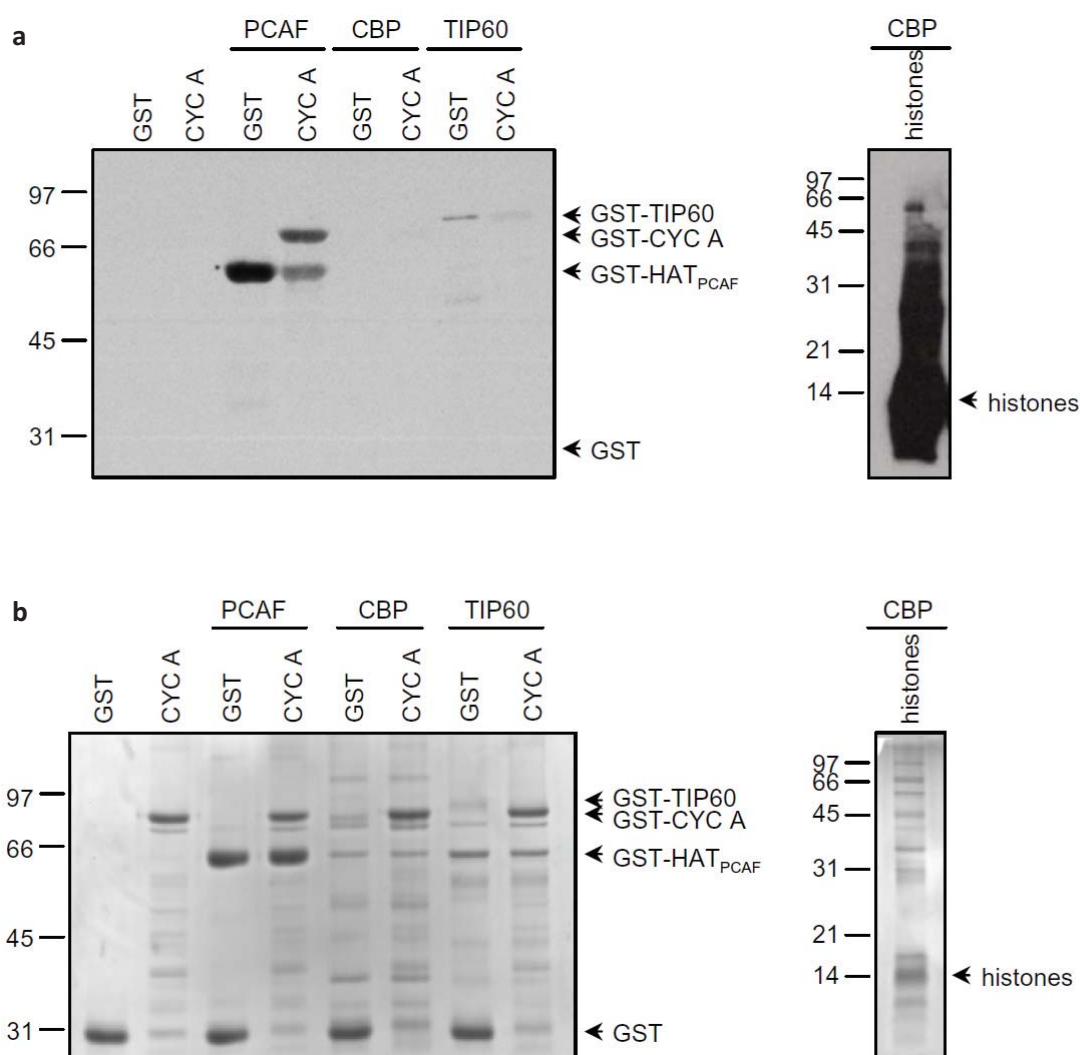


Figura 6. Acetilació *in vitro* de ciclina pel domini catalític HAT de PCAF, CBP i Tip60. (a) Autoradiografia. **(b)** Control de càrrega del gel de SDS-acrilamida utilitzat per resoldre les mostres de l'acetilació *in vitro* tenyit amb blau de Coomassie.

2.3. PCAF acetila la ciclina A *in vivo*

Per tal de saber si l'acetilasa PCAF és la responsable de l'acetilació *in vivo* de la ciclina A vam deplecionar els nivells de PCAF en cèl·lules HCT-116 mitjançant un siRNA dirigit contra els transcrits de PCAF. També vam transfectar les cèl·lules amb HA-ciclina A. Tot seguit vam realitzar IPs amb anti-HA, vam separar les proteïnes de les mostres per electroforesi i vam detectar els nivells de PCAF, ciclina A i l'acetilació de ciclina A per WB. Tal com es veu a la figura 7a, el siRNA dirigit contra PCAF provoca una dràstica disminució dels nivells d'aquesta proteïna. A les cèl·lules tractades amb el siRNA de PCAF els nivells d'acetilació de la ciclina A són baixos en comparació amb els nivells d'acetilació de la ciclina A en cèl·lules transfectades amb el siRNA control. Aquesta diferència encara es veu més accentuada a l'experiment on vam cotransfectar Flag-PCAF i HA-ciclina A juntament amb el siRNA de PCAF (figura 7b). Aquests resultats indiquen que PCAF és l'enzim que acetila majoritàriament la ciclina A *in vivo*. L'acetilasa GCN5 pertany a la família de PCAF i, com que en ocasions aquests enzims tenen funcions redundants, vam voler determinar si també era capaç d'acetilar la ciclina A. Per aquest motiu vam cotransfectar cèl·lules HCT-116 amb Flag-GCN5, HA-ciclina A i el siRNA de GCN5 o bé un siRNA control. En aquest cas no sembla que l'absència de GCN5 afecti els nivells d'acetilació de la ciclina A.

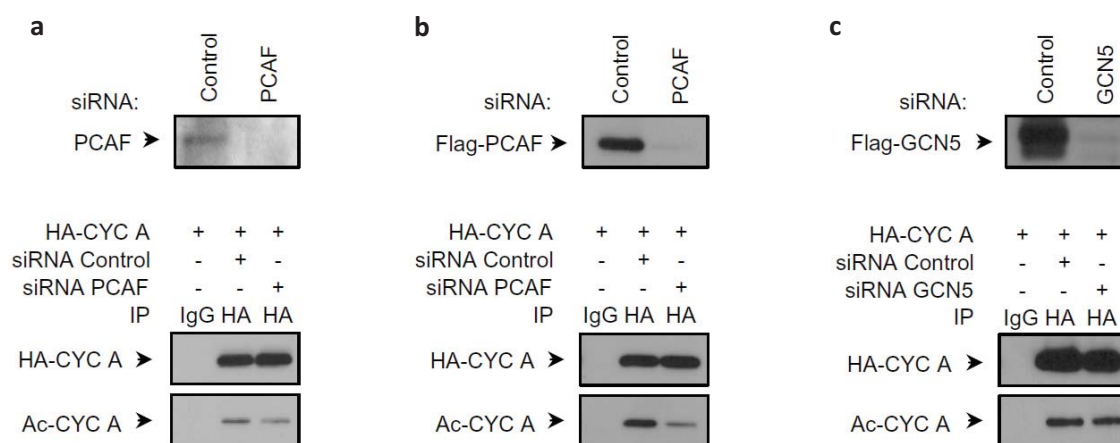


Figura 7. PCAF acetila la ciclina A *in vivo*. (a) Cèl·lules HCT-116 van ser transfectades amb HA-ciclina A i siRNA control o dirigit contra PCAF. Posteriorment es van lisar i es van realitzar IPs amb anticossos anti HA o IgG com a control. Les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida i després van ser analitzades per WB amb anti-PCAF, anti-HA i anti-acetil-lisina. El panell superior correspon al WB dels extractes cel·lulars per comprovar si els siRNA havien funcionat. (b) Igual que a (a), però en aquest cas vam transfectar les cèl·lules també amb Flag-PCAF. (c) En aquest cas vam seguir el mateix procediment que a (b), però vam transfectar les cèl·lules amb Flag-GCN5 i siRNA contra GCN5.

2.4. Anàlisi de la interacció de ciclina A amb PCAF

Per tal de saber si la ciclina A i PCAF interaccionen dins la cèl·lula i quina és la naturalesa d'aquesta interacció vam fer diferents experiments. En primer lloc, vam voler determinar si ciclina A i PCAF presenten la mateixa localització subcel·lular. Per assolir aquest objectiu, vam generar construccions de ciclina A i PCAF fusionades amb les proteïnes fluorescents *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) i *Yellow Fluorescent Protein* (YFP). Es van transfectar cèl·lules COS-1 amb aquestes construccions. Després de 24 h d'expressió, les mostres van ser fixades i analitzades per microscòpia de fluorescència, com es mostra a la figura 8. Tant ciclina A com PCAF colocalitzen en el nucli.

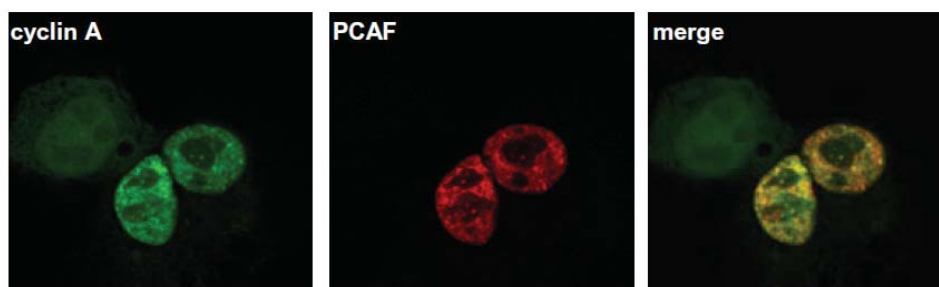


Figura 8. Ciclina A i PCAF colocalitzen al nucli. Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb les construccions CFP-ciclina A i YFP-PCAF, fixades (veure "Materials i Mètodes") i observades per microscòpia de fluorescència.

A continuació vam realitzar experiments d'immunoprecipitació per tal de veure si aquestes proteïnes interaccionen ja sigui directa o indirectament dins la cèl·lula. Vam transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions YFP-PCAF i HA-ciclina A, i més endavant vam utilitzar aquests extractes cel·lulars per realitzar IPs amb anticossos anti-HA. Tal i com es veu a la figura 9, ciclina A i PCAF coimmunoprecipiten. A la figura també observem que CDK2 coprecipita amb la ciclina A, la qual cosa és lògica ja que formen un complex proteic. No obstant, d'aquest resultat no podem inferir necessàriament que totes les proteïnes del complex ciclina A-CDK2 coprecipiten amb PCAF, ja que pot ser que estiguem precipitant diferents tipus de complexes: per una banda, ciclina A-CDK2, i per una altra, ciclina A-PCAF.

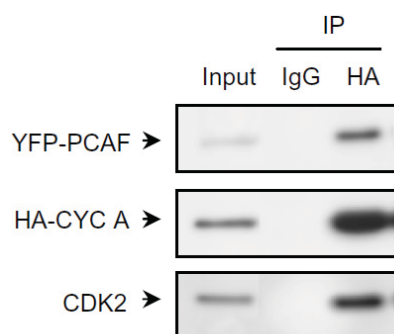


Figura 9. PCAF i ciclina A coimmunoprecipiten.

Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb HA-ciclina A i YFP-PCAF. Els extractes cel·lulars es van sotmetre a IP utilitzant anti-HA o IgG com a control. Les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-HA, PCAF i CDK2.

Per saber si ciclina A i PCAF interaccionen de manera directa o indirecta es van fer assajos de *Surface Plasmon Resonance* (SPR). En aquests experiments, PCAF (proteïna purificada, sense GST) es va acoblar a un carril d'un xip de dextrans carboximetilats (CM5) utilitzant el mètode d'acoblament per amines. Per aquest mateix mètode es va fer la fixació d'un carril control, que seria tractat com a superfície de referència. Tot seguit es va fer passar una solució que contenia ciclina A purificada (i sense GST) pels carrils control i PCAF. La interacció entre la ciclina A i la superfície control o la superfície amb PCAF es troba representada al sensograma de la figura 10, on es mostren les unitats de ressonància (provocades per la interacció de ciclina A amb la superfície del xip) al llarg del temps. La conclusió d'aquest experiment és que la ciclina A interacciona amb PCAF de manera directa.

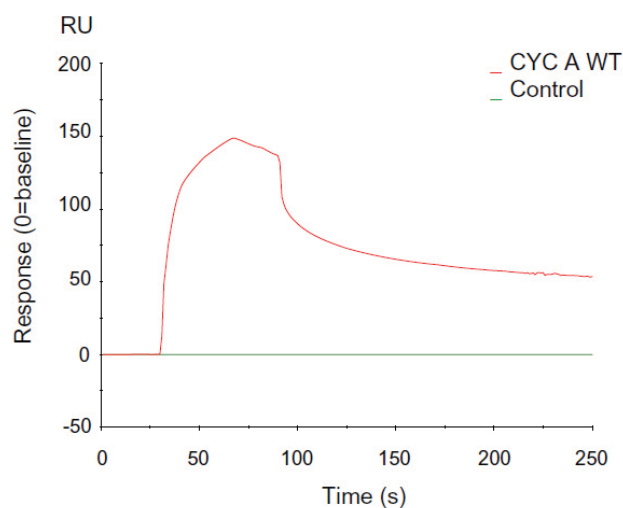


Figura 10. Ciclina A i PCAF interaccionen directament. Per tal de comprovar si la interacció de ciclina A amb PCAF és directa o indirecta, es van fer assajos de SPR (veure "Materials i Mètodes") on PCAF purificada o bé un blanc es fixaven a un xip tipus CM5. Posteriorment, s'injectava una solució control o amb ciclina A purificada per sobre del xip. La interacció entre les proteïnes és detectada per uns sensors i es representa amb un sensograma com el de la figura. Per fer aquests experiments es va utilitzar un BIAcore T100.

Tot seguit ens vam proposar determinar en quin moment del cicle cel·lular té lloc la interacció de ciclina A i PCAF. Vam transfectar cèl·lules HeLa amb YFP-PCAF i HA-ciclina A i les vam sincronitzar utilitzant timidina i nocodazol. Per tal d'obtenir cèl·lules en fase S, vam tractar les cèl·lules transfectades amb un doble bloqueig de timidina. Per obtenir el punt de G₂/M, vam alliberar les cèl·lules del bloqueig de timidina i els vam posar medi fresc durant 4 h, al cap de les quals vam recollir el punt. El punt de metafase procedeix de cèl·lules tractades durant 16 h amb nocodazol, i el punt de G₁ procedeix de cèl·lules tractades 16 h amb nocodazol i després rentades i posades en medi fresc durant 3-4 h. Finalment, vam realitzar IPs amb anti-HA amb aquests extractes de cèl·lules transfectades i en diferents fases del cicle i vam analitzar les mostres per WB. Al panell de l'esquerra de la figura 11 hi ha una anàlisi dels nivells de diferents proteïnes en els extractes cel·lulars. Veiem que els nivells de CDK2 són pràcticament constants al llarg del cicle, mentre que els de histona H3 fosforilada només són alts a la metafase mitòtica. D'altra banda els nivells de ciclina A són alts a les fases S i G₂/M, com és esperable ja que és en aquestes fases quan actuen els complexos ciclina A-CDK2 i ciclina A-CDK1. Pel que fa a PCAF, els seus nivells varien de la mateixa manera que els nivells de ciclina A. Al panell de la dreta veiem el resultat de l'experiment d'immunoprecipitació. PCAF i ciclina A coprecipiten majoritàriament a les fases S i G₂/M, coincidint amb els moments en què els seus nivells són més elevats. També en aquestes fases la ciclina A està acetilada (de fet, sembla que l'acetilació augmenta a G₂/M).

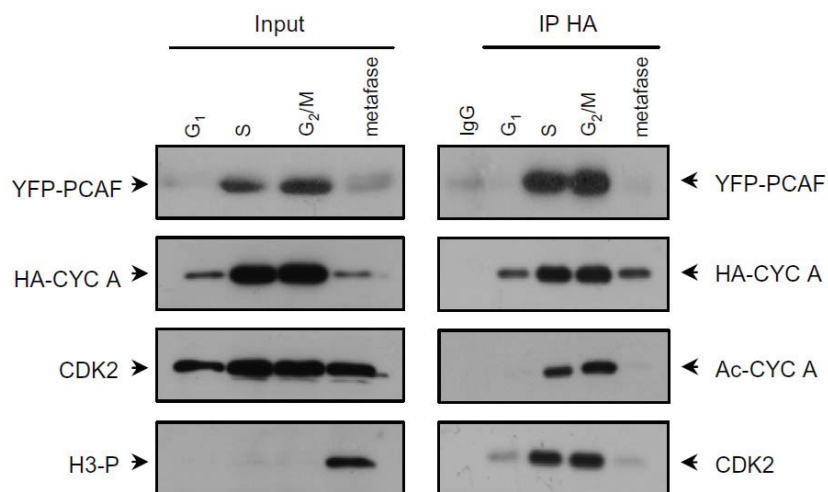


Figura 11. Ciclina A i PCAF interaccionen a les fases S i G₂/M del cicle cel·lular. Cèl·lules HeLa transfectades amb YFP-PCAF i HA-ciclina A van ser sincronitzades utilitzant timidina i nocodazol (veure "Materials i Mètodes"). Es van recollir mostres representatives de diferents fases del cicle i els nivells de diferents proteïnes es van analitzar per WB (panell esquerre). Els extractes cel·lulars també van ser sotmesos a IP amb anticossos anti-HA o IgG com a control, i l'anàlisi per WB de les proteïnes precipitades es mostra al panell de la dreta.

2.5. Identificació dels residus de lisina que s'acetilen

A continuació ens vam proposar descobrir quins residus de lisina de la ciclina A eren acetilats per PCAF *in vitro*. La ciclina A presenta 31 residus de lisina (figura 12). Com a primera aproximació per identificar quins d'aquests residus s'acetilen, vam tenir en compte el treball de (Fung et al., 2005), on s'identifiquen les lisines 37, 54 i 68 de la ciclina A com a llocs d'ubiquitinització. Aquest i altres treballs anteriors (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001) indiquen que a la regió compresa entre els aminoàcids 1 i 171 de la ciclina A és on es troben els dominis implicats en la seva degradació: la D-box, que és reconeguda per la maquinària de degradació de la cèl·lula, i les lisines susceptibles de ser ubiquitinitzades. Els mutants de ciclina A que no presenten aquests primers 171 aminoàcids són estables, ja que no poden ser ubiquitinitzats ni per tant degradats pel sistema ubiquitina-proteasoma (Fung et al., 2005).

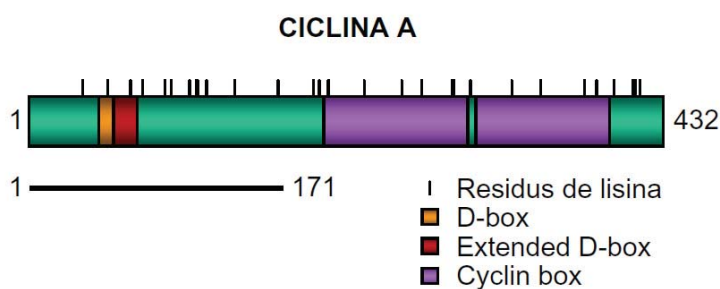


Figura 12. Esquema dels dominis de la ciclina A i la localització dels seus residus de lisina.

A més, tal i com hem explicat a la introducció, la ubiquitinització i l'acetilació són dos tipus de modificacions post-traduccionals que poden experimentar els residus de lisina i són mútuament excloents en el mateix residu, de manera que es poden donar situacions de competència que marquin l'estabilitat d'una proteïna (és a dir, si un determinat residu és ubiquitinitzat, la proteïna es degrada, mentre que si aquest mateix residu s'acetila, la proteïna és estable). Per tots aquests motius vam decidir analitzar si hi havia residus de lisina dins de la regió que va dels aminoàcids 1 al 171 de la ciclina A que poguessin ser llocs d'acetilació.

Per assolir aquest objectiu es va recórrer a la tècnica del *spot-mapping*. Aquesta tècnica consisteix en la generació, a partir de la seqüència de la ciclina A en aquest cas, de pèptids d'uns 10 aminoàcids que contenen una lisina a la part central. Aquests pèptids es col·loquen

sobre una membrana de cel·lulosa i se sotmeten a un assaig d'acetilació *in vitro*, utilitzant PCAF com a acetilasa i acetilCoA¹⁴C com a cofactor. L'acetilació d'un pèptid de la histona H3 s'utilitza com a control positiu de la reacció. Tal i com s'aprecia a la figura 13, els pèptids 3, 4, 7, 9 i 11 s'acetilaven, i això es tradueix en què les lisines 54, 68, 95 i 112 són llocs acetilats per PCAF *in vitro*.

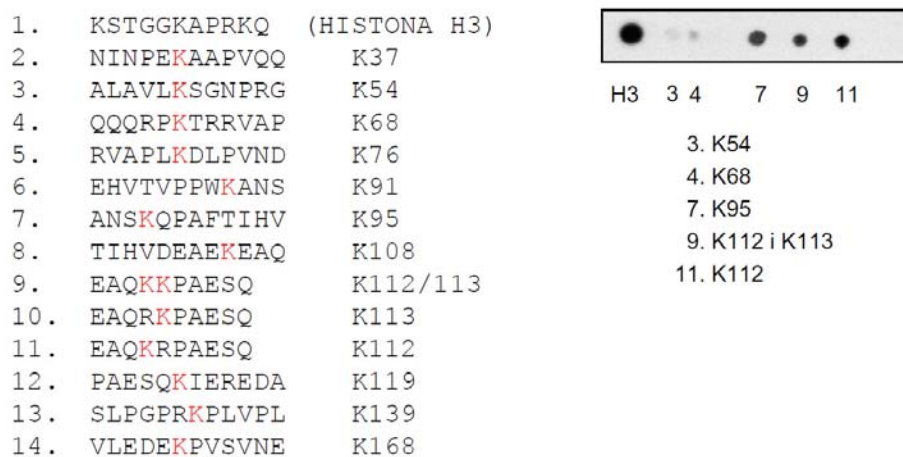


Figura 13. Spot-mapping de la ciclina A. Esquerra: seqüències dels pèptids utilitzats en l'assaig. Dreta: autoradiografia de la membrana.

Per comprovar si aquests residus podien ser llocs d'acetilació dins la conformació de la proteïna ciclina A sencera, es va generar el mutant ciclina A 4R, que presentava les lisines 54, 68, 95 i 112 mutades a arginina (R), un aminoàcid que preserva l'estructura de l'aminoàcid lisina (K), però que no pot ser acetilat. En realitzar assajos d'acetilació *in vitro* comparant la ciclina A *wild type* (WT) amb la ciclina A 4R, es va veure que clarament la ciclina A 4R no és acetilada *in vitro* per PCAF.

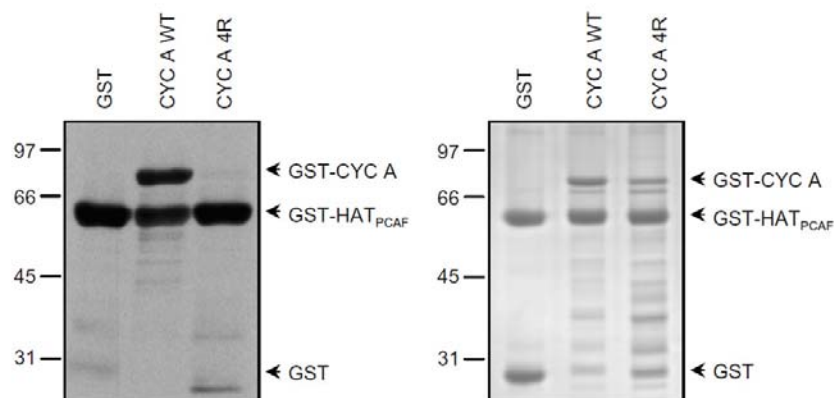


Figura 14. Acetilació *in vitro* de ciclina A WT versus 4R. Les proteïnes ciclina A WT i 4R es van sotmetre a assajos

d'acetilació *in vitro* utilitzant el domini HAT de PCAF com a acetilasa, l'autoacetilació de PCAF com a control positiu, i GST com a control negatiu. Esquerra: autoradiografia; dreta: control de càrrega de les proteïnes utilitzades per l'assaig tenyit amb blau de Coomassie.

Finalment vam voler comprovar si aquestes lisines de la ciclina A acetilades *in vitro* podien ser llocs d'acetilació de la proteïna *in vivo*. Per aquest motiu es van generar les construccions Flag-ciclina A WT i Flag-ciclina A 4R, es van transfectar a cèl·lules HeLa i es van realitzar IPs amb anticossos anti-Flag, seguits de WB amb anticossos anti-acetil-lisina. Com s'aprecia a la figura 15, la ciclina A WT s'acetila, mentre que la ciclina A 4R pràcticament no s'acetila gens, demostrant que les lisines 54, 68, 95 i 112 són els llocs majoritaris d'acetilació *in vivo*.

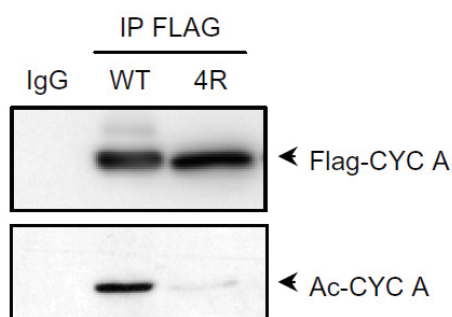


Figura 15. Acetilació *in vivo* de ciclina A WT versus 4R. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb Flag-ciclina A WT o bé Flag-ciclina A 4R, es van realitzar IPs amb anti-Flag o IgG com a control, i tot seguit les mostres van ser resoltes en un gel de SDS-acrilamida, van ser transferides a una membrana de nitrocel·lulosa i es van analitzar per WB amb anti-Flag i anti-acetil-lisina.

2.6. Estudi de l'efecte de l'acetilació de la ciclina A

🔗 Anàlisi de la vida mitja

Per tal d'estudiar els efectes de l'acetilació de la ciclina A vam transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions Flag-ciclina A WT (*wild type*) o Flag-ciclina A 4R (mutant no acetilable) i vam analitzar diferents paràmetres. En primer lloc, donat que els residus acetilables es troben en una regió molt important per l'estabilitat de la ciclina A, vam comparar la vida mitja de ciclina A WT i 4R. Es van transfectar cèl·lules HeLa amb Flag-ciclina A WT o bé Flag-ciclina A 4R i posteriorment es van tractar amb cicloheximida durant els temps indicats a la figura 16. Tal i com s'observa a la figura, a les 6 h de tractament amb cicloheximida la quantitat de proteïna

Flag-ciclina A WT ha quedat reduïda a la meitat, mentre que encara queda més del 80% de la proteïna 4R. Per tant, el mutant 4R té una vida mitja més llarga que la proteïna WT; és a dir, és més estable.

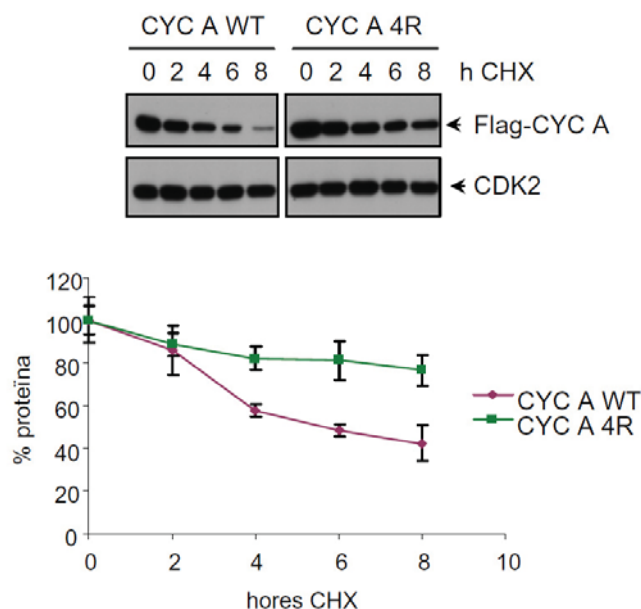


Figura 16. Vida mitja de ciclina A WT versus 4R. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-ciclina A WT o 4R i 24 h post-transfecció van ser tractades amb cicloheximida (CHX) durant els temps indicats. Els extractes cel·lulars van ser analitzats per WB amb anticossos anti-Flag i anti-CDK2 (aquest últim es va fer servir com a control de càrrega). A la gràfica es presenten les dades \pm SE corresponents a 8 experiments independents. SE, error estàndard.

A continuació ens vam plantejar la necessitat de trobar unes condicions on la ciclina A endògena estigués molt acetilada per tal de poder comparar la seva vida mitja amb la d'una ciclina A en condicions normals. Per això vam comprovar l'estat d'acetilació de la ciclina A en cèl·lules control i cèl·lules que havien estat tractades durant 16 h amb diferents inhibidors de deacetilases (NaB i TSA). Com es pot veure a la figura, les cèl·lules tractades amb inhibidors de deacetilases presenten nivells elevats d'acetilació d'histones, i quan fem IP contra la ciclina A endògena resulta que aquesta proteïna també està molt acetilada. Si analitzem la vida mitja de la ciclina A en aquestes condicions, veiem que és més curta a les cèl·lules tractades amb NaB i TSA. Per tant, sembla que l'acetilació de la ciclina A la fa menys estable, és a dir, l'acetilació podria conduir a la degradació de la ciclina A. De fet, si ens fixem en els nivells totals de ciclina A als extractes cel·lulars (apartat (a), panell superior a l'esquerra) veiem que la quantitat

d'aquesta proteïna es veu disminuïda en els tractaments amb inhibidors de deacetilases, suggerint que l'acetilació podria conduir a la seva degradació.

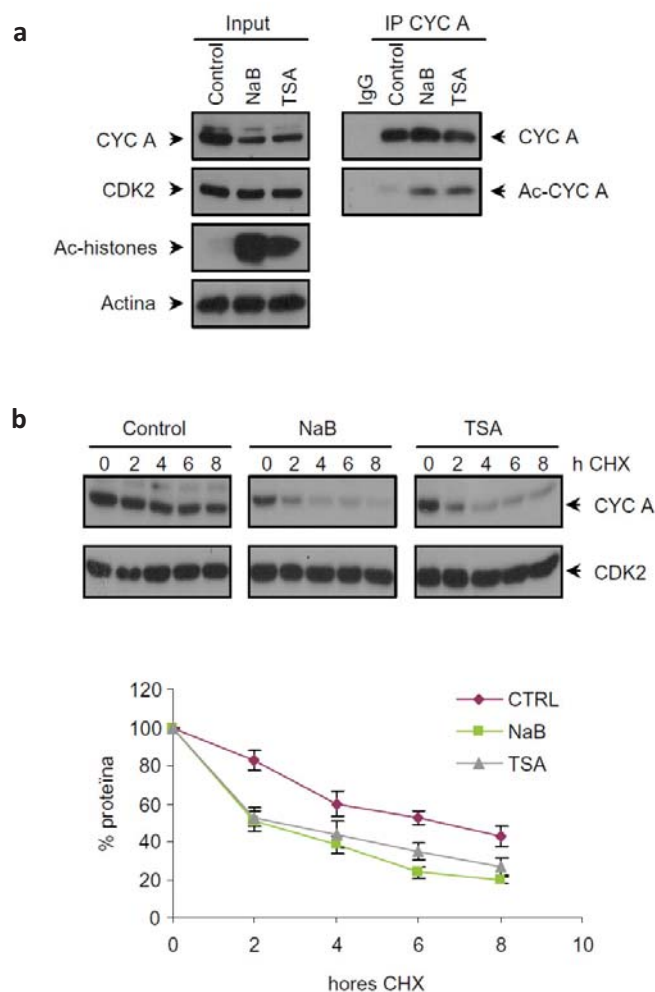


Figura 17. Comparació de la vida mitja de la ciclina A en diferents condicions. (a) Cèl·lules HCT-116 van ser tractades amb els inhibidors de deacetilases NaB (4 mM) i TSA (200-500 nM) o amb DMSO (vehicle de la solució de TSA) com a control. Després de 16 h de tractament es van preparar els extractes cel·lulars i es van analitzar per WB utilitzant anticossos anti-ciclina A, CDK2, acetil-lisina i actina (esquerra). Part dels extractes es va utilitzar per realitzar IPs amb anticossos anti-ciclina A o IgG com a control, seguit de l'anàlisi per WB amb anticossos anti-ciclina A i anti-acetil-lisina (dreta). (b) Es van sotmetre cèl·lules HCT-116 als mateixos tractaments explicats a l'apartat (a), i a continuació es va afegir cicloheximida (CHX) al medi de cultiu i es van recollir mostres als temps indicats. Els extractes cel·lulars van ser analitzats per WB amb anticossos anti-ciclina A i anti-CDK2 (aquest últim es va fer servir com a control de càrrega). A la gràfica es presenten les dades \pm SE corresponents a 6 experiments independents.

Existeixen diferents treballs que afirmen que el canvi de l'aminoàcid lisina per una glutamina mimetitzava els efectes de l'acetilació. Per exemple, aquest canvi en un lloc d'acetilació de la histona H4 fa que aquesta es comporti de la mateixa manera que quan està

acetilada (Hecht et al., 1995). A la figura 18 es mostra la similitud estructural entre un residu de lisina acetilat i l'aminoàcid glutamina (Li et al., 2002).

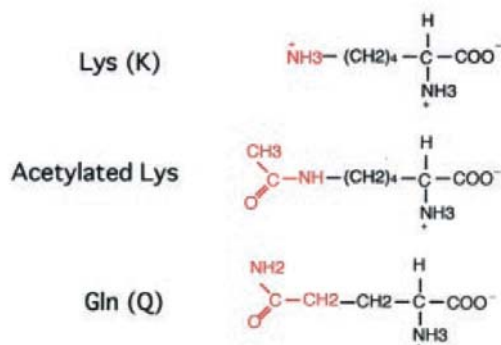


Figura 18. El canvi lisina \rightarrow glutamina mimetitzava els efectes de l'acetilació. Representació esquemàtica de la similitud estructural entre els residus de lisina acetilats i l'aminoàcid glutamina. Extret de (Li et al., 2002).

Tenint en compte aquesta dada, vam generar el mutant ciclina A 4Q i vam analitzar la seva vida mitja en comparació amb la de ciclina A WT i 4R. Com a resultat vam obtenir que la vida mitja del mutant ciclina A 4Q és inferior a la del mutant 4R, però una mica més llarga que la de ciclina A WT. Per tant, aquest mutant no reflecteix prou acuradament el comportament de la ciclina A acetilada que hem mostrat anteriorment. Aquesta diferència podria ser causada per canvis conformacionals en el mutant 4Q que afectin el seu reconeixement pel proteasoma, per exemple.

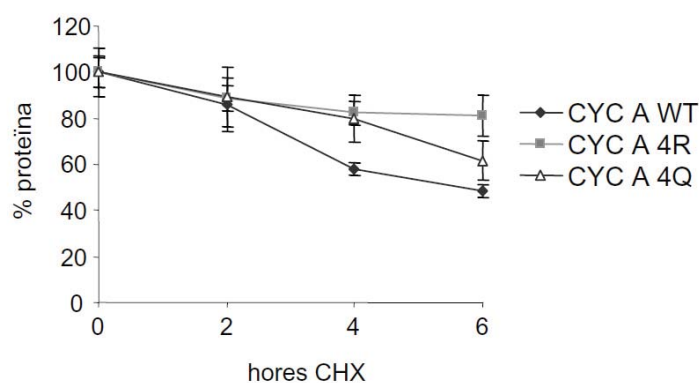
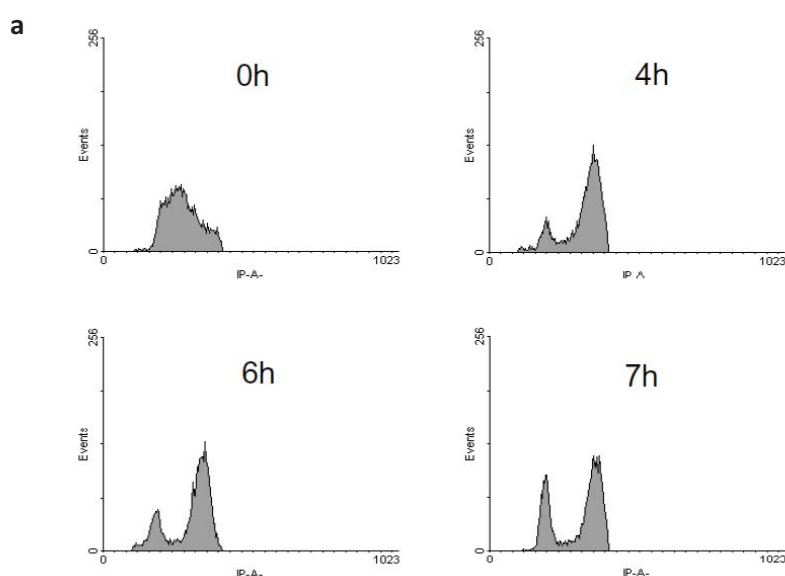


Figura 19. Comparació de la vida mitja de ciclina A WT, 4R i 4Q. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-ciclina A WT, 4R o 4Q. 24 h post-transfecció van ser tractades amb cicloheximida durant els temps indicats. Les mostres dels extractes cel·lulars van ser resoltes en un gel de SDS-acrilamida i analitzades per WB amb anticossos anti-Flag i anti-CDK2 (aquest últim va ser utilitzat com a control de càrrega). A la figura es mostra la gràfica resum del percentatge de proteïna present a les mostres al llarg dels temps indicats de tractament amb cicloheximida. Els resultats són la mitjana \pm SE de 8 experiments independents.

Tornant als resultats anteriors mostrats a la figura 17, sembla que l'acetilació de la ciclina A podria conduir a la seva degradació. Com que la ciclina A es degrada via proteasoma, ens vam plantejar que seria interessant veure si la ubiquitinització i l'acetilació de la ciclina A es donen alhora. Si fos així, podríem concloure que probablement l'acetilació de la ciclina actua com una senyal que comportaria la seva ubiquitinització i posterior degradació. Per tal d'analitzar aquesta possibilitat, vam estudiar l'estat d'acetilació i ubiquitinització de la ciclina A en diferents estadis del cycle cel·lular. Sabem que la ciclina A s'expressa a partir de l'inici de la fase S i es degrada a partir de la prometafase mitòtica. Per aquest motiu vam decidir transfectar cèl·lules HeLa amb Flag-ciclina A WT i sincronitzar-les al principi de la fase S mitjançant un doble bloqueig de timidina. També vam tractar les cèl·lules amb l'inhibidor del proteasoma ALLN per tal de permetre l'acumulació de formes poliubiquitinitzades de la ciclina A. Tot seguit vam alliberar les cèl·lules del bloqueig tot posant-los medi fresc, i vam recollir punts de cèl·lules a diferents temps fins arribar a la mitosi. Vam fer un seguiment per FACS d'aquestes mostres (figura 20a), i una part la vam utilitzar per a fer experiments d'IP amb anticossos anti-Flag, seguit de l'anàlisi per WB de l'estat d'acetilació i d'ubiquitinització de la ciclina A (figura 20b). En les nostres condicions experimentals, després del doble bloqueig de timidina les cèl·lules es troben en fase S (0h), i a les 4 h de ser alliberades ja es troben a G₂/M. A les 7 h estan finalitzant la mitosi i comencem a tenir una població cel·lular en G₁. Si ens fixem en l'apartat (b) de la figura, veiem que hi ha un pic d'acetilació de la ciclina A entre les 4 i 6 h, coincidint amb la seva màxima ubiquitinització. Per tant, aquest experiment recolza la hipòtesi de que l'acetilació i la ubiquitinització de la ciclina A es donen simultàniament.



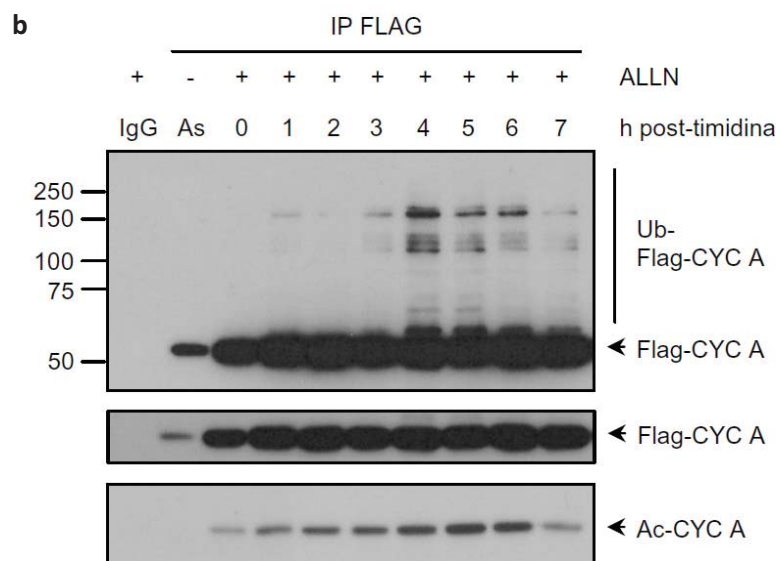


Figura 20. L'acetilació i la ubiquitinització de la ciclina A es donen simultàniament. (a) Seguiment per FACS de la distribució al llarg del cycle cel·lular de cèl·lules HeLa transfectades amb Flag-ciclina A WT i sincronitzades amb doble bloqueig de timidina. A partir del temps 0 h les cèl·lules van ser alliberades del bloqueig, recollides als temps indicats, i després fixades i tenyides amb iodur de propidi segons el protocol descrit a l'apartat "Materials i Mètodes". (b) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-ciclina A WT, sincronitzades amb un doble bloqueig de timidina i després alliberades i recollides als temps indicats a la figura. També van ser tractades amb ALLN durant 16 h. Els extractes cel·lulars obtinguts van ser sotmesos a IP amb anticossos anti-Flag o IgG com a control. Posteriorment es va realitzar l'anàlisi per WB de les mostres amb anticossos anti-Flag (panell superior) i anti-acetil-lisina (panell inferior). Una exposició curta del WB anti-Flag es mostra al panell del mig, com a control de la càrrega de ciclina A. Al segon carril es mostra un control de cèl·lules assincròniques no tractades amb ALLN per comprovar que la droga funciona.

🔗 Efecte del mutant 4R sobre el cycle cel·lular

A continuació vam voler profunditzar en els efectes que podria tenir sobre el cycle cel·lular la sobreexpressió del mutant no acetilable 4R. Per això vam transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions CFP-ciclina A WT o CFP-ciclina A 4R. Al cap de 48 h van ser fixades i vam analitzar per FACS el cycle de la població de cèl·lules transfectades (figura 21). En comparació amb un cycle control (cèl·lules transfectades amb un vector buit), les cèl·lules transfectades amb ciclina A WT presenten un lleuger increment del percentatge de cèl·lules que es troben a les fases S i G₂/M. En el cas de les cèl·lules que sobreexpressen el mutant 4R aquest increment és molt més gran, amb pràcticament un 45% de les cèl·lules aturades a la fase G₂/M. Per tant, l'estabilitat del mutant 4R té com a conseqüència l'aturada del cycle cel·lular a G₂/M, tal i com succeeix

emprant mutants de ciclina A no degradables que presenten delecions de la D-box o dels primers 90 o 171 aminoàcids (den Elzen and Pines, 2001; Fung et al., 2005; Geley et al., 2001).

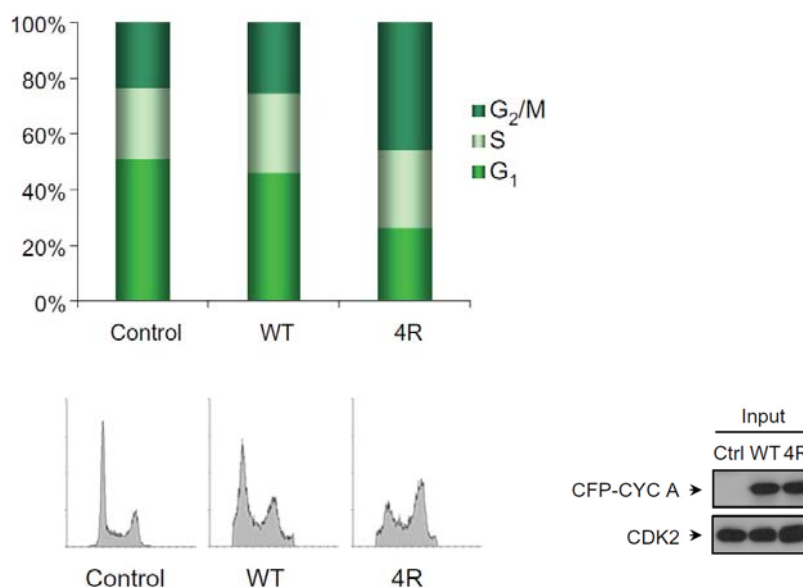


Figura 21. El mutant 4R provoca l'aturada del cycle cel·lular a G₂/M. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb un vector buit (control) o bé amb CFP-ciclina A WT o CFP-ciclina A 4R. 48 h després van ser recollides, fixades i tenyides amb iodur de propidi per marcar el seu contingut en DNA. Finalment van ser analitzades per FACS (panell inferior). Els percentatges de cèl·lules en cada fase estan representats a la gràfica. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu de tres experiments independents. A la figura també es mostra un control dels nivells d'expressió de CFP-ciclina A WT i 4R.

Amb l'anàlisi per citometria no podem distingir entre les cèl·lules que es troben a les fases G₂ o M del cycle cel·lular perquè en totes dues el contingut de DNA és el mateix (4n, perquè ja s'ha produït la replicació), per això parlem de cèl·lules que es troben a G₂/M. Per tal de poder fer aquesta distinció, vam transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions HA-∅, HA-ciclina A WT i HA-ciclina A 4R i després vam fer tincions per immunocitoquímica per visualitzar les cèl·lules transfectades i les que es trobaven en mitosi. Com s'aprecia a la figura, a les preparacions on havíem transfectat el mutant 4R hi havia més cèl·lules mitòtiques (positives per la tinció amb anti-histona H3 fosforilada). Una anàlisi més acurada ens va permetre determinar que les cèl·lules mitòtiques transfectades amb el mutant 4R es trobaven majoritàriament aturades a la metafase. A la taula presentem el resum del comptatge del nombre de cèl·lules transfectades amb les tres construccions que van donar positiu per la tinció de la histona i el percentatge d'aquestes cèl·lules que es trobava en metafase mitòtica.

	n	% mitosis (promig \pm SD)	% metafases (promig \pm SD)	% metafases/ mitosis (promig \pm SD)
HA- \emptyset	4027	1.72 \pm 0.45	0.37 \pm 0.04	22.68 \pm 3.63
HA-CYC A WT	3066	1.65 \pm 0.25	0.59 \pm 0.11	35.05 \pm 1.75
HA-CYC A 4R	3604	4.68 \pm 0.32	3.36 \pm 0.24	71.92 \pm 0.58

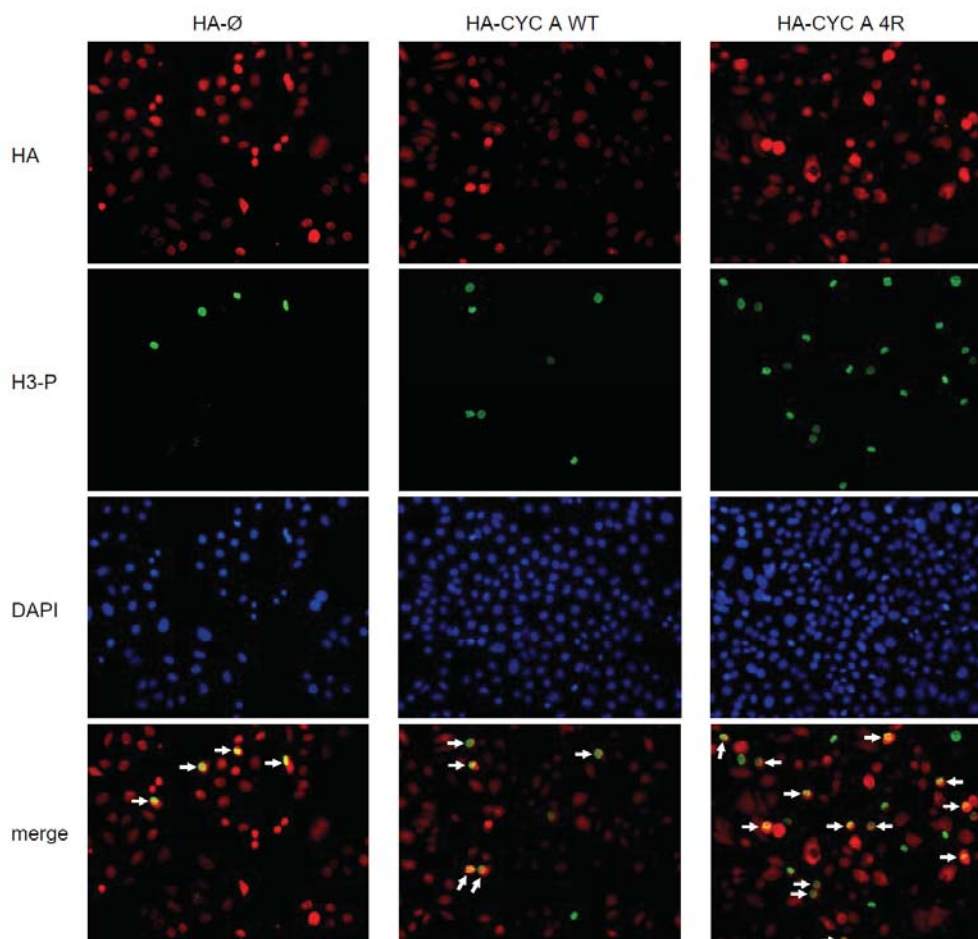


Figura 22. El mutant 4R provoca un increment del nombre de cèl·lules en mitosi. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb les construccions HA- \emptyset , HA-ciclina A WT i HA-ciclina A 4R. 24 h després van ser fixades i les mostres es van analitzar per immunocitoquímica utilitzant anticossos anti-HA i anti-H3 fosforilada. Els nuclis van ser tenyits amb DAPI. Les fletxes assenyalen cèl·lules transfectades en mitosi. A la part superior de la figura es mostra una taula resum del comptatge de les cèl·lules transfectades presents a les mostres. El percentatge de mitosis i el de metafases estan fets en relació al total de cèl·lules transfectades, mentre que a l'última columna es presenta el percentatge de metafases en relació al nombre de cèl·lules en mitosi. SD, desviació estàndard.

Mentre que per FACS s'observa que hi ha aproximadament un 45% de cèl·lules transfectades amb ciclina A 4R que s'aturen a G₂/M, fent comptatges només veiem un 4,68% de cèl·lules en mitosi. Una explicació podria ser que aquest mutant, pel fet de ser més estable,

d'alguna manera provoqués un alentiment en la progressió del cicle de la fase G₂ cap a M. Una altra explicació possible prové de les limitacions de la pròpia tècnica: les cèl·lules mitòtiques són arrodonides i es troben només dèbilment enganxades a la superfície de la placa de cultiu (en el nostre cas, dels cobreobjectes). En fer els successius rentats del procés d'immunocitoquímica es van perdre cèl·lules mitòtiques, cosa que no passa quan es recullen les cèl·lules per al seu posterior anàlisi per FACS. Aquest problema es va veure especialment aguditzat en el cas de les mostres recollides al cap de 48 h d'expressió, per això les imatges procedeixen de cèl·lules recollides al cap de 24 h. Igualment, tot i que el percentatge de mitosis del mutant 4R sigui petit, continua sent unes tres vegades superior al nombre de mitosis de les cèl·lules control o les transfectades amb ciclina A WT. I pel que fa al percentatge de metafases, en el cas de la ciclina A 4R és més de cinc vegades superior a les altres dues condicions.

📍 Anàlisi de la ubiquitinització de ciclina A WT i 4R

Tot seguit vam passar a analitzar les causes de la major estabilitat del mutant 4R. Aquesta característica podria ser causada per un defecte en la seva ubiquitinització. Per aquest motiu vam comparar la ubiquitinització *in vitro* i *in vivo* de ciclina A WT i 4R. Per fer els experiments d'ubiquitinització *in vitro* es van traduir *in vitro* les construccions Flag-ciclina A WT i 4R, tot marcant-les radioactivament amb metionina³⁵S. A continuació es van incubar amb una barreja que contenia, entre d'altres components, molècules d'ubiquitina, un enzim activador d'ubiquitines E1, la E2 Ubch10 i la E3 ubiquitina lligasa Cdh1. Les reaccions d'ubiquitinització es van aturar a diferents temps per veure com progressava la generació de formes poliubiquitinitzades. A la figura veiem que la generació de formes poliubiquitinitzades en el cas del mutant 4R comença més tard que en el cas de la ciclina A WT i que la proporció d'aquestes formes és menor.

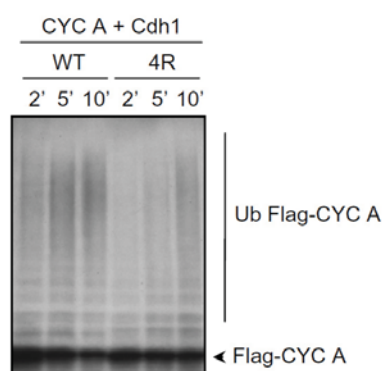


Figura 23. Ubiquitinització *in vitro* de ciclina A WT i 4R. Les construccions Flag-ciclina A WT i 4R van ser traduïdes *in vitro* i marcades amb metionina³⁵S. Posteriorment van ser incubades amb una mix d'ubiquitinització que contenia la ubiquitina lligasa Cdh1, Ubch10, E1 i ubiquitina, entre d'altres components. Les reaccions van ser aturades als temps indicats a la figura. Les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida que tot seguit es va incubar amb líquids de fluorografia i va ser assecat. Finalment, el gel es va posar en contacte amb un film d'autoradiografia i es va realitzar una exposició de 16 h a -80°C. La figura correspon al resultat de l'autoradiografia.

Per comprovar la seva capacitat d'ubiquitinització *in vivo*, es van transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions Flag-ciclina A WT o 4R juntament amb HA-ubiquitina. Més endavant aquestes cèl·lules van ser tractades amb l'inhibidor del proteasoma ALLN i finalment es van realitzar IPs amb anticossos anti-Flag amb aquests extractes cel·lulars. Com es pot apreciar a la figura 24, als carrils de les mostres transfectades amb ciclina A WT apareixen formes d'elevat pes molecular que es corresponen amb diferents graus d'ubiquitinització de la proteïna, mentre que el grau d'ubiquitinització de la ciclina A 4R és molt menor.

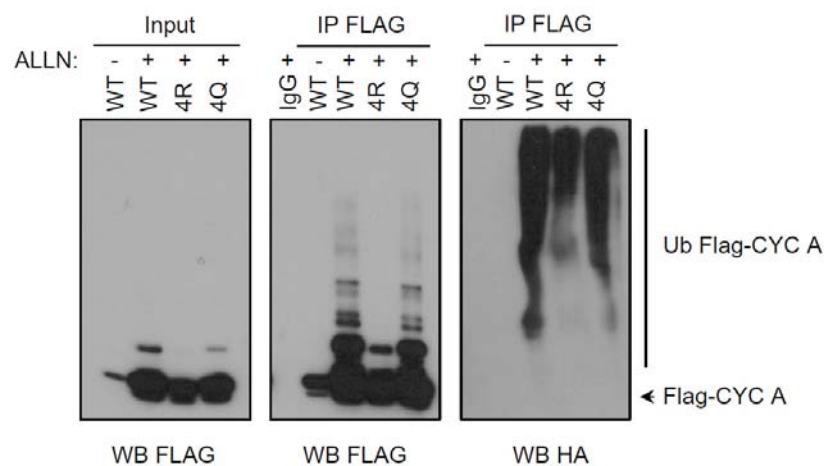


Figura 24. Ubiquitinització *in vivo* de ciclina A WT, 4R i 4Q. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb les construccions HA-ubiquitina i Flag-ciclina A WT, 4R o 4Q. 24 h post-transfecció van ser tractades amb l'inhibidor del proteasoma ALLN durant 16 h. Finalment, es van realitzar IPs amb els extractes cel·lulars utilitzant anticossos anti-Flag o IgG com a control. Les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag (panell del mig) i anti-HA (panell dret). Al panell esquerre hi ha una mostra dels extractes on es pot observar que l'ALLN provoca un augment dels nivells de la ciclina A a causa de la seva capacitat d'inhibir el proteasoma.

Tot i que el mutant ciclina A 4Q no acaba de comportar-se exactament igual que la ciclina acetilada, igualment el vam incorporar en aquest experiment per veure si podia ser ubiquitinitzat. D'aquesta manera vam comprovar que el mutant 4Q s'ubiquitinitza tant com la ciclina A WT. Així doncs, la manca d'ubiquitinització del mutant 4R ens estaria indicant que cal que les lisines 54, 68, 95 i 112 estiguin acetilades per tal que posteriorment es pugui ubiquitinitzar la ciclina A en altres residus de lisina diferents.

📌 Interacció amb la maquinària de degradació

Un possible motiu pel qual el mutant 4R no s'ubiquitinitza gaire és perquè la seva interacció amb components de la maquinària degradativa de la cèl·lula podria estar afectada per la manca d'acetilació. En aquest sentit vam realitzar experiments en els que vam transfectar cèl·lules (ho vam provar amb diferents tipus cel·lulars, sempre amb els mateixos resultats: HeLa, 293T i HCT-116) amb Flag-ciclina A WT o 4R, i a continuació vam realitzar experiments d'immunoprecipitació amb anticossos anti-Flag. Tot seguit vam analitzar les mostres per WB amb anticossos dirigits contra diferents components de la maquinària degradativa de la cèl·lula, per veure si hi havia canvis en la interacció amb ciclina A WT o 4R. Com s'aprecia a la figura 25a, la interacció de ciclina A 4R amb Cdc20 i APC3/Cdc27 (components del complex APC/C) no varia, però en canvi presenta una major interacció amb Cdh1 (un altre coactivador d'APC/C) que la ciclina A WT. D'altra banda, la ciclina A 4R també interacciona molt més que la ciclina A WT amb CDK2, CDK1 i Cks 1/2 (en el cas d'aquesta última, recentment s'ha publicat que és necessària pel reconeixement del complex ciclina A-CDK2 per part de Cdc20 (Wolthuis et al., 2008)).

El fet que el mutant no acetilable interaccioni més que la ciclina A WT amb certes proteïnes podria estar indicant que l'acetilació, a part de regular la degradació de la ciclina A, està jugant un paper en la regulació de les interaccions amb altres proteïnes, com ara Cdh1 i les CDKs 1 i 2. La major interacció de ciclina A 4R amb les Cks 1/2 probablement és una conseqüència indirecta derivada de la major interacció amb CDK2, ja que les Cks interaccionen directament amb CDK2 i no amb la ciclina A. L'extrem amino terminal de la ciclina A (aminoàcids 1 al 171) encara no ha estat cristal·litzat, i per tant no se sap quina estructura tridimensional té. És possible que l'acetilació (ciclina A WT) o la manca d'acetilació (4R) provoquin canvis conformacionals en aquesta regió que acabin afectant la interacció amb altres proteïnes. O bé podria ser senzillament que aquestes lisines siguin llocs importants per la regulació de la interacció amb altres proteïnes, i la seva absència (mutant 4R) faci que aquestes interaccions siguin més fortes.

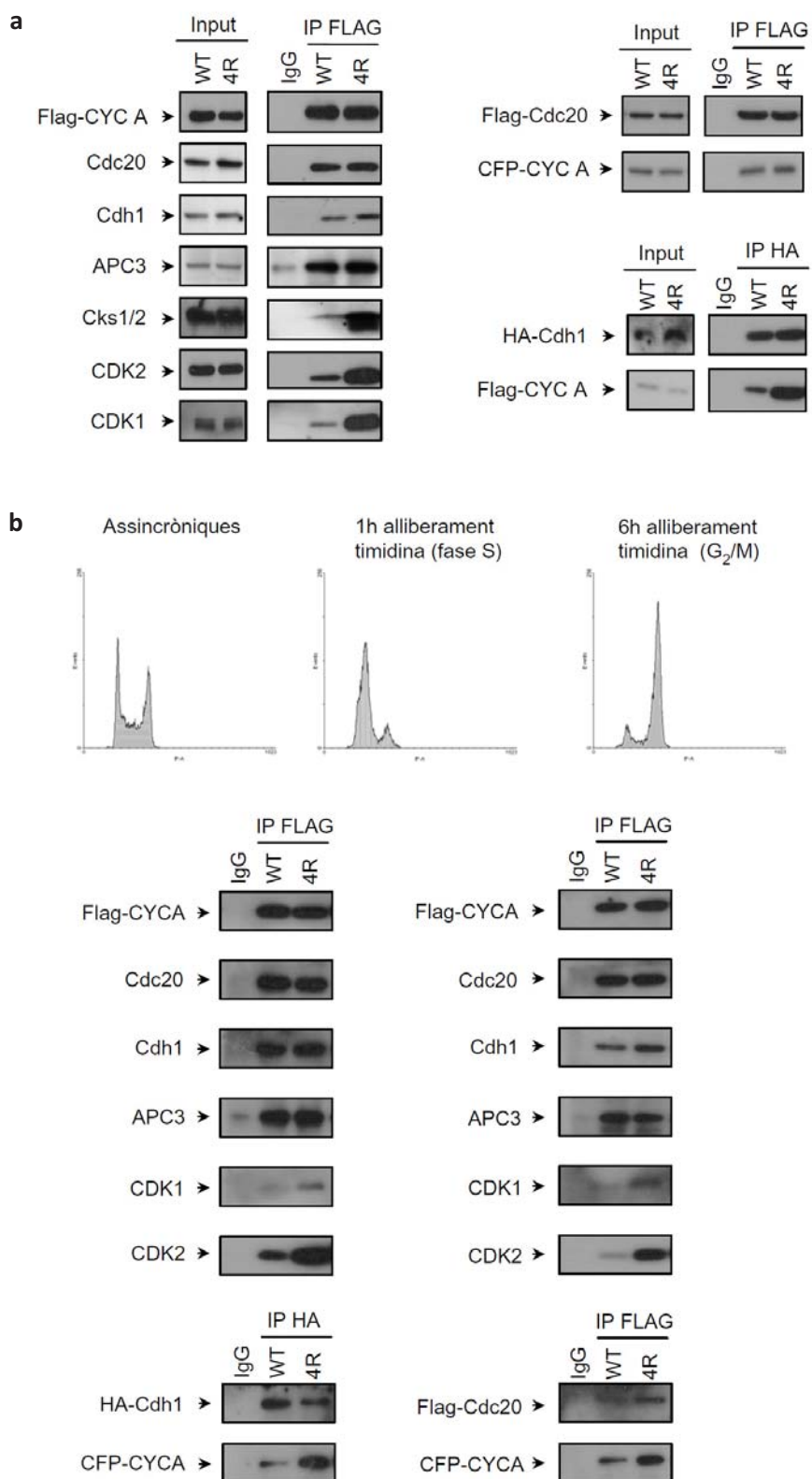


Figura 25. Comparació de la interacció de ciclina A WT i 4R amb diferents proteïnes. (a) Cèl·lules 293T assincròniques van ser transfectades amb Flag-ciclina A WT o 4R i amb els extractes cel·lulars resultants es van realitzar IPs utilitzant anticossos anti-Flag o IgG com a control. Posteriorment es va realitzar l'anàlisi per WB de les proteïnes precipitades amb anticossos anti-Flag, Cdc20, Cdh1, APC3/Cdc27, CDK1, CDK2 i Cks 1/2. Paral·lelament,

cèl·lules 293T van ser cotransfectades amb Flag-Cdc20 i CFP-ciclina A WT o 4R, o bé amb HA-Cdh1 i Flag-ciclina A WT o 4R, i es van fer IPs amb anti-Flag en el primer cas, i anti-HA en el segon, seguides de WB amb anticossos anti-Flag, GFP i HA. **(b)** Cèl·lules HCT-116 van ser transfectades amb Flag-ciclina A WT o 4R i sincronitzades a la transició G₁/S o bé a mitosi mitjançant un doble bloqueig de timidina. Amb els extractes cel·lulars es va seguir el mateix procediment explicat a l'apartat (a). En aquest apartat no es mostra la coprecipitació de ciclina A WT o 4R amb Cks 1/2 perquè a les cèl·lules HCT-116 aquesta interacció no es dona. D'altra banda, als panells inferiors només es mostra la cotransfecció amb HA-Cdh1 en el cas de la fase S, i amb Flag-Cdc20 a mitosi, ja que és principalment en aquestes fases quan aquestes proteïnes es troben presents.

L'experiment mostrat a la figura 25a va ser realitzat en cèl·lules assincròniques. Per tal de saber si la diferència d'interaccions que mostren ciclina A WT i 4R és dependent de la fase del cicle cel·lular, es van transfectar cèl·lules HCT-116 amb Flag-ciclina A WT o 4R i es van sincronitzar amb un doble bloqueig de timidina. Es van recollir mostres al principi de la fase S i a mitosi i es van realitzar experiments d'immunoprecipitació, seguits de l'anàlisi d'interaccions amb Cdh1, Cdc20, APC3/Cdc27, CDK1, CDK2 i Cks 1/2. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 25b i són els mateixos que amb cèl·lules assincròniques.

A la figura també s'observa que es van transfectar cèl·lules amb Flag o CFP-ciclina A WT o 4R al mateix temps que sobreexpressàvem Flag-Cdc20 o HA-Cdh1. Aquests experiments es van fer per a veure més clarament la diferència d'interacció entre ciclina A WT o 4R amb Cdc20 i Cdh1 (ja que fent la IP amb anti-Flag a partir de cèl·lules transfectades amb Flag-ciclina A WT o 4R no s'apreciava gaire aquesta diferència).

Com que la ciclina A 4R presenta una major interacció amb CDK2 i 1, vam voler investigar si això es tradueix en una major activitat quinasa d'aquests complexos. Per aquest motiu vam transfectar cèl·lules HeLa amb Flag-ciclina A WT o 4R, i amb els extractes cel·lulars vam realitzar IPs amb anticossos anti-Flag o bé anti-CDK2. Seguidament es van realitzar assajos quinasa amb les proteïnes precipitades. Els resultats es mostren a la figura 26. Òbviament, com que hi ha més interacció entre la ciclina A 4R i CDK2 que entre ciclina A WT i CDK2, en el primer cas l'activitat quinasa associada és més gran que en el segon, tal i com ho mostra la imatge de la fosforilació de la histona H1. Ara bé, en normalitzar la fosforilació de la histona H1 per la quantitat de CDK2 immunoprecipitada, si els complexos formats per ciclina A WT i els formats per ciclina A 4R fossin igualment actius, no hauríem de trobar diferències d'activitat. No obstant, a les gràfiques veiem que aquest no és el cas, i que el complexos ciclina A 4R-CDK2 són més actius que els complexos formats per la ciclina A WT. Aquest fet ens indica que quan

la ciclina A no es pot acetilar, no només forma més complexes amb CDK2, sinó que per algun motiu aquests complexos són més actius.

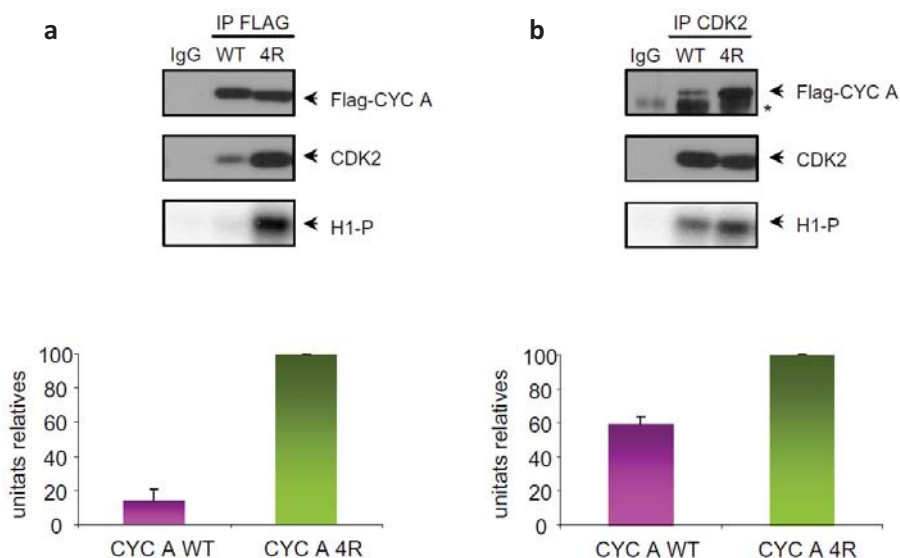


Figura 26. Els complexos ciclina A 4R-CDK són més actius que els formats per ciclina A WT. (a) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-ciclina A WT o 4R, i posteriorment es van realitzar IPs amb anticossos anti-Flag o IgG com a control, seguides d'un assaig quinasa amb ATP marcat radioactivament amb ^{32}P (veure "Materials i Mètodes"). La fosforilació de la histona H1 va ser detectada amb PhosphorImager i es mostra al panell inferior. Paral·lelament, una part de les IPs va ser analitzada per WB amb anticossos anti-Flag i anti-CDK2 per a conèixer la quantitat de ciclina A i CDK2 immunoprecipitada (panells superior i central). A la part inferior de la figura es mostra una gràfica de la normalització de la fosforilació de la histona H1 en relació amb la quantitat de CDK2 immunoprecipitada. Els resultats mostrats provenen de la normalització de 3 experiments independents \pm SE. (b) El mateix que a l'apartat (a), però fent la IP amb anticossos anti-CDK2. L'asterisc marca bandes inespecífiques detectades per l'anticòs anti-Flag.

2.7. Interacció de ciclina A amb Histona Deacetilases (HDACs)

Com s'explicava a l'apartat d'Introducció, l'acetilació de proteïnes és un procés dinàmic, que *in vivo* es troba sotmès a les accions oposades de les acetilases i les deacetilases. Per aquest motiu ens vam interessar en buscar les HDACs que podrien deacetilar la ciclina A. Com a primera aproximació, vam fer experiments de *pull down* on incubàvem proteïnes purificades (GST, GST-CDK2, GST-ciclina A i GST-p27) acoblades a *beads* de sefarosa amb extractes de cèl·lules HCT-116. A continuació, vam analitzar per WB la presència de HDAC1 i 2 en els precipitats. Com mostrem a la figura 27a, la HDAC1 coprecipita amb ciclina A i també amb CDK2 i p27, mentre que la HDAC2 només coprecipita amb CDK2.

Per acabar de confirmar si *in vivo* existeix la interacció entre ciclina A i HDAC1, es van cotransfectar cèl·lules HCT-116 (i també 293T) amb les construccions HA-ciclina A i Flag-HDAC1. Tot seguit es va realitzar la IP amb anti-Flag, i les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-HA i anti-Flag. A la figura 27b veiem clarament que ciclina A i HDAC1 interaccionen *in vivo*.

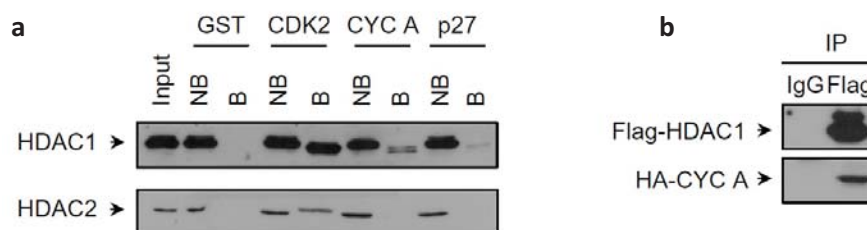


Figura 27. La ciclina A interacciona amb HDAC1. (a) Experiment de *pull down* realitzat amb proteïnes purificades (GST, GST-CDK2, GST-ciclina A i GST-p27) acoblades a *beads* de CNBr-sefarosa. Aquestes *beads* van ser incubades amb extractes de cèl·lules HCT-116. Després de realitzar el *pull down* (veure "Materials i Mètodes"), les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida i van ser analitzades per WB amb anti-HDAC1 i 2. NB, not bound (fracció no unida); B, bound (fracció unida). (b) Cèl·lules 293T van ser cotransfectades amb Flag-HDAC1 i HA-ciclina A WT. Seguidament, els extractes cel·lulars van ser sotmesos a IP amb anti-Flag o IgG com a control, i les mostres es van analitzar per WB amb anticossos anti-Flag i anti-HA. Imatge cedida per Miriam Vidal-Laliena.

Aquests experiments obren el camí per a futurs estudis sobre el paper de la deacetilació de la ciclina A per HDAC1. També podria ser interessant aprofundir en l'estudi de la interacció de p27 i CDK2 amb HDACs, i com afecta la interacció amb acetilases i deacetilases el comportament del complex ciclina A-CDK2 i del seu inhibidor, p27.

3. LA RELACIÓ ENTRE PCAF I CDK2

3.1. PCAF i CDK2 interaccionen *in vivo* i *in vitro*

Al *screening* inicial d'acetilació de proteïnes de cicle cel·lular vam observar que CDK2 (el component catalític del complex ciclina A-CDK2) és acetilada *in vitro* per PCAF. Després d'haver estudiat els efectes de l'acetilació de la ciclina A ens vam endinsar en l'estudi de la relació entre PCAF i CDK2: com i quan interaccionen i quina és la funció que es deriva d'aquesta interacció.

En primer lloc, vam utilitzar la microscòpia de fluorescència per determinar si aquestes proteïnes colocalitzen dins la cèl·lula. A la figura 28 es mostren unes imatges de cèl·lules COS-1 cotransfectades amb YFP-PCAF i CFP-CDK2. Com es pot apreciar, totes dues proteïnes colocalitzen al nucli, tot i que també és cert que CDK2 no sempre presenta una localització exclusivament nuclear; en molts casos es troba dispersa a nucli i citoplasma.

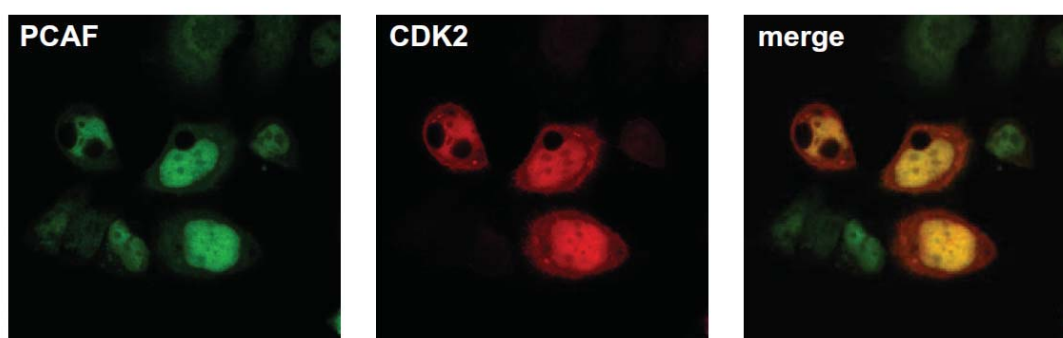


Figura 28. CDK2 i PCAF colocalitzen al nucli cel·lular. Cèl·lules COS-1 van ser cotransfectades amb YFP-PCAF i CFP-CDK2. 24 h post-transfecció van ser fixades per al seu posterior anàlisi per microscòpia de fluorescència.

A continuació vam realitzar experiments de *pull down* per determinar si CDK2 i PCAF interaccionen *in vitro*. Vam purificar les proteïnes GST, GST-HAT (domini catalític de PCAF) i GST-PCAF, i les vam acoblar a *beads* de sefarosa. Tot seguit vam incubar aquestes *beads* amb extractes de cèl·lules HCT-116, i finalment vam analitzar per WB les proteïnes precipitades. D'aquesta manera vam poder determinar, tal i com es veu a la figura 29a, que CDK2 interacciona tant amb la PCAF sencera com amb el seu domini catalític (HAT).

També vam fer assajos d'immunoprecipitació per veure si PCAF i CDK2 interaccionen *in vivo*. Amb aquest propòsit, vam transfectar cèl·lules HeLa amb YFP-PCAF i Flag-CDK2. Posteriorment vam realitzar IPs amb anticossos anti-Flag, i vam analitzar les mostres per WB amb anti-Flag i anti-PCAF. Com s'aprecia a la figura 29b, CDK2 i PCAF interaccionen *in vivo*.

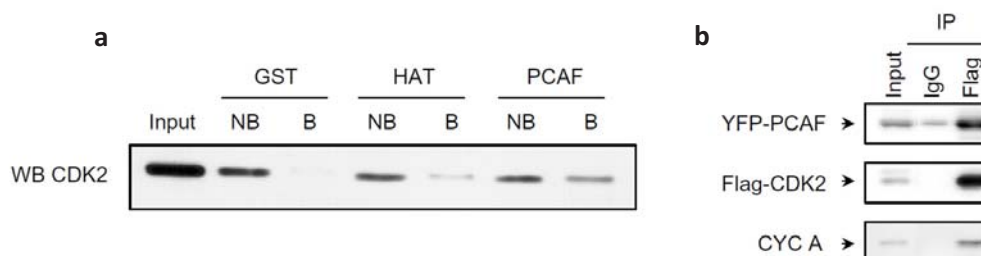


Figura 29. PCAF i CDK2 interaccionen *in vitro* i *in vivo*. (a) Experiment de *pull down* realitzat amb proteïnes purificades (GST, GST-HAT (PCAF) i GST-PCAF) acoblades a *beads* de CNBr-sefarosa. Aquestes *beads* van ser incubades amb extractes de cèl·lules HCT-116. Després de realitzar el *pull down*, les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida i van ser analitzades per WB amb anticossos anti-CDK2. (b) Cèl·lules HeLa van ser cotransfectades amb Flag-CDK2 i YFP-PCAF. Seguidament, els extractes cel·lulars van ser sotmesos a IP amb anti-Flag o IgG com a control, i les mostres es van analitzar per WB amb anticossos anti-Flag, PCAF i ciclina A. Una mostra de l'extracte cel·lular s'ensenya en el primer carril com a control de la transfecció (*input*).

Per determinar si la interacció de CDK2 amb PCAF és directa o indirecta, es van realitzar experiments de *Surface Plasmon Resonance* (SPR), on la proteïna PCAF purificada s'acoblava a un xip tipus CM5 i es feia circular una solució amb CDK2 purificada per sobre d'aquest xip. Si es produïa interacció entre CDK2 i PCAF, es generaven unes unitats de ressonància (RU) que eren detectades i representades en una gràfica com la que es mostra a la figura 30. El que ens indica aquest experiment és que PCAF i CDK2 interaccionen directament.

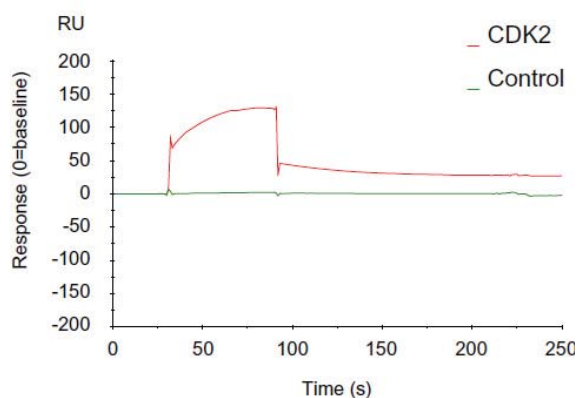


Figura 30. CDK2 i PCAF interaccionen directament.

Per tal de comprovar si la interacció de CDK2 amb PCAF és directa o indirecta, es van fer assajos de SPR (veure "Material i Mètodes") on PCAF purificada o bé un blanc es fixen a un xip tipus CM5. Posteriorment, s'injecta una solució control o amb CDK2 purificada per sobre del xip. La interacció entre les proteïnes és detectada per uns sensors i es representa amb un sensograma com el de la figura.

Finalment vam estudiar en quines fases del cicle cel·lular es produeix la interacció entre CDK2 i PCAF. Per això vam transfectar cèl·lules HeLa amb Flag-CDK2 i YFP-PCAF, i a continuació les vam sincronitzar tal i com hem explicat anteriorment en el cas dels experiments per veure la interacció de ciclina A i PCAF al llarg del cicle cel·lular. Vam realitzar IPs amb anticossos anti-Flag i vam analitzar les mostres per WB. Tal i com s'aprecia a la figura 31, CDK2 i PCAF interaccionen fonamentalment durant les fases S i G₂/M, que és quan els nivells de PCAF són més alts. Els nivells de CDK2 no canvien al llarg del cicle cel·lular.

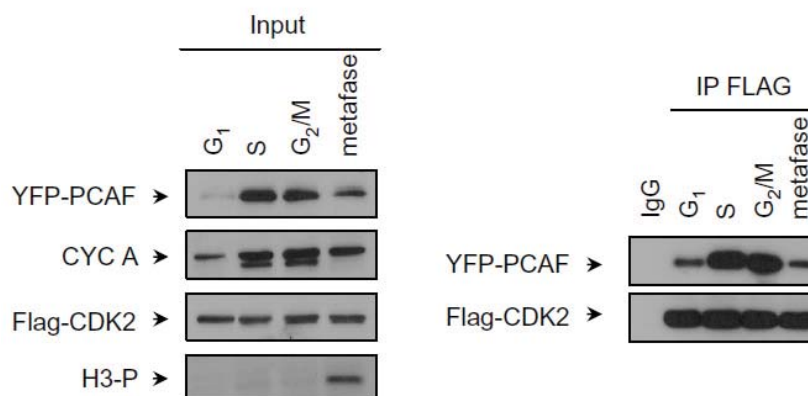


Figura 31. CDK2 i PCAF interaccionen a les fases S i G₂/M del cicle cel·lular. Cèl·lules HeLa transfectades amb YFP-PCAF i Flag-CDK2 van ser sincronitzades utilitzant timidina i nocodazol (veure "Materials i Mètodes"). Es van recollir mostres representatives de diferents fases del cicle i els nivells de diverses proteïnes es van analitzar per WB (panell esquerre). Els extractes cel·lulars també van ser sotmesos a IP amb anticossos anti-Flag o IgG com a control, i l'anàlisi per WB de les proteïnes precipitades es mostra al panell de la dreta.

3.2. PCAF inhibeix l'activitat quinasa dels complexos formats per CDK2

Vam voler analitzar les conseqüències que podria tenir la interacció de CDK2 amb PCAF. Com que CDK2 és una quinasa, en primer lloc ens vam proposar estudiar si PCAF podria alterar la seva activitat enzimàtica. A més, com que la família de les CDKs es caracteritza perquè els seus membres tenen seqüències molt conservades, també vam voler analitzar si PCAF podria afectar l'activitat d'altres CDKs diferents. Amb aquests objectius, vam realitzar assajos quinasa on vam posar en contacte concentracions creixents de PCAF amb concentracions constants dels complexos ciclina D3-CDK6, ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2 i ciclina B-CDK1. Com es pot observar a la figura 32, la presència de PCAF provoca la inhibició de l'activitat quinasa específicament dels complexos formats per CDK2.

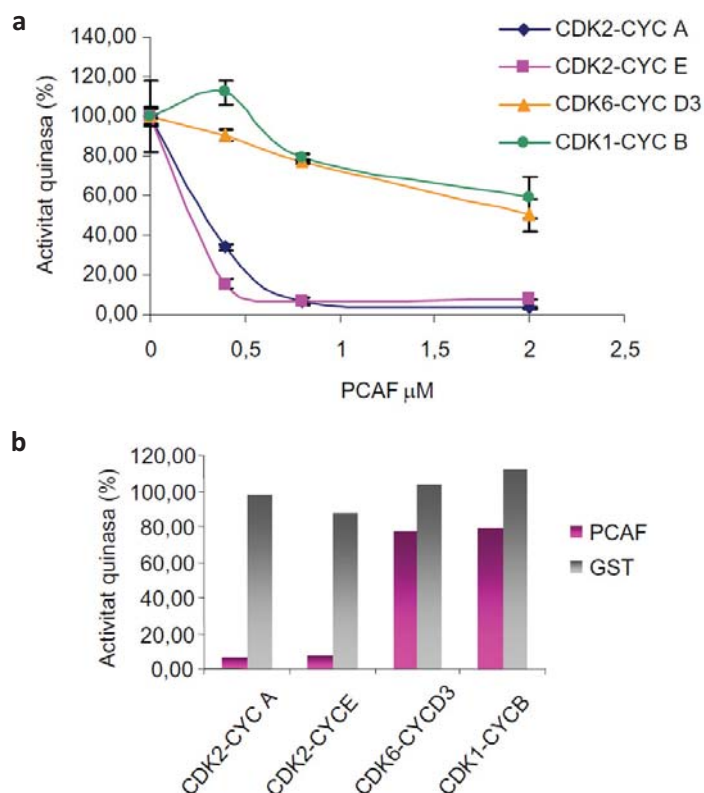


Figura 32. PCAF inhibeix específicament els complexos que tenen CDK2. (a) Es van incubar concentracions constants de complexos ciclina-CDK comercials (purificats i activats per CAK; vam utilitzar les quantitats recomanades pel fabricant per assolir la meitat de l'activitat quinasa màxima) amb concentracions creixents de GST-PCAF, i es van realitzar assajos quinasa (veure "Materials i Mètodes"). (b) Controls per demostrar que a les mateixes concentracions de GST-PCAF, GST no inhibeix l'activitat dels complexos. Els valors d'activitat quinasa mostrats a les gràfiques són percentatges d'activitat referits a l'activitat màxima dels complexos tots sols (100%).

Per saber si PCAF també és capaç de produir aquest efecte *in vivo*, vam transfectar cèl·lules HeLa amb YFP-PCAF. Vam realitzar IPs amb anticossos dirigits contra la CDK2 endògena, i vam fer assajos quinasa amb les proteïnes precipitades. El resultat es mostra a la següent figura, on s'aprecia que a les cèl·lules transfectades amb YFP-PCAF l'activitat quinasa de CDK2 és menor (hi ha quasi un 40% de disminució de la fosforilació de la histona H1). En el WB de control de càrrega de les IPs (figura 33, esquerra) podem veure com PCAF coprecipita amb CDK2 a les cèl·lules transfectades.

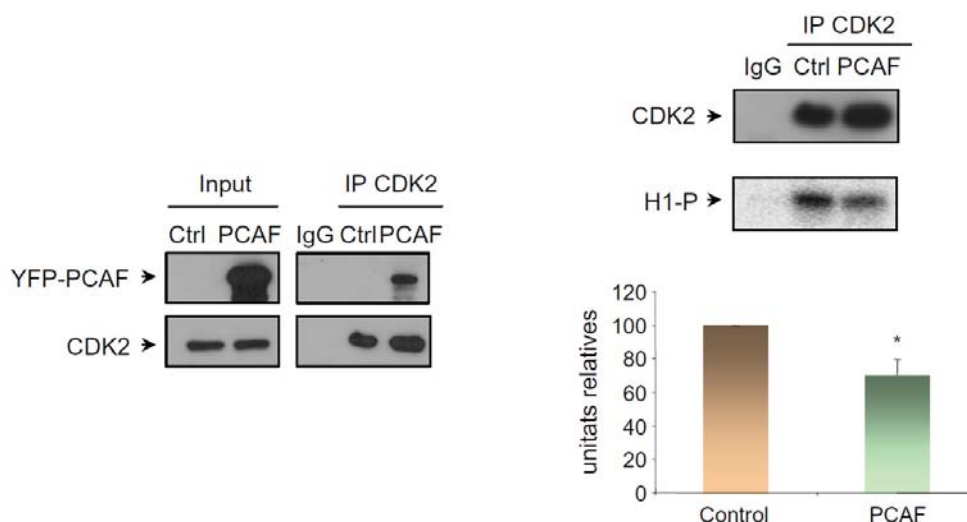


Figura 33. PCAF inhibeix l'activitat quinasa dels complexos que tenen CDK2 *in vivo*. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb vector buit (control, Ctrl) o amb YFP-PCAF. 24 h després es van lisar i es van realitzar IPs amb els extractes cel·lulars utilitzant anticossos anti-CDK2 o IgG com a control. Una part de les IPs va ser utilitzada per a realitzar assajos quinasa (panell de fosforilació de la histona H1 i gràfica) i l'altra va ser analitzada per WB amb anticossos anti-CDK2 i anti PCAF (esquerra). A la gràfica es representa la normalització de la fosforilació de la histona H1 en relació a la quantitat de CDK2 immunoprecipitada. Els resultats presentats són la mitjana de 3 experiments independents \pm SE. L'asterisc indica significació amb p-valor $\leq 0,05$.

🔗 Identificació dels dominis de PCAF responsables de la inhibició

Tot seguit ens vam centrar en la caracterització de la inhibició de ciclina A-CDK2 per PCAF a través de la realització de diversos experiments *in vitro*. En primer lloc, vam voler determinar quina regió de PCAF és la responsable de la inhibició de l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2. Per això es van purificar fragments de la proteïna PCAF (figura 34a) i es van realitzar assajos quinasa per determinar el seu efecte sobre l'activitat d'aquest complex. A la figura 34b es mostra que la regió amino terminal de PCAF no té cap efecte sobre l'activitat de ciclina A-CDK2, mentre que la regió carboxi terminal provoca una inhibició de l'activitat quinasa semblant a la que fa la PCAF sencera. La forma C terminal Δ HAT presenta una petita deleció d'uns 20 aminoàcids dins del domini catalític HAT. El fet que aquesta proteïna inhibeixi ciclina A-CDK2 de la mateixa manera que ho fa la proteïna *wild type* ens indica que aquests residus no són importants per la inhibició, i que una PCAF que no pot acetilar igualment pot inhibir aquests complexos per interacció. A l'apartat (c) veiem que, per separat, els diferents dominis de l'extrem carboxi terminal de PCAF no són capaços de causar una inhibició significativa de ciclina A-CDK2; cal una combinació de tots ells, la qual està representada pel fragment carboxi

terminal. Aquests dominis de l'extrem carboxi terminal tenen funcions conegudes: HAT és el domini catalític de PCAF i presenta l'activitat acetiltransferasa; ADA és la regió per on PCAF s'uneix al cofactor ADA2 (un component de complexos multiproteics amb activitat acetilasa), i Bromo és el domini d'interacció amb altres proteïnes acetilades. A l'extrem amino terminal de PCAF s'hi troben les regions responsables de la seva activitat E3 ubiquitina lligasa, descrita recentment (Linares et al., 2007).

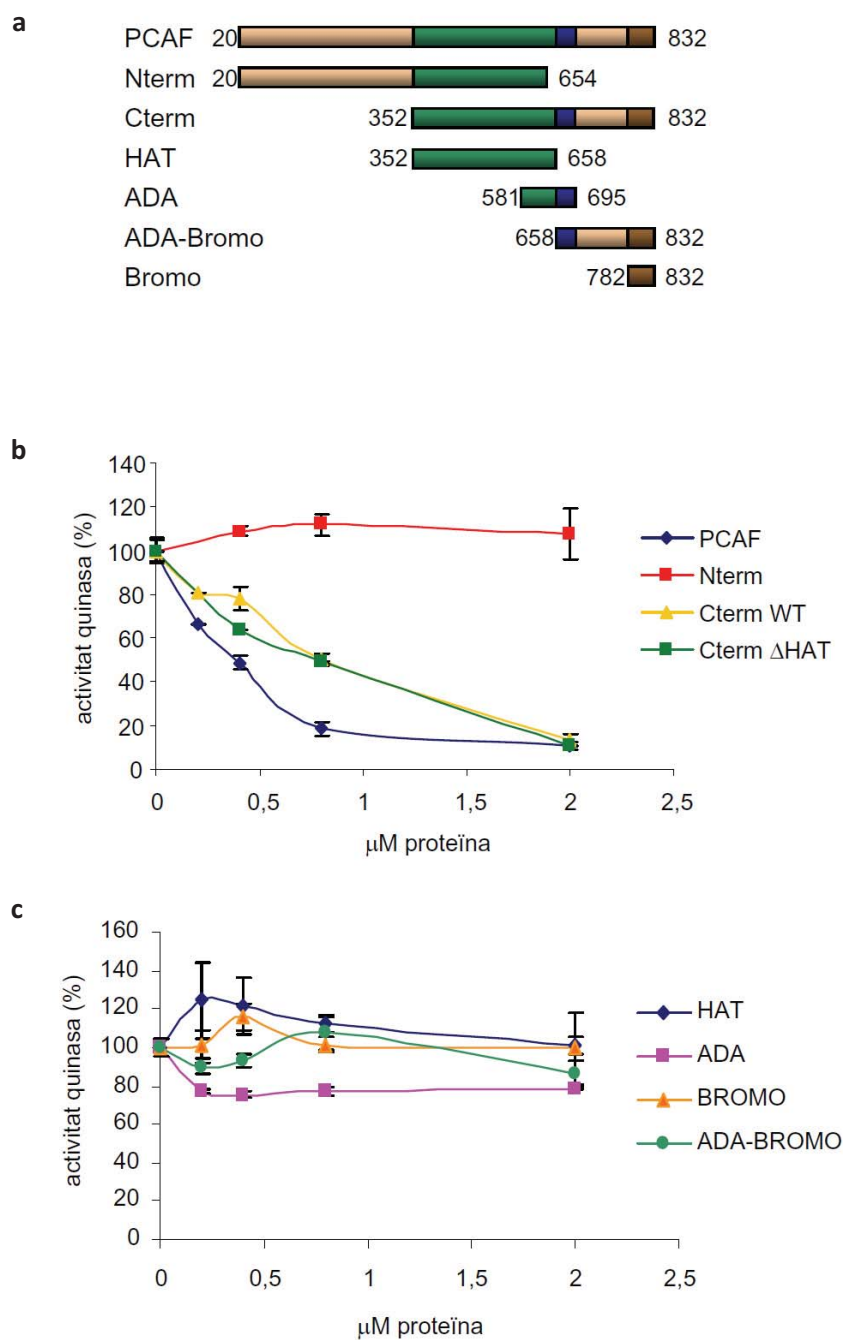






Figura 34. La regió C terminal de PCAF és la mínima necessària per inhibir l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2. **(a)** Esquema dels fragments de PCAF utilitzats en aquests experiments. **(b)** Assaig quinasa on es mostra

l'efecte de concentracions creixents de PCAF sencera, la regió carboxi terminal de PCAF (Cterm) o bé l'amino terminal (Nterm) sobre una concentració constant (400nM) del complex ciclina A-CDK2 (purificat al laboratori, no comercial). (c) Assaig quinasa mostrant l'efecte dels diferents fragments purificats pertanyents a l'extrem carboxi terminal de PCAF sobre l'activitat quinasa de ciclina A-CDK2. Aquest complex va ser utilitzat a una concentració constant de 400nM, i els fragments a les concentracions creixents mostrades a la gràfica. Totes les proteïnes emprades en aquests experiments estan fusionades a GST, per aquest motiu es van fer controls amb GST a la concentració màxima (2µM), i es va comprovar que no afectava l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2. Els valors d'activitat quinasa mostrats a les gràfiques són percentatges referits a l'activitat màxima del complex ciclina A-CDK2 sol.

Caracterització del mecanisme d'inhibició

A continuació vam intentar determinar el mecanisme pel qual PCAF inhibeix el complex ciclina A-CDK2. Existeixen diverses possibilitats:

-  PCAF podria interferir en l'arribada d'ATP al centre catalític de CDK2, i així impedir que aquesta fosforili el substrat utilitzat en els assajos, que és la histona H1.
-  PCAF podria competir amb el substrat, ja sigui perquè s'uneix al complex ciclina A-CDK2 per la zona d'interacció amb els seus substrats, o bé perquè segresta la histona H1 i impedeix que aquesta arribi al centre catalític de la CDK2. Aquesta última possibilitat la podríem descartar perquè en principi la histona H1 no és substrat de PCAF, sinó que ho són les histones H3 i H4.
-  PCAF s'uneix directament a ciclina A i a CDK2, tal i com demostren els estudis de SPR. Potser inhibeix el complex a través de provocar la separació dels seus components, tot i que aquesta possibilitat no és gaire creïble, ja que l'afinitat de ciclina A per CDK2 probablement és molt més gran que la que tenen aquestes proteïnes per PCAF.
-  Finalment, i aquesta possibilitat és la més difícil de demostrar, podria ser que PCAF, en unir-se al complex ciclina A-CDK2, provoqués un canvi en la conformació del complex que tindria com a conseqüència la pèrdua d'activitat.

Per estudiar totes aquestes possibilitats, en primer lloc vam fer una cinètica per comprovar si existia competència entre PCAF i l'ATP. Per això vam incubar una concentració fixa de ciclina A-CDK2 amb concentracions creixents d'ATP (mostres "control"), o bé vam incubar una concentració fixa de ciclina A-CDK2 juntament amb una concentració fixa de PCAF, en presència de concentracions creixents d'ATP (mostres "+PCAF"). Els valors obtinguts van ser

sotmesos a la transformació de Lineweaver-Burk i es va obtenir el resultat mostrat a la figura 35. Quan les rectes es tallen a l'eix d'abscisses vol dir que l'inhibidor utilitzat a l'assaig no és competitiu. Per tant, PCAF no competeix amb l'ATP i això vol dir que no interfereix en l'arribada d'ATP al centre catalític de CDK2.

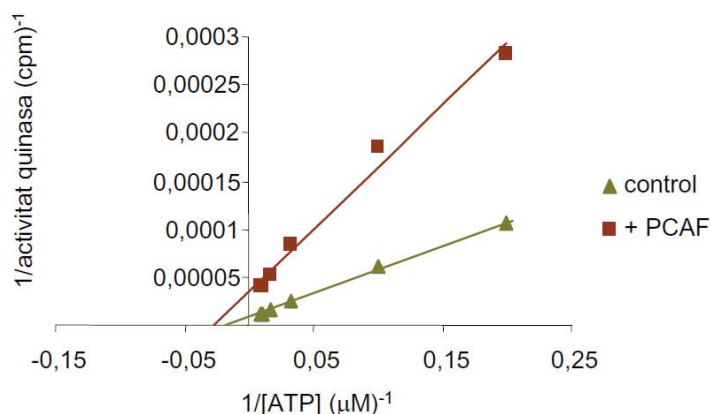


Figura 35. PCAF és un inhibidor de ciclina A-CDK2 no competitiu amb l'ATP. Es van realitzar assajos quinasa incubant una mostra control (400 nM ciclina A-CDK2) amb concentracions creixents d'ATP. La mostra "+PCAF" consistia en 400 nM ciclina A-CDK2 + 800 nM PCAF, incubades també en presència de concentracions creixents d'ATP. Totes les reaccions es van dur a terme durant 30 min a 30°C (veure "Materials i Mètodes"). Els resultats obtinguts van ser sotmesos a la transformació de Lineweaver-Burk (es va fer la inversa dels valors) i es van representar a la gràfica.

Tot seguit vam comprovar si PCAF podria competir amb la histona H1 per la unió a ciclina A-CDK2. En aquest cas, vam incubar una concentració constant de ciclina A-CDK2 (400 nM) amb quantitats creixents d'histona H1 ("control"), o bé vam incubar la barreja de 400 nM ciclina A-CDK2 + 800 nM PCAF també en presència de quantitats creixents d'histona H1 ("PCAF"). Després de sotmetre els resultats a la transformació de Lineweaver-Burk, vam obtenir la gràfica de la figura 36, la qual mostra que PCAF és un inhibidor de ciclina A-CDK2 que no competeix amb la histona H1. Per tant, PCAF no està interferint en la interacció del substrat histona H1 amb el complex ciclina A-CDK2.

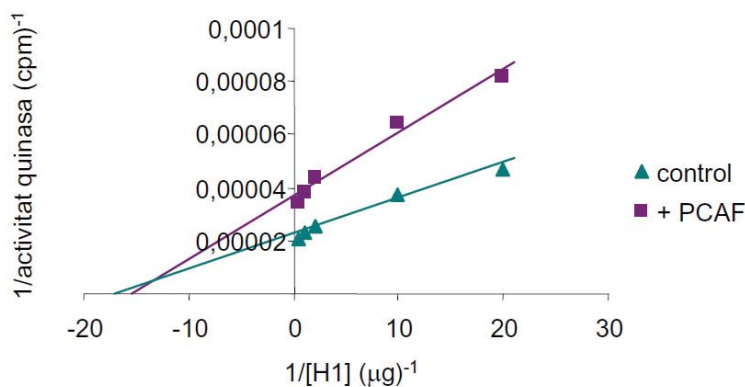


Figura 36. PCAF és un inhibidor de ciclina A-CDK2 no competitiu amb el substrat histona H1. Es va realitzar un assaig quinasas incubant una mostra control (400 nM ciclina A-CDK2) amb quantitats creixents d'histona H1. La mostra "+PCAF" consistia en 400 nM ciclina A-CDK2 + 800 nM PCAF, incubats també amb quantitats creixents d'histona H1. Totes les reaccions es van dur a terme durant 30 min a 30°C. Els resultats obtinguts van ser sotmesos a la transformació de Lineweaver-Burk (es va fer la inversa dels valors) i es van representar a la gràfica.

Finalment, per saber si PCAF podria estar interferint en la interacció de ciclina A amb CDK2, vam realitzar assajos quinasas on incubàvem una concentració fixa de CDK2 ("control") o de CDK2 + PCAF ("PCAF") amb concentracions creixents de ciclina A. En aquest cas el resultat també indica que PCAF és un inhibidor que no competeix amb la ciclina A. Per tant, PCAF no inhibeix el complex ciclina A-CDK2 a través de separar els seus components.

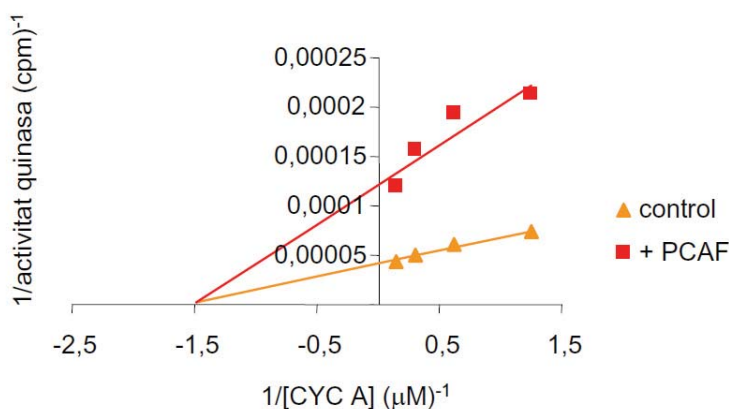


Figura 37. PCAF és un inhibidor de ciclina A-CDK2 que no actua trencant aquest complex. Es van realitzar assajos quinasas incubant una mostra control (400 nM CDK2) amb concentracions creixents de ciclina A. La mostra "+PCAF" consistia en 400 nM CDK2 + 800 nM PCAF, incubats també amb concentracions creixents de ciclina A. Totes les reaccions es van dur a terme durant 30 min a 30°C. Els resultats obtinguts van ser sotmesos a la transformació de Lineweaver-Burk i es van representar a la gràfica.

Amb els resultats obtinguts en aquests experiments podem concloure que la PCAF no sembla inhibir el complex ciclina A-CDK2 per cap dels mecanismes estudiats, i per tant ho ha de fer d'una altra manera. Una possibilitat podria ser que la unió de PCAF al complex ciclina A-CDK2 induís un canvi conformacional d'aquest complex que acabaria afectant a la seva activitat.

3.3. La sobreexpressió de PCAF altera el cicle cel·lular

L'acetiltransferasa PCAF és coneguda principalment com a coactivador transcripcional de molts gens, però a l'actualitat hi ha un nombre creixent de publicacions on es demostra que participa en molts processos cel·lulars: resposta a dany al DNA, diferenciació, proliferació i apoptosi. Nosaltres ens vam proposar estudiar els efectes de la sobreexpressió de PCAF en diferents tipus cel·lulars i si aquests efectes es donaven a través de la inhibició de l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2.

☉ PCAF afecta la proliferació cel·lular

En primer lloc vam realitzar experiments per comprovar si PCAF afecta la capacitat de proliferació de les cèl·lules. Per tal d'estudiar aquesta possibilitat, vam transfectar cèl·lules NIH3T3 amb la construcció Flag-PCAF o un plàsmid buit com a control. Vam escollir les cèl·lules NIH3T3 perquè no expressen PCAF endògena (Wiper-Bergeron et al., 2007), de manera que els efectes que hi poguéssim detectar serien causats exclusivament per la PCAF transfectada. Com s'observa a la figura, les cèl·lules que sobreexpressen PCAF proliferen significativament menys que les cèl·lules control.

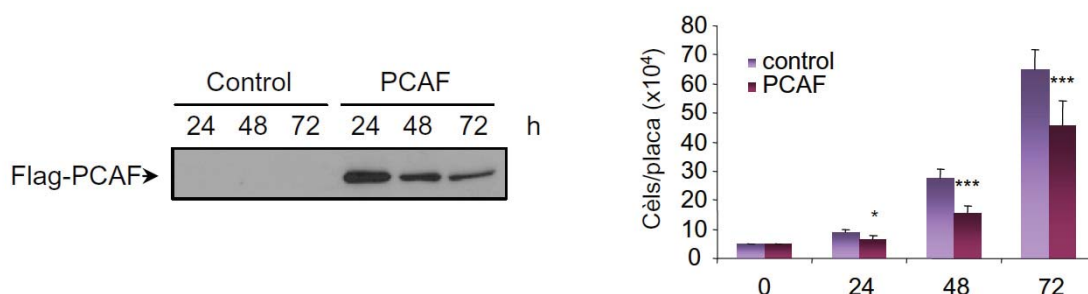


Figura 38. PCAF provoca una disminució de la proliferació cel·lular. Cèl·lules NIH3T3 van ser transfectades amb un vector buit o bé amb Flag-PCAF. Després de la transfecció es van ressemar en plaques de 6 pous posant 50.000 cèl·lules per pou. Es van realitzar comptatges per triplicat a les 24, 48 i 72 h post-transfecció, i les dades es van

representar a la gràfica. El resultat presentat és la mitjana de 3 experiments independents \pm SE. Al panell de l'esquerra es mostra un WB amb els nivells d'expressió de PCAF en els extractes cel·lulars al llarg del temps. Un asterisc indica significació amb p-valor $\leq 0,05$ i 3 asteriscs corresponen a un p-valor $\leq 0,001$.

📍 PCAF provoca l'aturada del cycle cel·lular

La disminució de la proliferació de les cèl·lules pot tenir lloc com a conseqüència de l'aturada en alguna fase del cycle cel·lular o perquè les cèl·lules es morin. Per distingir entre aquestes possibilitats, vam transfectar cèl·lules HeLa amb YFP-PCAF i vam analitzar el cycle de les cèl·lules transfectades. Vam utilitzar aquest tipus cel·lular perquè presenta una alta eficiència de transfecció. Com es veu a la figura, la sobreexpressió de PCAF en aquestes cèl·lules causa fins a un 20% de mort cel·lular, juntament amb la disminució a la meitat de les poblacions en fases S i G₂/M en relació amb cèl·lules control (transfectades amb un vector buit); és a dir, la majoria de les cèl·lules estan mortes o aturades a la fase G₁. Vam voler comparar l'efecte de PCAF amb el de l'inhibidor de deacetilases TSA. A la figura s'observa que el TSA provoca l'aturada del cycle cel·lular a la fase G₁ (aquesta població puja un 10% respecte al control). Quan es combinen PCAF i TSA, és a dir, incrementem l'acetilació de proteïnes per PCAF i inhibim la deacetilació, tornem a trobar un increment de la població de cèl·lules mortes (30%), tot i que en aquest cas la població en fase S es manté com al control i disminueixen les poblacions en G₁ i G₂/M. La conclusió que podem extreure d'aquests experiments és que en aquest tipus cel·lular, la sobreexpressió de PCAF condueix a una disminució de la proliferació perquè provoca que la majoria de les cèl·lules s'aturin a la fase G₁ o morin.

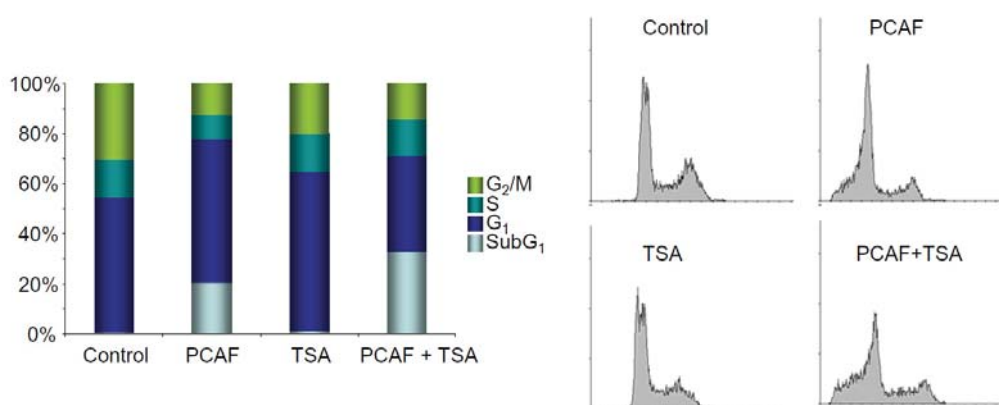


Figura 39. La sobreexpressió de PCAF en cèl·lules HeLa provoca mort i aturada a la fase G₁. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb un vector buit o YFP-PCAF. 24 h post-transfecció les cèl·lules van ser recollides, fixades i tenyides amb iodur de propidi i es van analitzar per FACS. A l'esquerra es mostra la gràfica resum del percentatge

de cèl·lules que es troben a cada fase del cicle cel·lular. A la dreta s'ensenyen els perfils de cicle obtinguts per FACS. La població "SubG₁" correspon a les cèl·lules mortes.

També vam transfectar cèl·lules HeLa amb les construccions GFP-carboxi terminal WT o Δ HAT de PCAF amb l'objectiu de veure si la mort i l'aturada a G₁ provocades per PCAF són dependents de la seva activitat acetilasa. Es va procedir a l'anàlisi per FACS de les cèl·lules transfectades i, com es pot apreciar a la figura 40, la PCAF que no té activitat acetilasa provoca el mateix efecte que la PCAF activa (mort cel·lular i aturada a G₁). Per tant, PCAF provoca alteracions en el cicle cel·lular independentment de si és o no capaç d'acetilar altres proteïnes. Aquest resultat recolza els experiments *in vitro* que hem mostrat anteriorment on PCAF inhibeix l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2 simplement per interacció.

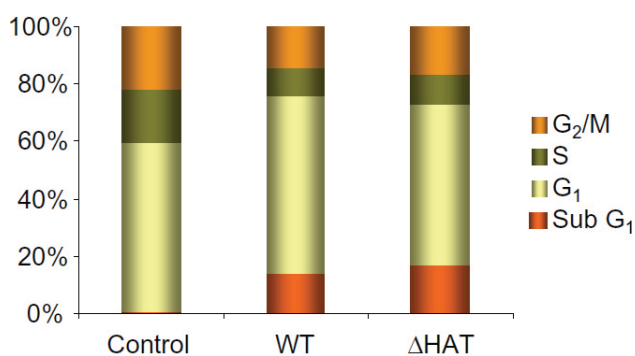


Figura 40. PCAF Δ HAT també atura el cicle cel·lular a G₁ en cèl·lules HeLa. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb un vector buit o bé GFP-C terminal WT o GFP-C terminal Δ HAT PCAF. 24 h post-transfecció, les cèl·lules van ser recollides, fixades i tenyides amb TOPRO-3 per tal d'anàlitzar el cicle cel·lular per FACS. L'anàlisi de les cèl·lules transfectades es mostra a la gràfica.

Per corroborar que PCAF provoca l'aturada en la fase G₁ a cèl·lules HeLa, es van fer experiments de transfecció amb YFP-PCAF seguits d'un pols d'incorporació de Bromodeoxiuridina (BrdU). La BrdU és un anàleg de la timidina que és incorporat al DNA de les cèl·lules que es troben a la fase de replicació. Pot ser detectada per immunocitoquímica utilitzant anticossos específics. Com es pot apreciar a les figures 41a i b, les cèl·lules transfectades amb PCAF no poden incorporar BrdU, ni després d'un pols de 2 h ni d'un tractament de 24 h. Per tant, quan sobreexpressem PCAF les cèl·lules resten majoritàriament aturades a la fase G₁ i no poden entrar en la fase S.

Un altre marcador de fase S és la proteïna PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), la qual participa en el procés de replicació ja que és un cofactor de la DNA polimerasa δ . Es van realitzar immunocitoquímiques amb cèl·lules HeLa transfectades amb YFP-PCAF per detectar si quan s'expressa PCAF hi ha PCNA al nucli. Tal i com es pot veure a la figura 41c, no es van trobar cèl·lules transfectades que presentessin PCNA al nucli, indicant un altre cop que les cèl·lules que sobreexpressen PCAF majoritàriament no es troben en fase S.

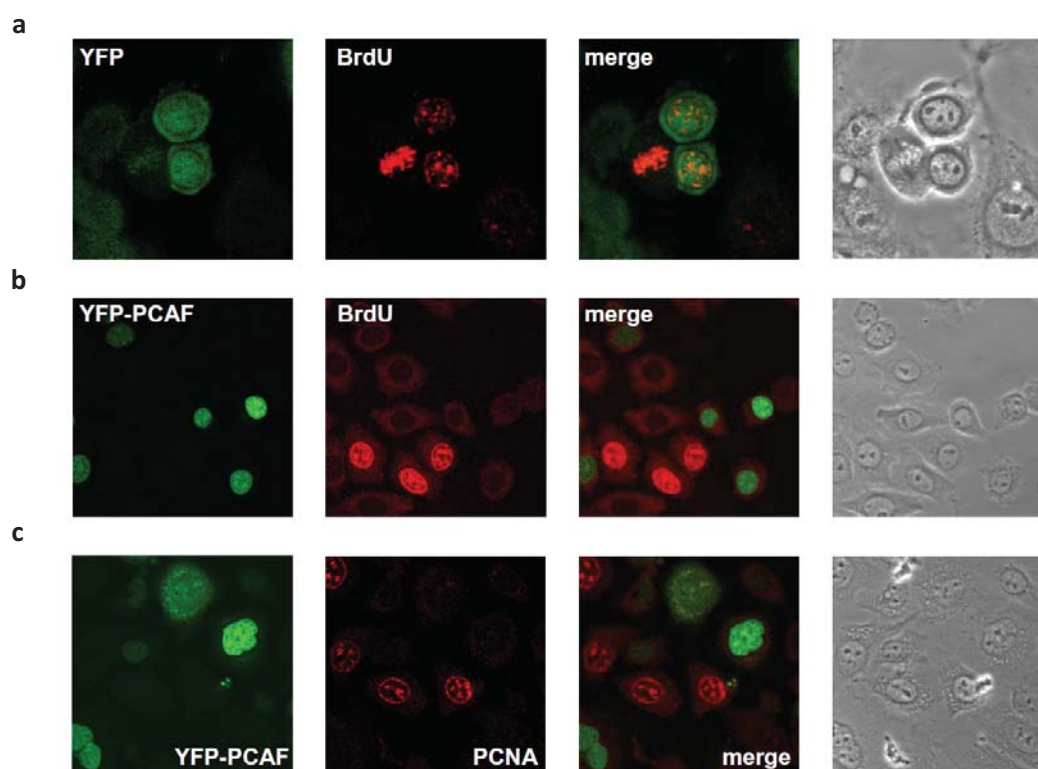


Figura 41. Les cèl·lules HeLa que sobreexpressen PCAF no entren en la fase S. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb YFP (a) o bé YFP-PCAF (b) i posteriorment van ser incubades en medi amb BrdU durant polsos de 2 o 24 h. Després del pols amb BrdU les cèl·lules van ser fixades i incubades amb anticossos anti-BrdU segons el protocol indicat a "Materials i Mètodes". Finalment, les mostres van ser analitzades per microscòpia confocal. (c) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb YFP-PCAF. 24 h post-transfecció les cèl·lules van ser fixades i incubades amb anticossos anti-PCNA. Finalment, les mostres van ser analitzades per microscòpia confocal.

PCAF pot tenir un paper en la mort cel·lular

En els experiments de FACS mostrats en apartats anteriors (figures 39 i 40) havíem detectat un increment de la mort cel·lular com a conseqüència de la sobreexpressió de PCAF. Uns experiments que vam realitzar per veure l'efecte de la cotransfecció de PCAF i ciclina A ens van donar pistes sobre la manera com PCAF podria estar causant la mort de les cèl·lules. En

aquests experiments vam transfectar cèl·lules COS-1 amb YFP-PCAF i CFP-ciclina A. Vam utilitzar aquestes cèl·lules perquè tenen un volum i una morfologia òptims per a l'observació al microscopi. 24 h després de la transfecció vam gravar el comportament de PCAF i de ciclina A dins les cèl·lules durant 16 h amb l'ajut d'un microscopi confocal Leica SP5. Als fotogrames de la figura 42 mostrem només el que ocorre amb YFP-PCAF. Observem com a partir d'un determinat moment la quantitat de PCAF al nucli cel·lular comença a incrementar, a continuació surt del nucli i la cèl·lula emet unes prolongacions del citoplasma cap a l'exterior fins que finalment esclata. La ciclina A es comporta de manera semblant a la PCAF però els seus nivells comencen a augmentar una mica més tard. Aquests experiments ens aporten la informació de que la sobreexpressió de PCAF podria estar causant apoptosi, però no sabem quin és el factor detonant de l'increment de la concentració de PCAF dins la cèl·lula. Tampoc no sabem fins a quin punt la sobreexpressió de ciclina A contribueix a aquest fenotip, però altres experiments realitzats al laboratori cotransfectant cèl·lules amb PCAF i p27 donen el mateix resultat.

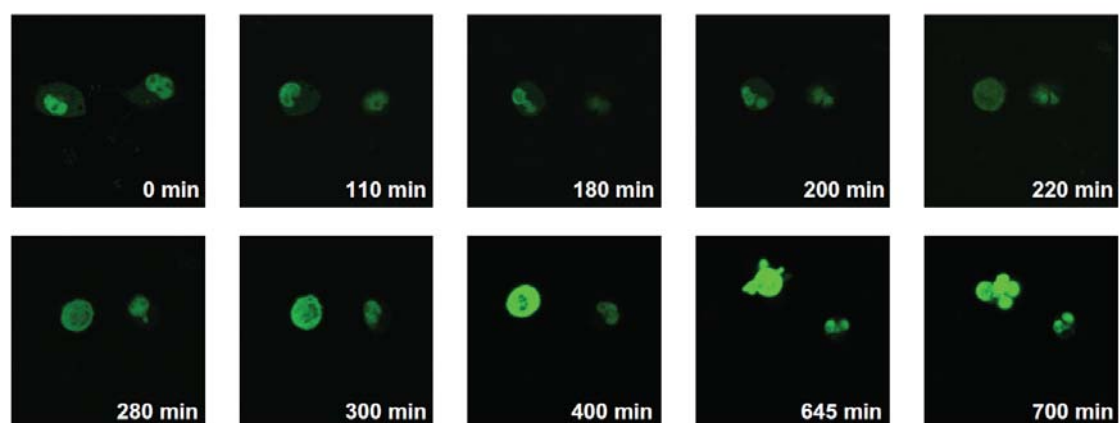


Figura 42. La sobreexpressió de PCAF pot causar la mort cel·lular. Cèl·lules COS-1 van ser transfectades amb YFP-PCAF i CFP-ciclina A. 24 h post-transfecció es va procedir a gravar el comportament d'aquestes proteïnes mitjançant un microscopi confocal Leica SP5. A la figura es mostren fotogrames de la localització de PCAF en diferents moments de la gravació.

☞ PCAF exerceix els seus efectes a través de la inhibició de CDK2

Amb els experiments mostrats fins ara hem demostrat que PCAF afecta la progressió del cicle cel·lular i fins i tot pot provocar la mort de les cèl·lules. No obstant, no tenim proves de que aquests efectes els provoqui directament a través de la inhibició de l'activitat quinasa de

CDK2. Per aquest motiu ens vam plantejar utilitzar cèl·lules procedents de ratolins $CDK2^{-/-}$ per veure si, en absència de CDK2, PCAF pot provocar alteracions en el cicle cel·lular. El Dr. M. Malumbres ens va proporcionar MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) immortalitzats procedents de ratolins WT i $CDK2^{-/-}$. Nosaltres els vam transfectar amb YFP (control) o YFP-PCAF i vam intentar analitzar per FACS el cicle de les cèl·lules transfectades. No vam tenir gaire èxit amb aquesta aproximació perquè per una banda el percentatge de transfecció era molt baix, i per l'altra els MEFs $CDK2^{-/-}$ costaven de passar pel citòmetre i a més presentaven un cicle cel·lular estrany amb 3 pics en lloc dels 2 que apareixen en un cicle normal (G_1 i G_2/M). Problemes tècnics apart, semblava que els MEFs WT transfectats amb PCAF presentaven una disminució del percentatge de cèl·lules en fase S respecte al control (MEFs WT transfectats amb YFP), mentre que els MEFs $CDK2^{-/-}$ eren refractaris a aquest efecte. Aquesta observació podria suggerir que PCAF hauria d'actuar a través de CDK2 per tal de produir una aturada del cicle, però no és suficient.

Així doncs, vam plantejar una altra aproximació per veure si PCAF exerceix la seva funció de parada del cicle a través de CDK2. En aquest cas, vam transfectar cèl·lules HCT-116 només amb PCAF, només amb CDK2 o bé amb totes dues proteïnes alhora. Si PCAF provoca l'aturada de cicle a través de CDK2, la sobreexpressió de CDK2 en cèl·lules transfectades amb PCAF hauria de revertir l'efecte causat per la PCAF tota sola. Es van transfectar, doncs, cèl·lules HCT-116 amb YFP-PCAF i com podem apreciar a la figura 43, en analitzar el cicle de les cèl·lules transfectades vam veure que en aquest tipus cel·lular la PCAF provoca una aturada significativa del cicle a les fases S i G_2/M (que és justament on actuen els complexos ciclina A-CDK2). És possible que l'increment del nombre de cèl·lules aturades en aquestes fases sigui causat per un alentiment en la progressió del cicle perquè PCAF està inhibint l'activitat del complexos ciclina A-CDK2. D'altra banda, la transfecció de CFP-CDK2 no altera significativament el cicle d'aquestes cèl·lules. Quan transfectem conjuntament YFP-PCAF i CFP-CDK2, el cicle torna a ser normal, o fins i tot podríem parlar d'un increment de la població aturada a G_1 . Per tant, en aquest cas CDK2 està revertint la parada de cicle provocada per PCAF. Això confirma que PCAF podria estar aturant el cicle a través de provocar directa o indirectament la inhibició de CDK2, i per això una sobreexpressió de CDK2 permet recuperar la normalitat. Es va provar de fer el mateix experiment amb cèl·lules 293T i es van obtenir resultats similars, tot i que els canvis en el cicle provocats per PCAF i CDK2 no eren tan accentuats com a cèl·lules HCT-116 (figura 43c).

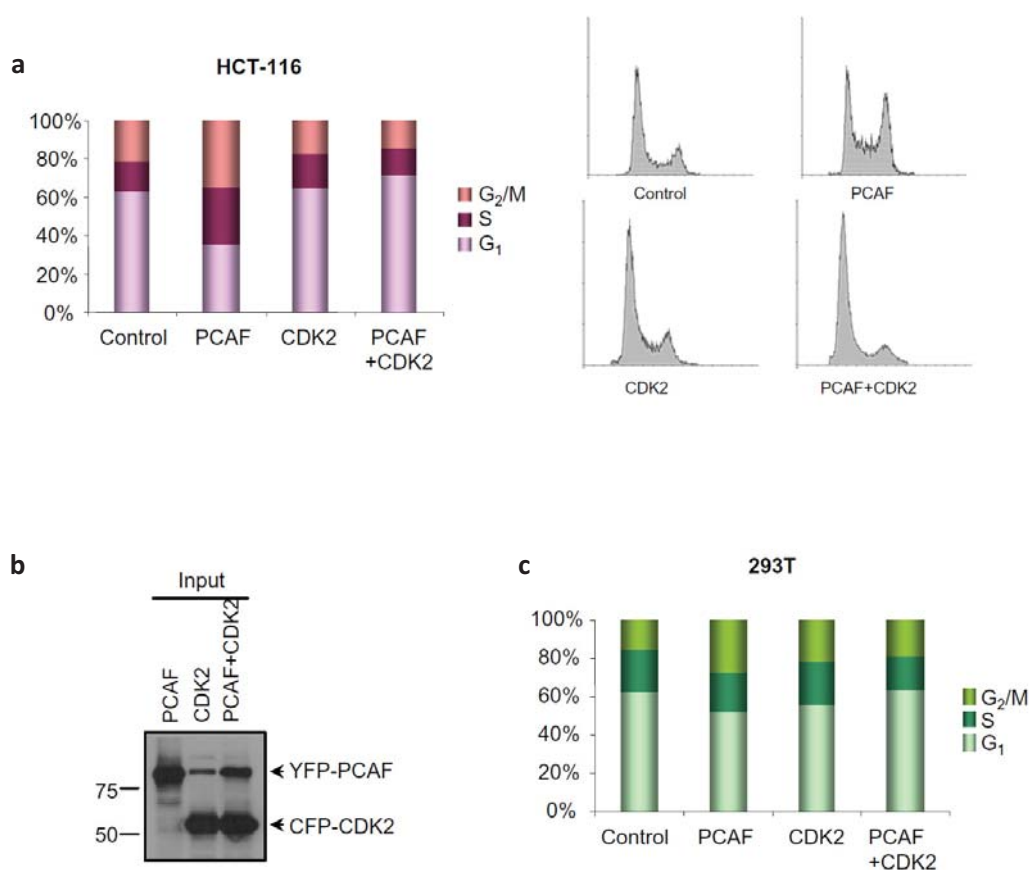


Figura 43. PCAF atura el cycle de les cèl·lules HCT-116 i CDK2 fa que es recuperi el cycle normal. (a) Cèl·lules HCT-116 van ser transfectades amb YFP-PCAF, CFP-CDK2 o totes dues. 48 h després les cèl·lules van ser recollides, fixades i tenyides amb TOPRO-3 per tal d'analitzar el cycle de les cèl·lules transfectades per FACS. A la gràfica es mostren les proporcions de cèl·lules a cada fase del cycle cel·lular dependent de la transfecció. A la dreta es troben les anàlisis per FACS de les mostres. Els resultats corresponen a un experiment representatiu de 3 experiments independents. (b) Control dels nivells d'expressió de cadascuna de les construccions. (c) Gràfica representativa del comportament de les cèl·lules 293T davant els mateixos tractaments explicats a l'apartat (a).

3.4. Paper de la interacció entre CDK2 i PCAF en la regulació de la resposta a progesterona

A la introducció vam comentar com recentment s'ha descrit el paper del complex ciclina A-CDK2 en la resposta a progesterona (Narayanan et al., 2005a). Bàsicament, aquest complex pot fosforilar el receptor de la progesterona (PR) i també l'acetilasa SRC-1, fent que aquesta sigui reclutada pel PR als promotors. Llavors SRC-1 acetila la histona H4 i així promou l'activació transcripcional dels gens de resposta a progesterona. Nosaltres vam voler comprovar si la

presència de PCAF podia afectar la transcripció de gens de resposta a progesterona a través de la seva acció inhibidora sobre l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2.

Per realitzar aquests estudis, en primer lloc vam comprovar si en les nostres condicions es reproduïen els resultats publicats. Vam transfectar cèl·lules NIH3T3 amb les construccions següents: PR-B (isoforma B del PR), MMTV-Luc (gen *reporter* que codifica per la Luciferasa, sota el control d'un promotor de resposta a progesterona) i concentracions creixents de HA-ciclina A. Per fer tots aquests experiments, les cèl·lules es van fer créixer en medi blanc (sense *Phenol-Red*, que pot tenir efectes estrogènics) suplementat amb sèrum xarcolitzat (sense hormones) durant 24 o 48 h, per tal d'assegurar-nos que els efectes observats serien conseqüència exclusivament de l'agonista de la progesterona (R5020) que nosaltres incorporàvem al medi. La figura 44a mostra com, en presència de R5020 i en resposta a concentracions creixents de ciclina A, va augmentant la transcripció del gen *reporter*. Això vol dir que l'expressió de gens de resposta a progesterona és dependent de la quantitat de ciclina A a la cèl·lula. A més, per confirmar si la resposta a progesterona en el nostre sistema era dependent o no de l'activitat CDK2, vam tractar les cèl·lules transfectades amb PR-B i MMTV-Luc amb Roscovitina (inhibidor de CDK2 i altres CDKs). A la figura 44b veiem que en presència de Roscovitina disminueix molt la transcripció gènica en resposta a la progesterona, indicant que l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2 és necessària perquè es doni aquest procés.

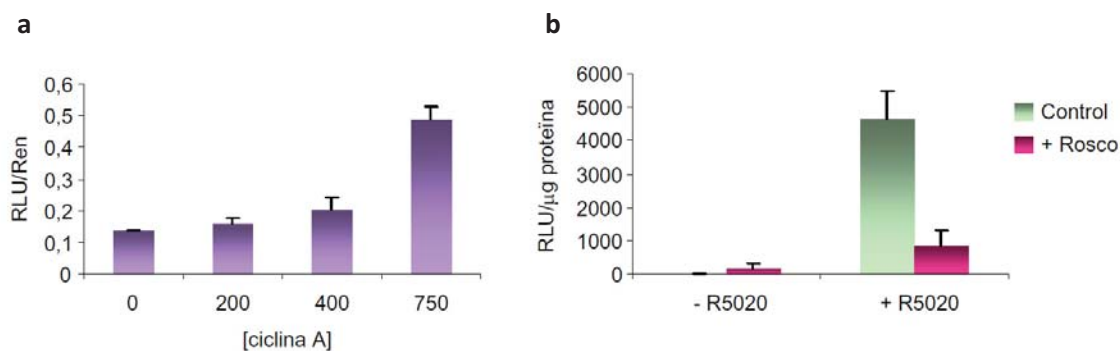


Figura 44. La resposta a progesterona és dependent de ciclina A-CDK2. (a) Cèl·lules NIH3T3 van ser sembrades i tractades amb medi blanc suplementat amb sèrum xarcolitzat. 24 h després van ser transfectades amb PR-B, MMTV-Luc i concentracions creixents de ciclina A. També es va transfectar el plàsmid que codifica per la proteïna *reporter* Renilla per tal d'utilitzar-la com a control de transfecció. 5-6 h després de la transfecció es va canviar el medi i es va afegir medi fresc suplementat amb R5020 (10 nM) durant 16 h. Finalment les cèl·lules van ser recollides i tractades amb el kit de Promega *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* i les senyals de luciferasa i renilla es van mesurar amb un LAS-3000. A la gràfica es mostra com varia la senyal de luciferasa en funció de la quantitat (ng) de ciclina A transfectada. RLU, *relative light units*; Ren, renilla. (b) Cèl·lules NIH3T3 van ser transfectades amb PR-B i MMTV-Luc. 5-6 h després de la transfecció, es va canviar el medi i es va afegir R5020 (10

nM) i roscovitina (30 μ M) en els casos indicats. Finalment, les cèl·lules van ser recollides i tractades tal i com s'explica a (a). A la gràfica es mostra la senyal de luciferasa en resposta a diferents condicions. En aquest cas la senyal luciferasa es va normalitzar per la quantitat de proteïna de cada mostra (vam haver de procedir d'aquesta manera perquè el control de transfecció renilla no funcionava correctament).

Després de fer aquestes comprovacions, vam concloure que amb les nostres condicions experimentals podíem reproduir els resultats publicats per (Narayanan et al., 2005a). Tot seguit vam intentar veure l'efecte de PCAF sobre la transcripció de gens de resposta a progesterona utilitzant uns clons de NIH3T3 amb expressió induïble de PCAF. Aquests clons són línies estables de cèl·lules NIH3T3 a les quals es va incorporar un plàsmid que contenia el gen que codifica pel domini carboxi terminal de PCAF sota el control d'un element regulador de la transcripció en resposta a tetraciclina (sistema Tet-off). Aquestes línies es mantenen en cultiu en presència de tetraciclina, i quan es vol expressar la PCAF es retira la tetraciclina del medi. L'avantatge que representen les línies estables en comparació amb les cèl·lules transfectades és que totes les cèl·lules expressen la construcció. Malgrat això, els nivells i els patrons d'expressió de PCAF varien a cada clon, i a més, al llarg del temps aquestes cèl·lules deixen d'expressar PCAF (potser perquè els resulta tòxica, ja que disminueix la proliferació cel·lular). Vam transfectar diferents clons que expressaven PCAF WT o Δ HAT amb PR i MMTV-Luc i vam analitzar l'activitat luciferasa en absència o presència de PCAF. A la figura 45 es pot apreciar que quan PCAF s'expressa hi ha una disminució de la transcripció gènica en resposta a progesterona. I a més, l'anàlisi del clon 4 Δ HAT ens indica que aquesta baixada de l'activació transcripcional és independent de l'activitat acetilasa de PCAF, ja que en aquest cas la PCAF no és activa.

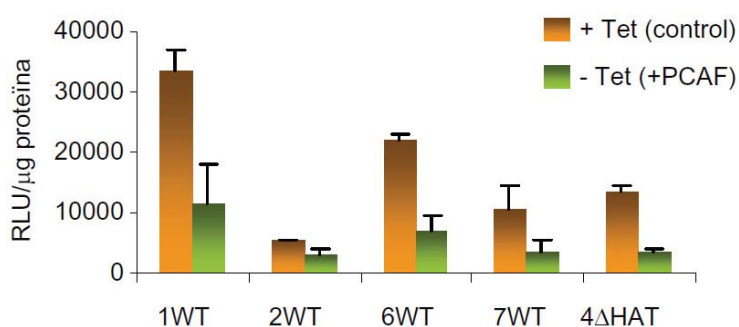


Figura 45. PCAF provoca una disminució de l'activació transcripcional en resposta a progesterona. Clons amb expressió induïble de PCAF van ser cultivats en medi blanc suplementat amb sèrum xarcolitzat i tetraciclina durant 24 h. Després van ser transfectats amb PR-B i MMTV-Luc. Posteriorment es va afegir R5020 al medi per activar la resposta a progesterona, i també es va treure la tetraciclina del medi en els casos en què es volia induir l'expressió

de PCAF. Passades 16 h des de l'inici d'aquests tractaments, les cèl·lules van ser recollides i tractades amb el *kit* de Promega *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* i la senyal de luciferasa es va mesurar amb un LAS-3000. La quantitat de proteïna es va mesurar per Bradford. A la gràfica es mostra la senyal de luciferasa presentada per cada clon en absència o presència de PCAF. Les dades d'activitat luciferasa van ser normalitzades per la quantitat total de proteïna analitzada.

Aquests resultats ens indiquen que, sota les nostres condicions, la presència de PCAF acaba provocant la disminució de la resposta a progesterona, però no podem saber si ho fa a través del seu efecte inhibitori directe sobre el complex ciclina A-CDK2 o si ho fa indirectament per altres vies. En moltes publicacions es considera que PCAF és un element coactivador en l'activació transcripcional en resposta a progesterona, ja que és reclutada pels promotors als pocs minuts d'incorporar R5020 al medi. Els nostres resultats ens fan pensar que potser la presència sostinguda de PCAF en aquests promotors (causada perquè nosaltres deixem que PCAF s'expressi durant 16 h en els clons) podria arribar a tenir un efecte inhibitori sobre la transcripció.

3.5. CDK2 és un substrat acetilable per PCAF *in vitro*

A la primera secció de l'apartat "Resultats" vam mostrar un experiment d'acetilació que indicava que CDK2 és acetilada *in vitro* per PCAF (figura 3c). A diferència del cas de la ciclina A, no hem pogut realitzar un estudi exhaustiu sobre l'acetilació de CDK2 *in vivo* perquè no hem trobat cap anticòs anti-acetil-lisina que reconegui de manera fiable i reproduïble la CDK2 acetilada. En aquest apartat presentarem tots els experiments que es van fer relacionats amb l'acetilació de CDK2 perquè, encara que no haguem pogut demostrar consistentment l'acetilació *in vivo* d'aquesta proteïna, els resultats *in vitro* no deixen de ser interessants i de proporcionar-nos pistes sobre els efectes que podria tenir l'acetilació de CDK2 dins la cèl·lula.

En primer lloc, per confirmar el resultat de la figura 3c, vam repetir els experiments d'acetilació *in vitro* de CDK2 utilitzant com a acetilases PCAF, CBP i Tip60. Com es mostra a la figura 46 CDK2 és acetilada *in vitro* per PCAF, però no per CBP ni Tip60.

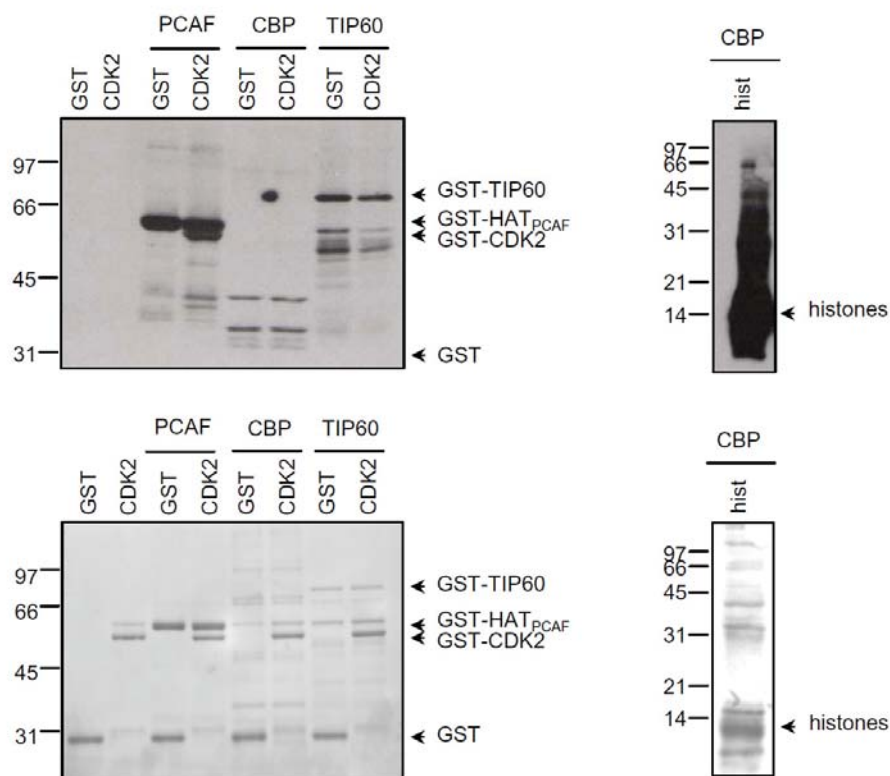


Figura 46. CDK2 és acetilada *in vitro* per PCAF. Vam realitzar diferents reaccions d'acetilació utilitzant GST o GST-CDK2 com a substrat i les acetilases GST-HAT (domini catalític de PCAF), GST-CBP i GST-Tip60 com a enzims. Vam utilitzar acetilCoA¹⁴C com a cofactor de les reaccions per poder detectar les acetilacions per autoradiografia. GST es va utilitzar com a control negatiu de les reaccions d'acetilació. L'autoacetilació de PCAF i de Tip60 són controls positius de l'activitat d'aquests enzims. En el cas de CBP, l'acetilació d'histones és el control de la seva activitat. Les reaccions es van dur a terme durant 30 min a 30°C i es van aturar mitjançant l'addició de tampó de mostra. Les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida que després va ser transferit a una membrana de nitrocel·lulosa. La membrana es va posar en contacte amb un film d'autoradiografia i es va realitzar una exposició de 2 dies a -80°C. A la part superior de la figura es mostra el resultat de l'autoradiografia. A la part inferior hi ha el control de càrrega de les proteïnes utilitzades per l'experiment tenyit amb blau de Coomassie.

Tot seguit vam purificar tres fragments de CDK2 d'uns 100 aminoàcids de longitud que comprenien tota la seqüència de la proteïna. Vam realitzar experiments d'acetilació *in vitro* utilitzant PCAF com a acetilasa i aquestes construccions com a substrats. A la figura 47 es mostra que només s'acetila el fragment que conté els aminoàcids 1 al 106.

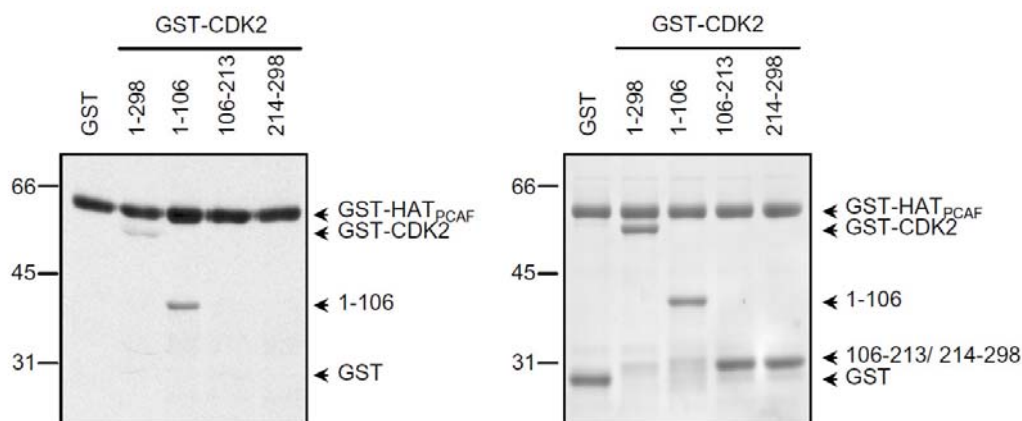


Figura 47. Els residus de CDK2 acetilats per PCAF es troben a la regió compresa entre els aminoàcids 1 i 106.

Esquerra de la figura, autoradiografia. Dreta, control de càrrega de les proteïnes tenyit amb blau de Coomassie.

Per identificar els residus de lisina de CDK2 que són acetilats per PCAF vam recórrer, com en el cas de la ciclina A, a la tècnica de *spot-mapping*. Es van dissenyar 14 pèptids de 10 aminoàcids amb les seqüències de CDK2 que presentaven una o dues lisines a la part central, es van col·locar sobre una membrana de cel·lulosa, i es van sotmetre a un assaig d'acetilació *in vitro* per PCAF. El resultat es mostra a la figura: la lisina 33 de CDK2 és el residu acetilat per PCAF.

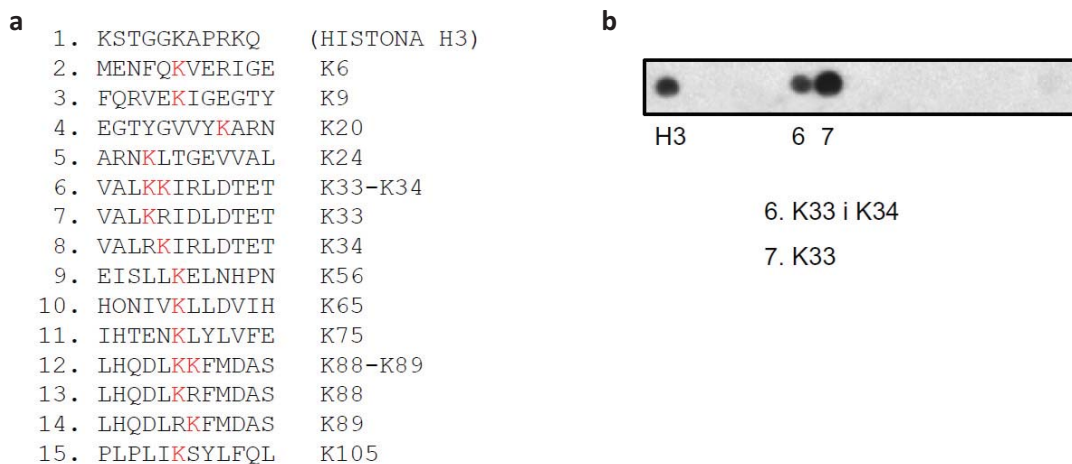


Figura 48. CDK2 s'acetila a la lisina 33. (a) Seqüències dels pèptids utilitzats per la tècnica de *spot-mapping*. Un pèptid de la histona H3 va ser utilitzat com a control positiu de la reacció d'acetilació. (b) Autoradiografia que mostra que els pèptids que s'acetilen són els que contenen la lisina 33.

Per confirmar que la lisina 33 és el residu acetilat per PCAF en l'entorn de la proteïna sencera, es va generar el mutant CDK2 K33R per mutagènesi dirigida. A la figura 49 podem veure que el mutant CDK2 K33R no s'acetila, mentre que la proteïna *wild type* sí que ho fa.

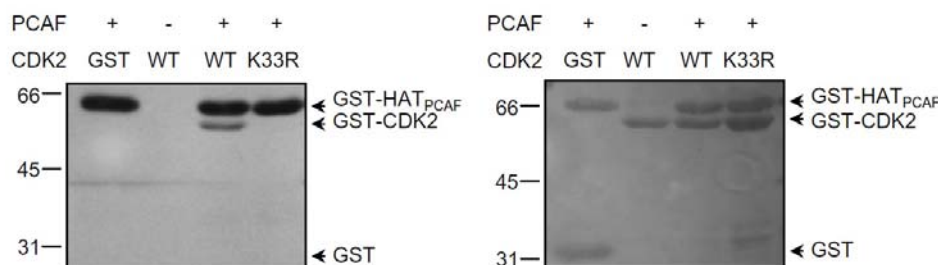


Figura 49. El mutant CDK2 K33R no és acetilat per PCAF. Esquerra: autoradiografia corresponent a l'acetilació *in vitro* de CDK2 WT i K33R per PCAF. Es va utilitzar GST com a control negatiu i l'autoacetilació de PCAF com a control positiu de les reaccions d'acetilació. Dreta: control de càrrega de les proteïnes utilitzades per l'assaig tenyit amb *Red Ponceau*.

A la figura següent presentem alguns dels resultats obtinguts en intentar detectar l'acetilació de CDK2 *in vivo*. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-CDK2. 24 h post-transfecció es van realitzar IPs amb els extractes cel·lulars utilitzant anticossos anti-Flag o IgG com a control, seguit de l'anàlisi per WB de les proteïnes precipitades amb anti-Flag i anti-acetil-lisina. A la figura 50a es veu com utilitzant el mateix anticòs anti-acetil-lisina que funcionava perfectament per a la detecció de la ciclina A acetilada, només detectem una banda molt tènue d'acetilació de CDK2. A més, aquest resultat era dependent de la quantitat de proteïna utilitzada en la IP: com més mil·ligrams d'extracte cel·lular, més senyal en el WB anti-acetil-lisina. A la figura 50b mostrem el mateix tipus d'experiment, però en aquest cas vam fer servir pel WB un anticòs sintetitzat per nosaltres dirigit contra la CDK2 acetilada a la K33. Amb aquest anticòs obtenim una bona senyal suposadament d'acetilació, però d'altra banda també veiem que el mutant K33R s'acetila pràcticament tant com la CDK2 WT. Aquest fet ens podria estar indicant que *in vivo* CDK2 s'acetila a altres residus a part de la lisina 33. Per espectrometria de masses havíem vist que possiblement la CDK2 es podria acetilar a la K34, i per aquest motiu vam decidir crear el mutant K33,34R. En experiments posteriors vam veure que aquest mutant també s'acetilava tant com la proteïna WT. Tots aquests resultats ens van fer arribar a la conclusió de que, almenys de moment, no disposem d'un bon sistema per a la detecció de la CDK2 acetilada *in vivo*

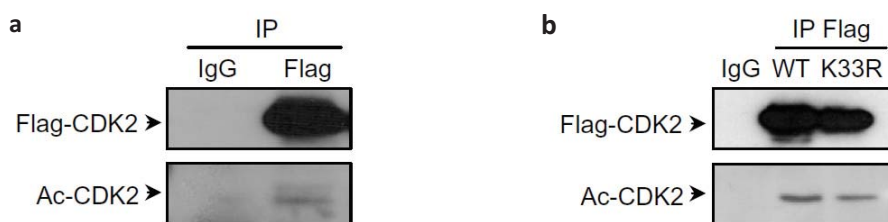


Figura 50. Intents de determinar l'acetilació de CDK2 *in vivo*. (a) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-CDK2. 24 h post-transfecció van ser recollides i lisades. Es van utilitzar 2 mg d'extracte cel·lular per fer IPs amb anti-Flag o IgG com a control. Tot seguit es va realitzar l'anàlisi per WB de les proteïnes precipitades amb anticossos anti-Flag i anti-acetil-lisina. (b) El mateix que a (a), però en aquest cas les cèl·lules van ser transfectades amb Flag-CDK2 WT o K33R. Per detectar l'acetilació de CDK2 per WB en aquest cas es va utilitzar l'anticòs sintetitzat per nosaltres contra la CDK2 acetilada a la lisina 33.

📍 L'acetilació de la lisina 33 inhibeix l'activitat quinasa de CDK2

La lisina 33 de CDK2 és un residu molt conservat a la família de les CDKs que es troba dins el centre catalític de la quinasa i és imprescindible per a la interacció amb les molècules d'ATP. Quan es muta aquest residu, CDK2 és inactiva i no pot fosforilar els seus substrats. De fet, els mutants CDK2 K33R ja s'havien fet servir en diversos estudis on es requeria disposar d'una CDK2 catalíticament inactiva (Moreau et al., 1998; Picard et al., 1996).

```

CDK2 26 TGEVVALKKI 35
CDK1 26 TGQVVAMKKI 35
CDK4 28 SGHFVALKSV 37
CDK5 26 THEIVALKRV 35
CDK6 36 GGRFVALKRV 45
CDK7 34 TNQIVAIKKI 43
CDK8 45 DDKDYALKQI 54
CDK9 41 TGQKVALKKV 50

```

Figura 51. La lisina 33 de CDK2 és un residu conservat a la família de les CDKs. Alineament de les seqüències d'aminoàcids dels centres catalítics de diferents CDKs, mostrant en vermell la conservació de la lisina que interacciona amb l'ATP.

Donada la importància de la lisina 33 de CDK2 en la seva activitat catalítica, vam decidir intentar purificar CDK2 acetilada i determinar la seva activitat quinasa. Per tal de fer això, vam seguir l'exemple del treball de (Mukherjee et al., 2006) i vam cotransformar *E. coli* amb els plàsmids d'expressió de GST-CDK2 i 6His-PCAF. Si dins dels bacteris PCAF pot acetilar CDK2, hauríem de ser capaços de purificar CDK2 acetilada. Tal com es veu a la figura 52 (part superior), la CDK2 purificada a partir de bacteris que només sobreexpressen aquesta proteïna es troba una mica acetilada. En canvi, la CDK2 purificada a partir de bacteris que coexpressen

CDK2 i PCAF es troba molt acetilada, i la CDK2 K33R purificada en les mateixes condicions no s'acetila gens.

A continuació, vam realitzar assajos quinasa amb les CDK2 purificades en absència o presència de PCAF. Els resultats es mostren a la figura 52 (part inferior), i indiquen que la CDK2 més acetilada té una activitat menor que la CDK2 normal. La diferència d'activitat entre les dues proteïnes no és més gran perquè probablement no tota la CDK2 que vam purificar en presència de PCAF estava acetilada. Per obtenir un 100% de proteïna acetilada hauríem de fer servir altres sistemes de purificació més acurats.

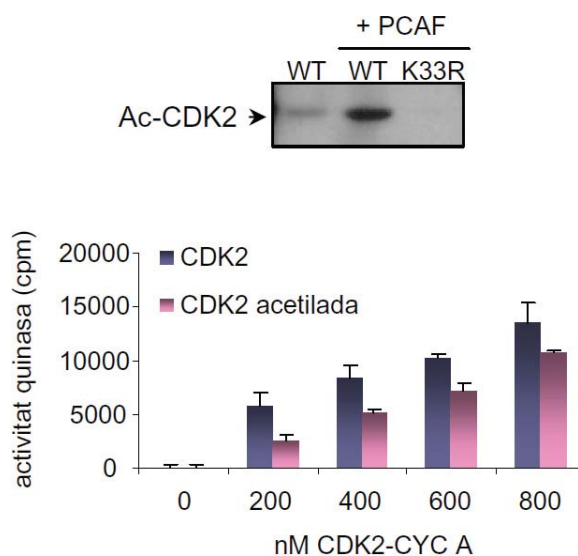


Figura 52. La CDK2 acetilada té menor activitat quinasa que la CDK2 no-acetilada. Les proteïnes CDK2 WT i K33R van ser sobreexpressades en soques BL-21 de *E. coli* i purificades utilitzant *beads* de glutatona sefarosa (veure "Materials i Mètodes"). Es va recollir 1µg de proteïna purificada en cada condició i les mostres es van resoldre en un gel de SDS-acrilamida, seguit de l'anàlisi per WB amb l'anticòs anti-acetil-lisina de Cell Signaling #9441 (part superior). A continuació es van realitzar assajos quinasa utilitzant diferents concentracions de complexos formats per ciclina A juntament amb CDK2 purificada en condicions normals o en condicions d'acetilació (és a dir, en presència de PCAF). La gràfica mostra la fosforilació del substrat histona H1 en aquestes diferents condicions (part inferior).

Com en el cas de la ciclina A, vam generar el mutant pseudo-acetilat CDK2 K33Q per veure quin efecte tenia sobre l'activitat quinasa d'aquesta proteïna. Vam realitzar assajos quinasa amb proteïnes purificades i també a partir de la immunoprecipitació de les construccions Flag-CDK2 WT, K33R o K33Q, prèviament transfectades a cèl·lules HeLa. En tots dos casos veiem que el mutant pseudo-acetilat es comporta igual que el mutant K33R.

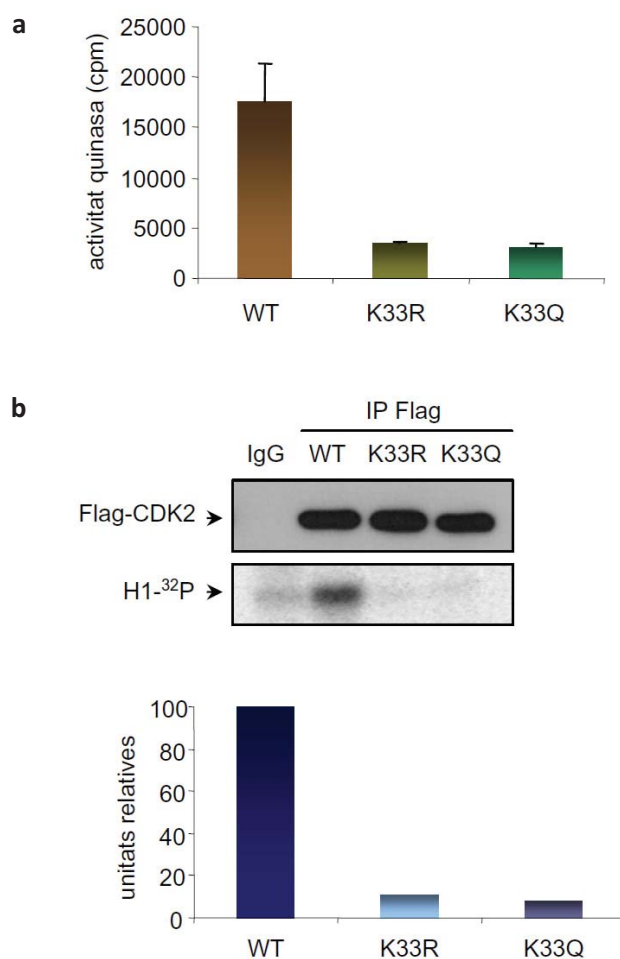


Figura 53. Efecte dels mutants CDK2 K33R i K33Q sobre l'activitat quinasa. (a) Es van purificar les proteïnes CDK2 WT, K33R i K33Q. A continuació es van incubar amb ciclina A i es van realitzar assajos per a comprovar l'activitat quinasa d'aquests complexos. Totes les proteïnes es van utilitzar a una concentració de 400 nM. A la gràfica es mostra la fosforilació del substrat histona H1 en cada condició. **(b)** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-CDK2 WT o K33R o K33Q. 24 h post-transfecció es van lisar les cèl·lules i es van realitzar IPs utilitzant anti-Flag o IgG com a control. Les proteïnes immunoprecipitades van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag (panell superior), i també es va determinar la seva activitat mitjançant assajos quinasa (al panell inferior es mostra la fosforilació de la histona H1 realitzada per cada tipus de CDK2. Imatge obtinguda amb PhosphorImager). La gràfica representa la quantificació del resultat de l'assaig quinasa.

📍 L'acetilació afecta la interacció de CDK2 amb altres proteïnes

Finalment vam fer una anàlisi de les interaccions de les diferents formes de CDK2 amb altres proteïnes. Per aquest motiu vam transfectar cèl·lules 293T amb les construccions Flag-CDK2 WT, K33R o K33Q i vam realitzar IPs amb anticossos anti-Flag. Tot seguit vam analitzar per WB les proteïnes que coprecipitaven amb aquestes construccions. Tal i com es mostra a la

figura 54, el mutant pseudo-acetilat interacciona menys amb la ciclina A. Aquest fet ens podria estar indicant que l'acetilació de CDK2 no sols impedeix la unió amb l'ATP, sinó que també podria conduir al trencament del complex ciclina A-CDK2, assegurant d'aquesta manera la completa inhibició de l'activitat quinasa associada a aquest complex. Com que CDK2 K33Q perd interacció amb la ciclina A, també la perd amb Cdh1 i Cdc20, que són activadors del complex APC/C encarregats de la degradació de ciclina A. D'altra banda, el mutant pseudo-acetilat també perd interacció amb l'inhibidor de complexos ciclina-CDK p27. p27 inhibeix l'activitat de CDK2 a través de la interacció amb la lisina 33, de manera que impedeix que l'ATP tingui accés a aquest residu. Sembla que l'acetilació de la CDK2, com que també té lloc a la lisina 33, no permet que ni l'ATP ni la p27 hi puguin accedir. De fet, com que l'acetilació ja té un efecte inhibitor, la seva presència podria fer que ja no sigui necessària l'acció de p27. D'altra banda, CDK2 K33Q també interacciona poc o gens amb les proteïnes Cul1, Skp1 i Skp2, que formen part del complex SCF^{Skp2} encarregat de la degradació de p27 via proteasoma. Aquesta poca interacció probablement és una conseqüència de la disminució de la interacció amb p27.

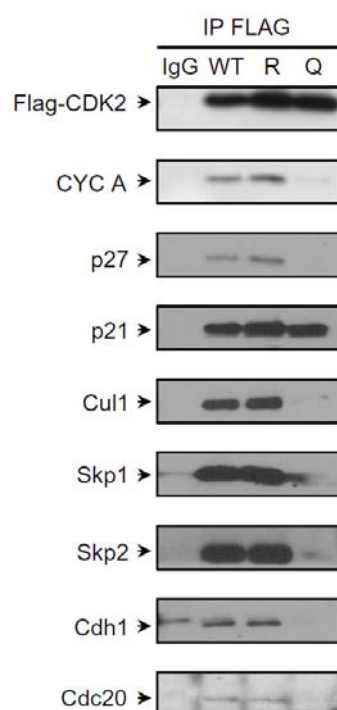


Figura 54. Anàlisi de les interaccions de CDK2 WT, K33R i K33Q amb diferents proteïnes. Cèl·lules 293T van ser transfectades amb les construccions Flag-CDK2 WT, K33R o K33Q. 24 h post-transfecció, les cèl·lules es van lisar i es van realitzar IPs amb anti-Flag o IgG com a control, seguit de l'anàlisi per WB de les proteïnes immunoprecipitades i els seus interactors.

*Science without religion is lame,
religion without science is blind.*

Albert Einstein

DISCUSSIÓ

Els complexes ciclina A-CDK2 estan implicats en la progressió de les fases S i G₂ del cicle cel·lular. Per una banda fosforilen els reguladors de G₀ i G₁ pRb, p21, p27 i Cdh1, inactivant-los o estimulant la seva degradació. Per una altra, permeten l'inici de la replicació i limiten la iniciació a un sol cop per cicle (bloqueig de la re-replicació) a través de fosforilar components dels complexos replicatius com ara les proteïnes ORC, Cdc6, Cdt1, MCM2-7, DNA polimerasa α i δ , i PCNA. A més, al principi de la mitosi els complexos ciclina A-CDK1 participen en la condensació dels cromosomes, la duplicació dels centrosomes i el trencament de la coberta nuclear. Estem davant, doncs, d'uns components molt importants de la maquinària del cicle cel·lular, la regulació dels quals ha de ser molt fina per tal que el cicle progressi adequadament.

Fins ara els mecanismes de regulació coneguts dels complexos ciclina A-CDK2 eren els següents:

- Interacció de la CDK amb la ciclina
- Fosforilacions i defosforilacions, activadores i inhibidores
- Interacció amb CKIs

Aquesta tesi afegeix un nivell més en la regulació dels complexos ciclina A-CDK2 a través de la interacció i acetilació per part de l'acetiltransferasa PCAF.

1 L'acetilasa PCAF

L'acetilasa PCAF (*p300/CBP associated factor*) pertany a la superfamília GNAT (*GCN5-related N-acetyltransferase*) (Neuwald and Landsman, 1997), dins la qual es troben altres proteïnes com ara GCN5, Hat1, Elp3 i Hpa2. Els membres d'aquesta família contenen un domini N terminal de longitud variable, un domini catalític anomenat HAT molt més conservat, una regió que interacciona amb el cofactor Ada2 i, a l'extrem carboxi, presenten un Bromodomini, el qual interacciona amb residus de lisina acetilats (figura 1).

Els membres de la família GNAT són importants per a la regulació del creixement cel·lular i el desenvolupament. En el ratolí, el fenotip del *knockout* de GCN5L és letal embrionari. En els llevats es requereix GCN5 per a la progressió normal del cicle a la transició G₂/M i per a

l'expressió de gens mitòtics. La importància de les proteïnes d'aquesta família està relacionada amb el seu paper en la transcripció gènica i la reparació del DNA (Carrozza et al., 2003).

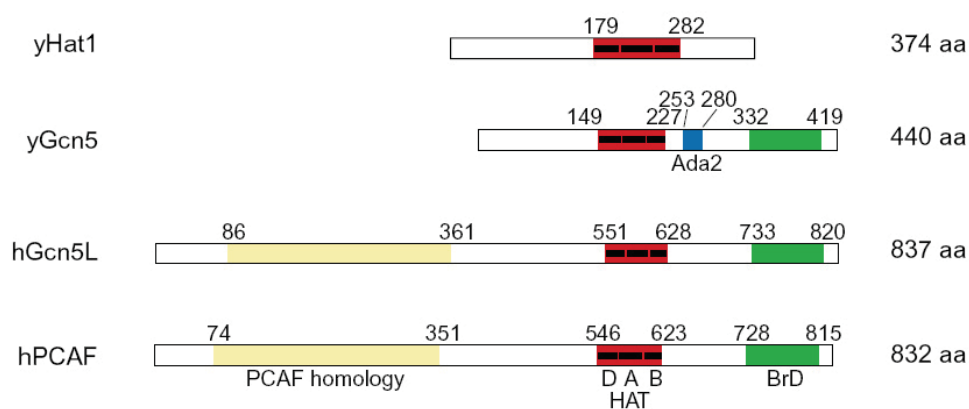


Figura 1. Diagrama que mostra els dominis funcionals de la família GNAT (Carrozza et al., 2003). La mida de cada proteïna s'indica a la dreta i la localització dels dominis funcionals la indiquen els números d'aminoàcids que hi ha sobre cada proteïna. En groc es mostra la regió d'homologia amb PCAF que es troba a la majoria de GNATs presents a metazous. En vermell es representa el domini acetiltransferasa (HAT), i en negre unes seqüències conservades d'aminoàcids (D, A i B). En blau trobem la regió d'interacció amb Ada2 i en verd el bromodomini (BrD).

PCAF va ser descrita per primer cop l'any 1996 com a proteïna associada a les HATs (histona acetiltransferases) p300 i CBP, amb activitat HAT intrínseca, i que competia amb l'oncoproteïna viral E1A per la unió a p300/CBP (Yang et al., 1996). PCAF i E1A presenten efectes oposats sobre la regulació del cicle, suggerint que PCAF té un paper en la inhibició de la progressió del cicle cel·lular i que l'acció mitogènica d'E1A té lloc a través de la disrupció de la interacció de PCAF amb p300/CBP.

La funció principal que s'ha atribuït a l'acetilasa PCAF és la de coactivador transcripcional, i s'ha descrit el seu paper en el procés de miogènesi i en l'activació transcripcional mitjançada per receptors nuclears i factors de creixement (revisat a (Sterner and Berger, 2000)). Tot i que inicialment va ser descrita i caracteritzada com a HAT, actualment es coneixen moltes proteïnes no-histones que són acetilades per PCAF. Entre aquestes es troben les proteïnes associades a cromatina HMG17 i HMG I(Y) (Herrera et al., 1999; Munshi et al., 1998), factors de transcripció relacionats amb el cicle cel·lular com p53 (acetilada en resposta a dany en el DNA) (Liu et al., 1999) i E2F (Martinez-Balbas et al., 2000), el factor implicat en la diferenciació muscular MyoD (Puri et al., 1997), la proteïna del virus d'immunodeficiència adquirida Tat

(Kiernan et al., 1999), i els factors de transcripció generals TFIIE i TFIIF (Imhof et al., 1997). Tot plegat ens indica que les funcions de PCAF no es limiten únicament a l'acetilació d'histones i per tant, l'activació transcripcional, sinó que participa en la regulació de molts processos cel·lulars.

La majoria de HATs formen part de complexos multiproteics. La major part de components d'aquests complexos ajuden a determinar l'especificitat de substrat de la HAT i permeten, per exemple, el reconeixement de cues d'histones específiques dins els nucleosomes substrat. A humans, el complex que conté PCAF s'assembla al complex SAGA de llevat, i està format per les proteïnes hAda2, cinc proteïnes TAF_{II} o relacionades amb TAF_{II} i la proteïna TRRAP. Aquesta última és membre de la família d'ATM i regula l'activitat d'E2F i c-Myc (McMahon et al., 1998). A més, diversos estudis han demostrat recentment que TRRAP participa en el *checkpoint* de fus mitòtic tot regulant la transcripció de gens que participen en aquest procés, com ara Mad1 i Mad2 (Li et al., 2004). Aquests descobriments semblen indicar que existeix una estreta relació entre l'acetilació i el control del cicle cel·lular.

Com que pertanyen a la mateixa família, en ocasions s'ha postulat que PCAF i GCN5 tenen funcions redundants. De fet, existeixen importants similituds i diferències entre aquestes proteïnes. En primer lloc, en cèl·lules humanes aquestes proteïnes formen part de complexos multiproteics diferents (les subunitats dels quals, per una altra banda, són molt semblants) (Ogryzko et al., 1998). A més, les GCN5 humana i de ratolí interaccionen també amb p300/CBP, suggerint la similitud funcional amb PCAF (Xu et al., 1998). Finalment, tant PCAF com GCN5 s'expressen ubíquament en ratolí, però els seus nivells en diferents teixits són molt diferents. En conclusió, caldran més estudis en el futur per acabar de determinar si aquestes proteïnes són funcionalment redundants o diferents.

A part de la seva activitat com a acetiltransferasa, recentment s'ha descrit que PCAF pot actuar també com a E3 ubiquitina lligasa tot regulant els nivells de la proteïna Hdm2 (l'ortòleg humà de MDM2), i per tant les funcions de p53 (Linares et al., 2007). L'activitat E3 de PCAF és crítica per accelerar la degradació de Hdm2 induïda per agents genotòxics com la neocarzinostatina a temps curts. A temps llargs predomina l'autoubiquitinització de Hdm2. Les regions responsables de l'activitat E3 de PCAF es troben dins el seu domini N terminal, i sembla que aquesta activitat és, almenys parcialment, independent de la seva activitat HAT, ja que Hdm2 no és acetilada per PCAF. No obstant, cal la integritat del domini HAT de PCAF per aconseguir la màxima degradació de Hdm2 *in vivo*. Aquest no és el primer cop que es descriu

que una acetilasa pot exercir un paper en la ubiquitinització de proteïnes. Anteriorment s'havia descrit una activitat E4 poli-ubiquitinitzadora associada a les proteïnes p300/CBP (Grossman et al., 2003), i la proteïna TAF1 de *Drosophila* (un component del factor de transcripció general TFIID) a part de la seva capacitat acetilasa també posseeix una activitat E1/E2 intrínseca (Pham and Sauer, 2000). Aquestes i altres observacions ens indiquen que existeix una estreta relació entre l'acetilació i la ubiquitinització de proteïnes. De fet, la maquinària d'acetilació s'està revelant, cada cop més clarament, com a un element determinant en el control de les activitats proteolítiques de la cèl·lula.

2 PCAF interacciona amb la ciclina A i l'acetilasa

En aquesta tesi demostrem que la ciclina A és acetilada als residus K54, 68, 95 i 112, i que aquestes lisines són els principals llocs d'acetilació tant *in vitro* com *in vivo*. PCAF és la principal acetilasa responsable de l'acetilació de ciclina A tal i com ho demostren els experiments d'acetilació *in vitro* i la transfecció fent servir el siRNA de PCAF. No obstant, no podem descartar que altres acetilases també puguin acetilar la ciclina, ja que en depleccionar els nivells de PCAF l'acetilació de ciclina A disminueix molt, però encara en queden uns nivells mínims. Sí que podem dir que la GCN5 no sembla que faci aquest paper, ja que en provocar la disminució dels seus nivells amb siRNA l'acetilació de la ciclina A no queda afectada; però encara queda una llarga llista d'acetilases que podrien participar en l'acetilació de ciclina A. Existeixen nombroses publicacions on es demostra que una mateixa proteïna pot ser acetilada per més d'una HAT, tot i que amb diferents eficiències i generalment en lisines diferents, indicant que aquests enzims poden tenir funcions redundants (Martinez-Balbas et al., 2000; Sabo et al., 2008).

Els nivells de PCAF oscil·len al llarg del cicle de manera similar als de ciclina A. Són baixos a la fase G₁, augmenten durant la fase S i es mantenen alts durant G₂ i al principi de la mitosi, fins que finalment disminueixen abans de la metafase. Com que la disminució de ciclina A és causada per la seva interacció i ubiquitinització pel complex APC/C^{Cd20}, el comportament similar de PCAF suggereix que també podria ser substrat d'aquesta ubiquitina lligasa. Aquesta és una teoria que potser caldria investigar. Alternativament, i donat que PCAF també presenta activitat E3 ubiquitina lligasa, podria ser que la seva degradació es produís per auto-ubiquitinització, la qual podria ser induïda d'alguna manera al principi de la mitosi.

La ciclina A interacciona amb PCAF durant la fase S i aquesta interacció es manté fins el principi de la mitosi on, abans de la metafase, aquest complex es desfà. Paral·lelament a la seva associació amb PCAF, la ciclina A és acetilada, i una anàlisi més detallada del procés ens indica que l'acetilació augmenta cap al principi de la mitosi, simultàniament amb la seva ubiquitinització. Aquestes dades apunten a que l'acetilació de la ciclina A per PCAF podria conduir a la seva degradació.

3 L'acetilació afecta l'estabilitat de la ciclina A

La ciclina A i la ciclina B són degradades en diferents moments del cicle: la ciclina A a la prometafase i la ciclina B més tard, a la metafase. A més aquestes dues proteïnes tenen una sensibilitat diferent enfront del *checkpoint* de fus mitòtic: mentre la ciclina B és protegida contra la degradació, la ciclina A és degradada. Aquests fets ens indiquen que han d'existir mecanismes específics que regulin l'estabilitat d'aquestes proteïnes i l'acetilació podria ser un d'ells.

Els residus que hem identificat com a acetilables per PCAF són K54, 68, 95 i 112, i es troben al domini N terminal de la ciclina A, on també se situen els dominis importants per determinar l'estabilitat de la proteïna (den Elzen and Pines, 2001; Geley et al., 2001). Dues d'aquestes lisines (K54 i K68) ja van ser descrites com a llocs importants per a la ubiquitinització i degradació de la ciclina A. Específicament, els autors d'aquell treball defensaven que la substitució de les lisines 37, 54 i 68 per arginines dóna lloc a una ciclina A més estable perquè no pot ser ubiquitinitzada en aquests residus (tot i que a les figures s'aprecia que aquest mutant encara pot ser ubiquitinitzat (Fung et al., 2005)). En aquesta tesi demostrarem que la mutació de les lisines K54, 68, i 95 i 112 a arginines genera una ciclina A encara més estable i amb un defecte molt més important en la seva capacitat de ser ubiquitinitzada, indicant que els residus 95 i 112 també són crucials en l'estabilitat de ciclina A.

A més, els nostres resultats ens inclinen a pensar que l'acetilació d'aquestes lisines és necessària per a la subsegüent ubiquitinització i degradació de la ciclina A (la ubiquitinització es donaria en altres residus diferents, o potser en aquests mateixos si poden ser deacetilats i després ubiquitinitzats). Les dades que ens porten a aquesta conclusió són diverses. En primer lloc, el tractament amb inhibidors de deacetilases provoca un augment de l'estat d'acetilació

de la ciclina A i una disminució de la seva vida mitja. En segon lloc, l'acetilació i la ubiquitinització de la ciclina A es donen simultàniament cap a G₂/M, i finalment, el mutant mimètic d'acetilació (4Q) es pot ubiquitinitzar igual que la ciclina A WT, mentre que el mutant no acetilable (4R) no s'ubiquitinitza. Si l'acetilació i la ubiquitinització de ciclina A fossin dos fenòmens excloents i que competissin entre sí, haurien de tenir lloc en moments o fases del cicle diferents, i el mutant pseudo-acetilat 4Q no s'hauria de poder ubiquitinitzar.

En aquest sentit, recentment han estat publicats diversos treballs on es parla de l'acetilació com a senyal que podria portar a la ubiquitinització i posterior degradació de diversos substrats. És el cas d'E2F1 (Galbiati et al., 2005), HIF-1 α (Jeong et al., 2002), l'antigen T de SV40 (Shimazu et al., 2006) i pRb (Leduc et al., 2006). Aquests descobriments expandeixen la visió inicial que considerava que, com que l'acetilació i la ubiquitinització de proteïnes es donen sobre el mateix tipus d'aminoàcid (els residus de lisina), el fet que una lisina sigui acetilada la "protegeix" de la ubiquitinització, i per tant, l'acetilació de proteïnes els confereix estabilitat. A més a més, a part de controlar l'estabilitat proteica, la ubiquitinització també controla altres funcions cel·lulars, com la transcripció i el trànsit intracel·lular (Aguilar and Wendland, 2003; Hicke and Dunn, 2003; Schnell and Hicke, 2003), de manera que és possible que el balanç acetilació-ubiquitinització estigui regulant alguns d'aquests processos no relacionats amb la degradació de proteïnes.

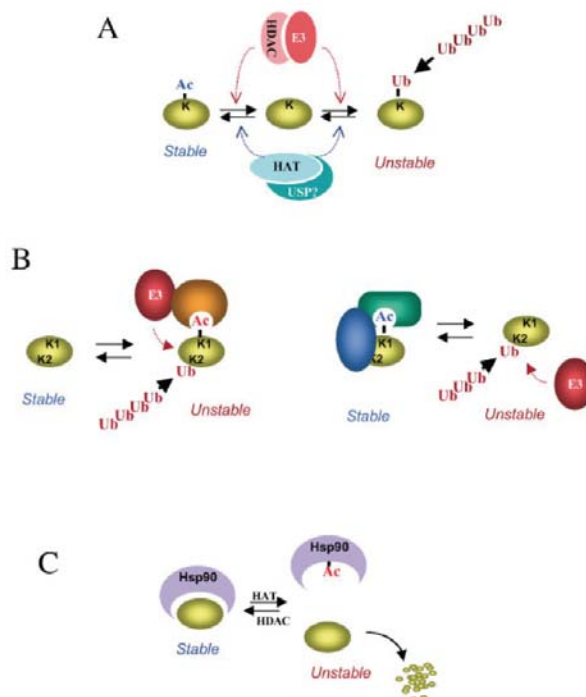


Figura 2. Mecanismes implicats en el control de l'estabilitat proteica que es donen després de l'acetilació (Caron et al., 2005). **(A)** Estabilització de proteïnes basada en la competència acetilació-ubiquitinització. En algunes

proteïnes com ara p53, les mateixes lisines són llocs d'acetilació i d'ubiquitinització. L'acetilació d'aquestes lisines bloquejaria la seva ubiquitinització i estabilitzaria la proteïna. Les HDACs en canvi alliberarien els llocs acceptors d'ubiquitines i prepararien la proteïna per a la seva ubiquitinització i degradació via proteasoma. El descobriment d'un complex format per MDM2 (una E3) i HDAC1 indica que les HDACs podrien potenciar la ubiquitinització de proteïnes. De manera similar, probablement les HATs en associació amb proteases específiques d'ubiquitina (USPs) podrien assegurar l'estabilitat de les proteïnes deubiquitinitzades a través de protegir les lisines diana contra l'acció de les E3s. **(B)** L'acetilació d'una lisina específica podria crear un lloc d'unió per al reclutament d'un complex que contingui una E3, la qual aleshores podria ubiquitinitzar la proteïna substrat (esquerra). Alternativament, una lisina acetilada podria atraure un "company", que aleshores emmascararia altres lisines tot protegint-les contra l'activitat d'E3s (dreta). **(C)** L'acetilació de lisines podria portar a la dissociació d'un complex de manera que els seus components quedarien exposats a la maquinària degradativa de la cèl·lula. La Hsp90 i les proteïnes amb qui interacciona en són un exemple.

Com a curiositat també esmentarem que l'estabilitat de proteïnes en alguns casos pot ser regulada per l'acetilació d'altres residus que no són lisines. És el cas de la N-acetiltransferasa NAT1, la qual acetila els seus substrats mitjançant un mecanisme anomenat "*ping pong bi bi*". El primer pas de la reacció consisteix en l'acetilació d'una cisteïna que es troba al centre actiu de l'enzim, seguida de la transferència del grup acetil al substrat. L'intermediari NAT1 acetilat és una proteïna estable, i la seva deacetilació dependent de substrat comporta la ràpida degradació de la proteïna a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Butcher et al., 2004). A part d'això, la poliubiquitinització a l'extrem N terminal de les proteïnes està emergint com una altra de manera de "marcar" les proteïnes per la seva posterior degradació via proteasoma, i això implicaria que l'acetilació de grups α -amino que té lloc a l'extrem N terminal de moltíssimes proteïnes quan són sintetitzades és un mecanisme protector contra aquest tipus particular de poliubiquitinització i posterior degradació (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004).

Les cèl·lules que sobreexpressen el mutant de ciclina A 4R experimenten una aturada del cicle cel·lular a G₂/M, amb un increment del nombre de cèl·lules aturades a la metafase mitòtica. Aquest fenotip d'aturada del cicle cel·lular just abans o al principi de l'anafase ja havia estat descrit anteriorment fent servir essencialment mutants de ciclina A que presentaven delecions a la regió N terminal (Parry and O'Farrell, 2001; Sigrist et al., 1995). En aquesta tesi per primer cop es descriu que la mutació de tan sols quatre lisines de l'extrem N terminal de la ciclina A és capaç de provocar l'aturada del cicle cel·lular.

Un dels motius pels quals es creu que una ciclina A més estable produeix aquest efecte és per la inhibició de la separasa. En cèl·lules de vertebrats està descrit que la separasa és un substrat de ciclina A-CDK, i cal que sigui defosforilada i per tant activada abans de l'anafase. Aleshores la separasa degrada la securina i es produeix la separació de cromàtides germanes. La fosfatasa que defosforila la separasa encara no es coneix. Una ciclina A més estable podria implicar que els complexos ciclina A-CDK siguin actius durant més temps, de manera que la separasa estaria constantment fosforilada i inactiva, i no es podria produir la segregació dels cromosomes.

Per tal de poder ser degradada, la ciclina A ha d'estar unida a la subunitat CDK, la qual al seu torn ha d'estar unida amb les proteïnes Cks1/2. Aleshores el complex ciclina A-CDK-Cks és reclutat per APC/C^{Cdc20} fosforilat i actiu a través de les subunitats Cks (Wolthuis et al., 2008). Cdc20 permetrà la ubiquitinització i degradació de la ciclina A independentment de que el *checkpoint* de fus mitòtic estigui activat o no. Una possible explicació de que el mutant 4R no sigui ubiquitinitzat podria ser que les lisines K54, 68, 95 i 112 fossin importants per la interacció de ciclina A amb algun component de la maquinària degradativa de la cèl·lula. Malgrat això, l'anàlisi de les interaccions entre la ciclina A 4R i les proteïnes del complex d'ubiquitinització APC/C indica que aquest mutant conserva la capacitat d'unir-se a totes les proteïnes del complex: APC3, Cdh1, Cdc20 (i CDKs i Cks). Per tant, el fet que el mutant 4R no s'ubiquitinizzi no es deu a una disminució de la seva capacitat per formar complexos amb la maquinària de degradació. Una possible explicació d'aquests resultats podria ser que cal que s'acetilini les lisines K54, 68, 95 i 112 perquè tingui lloc una correcta incorporació de molècules d'ubiquitina en altres llocs específics de la ciclina A.

4 L'acetilació afecta la interacció de ciclina A amb altres proteïnes i l'activitat de complexos ciclina A-CDK

Un resultat inesperat va ser l'observació de que els nivells de Cdh1, CDK2, CDK1 i Cks associades amb la ciclina A 4R eren molt superiors als nivells d'associació d'aquestes proteïnes amb la ciclina A WT. Aquests resultats semblen indicar que la ciclina A 4R té una major afinitat per aquestes proteïnes que la ciclina A WT (en el cas de les Cks1 i 2, però, com que aquestes proteïnes no interaccionen directament amb la ciclina A sinó amb les CDKs, probablement la major interacció de ciclina A 4R amb elles sigui conseqüència de la seva major afinitat per les

CDKs). Un fenomen similar a aquest ha estat descrit en un treball recent, on es va generar un mutant de Cdc20 amb totes les lisines mutades a arginines i va resultar que presentava una major afinitat per la proteïna Mad2 durant el *checkpoint* de fus mitòtic (Nilsson et al., 2008). En aquell cas, atribuïen l'increment d'afinitat al fet d'haver mutat algunes lisines molt conservades en els dominis d'interacció de Cdc20 amb Mad2. Això ens porta a la conclusió que a la regió N terminal de la ciclina A s'hi podrien trobar llocs d'interacció amb Cdh1 i les CDKs molt conservats, que encara no han estat descrits, i que es podrien veure afectats per l'acetilació. De fet, no s'ha aprofundit gaire en l'estudi d'aquesta regió de la ciclina A perquè encara no ha pogut ser cristal·litzada amb èxit.

A més, l'increment d'afinitat del mutant 4R per les CDKs va acompanyat d'un augment de l'activitat quinasa d'aquests complexos en comparació amb els formats per ciclina A WT. Una possible explicació d'aquest fenomen podria ser un canvi conformacional en el complex ciclina A 4R-CDK2 que el fes més actiu a força de millorar la interacció amb substrats, per exemple? Seria interessant aprofundir en el futur en les causes d'aquest increment d'activitat i saber si juga algun paper en el bloqueig de la ubiquitinització de la ciclina A 4R.

En conclusió, els resultats obtinguts de l'estudi dels efectes de l'acetilació de la ciclina A per PCAF revelen que l'acetilació de lisines específiques podria ser un nou mecanisme que condueixi a la degradació de la ciclina A al principi de la mitosi. A més a més, també hem trobat un possible nou mecanisme de regulació de l'activitat dels complexos ciclina A-CDK2 que depèn de la integritat d'aquestes quatre lisines.

5 PCAF interacciona amb CDK2 i inhibeix la seva activitat quinasa

En aquesta tesi hem demostrat que PCAF colocalitza i interacciona directament amb la proteïna CDK2. Aquesta interacció es tradueix en la inhibició de l'activitat quinasa dels complexos ciclina-CDK2 *in vitro* i *in vivo*.

Les anàlisis cinètiques de l'activitat dels complexos ciclina A-CDK2 en presència o absència de PCAF ens indiquen que PCAF és un inhibidor que no competeix amb l'ATP ni amb el substrat histona H1, ni tampoc trenca el complex ciclina A-CDK2. Com que PCAF interacciona

directament tant amb la ciclina com amb la CDK, és probable que aquesta doble interacció alteri d'alguna manera l'associació entre ciclina A i CDK2, produint una disminució de l'eficiència enzimàtica del complex. El fet que es necessiti la integritat d'un llarg fragment de PCAF (C terminal, aa 352-832) per inhibir l'activitat dels complexos ciclina A-CDK2 recolza aquesta teoria. Alguns dominis específics que es troben dins de la regió C terminal de PCAF com ara HAT, ADA i Bromo no poden inhibir per sí sols l'activitat ciclina-CDK. Per tant, probablement el fragment C terminal (que inclou els tres dominis anteriors) deu agrupar tots els llocs d'interacció amb la ciclina A i la CDK2. La identitat d'aquests llocs putatius d'interacció, però, encara ens és desconeguda.

En els experiments de sobreexpressió de PCAF *in vivo* hem vist que l'activitat quinasa dels complexos ciclina-CDK2 es veu disminuïda. Tanmateix, no podem assegurar que aquest fet estigui ocasionat únicament per la interacció directa de PCAF amb els membres del complex, ja que dins la cèl·lula PCAF fa múltiples funcions. Una possibilitat podria ser que PCAF, a través de l'acetilació i estabilització de p53, indueixi l'expressió de p21, la qual pot inhibir ciclina A-CDK2. Ara bé, en les nostres condicions experimentals no hem detectat un augment de p21 paral·lel a la transfecció de PCAF, així que la inhibició de ciclina A-CDK2 es devia donar per altres vies.

6 La sobreexpressió de PCAF atura el cicle cel·lular a través de CDK2

La sobreexpressió de PCAF atura la progressió del cicle en punts diferents segons el tipus cel·lular. Com que treballem amb diverses línies cel·lulars tumorals, les diferències moleculars que aquestes puguin presentar justificarien els efectes diferents derivats de la sobreexpressió d'aquesta proteïna. En el cas de cèl·lules HeLa, hem observat que PCAF indueix mort cel·lular i aturada a la fase G_1 , la qual cosa concorda amb el fet que PCAF sigui capaç d'inhibir els complexos ciclina E/A-CDK2 que permetrien que el cicle cel·lular avancés cap a les fases S i G_2 . En canvi, a cèl·lules HCT-116, PCAF provoca un increment del nombre de cèl·lules a les fases S i G_2 /M. Encara que aquests efectes puguin semblar discordants, una possible explicació podria ser que les cèl·lules HCT-116 siguin menys sensibles a l'efecte inhibitori de PCAF. Llavors l'augment del nombre de cèl·lules a les fases S i G_2 /M seria causat per un alentiment en la progressió del cicle cel·lular ocasionat per la inhibició d'una part dels complexos ciclina E/A-CDK2.

A HCT-116 també hem observat que es produeix la reversió de l'aturada del cicle quan coexpresssem PCAF i CDK2. Aquest resultat indica que PCAF podria estar afectant la disponibilitat de CDK2 a la cèl·lula i, si incrementem el *pool* de CDK2, les cèl·lules poden superar l'aturada. Pel que fa a les cèl·lules HeLa, encara no ho hem comprovat però en un futur proper es faran els experiments per determinar si la sobreexpressió de CDK2 és capaç de revertir l'aturada a la fase G₁.

També és interessant el fet que la PCAF Δ HAT, que presenta una petita deleció d'uns 20 aminoàcids dins el centre catalític de manera que és inactiva, també és capaç d'aturar el cicle cel·lular (com indiquen els experiments de FACS i comptatges fets amb clons amb expressió induïble de PCAF Δ HAT). Aquestes observacions recolzen la idea de que PCAF podria exercir funcions independents de la seva activitat com a acetilasa (com en el cas dels experiments on PCAF inhibeix *in vitro* i només per interacció els complexos ciclina A-CDK2).

Com hem explicat anteriorment, una de les funcions atribuïdes a PCAF és la de participar en l'activació transcripcional en resposta a progesterona. Les publicacions relacionades amb aquest tema presenten experiments de CHIP (*chromatin immunoprecipitation*) per demostrar que PCAF és reclutada pels promotors al cap de poc temps d'incorporar progesterona al medi, i assumeixen que fa la funció de coactivador transcripcional. Nosaltres, però, hem observat que l'expressió de PCAF provoca una disminució de l'activació transcripcional en resposta a progesterona. Aquests resultats potser són causats perquè en les nostres condicions provoquem una presència sostinguda de PCAF als promotors. Podria ser que en principi PCAF col·laborés amb SRC-1 en l'acetilació d'histones i l'activació de la transcripció, però al cap del temps, i com a conseqüència de la presència d'un nombre elevat de molècules de PCAF al nucli, acabés predominant la seva funció d'inhibició dels complexos ciclina A-CDK2. L'activitat de ciclina A-CDK2 es requereix per a la fosforilació del PR i l'activació de SRC-1, i quan aquest complex no és actiu, disminueix l'activació transcripcional. La resposta a progesterona implica l'expressió de gens que estimulen la progressió del cicle cel·lular, i si està inhibida el cicle probablement es veurà afectat. Aquesta podria ser una altra possible via a través de la qual PCAF comporta l'aturada del cicle cel·lular: impedit l'expressió de gens de progressió del cicle regulats per ciclina A-CDK2.

7 CDK2 és acetilada per PCAF

Hem observat que la CDK2 és acetilada *in vitro* per PCAF a la lisina 33. Aquesta lisina és essencial per a l'activitat de CDK2 ja que és un lloc d'interacció amb les molècules d'ATP, i la seva acetilació té com a conseqüència la inhibició de l'activitat quinasa del complex ciclina A-CDK2. Un fenomen molt similar ha estat descrit per CDK9. Recentment s'ha publicat un treball on es demostra que aquesta proteïna pot ser acetilada per GCN5 i PCAF a la lisina 48, que és l'equivalent a la K33 de CDK2 (Sabo et al., 2008). CDK9 està implicada en transcripció (Peterlin and Price, 2006), i els autors demostren que l'acetilació d'aquesta quinasa inhibeix específicament l'activitat transcripcional dependent de CDK9.

La K33 de CDK2 i la K48 de CDK9 són residus molt conservats que es troben al centre catalític no tan sols de tots els membres de la família de les CDKs, sinó també d'altres quinases. Per aquest motiu podríem especular que l'acetilació d'aquests residus de lisina podria ser un mecanisme molt general de regulació de l'activitat quinasa a la cèl·lula.

A més, l'anàlisi d'interaccions del mutant mimètic d'acetilació de CDK2 (CDK2 K33Q) ens indica que l'acetilació d'aquest residu no tan sols afecta l'activitat de l'enzim, sinó també la seva capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes, com ara p27 i ciclina A. En el cas de p27, un dels llocs pels quals interacciona amb el complex ciclina A-CDK2 és a través del seu domini RXL, però també interacciona amb la lisina 33 de CDK2 i així impedeix que hi arribi l'ATP (provocant la inhibició de l'activitat quinasa) (Russo et al., 1996). Com veiem, el mimètic d'acetilació CDK2 K33Q perd la interacció amb p27, indicant que l'acetilació pot interferir en aquesta associació. En canvi, aquest mutant no perd la interacció amb p21, possiblement perquè p21 no deu interaccionar amb la lisina 33 de CDK2, i només s'uneix a aquest complex a través dels seus dominis RXL. Com a conseqüència de la pèrdua d'interacció amb p27, CDK2 K33Q tampoc no interacciona amb Skp1-Skp2-Cul1, ja que aquestes proteïnes interaccionen directament amb p27 per tal de portar-la a degradar. El fet que el mutant pseudo-acetilat de CDK2 perdi interacció amb la ciclina A podria suggerir un altre aspecte més de la inhibició del complex ciclina A-CDK2 per PCAF: PCAF interacciona amb el complex i acetila la CDK2 inhibint la seva activitat quinasa i separant-la de la ciclina A, la qual també és acetilada i a continuació ubiquitinitzada i degradada via proteasoma. La pèrdua d'unió amb la ciclina del mutant CDK2 K33Q també justifica que no interaccioni amb Cdh1 ni Cdc20, ja que aquestes proteïnes són activadors del complex APC/C que interaccionen directament amb la ciclina A.

La inhibició del complex ciclina A-CDK2 per PCAF podria donar-se en un cicle normal a la transició G₂/M per tal de garantir la inactivació d'aquests complexos ciclina-CDK i la correcta degradació de la ciclina A, elements necessaris per a la progressió del cicle cel·lular. Però també hi ha altres circumstàncies on es podrien produir aquests fets. Per exemple, PCAF juga un paper molt important en el *checkpoint* de resposta a dany al DNA a través d'acetilar p53 i E2F1. Després de que es produeixi un "insult" al DNA, PCAF s'uneix a E2F1, l'acetila i l'estabilitza. Aquests complexos es relocalitzen i passen d'estar a promotors de gens de progressió del cicle a promotors de gens pro-apoptòtics (Ianari et al., 2004). En condicions de dany al DNA PCAF també acetila p53 a la lisina 320 i indueix l'expressió de gens regulats per p53 com ara PIG3 i NOXA (Liu et al., 1999; Terui et al., 2003). Els resultats presentats en aquesta tesi ens permeten hipotetitzar que una altra manera com PCAF podria participar en la resposta a dany al DNA seria inhibint els complexos ciclina-CDK2 per tal d'aturar la progressió del cicle. Així, l'activació de PCAF després del dany podria induir l'acetilació de ciclina A i CDK2, conduint a la inhibició de l'activitat CDK2 i l'aturada del cicle cel·lular.

8 En resum

Els mecanismes clàssics de regulació de l'activitat dels complexos ciclina-CDK inclouen la interacció amb la ciclina (la qual estimula l'activitat quinasa de la subunitat CDK), la interacció amb CKIs (que, per contra, inhibeix l'activitat quinasa), i la fosforilació, que també regula positiva i negativament l'activitat de les CDKs. Últimament, però, estan emergint nous mecanismes que regulen l'activitat d'aquests complexos. Per exemple, la proteïna SET (oncogen i proteïna remodeladora de la cromatina) inhibeix l'activitat de ciclina B-CDK1 tot associant-se amb aquest complex (Canela et al., 2003). Un altre exemple és l'acetilació de la lisina 48 de CDK9 per GCN5 i PCAF, la qual inactiva aquest enzim (Sabo et al., 2008).

El nostre treball demostra que PCAF interacciona directament i acetila la ciclina A tot estimulant la seva degradació al principi de la mitosi, amb la conseqüent inactivació dels complexos ciclina A-CDK2. A més, aquesta acetilasa controla l'activitat quinasa de CDK2 per un mecanisme que inclou la unió directa amb el complex ciclina A-CDK2 (que d'alguna forma afecta la seva activitat) i l'acetilació d'una lisina essencial situada dins el centre actiu de la quinasa. L'acetilació de CDK2 podria ser també una estratègia per garantir que, un cop se

separi de la ciclina A, romanguí inactiva tot i que es pogués unir a una altra ciclina (E o B, per exemple).

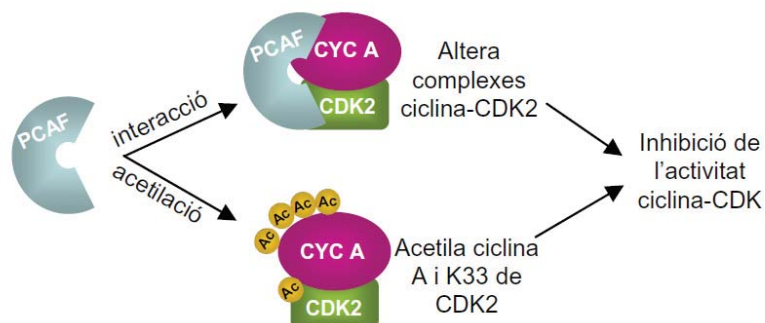


Figura 3. Esquema resum dels mecanismes pels quals PCAF inhibeix el complex ciclina A-CDK2.

9 Importància des del punt de vista terapèutic

A part dels resultats obtinguts en aquesta tesi, altres estudis recents subratllen la comunicació entre la maquinària reguladora de cicle i les proteïnes que regulen l'acetilació d'histones i de substrats no-histona (HATs i HDACs). Per exemple, pRb s'uneix a E2F i a HDACs, i aquestes últimes tenen un paper important en les funcions de supressió de tumors i la repressió transcripcional mitjançades per pRb. Per una altra banda, el complex ciclina E-CDK2 fosforila les HATs p300/CBP, estimulant així la progressió del cicle cel·lular, i també fosforila NPAT, la qual promou la progressió del cicle en absència de pRb i contribueix a l'expressió dependent de cicle dels gens que codifiquen per histones. L'acetilació d'histones per part d'algunes HATs també juga un paper molt important en la coordinació de l'expressió gènica i la progressió del cicle cel·lular. Finalment, molts factors de transcripció han estat identificats com a substrats de HATs, i mutacions en els llocs d'acetilació s'han associat amb la seva activació constitutiva i l'estimulació de la proliferació cel·lular, suggerint un paper molt important de l'acetilació tant en la repressió com en l'activació transcripcional. En conjunt, tots aquests estudis proporcionen un model en el que quinases reguladores de cicle poden fosforilar i inactivar HDACs, coordinar l'expressió dels gens que codifiquen per histones i unir-se a histona acetilases.

Aquestes evidències de que hi ha una comunicació entre quinases dependents de cicle i l'expressió gènica d'histones o la regulació de HATs suggereixen que els agents quimioterapèutics que tenen com a diana l'acetilació d'histones podrien tenir efectes complexes i possiblement complementaris amb els agents que tenen com a dianes les CDKs. Per exemple, el butirat de sodi és un inhibidor de HDACs que provoca l'aturada del cicle cel·lular i reverteix el fenotip d'algunes cèl·lules transformades. Un dels mecanismes a través dels quals provoca aquest efecte és induint l'expressió de CKIs.

Intentant aplicar aquests coneixements als resultats d'aquesta tesi, podríem pensar que en els tumors caracteritzats per una hiperactivació del complex ciclina A-CDK2 (per exemple, els melanomes), l'ús d'inhibidors de HDACs com a agents quimioterapèutics podria estar molt indicat. La inhibició de la deacetilació generaria un panorama on els substrats acetilats per PCAF no serien deacetilats, i per tant el complex ciclina A-CDK2 quedaria molt inhibit. Probablement l'administració simultània de fàrmacs que inhibeixen les CDKs encara potenciarà més aquest efecte. També cal tenir en compte, com ja vam esmentar a la introducció, que els ratolins *knockout* de CDK2 són viables i això indica que l'activitat de CDK2 no és essencial per a poder desenvolupar un cicle normal. No obstant, les cèl·lules tumorals sembla que sí que podrien ser més dependents de l'activitat CDK2 per tal de mantenir un ritme de divisió molt elevat, i justament aquesta diferència podria permetre que els fàrmacs orientats a inhibir les CDKs (tant els inhibidors només de CDKs com els inhibidors de HDACs) tinguessin efecte només sobre les cèl·lules tumorals i no sobre les cèl·lules sanes.

10 Perspectives de futur

A partir del treball presentat en aquesta tesi es plantegen tot un seguit de qüestions en les quals caldria aprofundir. En primer lloc, ja que els nostres resultats semblen indicar que l'acetilació de les lisines K54, 68, 95 i 112 de ciclina A conduiria a la ubiquitinització de la proteïna, seria interessant determinar quins són els residus que s'ubiquitinitzen. Així podríem tenir una idea clara de tot el procés que porta a la degradació de la ciclina A, el qual encara no es coneix prou bé.

En segon lloc, seria molt rellevant l'estudi de la importància de les lisines K54, 68, 95 i 112 en la interacció amb Cdh1, CDK1 i CDK2. Fins ara hem observat que quan aquestes lisines es

muten a arginines, la interacció augmenta. Per què passa això? I a més, els complexos que forma el mutant 4R amb les CDKs són més actius; quin sentit té? Es genera algun canvi estructural que fa que la CDK sigui més activa? O és que aquest complex no pot interaccionar amb CKIs o altres inhibidors? La regió N terminal de ciclina A que comprèn els aa 1 al 171, que és on es troben aquestes lisines encara no ha pogut ser cristal·litzada. Posar esforços en la determinació de l'estructura d'aquesta part de la ciclina A ens aportaria moltíssima informació per resoldre les qüestions que acabem de plantejar.

D'altra banda, hem observat que la ciclina A interacciona amb HDAC1, i CDK2 amb HDAC1 i 2. Tindria un enorme interès determinar quan i on es produeixen aquestes interaccions i quin sentit tenen: podria ser que la HDAC1 deacetilés els residus que són acetilats per PCAF? Si fos així, es deixaria de degradar la ciclina A? I què passaria amb la CDK2? La interacció amb HDACs deacetilaria la K33 de CDK2, tot activant l'enzim? Una altra possibilitat podria ser que la interacció del complex ciclina A-CDK2 amb HDACs tingués sentit des del punt de vista transcripcional, i afectés l'expressió dels gens regulats per ciclina A-CDK2 (com ara els de resposta a progesterona).

També seria interessant invertir més esforços en intentar desenvolupar un anticòs que reconegui la CDK2 acetilada *in vivo*. Ja que els autors del treball sobre l'acetilació de la K48 de CDK9 van tenir (suposadament) èxit en aquesta empresa, potser ho hauríem de tornar a provar. El fet de disposar d'una eina així ens permetria situar el moment i les circumstàncies en les quals es produeix l'acetilació de CDK2. I per exemple podríem provar si és certa la hipòtesi de que PCAF podria acetilar CDK2 en situacions de dany al DNA. Per no dir que també es podrien fer estudis de localització subcel·lular i immunoprecipitacions per comprovar els canvis en les interaccions amb altres proteïnes.

Per tal d'assegurar que la reversió dels fenotips d'aturada del cicle provocats per PCAF té a veure amb la interacció directa de PCAF amb CDK2, es podrien generar mutants de CDK2 que no interaccionin amb PCAF. Aquests mateixos mutants es podrien fer servir en els assajos de resposta a progesterona, per tal de veure si PCAF està provocant la inhibició de la transcripció a través d'interaccionar i inhibir el complex ciclina A-CDK2. De fet, com que PCAF també interacciona directament amb la ciclina A, potser seria interessant generar mutants de PCAF que no interaccionin ni amb CDK2 ni amb ciclina A, de manera que PCAF no pogués continuar inhibint el complex a través de la unió amb ciclina A. I seguint amb el tema de la resposta a progesterona, podríem analitzar si la presència de PCAF impedeix que ciclina A-CDK2 fosforili

SRC-1 (l'acetilasa que es requereix per a l'activació de la transcripció dels gens de resposta a progesterona).

A part de tot això, també hem observat que CDK1 i ciclina E podrien ser acetilades *in vitro* per PCAF. La confirmació d'aquests resultats podria complementar el treball realitzat en aquesta tesi i iniciar noves línies d'investigació al laboratori.

*Science is a wonderful thing
if one does not have to earn one's living at it.*

Albert Einstein

CONCLUSIONS

1. La ciclina A és acetilada per l'acetiltransferasa PCAF a les lisines K54, 68, 95 i 112.
2. La interacció entre ciclina A i PCAF és directa, i es dona a les fases S i G₂/M del cicle cel·lular.
3. L'acetilació de la ciclina A comporta la seva posterior degradació: provoca una disminució de la vida mitja de la ciclina A, i es dona simultàniament a la seva ubiquitinització.
4. El mutant de ciclina A que no es pot acetilar (4R) no s'ubiquitinitza, és més estable que la ciclina A WT i provoca l'aturada del cicle a G₂/M.
5. La major estabilitat del mutant 4R no es deu a que es vegi afectada la seva interacció amb la maquinària degradativa de la cèl·lula.
6. Les lisines K54, 68, 95 i 112 són importants per regular la interacció de ciclina A amb Cdh1 i CDKs, i també per a la regulació de l'activitat quinasa associada a ciclina A.
7. CDK2 també interacciona directament amb PCAF a les fases S i G₂/M del cicle cel·lular.
8. La interacció de PCAF amb CDK2 provoca la inhibició de la seva activitat quinasa per un mecanisme desconegut que probablement afecta la conformació del complex ciclina A-CDK2.
9. La sobreexpressió de PCAF afecta la progressió del cicle i provoca una disminució de la proliferació cel·lular. La coexpressió de CDK2 reverteix aquest fenotip, indicant que aquests efectes es produeixen a través de CDK2.
10. CDK2 és acetilada *in vitro* per PCAF a la lisina 33 i queda inactiva, probablement perquè perd la interacció amb l'ATP. El mutant mimètic d'acetilació CDK2 K33Q també perd la interacció amb la ciclina A i p27.

The Roots of Violence:
Wealth without work,
Pleasure without conscience,
Knowledge without character,
Commerce without morality,
Science without humanity,
Worship without sacrifice,
Politics without principles.
Mahatma Gandhi

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, R. C., and Wendland, B. (2003). Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15, 184-190.
- Aleem, E., Kiyokawa, H., and Kaldis, P. (2005). Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 7, 831-836.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9, 69-75.
- Ang, X. L., and Harper, J. W. (2004). Interwoven ubiquitination oscillators and control of cell cycle transitions. *Sci STKE* 2004, pe31.
- Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S., and Kato, J. Y. (2000). Cdk2-dependent and -independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J Biol Chem* 275, 6337-6345.
- Arellano, M., and Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 559-573.
- Assoian, R. K., and Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9, 93-98.
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110, 55-67.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428, 190-193.
- Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K. (2000). Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5522-5527.
- Bauer, W. R., Hayes, J. J., White, J. H., and Wolffe, A. P. (1994). Nucleosome structural changes due to acetylation. *J Mol Biol* 236, 685-690.
- Bell, S. D., Botting, C. H., Wardleworth, B. N., Jackson, S. P., and White, M. F. (2002). The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science* 296, 148-151.
- Bell, S. P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333-374.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 13, 1775-1785.
- Berthet, C., and Kaldis, P. (2007). Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 26, 4469-4477.

- Bhattacharjee, R. N., Banks, G. C., Trotter, K. W., Lee, H. L., and Archer, T. K. (2001). Histone H1 phosphorylation by Cdk2 selectively modulates mouse mammary tumor virus transcription through chromatin remodeling. *Mol Cell Biol* 21, 5417-5425.
- Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.
- Blow, J. J., and Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 476-486.
- Boonyaratanakornkit, V., and Edwards, D. P. (2004). Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem* 40, 105-120.
- Bortner, D. M., and Rosenberg, M. P. (1995). Overexpression of cyclin A in the mammary glands of transgenic mice results in the induction of nuclear abnormalities and increased apoptosis. *Cell Growth Differ* 6, 1579-1589.
- Bosco, G., Du, W., and Orr-Weaver, T. L. (2001). DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol* 3, 289-295.
- Bradbury, E. M., Inglis, R. J., and Matthews, H. R. (1974). Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation. *Nature* 247, 257-261.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J., and Hunt, T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4344-4349.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.
- Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A., Garman, E. F., Wakatsuki, S., Mitchell, E., Rasmussen, B., Hunt, T., and Johnson, L. N. (1995). The crystal structure of cyclin A. *Structure* 3, 1235-1247.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Buchkovich, K., Duffy, L. A., and Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58, 1097-1105.
- Butcher, N. J., Arulpragasam, A., and Minchin, R. F. (2004). Proteasomal degradation of N-acetyltransferase 1 is prevented by acetylation of the active site cysteine: a mechanism for the slow acetylator phenotype and substrate-dependent down-regulation. *J Biol Chem* 279, 22131-22137.
- Canela, N., Rodriguez-Vilarrupla, A., Estanyol, J. M., Diaz, C., Pujol, M. J., Agell, N., and Bachs, O. (2003). The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem* 278, 1158-1164.
- Cannell, E., and Mittnacht, S. (1999). Viral encoded cyclins. *Semin Cancer Biol* 9, 221-229.

- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H., and Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* 74, 979-992.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 739-751.
- Carlson, B., Lahusen, T., Singh, S., Loaiza-Perez, A., Worland, P. J., Pestell, R., Albanese, C., Sausville, E. A., and Senderowicz, A. M. (1999). Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res* 59, 4634-4641.
- Carnero, A., and Hannon, G. J. (1998). The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 43-55.
- Caron, C., Boyault, C., and Khochbin, S. (2005). Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* 27, 408-415.
- Carrozza, M. J., Utey, R. T., Workman, J. L., and Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* 19, 321-329.
- Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbe, J. C., and Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24, 314-325.
- Ciechanover, A., and Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 14, 103-106.
- Coleman, T. R., Carpenter, P. B., and Dunphy, W. G. (1996). The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* 87, 53-63.
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., and Lydon, J. P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 68, 771-778.
- Cook, J. G., Park, C. H., Burke, T. W., Leone, G., DeGregori, J., Engel, A., and Nevins, J. R. (2002). Analysis of Cdc6 function in the assembly of mammalian prereplication complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1347-1352.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C. Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D., and Gautier, J. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol Cell* 6, 649-659.
- Courvalin, J. C., Segil, N., Blobel, G., and Worman, H. J. (1992). The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *J Biol Chem* 267, 19035-19038.
- Coverley, D., Pelizon, C., Trewick, S., and Laskey, R. A. (2000). Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1929-1938.
- Chao, Y., Shih, Y. L., Chiu, J. H., Chau, G. Y., Lui, W. Y., Yang, W. K., Lee, S. D., and Huang, T. S. (1998). Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 58, 985-990.

Cheng, A., Xiong, W., Ferrell, J. E., Jr., and Solomon, M. J. (2005). Identification and comparative analysis of multiple mammalian Speedy/Ringo proteins. *Cell Cycle* 4, 155-165.

Chu, I., Sun, J., Arnaout, A., Kahn, H., Hanna, W., Narod, S., Sun, P., Tan, C. K., Hengst, L., and Slingerland, J. (2007). p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* 128, 281-294.

De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., and Kim, S. H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.

den Elzen, N., and Pines, J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153, 121-136.

Desdouets, C., Matesic, G., Molina, C. A., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J. (1995). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 15, 3301-3309.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.

Dinarina, A., Perez, L. H., Davila, A., Schwab, M., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (2005). Characterization of a new family of cyclin-dependent kinase activators. *Biochem J* 386, 349-355.

Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., Nishimura, E. K., Golub, T. R., and Fisher, D. E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 6, 565-576.

Dutta, A., and Stillman, B. (1992). cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication. *Embo J* 11, 2189-2199.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Erlandsson, F., Linnman, C., Ekholm, S., Bengtsson, E., and Zetterberg, A. (2000). A detailed analysis of cyclin A accumulation at the G(1)/S border in normal and transformed cells. *Exp Cell Res* 259, 86-95.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.

Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30, 290-294.

Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 12, 1871-1883.

Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9, 2364-2372.

- Ferby, I., Blazquez, M., Palmer, A., Eritja, R., and Nebreda, A. R. (1999). A novel p34(cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* 13, 2177-2189.
- Ferreira, M. F., Santocanale, C., Drury, L. S., and Diffley, J. F. (2000). Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* 20, 242-248.
- Fisher, R. P., and Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.
- Frangioni, J. V., and Neel, B. G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210, 179-187.
- Fujita, M., Yamada, C., Tsurumi, T., Hanaoka, F., Matsuzawa, K., and Inagaki, M. (1998). Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase. *J Biol Chem* 273, 17095-17101.
- Fung, T. K., Yam, C. H., and Poon, R. Y. (2005). The N-terminal regulatory domain of cyclin A contains redundant ubiquitination targeting sequences and acceptor sites. *Cell Cycle* 4, 1411-1420.
- Furuno, N., den Elzen, N., and Pines, J. (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 147, 295-306.
- Galbiati, L., Mendoza-Maldonado, R., Gutierrez, M. I., and Giacca, M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* 4, 930-939.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* 270, 17923-17928.
- Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J. M., and Hunt, T. (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 153, 137-148.
- Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114, 431-443.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-1179.
- Gladden, A. B., and Diehl, J. A. (2003). The cyclin D1-dependent kinase associates with the pre-replication complex and modulates RB.MCM7 binding. *J Biol Chem* 278, 9754-9760.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Gong, D., Pomerening, J. R., Myers, J. W., Gustavsson, C., Jones, J. T., Hahn, A. T., Meyer, T., and Ferrell, J. E., Jr. (2007). Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol* 17, 85-91.
- Graham, J. D., and Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502-519.

- Grimmler, M., Wang, Y., Mund, T., Cilensek, Z., Keidel, E. M., Waddell, M. B., Jakel, H., Kullmann, M., Kriwacki, R. W., and Hengst, L. (2007). Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128, 269-280.
- Grossman, S. R., Deato, M. E., Brignone, C., Chan, H. M., Kung, A. L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Guardavaccaro, D., Kudo, Y., Boulaire, J., Barchi, M., Busino, L., Donzelli, M., Margottin-Goguet, F., Jackson, P. K., Yamasaki, L., and Pagano, M. (2003). Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Dev Cell* 4, 799-812.
- Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2006). Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Mol Cell* 22, 1-4.
- Halkidou, K., Gnanapragasam, V. J., Mehta, P. B., Logan, I. R., Brady, M. E., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., and Robson, C. N. (2003). Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene* 22, 2466-2477.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Harper, J. W., Burton, J. L., and Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16, 2179-2206.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., and et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 6, 387-400.
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hassan, A. H., Prochasson, P., Neely, K. E., Galasinski, S. C., Chandy, M., Carrozza, M. J., and Workman, J. L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.
- Hateboer, G., Wobst, A., Petersen, B. O., Le Cam, L., Vigo, E., Sardet, C., and Helin, K. (1998). Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol* 18, 6679-6697.
- Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579-589.
- Heald, R., McLoughlin, M., and McKeon, F. (1993). Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74, 463-474.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583-592.
- Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S., and Gautier, J. (1996). Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12223-12228.

Henglein, B., Chenivresse, X., Wang, J., Eick, D., and Brechot, C. (1994). Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5490-5494.

Hengst, L., and Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* *227*, 25-41.

Henricksen, L. A., and Wold, M. S. (1994). Replication protein A mutants lacking phosphorylation sites for p34cdc2 kinase support DNA replication. *J Biol Chem* *269*, 24203-24208.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* *1*, 3-11.

Herrera, J. E., Sakaguchi, K., Bergel, M., Trieschmann, L., Nakatani, Y., and Bustin, M. (1999). Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol* *19*, 3466-3473.

Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* *19*, 141-172.

Hinds, P. W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., and Weinberg, R. A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* *70*, 993-1006.

Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* *12*, 53-63.

Hsu, J. Y., Reimann, J. D., Sorensen, C. S., Lukas, J., and Jackson, P. K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* *4*, 358-366.

Huet, X., Rech, J., Plet, A., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1996). Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol* *16*, 3789-3798.

Hughes, R. E. (2002). Polyglutamine disease: acetyltransferases awry. *Curr Biol* *12*, R141-143.

Hunt, T., Luca, F. C., and Ruderman, J. V. (1992). The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J Cell Biol* *116*, 707-724.

Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E., and Gulino, A. (2004). Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* *279*, 30830-30835.

Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* *7*, 689-692.

Ino, H., and Chiba, T. (2001). Cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 are required for excitotoxin-induced neuronal cell death in vivo. *J Neurosci* *21*, 6086-6094.

Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* *272*, 24508-24513.

Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Otori, A., and Kitagawa, M. (2000). Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* *275*, 16235-16241.

- Izumi, M., Yatagai, F., and Hanaoka, F. (2001). Cell cycle-dependent proteolysis and phosphorylation of human Mcm10. *J Biol Chem* 276, 48526-48531.
- Jares, P., and Blow, J. J. (2000). *Xenopus cdc7* function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. *Genes Dev* 14, 1528-1540.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., and Kim, K. W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709-720.
- Jiang, W., McDonald, D., Hope, T. J., and Hunter, T. (1999). Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Embo J* 18, 5703-5713.
- Kaldis, P., and Aleem, E. (2005). Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. *Cell Cycle* 4, 1491-1494.
- Kaspar, M., Dienemann, A., Schulze, C., and Sprenger, F. (2001). Mitotic degradation of cyclin A is mediated by multiple and novel destruction signals. *Curr Biol* 11, 685-690.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., and Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7, 331-342.
- Kawasaki, Y., Hiraga, S., and Sugino, A. (2000). Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 5, 975-989.
- Kelly, W. K., Richon, V. M., O'Connor, O., Curley, T., MacGregor-Curtelli, B., Tong, W., Klang, M., Schwartz, L., Richardson, S., Rosa, E., *et al.* (2003). Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res* 9, 3578-3588.
- Kiernan, R. E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K. T., *et al.* (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *Embo J* 18, 6106-6118.
- King, R. W., Glotzer, M., and Kirschner, M. W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell* 7, 1343-1357.
- King, R. W., Jackson, P. K., and Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.
- Kleff, S., Andrusis, E. D., Anderson, C. W., and Sternglanz, R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 270, 24674-24677.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 23, 417-425.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J. P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279-1294.

- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P. M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* *1*, 371-380.
- Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K., and Masai, H. (1999). A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol Cell Biol* *19*, 5083-5095.
- Kurland, J. F., and Tansey, W. P. (2004). Crashing waves of destruction: the cell cycle and APC(Cdh1) regulation of SCF(Skp2). *Cancer Cell* *5*, 305-306.
- Labib, K., Tercero, J. A., and Diffley, J. F. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* *288*, 1643-1647.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* *47*, 69-85.
- Larner, J. M., Lee, H., Little, R. D., Dijkwel, P. A., Schildkraut, C. L., and Hamlin, J. L. (1999). Radiation down-regulates replication origin activity throughout the S phase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* *27*, 803-809.
- Lau, O. D., Kundu, T. K., Soccio, R. E., Ait-Si-Ali, S., Khalil, E. M., Vassilev, A., Wolffe, A. P., Nakatani, Y., Roeder, R. G., and Cole, P. A. (2000). HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* *5*, 589-595.
- Lavau, C., Du, C., Thirman, M., and Zeleznik-Le, N. (2000). Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *Embo J* *19*, 4655-4664.
- Leduc, C., Claverie, P., Eymin, B., Col, E., Khochbin, S., Brambilla, E., and Gazzeri, S. (2006). p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* *25*, 4147-4154.
- Lee, J. K., Seo, Y. S., and Hurwitz, J. (2003). The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2334-2339.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* *9*, 639-649.
- Lee, Y. M., and Sicinski, P. (2006). Targeting cyclins and cyclin-dependent kinases in cancer: lessons from mice, hopes for therapeutic applications in human. *Cell Cycle* *5*, 2110-2114.
- Lees, E. M., and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* *13*, 1194-1201.
- Leveillard, T., and Wasylyk, B. (1997). The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter. *J Biol Chem* *272*, 30651-30661.
- Lew, D. J., and Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 795-804.
- Li, H., Cuenin, C., Murr, R., Wang, Z. Q., and Herceg, Z. (2004). HAT cofactor Trrap regulates the mitotic checkpoint by modulation of Mad1 and Mad2 expression. *Embo J* *23*, 4824-4834.

- Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* *277*, 50607-50611.
- Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H., and Kastan, M. B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* *404*, 613-617.
- Linares, L. K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., and Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol* *9*, 331-338.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., and Piwnica-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* *17*, 571-583.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* *19*, 1202-1209.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* *193*, 265-275.
- Lukas, C., Sorensen, C. S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J. M., Bartek, J., and Lukas, J. (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* *401*, 815-818.
- Lukas, J., and Bartek, J. (2004). Cell division: the heart of the cycle. *Nature* *432*, 564-567.
- Maiorano, D., Moreau, J., and Mechali, M. (2000). XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* *404*, 622-625.
- Maity, A., McKenna, W. G., and Muschel, R. J. (1997). Cyclin A message stability varies with the cell cycle. *Cell Growth Differ* *8*, 311-318.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* *30*, 630-641.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* *118*, 493-504.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J. Y., Loktev, A., Hsieh, H. M., Reimann, J. D., and Jackson, P. K. (2003). Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* *4*, 813-826.
- Marks, P. A., Richon, V. M., Breslow, R., and Rifkind, R. A. (2001). Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr Opin Oncol* *13*, 477-483.
- Martin, A., Odajima, J., Hunt, S. L., Dubus, P., Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell* *7*, 591-598.

- Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 19, 662-671.
- Masai, H., Matsui, E., You, Z., Ishimi, Y., Tamai, K., and Arai, K. (2000). Human Cdc7-related kinase complex. In vitro phosphorylation of MCM by concerted actions of Cdks and Cdc7 and that of a critical threonine residue of Cdc7 by Cdks. *J Biol Chem* 275, 29042-29052.
- McCampbell, A., and Fischbeck, K. H. (2001). Polyglutamine and CBP: fatal attraction? *Nat Med* 7, 528-530.
- McDonnell, D. P., Shahbaz, M. M., Vegeto, E., and Goldman, M. E. (1994). The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48, 425-432.
- McGarry, T. J., and Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.
- McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A. M., Bartek, J., and Nigg, E. A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* 1, 88-93.
- Mimura, S., and Takisawa, H. (1998). Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J* 17, 5699-5707.
- Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., *et al.* (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13, 1181-1189.
- Moore, N. L., Narayanan, R., and Weigel, N. L. (2007). Cyclin dependent kinase 2 and the regulation of human progesterone receptor activity. *Steroids* 72, 202-209.
- Moreau, J. L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J. C., Peaucellier, G., Picard, A., and Genevieve, A. M. (1998). Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Dev Biol* 200, 182-197.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol* 8, 767-772.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J., and Orth, K. (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211-1214.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., and Conneely, O. M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9744-9749.

- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., and Conneely, O. M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* *289*, 1751-1754.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G., and Thanos, D. (1998). Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* *2*, 457-467.
- Murphy, M., Stinnakre, M. G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C., and Sobczak-Thepot, J. (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* *15*, 83-86.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., *et al.* (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* *19*, 2069-2081.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* *6*, 661-672.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* *16*, 323-333.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 369-381.
- Narayanan, R., Adigun, A. A., Edwards, D. P., and Weigel, N. L. (2005a). Cyclin-dependent kinase activity is required for progesterone receptor function: novel role for cyclin A/Cdk2 as a progesterone receptor coactivator. *Mol Cell Biol* *25*, 264-277.
- Narayanan, R., Edwards, D. P., and Weigel, N. L. (2005b). Human progesterone receptor displays cell cycle-dependent changes in transcriptional activity. *Mol Cell Biol* *25*, 2885-2898.
- Nasheuer, H. P., Moore, A., Wahl, A. F., and Wang, T. S. (1991). Cell cycle-dependent phosphorylation of human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* *266*, 7893-7903.
- Nebreda, A. R. (2006). CDK activation by non-cyclin proteins. *Curr Opin Cell Biol* *18*, 192-198.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* *9*, 27-43.
- Neuwald, A. F., and Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* *22*, 154-155.
- Nguyen, V. Q., Co, C., Irie, K., and Li, J. J. (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol* *10*, 195-205.
- Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., and Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol* *10*, 1411-1420.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* *61*, 441-470.
- Nozato, T., Ito, H., Watanabe, M., Ono, Y., Adachi, S., Tanaka, H., Hiroe, M., Sunamori, M., and Marum, F. (2001). Overexpression of cdk inhibitor p16INK4a by adenovirus vector inhibits cardiac hypertrophy in

vitro and in vivo: a novel strategy for the gene therapy of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1493-1504.

Oakley, G. G., Patrick, S. M., Yao, J., Carty, M. P., Turchi, J. J., and Dixon, K. (2003). RPA phosphorylation in mitosis alters DNA binding and protein-protein interactions. *Biochemistry* 42, 3255-3264.

Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Howard, T., Yang, X. J., Howard, B. H., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.

Ohtani, K., Iwanaga, R., Nakamura, M., Ikeda, M., Yabuta, N., Tsuruga, H., and Nojima, H. (1999). Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene* 18, 2299-2309.

Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J. M., and Pagano, M. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15, 2612-2624.

Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J. L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35, 25-31.

Osuga, H., Osuga, S., Wang, F., Fetni, R., Hogan, M. J., Slack, R. S., Hakim, A. M., Ikeda, J. E., and Park, D. S. (2000). Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10254-10259.

Pacek, M., and Walter, J. C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *Embo J* 23, 3667-3676.

Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-971.

Painter, R. B. (1986). Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 49, 771-781.

Painter, R. B., and Young, B. R. (1980). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7315-7317.

Pan, Z. Q., Park, C. H., Amin, A. A., Hurwitz, J., and Sancar, A. (1995a). Phosphorylated and unphosphorylated forms of human single-stranded DNA-binding protein are equally active in simian virus 40 DNA replication and in nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4636-4640.

Pan, Z. Q., Reardon, J. T., Li, L., Flores-Rozas, H., Legerski, R., Sancar, A., and Hurwitz, J. (1995b). Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* 270, 22008-22016.

Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1286-1290.

Parisi, T., Beck, A. R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z., and Amati, B. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *Embo J* 22, 4794-4803.

Parry, D. H., and O'Farrell, P. H. (2001). The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr Biol* 11, 671-683.

- Paulovich, A. G., and Hartwell, L. H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* *82*, 841-847.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* *277*, 1501-1505.
- Peterlin, B. M., and Price, D. H. (2006). Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* *23*, 297-305.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., and Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J* *18*, 396-410.
- Petersen, B. O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E. R., Melixetian, M., Lazzerini Denchi, E., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J. M., and Helin, K. (2000). Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* *14*, 2330-2343.
- Pham, A. D., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* *289*, 2357-2360.
- Philips, A., Chambeyron, S., Lamb, N., Vie, A., and Blanchard, J. M. (1999). CHF: a novel factor binding to cyclin A CHR corepressor element. *Oncogene* *18*, 6222-6232.
- Picard, A., Galas, S., Peaucellier, G., and Doree, M. (1996). Newly assembled cyclin B-cdc2 kinase is required to suppress DNA replication between meiosis I and meiosis II in starfish oocytes. *Embo J* *15*, 3590-3598.
- Pierson-Mullany, L. K., and Lange, C. A. (2004). Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol Cell Biol* *24*, 10542-10557.
- Pines, J. (1991). Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ* *2*, 305-310.
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res* *66*, 181-212.
- Pines, J., and Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* *346*, 760-763.
- Pippin, J. W., Qu, Q., Meijer, L., and Shankland, S. J. (1997). Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J Clin Invest* *100*, 2512-2520.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., and Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* *78*, 59-66.
- Prinz, S., Hwang, E. S., Visintin, R., and Amon, A. (1998). The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol* *8*, 750-760.
- Prosperi, E., Scovassi, A. I., Stivala, L. A., and Bianchi, L. (1994). Proliferating cell nuclear antigen bound to DNA synthesis sites: phosphorylation and association with cyclin D1 and cyclin A. *Exp Cell Res* *215*, 257-262.

- Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y., and Levrero, M. (1997). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* *1*, 35-45.
- Ramachandran, V., Matzkies, M., Dienemann, A., and Sprenger, F. (2007). Cyclin A degradation employs preferentially used lysines and a cyclin box function other than Cdk1 binding. *Cell Cycle* *6*, 171-181.
- Rane, S. G., Dubus, P., Mettus, R. V., Galbreath, E. J., Boden, G., Reddy, E. P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* *22*, 44-52.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* *21*, 267-271.
- Reed, S. I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 855-864.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* *9*, 1831-1845.
- Riialland, M., Sola, F., and Santocanale, C. (2002). Essential role of human CDT1 in DNA replication and chromatin licensing. *J Cell Sci* *115*, 1435-1440.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., and Lees, E. (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* *12*, 2631-2640.
- Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Manning, N. G., Abel, M. G., Wolf, D. M., and Horwitz, K. B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* *277*, 5209-5218.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J. M., and Garabedian, M. J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* *274*, 22296-22302.
- Romanowski, P., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., and Laskey, R. A. (1996). The Xenopus origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr Biol* *6*, 1416-1425.
- Rowan, B. G., Garrison, N., Weigel, N. L., and O'Malley, B. W. (2000). 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* *20*, 8720-8730.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* *382*, 325-331.
- Sabo, A., Lusic, M., Cereseto, A., and Giacca, M. (2008). Acetylation of conserved lysines in the catalytic core of cyclin-dependent kinase 9 inhibits kinase activity and regulates transcription. *Mol Cell Biol* *28*, 2201-2212.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D., and Dutta, A. (1998). Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol Cell Biol* *18*, 2758-2767.

- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* *277*, 1497-1501.
- Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J. F., Dubus, P., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* *448*, 811-815.
- Schnell, J. D., and Hicke, L. (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* *278*, 35857-35860.
- Schulze, A., Zerfass-Thome, K., Berges, J., Middendorp, S., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1996). Anchorage-dependent transcription of the cyclin A gene. *Mol Cell Biol* *16*, 4632-4638.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11264-11268.
- Sedlacek, H. H. (2001). Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit Rev Oncol Hematol* *38*, 139-170.
- Shapiro, G. I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* *24*, 1770-1783.
- Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* *79*, 551-555.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* *9*, 1149-1163.
- Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K. I., Fukazawa, H., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2006). Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene* *25*, 7391-7400.
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S. Z., Bronson, R. T., Elledge, S. J., and Weinberg, R. A. (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* *82*, 621-630.
- Sigrist, S., Jacobs, H., Stratmann, R., and Lehner, C. F. (1995). Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *Embo J* *14*, 4827-4838.
- Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., and Kastan, M. B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* *11*, 3471-3481.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* *67*, 31-40.
- Smith, P. D., Crocker, S. J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K. L., Hayley, S., Mount, M. P., O'Hare, M. J., Callaghan, S., Slack, R. S., Przedborski, S., *et al.* (2003). Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13650-13655.
- Sobczak-Thopot, J., Harper, F., Florentin, Y., Zindy, F., Brechot, C., and Puvion, E. (1993). Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp Cell Res* *206*, 43-48.
- Soucek, T., Pusch, O., Hengstschlager-Ottner, E., Adams, P. D., and Hengstschlager, M. (1997). Deregulated expression of E2F-1 induces cyclin A- and E-associated kinase activities independently from cell cycle position. *Oncogene* *14*, 2251-2257.

- Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* 5, 745-751.
- Starai, V. J., Celic, I., Cole, R. N., Boeke, J. D., and Escalante-Semerena, J. C. (2002). Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* 298, 2390-2392.
- Starai, V. J., Takahashi, H., Boeke, J. D., and Escalante-Semerena, J. C. (2003). Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2 protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163, 545-555.
- Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.
- Stewart, E., Kobayashi, H., Harrison, D., and Hunt, T. (1994). Destruction of *Xenopus* cyclins A and B2, but not B1, requires binding to p34cdc2. *Embo J* 13, 584-594.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Su, T. T., and Jaklevic, B. (2001). DNA damage leads to a Cyclin A-dependent delay in metaphase-anaphase transition in the *Drosophila* gastrula. *Curr Biol* 11, 8-17.
- Taylor, W. R., and Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Terui, T., Murakami, K., Takimoto, R., Takahashi, M., Takada, K., Murakami, T., Minami, S., Matsunaga, T., Takayama, T., Kato, J., and Niitsu, Y. (2003). Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* 63, 8948-8954.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* 3, 233-245.
- Treuner, K., Findeisen, M., Strausfeld, U., and Knippers, R. (1999). Phosphorylation of replication protein A middle subunit (RPA32) leads to a disassembly of the RPA heterotrimer. *J Biol Chem* 274, 15556-15561.
- Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D. S., Pandolfi, P. P., Hansel, K. S., Koff, A., and Kiyokawa, H. (1999). Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* 19, 7011-7019.
- Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291.
- Upton, J. W., van Dyk, L. F., and Speck, S. H. (2005). Characterization of murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin interactions with cellular cdks. *Virology* 341, 271-283.
- Vaziri, C., Saxena, S., Jeon, Y., Lee, C., Murata, K., Machida, Y., Wagle, N., Hwang, D. S., and Dutta, A. (2003). A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* 11, 997-1008.
- Vegeto, E., Shahbaz, M. M., Wen, D. X., Goldman, M. E., O'Malley, B. W., and McDonnell, D. P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7, 1244-1255.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-149.

- Verschuren, E. W., Jones, N., and Evan, G. I. (2004). The cell cycle and how it is steered by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin. *J Gen Virol* *85*, 1347-1361.
- Voitenleitner, C., Fanning, E., and Nasheuer, H. P. (1997). Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene* *14*, 1611-1615.
- Waga, S., Li, R., and Stillman, B. (1997). p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia* *11 Suppl 3*, 321-323.
- Walker, D. H., and Maller, J. L. (1991). Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* *354*, 314-317.
- Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* *5*, 617-627.
- Wang, E. H., Zou, S., and Tjian, R. (1997). TAFII250-dependent transcription of cyclin A is directed by ATF activator proteins. *Genes Dev* *11*, 2658-2669.
- Watson, C. S., and Lange, C. A. (2005). Steadying the boat: integrating mechanisms of membrane and nuclear-steroid-receptor signalling. *EMBO Rep* *6*, 116-119.
- Wei, W., Ayad, N. G., Wan, Y., Zhang, G. J., Kirschner, M. W., and Kaelin, W. G., Jr. (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* *428*, 194-198.
- Weigel, N. L., and Zhang, Y. (1998). Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* *76*, 469-479.
- Whitfield, W. G., Gonzalez, C., Maldonado-Codina, G., and Glover, D. M. (1990). The A- and B-type cyclins of *Drosophila* are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition. *Embo J* *9*, 2563-2572.
- Wiper-Bergeron, N., Salem, H. A., Tomlinson, J. J., Wu, D., and Hache, R. J. (2007). Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 2703-2708.
- Wohlschlegel, J. A., Dhar, S. K., Prokhorova, T. A., Dutta, A., and Walter, J. C. (2002). *Xenopus* Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell* *9*, 233-240.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K., Cvetcic, C., Walter, J. C., and Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* *290*, 2309-2312.
- Wolthuis, R., Clay-Farrace, L., van Zon, W., Yekezare, M., Koop, L., Ogink, J., Medema, R., and Pines, J. (2008). Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Mol Cell* *30*, 290-302.
- Woo, R. A., and Poon, R. Y. (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* *2*, 316-324.
- Xie, G., Habbersett, R. C., Jia, Y., Peterson, S. R., Lehnert, B. E., Bradbury, E. M., and D'Anna, J. A. (1998). Requirements for p53 and the ATM gene product in the regulation of G1/S and S phase checkpoints. *Oncogene* *16*, 721-736.

- Xu, M., Sheppard, K. A., Peng, C. Y., Yee, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14, 8420-8431.
- Xu, W., Edmondson, D. G., and Roth, S. Y. (1998). Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* 18, 5659-5669.
- Yam, C. H., Fung, T. K., and Poon, R. Y. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59, 1317-1326.
- Yam, C. H., Siu, W. Y., Lau, A., and Poon, R. Y. (2000). Degradation of cyclin A does not require its phosphorylation by CDC2 and cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem* 275, 3158-3167.
- Yamada, M., Sato, N., Taniyama, C., Ohtani, K., Arai, K., and Masai, H. (2002). A 63-base pair DNA segment containing an Sp1 site but not a canonical E2F site can confer growth-dependent and E2F-mediated transcriptional stimulation of the human ASK gene encoding the regulatory subunit for human Cdc7-related kinase. *J Biol Chem* 277, 27668-27681.
- Yamamoto, M., Yoshida, M., Ono, K., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Sakai, T., and Nikaido, T. (1994). Effect of tumor suppressors on cell cycle-regulatory genes: RB suppresses p34cdc2 expression and normal p53 suppresses cyclin A expression. *Exp Cell Res* 210, 94-101.
- Yamasaki, L., and Pagano, M. (2004). Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 16, 623-628.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and Kornbluth, S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *Embo J* 18, 2174-2183.
- Yang, X. J. (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 32, 959-976.
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.
- Yoshizumi, M., Wang, H., Hsieh, C. M., Sibinga, N. E., Perrella, M. A., and Lee, M. E. (1997). Down-regulation of the cyclin A promoter by transforming growth factor-beta1 is associated with a reduction in phosphorylated activating transcription factor-1 and cyclic AMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* 272, 22259-22264.
- Zeng, X. R., Hao, H., Jiang, Y., and Lee, M. Y. (1994). Regulation of human DNA polymerase delta during the cell cycle. *J Biol Chem* 269, 24027-24033.
- Zeng, Y., Forbes, K. C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnica-Worms, H., and Enoch, T. (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature* 395, 507-510.
- Zerfass-Thome, K., Schulze, A., Zwerschke, W., Vogt, B., Helin, K., Bartek, J., Henglein, B., and Jansen-Durr, P. (1997). p27KIP1 blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol Cell Biol* 17, 407-415.
- Zhao, J., Kennedy, B. K., Lawrence, B. D., Barbie, D. A., Matera, A. G., Fletcher, J. A., and Harlow, E. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev* 14, 2283-2297.
- Zhao, K., Chai, X., and Marmorstein, R. (2003). Structure of a Sir2 substrate, Alba, reveals a mechanism for deacetylation-induced enhancement of DNA binding. *J Biol Chem* 278, 26071-26077.

Zou, L., and Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* 20, 3086-3096.

Zwicker, J., Lucibello, F. C., Wolfrain, L. A., Gross, C., Truss, M., Engeland, K., and Muller, R. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *Embo J* 14, 4514-4522.