



# La HDAC3 regula l'estabilitat de la ciclina A

Miriam Vidal Laliena

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

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

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



TESI DOCTORAL

**LA HDAC3 REGULA L'ESTABILITAT  
DE LA CICLINA A**

MIRIAM VIDAL LALIENA

**Imatge Portada:** *C.elegans* embryos of 50nm long and oriented with anterior to the left. (Kitagawa et al 2011)

**Imatge contraportada:** Fluorescence micrograph showing human cells at various stages of cell division, starting with interphase at the top. During interphase the cell gets bigger and duplicates its DNA. The second cell shows prophase, the stage at which the chromosomes form. The third cell is in metaphase, where all chromosomes are attached and aligned on the spindle. The fourth cell is in telophase, and the newly separated genetic material is encased into two new nuclei. Mathew Daniels, Wellcome Images, [www.wellcome.ac.uk/.../WTDV030896.htm](http://www.wellcome.ac.uk/.../WTDV030896.htm)

Barcelona, Abril 2012

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències

Programa de Doctorat en Biologia i Patologia Cel·lular

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Bienni 2004/2006

## **LA HDAC3 REGULA L'ESTABILITAT DE LA CICLINA A**

Memòria presentada per

**Miriam Vidal Laliena**

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Doctor Oriol Bachs Valldeu al Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona



*Als meus pares*

*A la meva germana*



Oriol, moltíssimes gràcies per donar-me una nova oportunitat de treballar en ciència. Després de tants anys passant bons moments i moments no tan bons, he après molt, tant a nivell científic com personal. És sobretot en aquests últims mesos, que et vull agrair tota l'ajuda i el recolzament que he rebut, mai ho oblidaré.

Xus, moltes gràcies perquè sempre estàs disposada a ajudar, perquè mai tens un no per resposta i perquè fas que tot sigui més fàcil.

Si fóssiu un company de laboratori, qui seríeu? Aquell que us demana si teniu líquids per autoclavar, o aquells que us ajuden perquè no aconseguiu clonar un DNA, quan la teoria sembla tan senzilla, o bé, aquells *frikkis* amb qui comenteu llibres (deixant de banda la discussió sobre Lestat el vampir, és clar...). O bé seríeu el que us aguanta a l'hora del cafè quan parleu del *western* que no surt, o simplement aquell que us diu bon dia. Amb aquell amb qui compartiu la campanya de cultius i els problemes sobre el creixement de cèl·lules o amb aquell amb qui parleu d'un assaig quinasa i el perquè no surt; o bé, amb qui netegeu la cambra de 4°C o amb qui parleu de Panettone o de tiramisú, o de les "chiretas, morcillas o tortetas". Aquell amb qui parleu la primera hora del matí al lab o aquell amb qui compartiu els moments pre-tesi. Aquells que us ajuden amb traduccions a diferents idiomes o aquell amb qui parleu de poblacions de FACs. Però, independentment de quin company de laboratori sigueu, tots i cadascun de vosaltres sou part de la meua vida i m'heu ajudat moltíssim. Ja sabeu que una part d'aquesta tesi és vostra. MOLTES GRÀCIES.

Eulàlia, una menció a part et correspon. Perquè durant tots aquests anys has intentat posar ordre en el laboratori mantenint els aparells en funcionament. Gràcies, perquè em sembla que sempre que parlava amb tu les frases començaven per: "Eulàlia, tal cosa no funciona...."

Nuria Morante, unas gracias tan grandes que no caben aquí. Porque cuando se acerca el final, deseas que todo sea fácil y tú lo consigues. Gracias por transmitirme esa tranquilidad que tanto necesitaba. Carme, gràcies, perquè sempre que parlo amb tu estàs contenta i això és fantàstic.

Mariajosé y Montse! Sou més que companyes de laboratori, sou amigues. Gracias Mariajosé por todos los cafés y paseos, por escucharme y por entenderme y por ser como eres. Montse!! Gràcies perquè em vas aguantar al principi, perquè no pressiones i em transmits tranquil·litat; gràcies per mostrar-me la Barcelona més oculta i per donar-me "L'illa dels cinc fars".



Gracias a mis amigas de la facultad. Trini, gracias por hacer “El Camino” conmigo. Fue muy importante para mí. Gracias por estar siempre allí, para hablar, reír o comentar la última película que hemos visto. Ruth i Anna, malgrat no veure’ns tant com voldria, gràcies perquè sé que sempre puc comptar amb vosaltres. Lidia, encara que visquis tant lluny i que trobi a faltar les creps de xocolata que ens menjàvem a Sants o els dies que anàvem al cine, gràcies perquè encara continua la nostra amistat.

Ifigènia i Sandra, hem compartit moments molt importants. Ifigènia, gràcies perquè m’ajudes i em dones idees. Perquè puc compartir tot amb tu i perquè em vas ajudar quan més ho necessitava. Sandra, malgrat que estiguis tan lluny sempre ens recordem l’una de l’altra. Gràcies per la teva amistat. Vane, sempre que penso en tu, em venen al cap tot d’acudits boníssims que sé que t’agradaran (ja,ja). Gràcies per deixar-me ser la primera en llegir els teus llibres i pel teu bon humor de sempre. Xavi, ara més que mai estic d’acord amb tu: “La vida es un frenesí”. Gràcies per ensenyar-me just sortir de la facultat i gràcies perquè feies la meva vida molt fàcil. Ets un encant.

Paki, diuen que la casualitat no existeix i que tot succeix per un motiu. Doncs, dono gràcies perquè vaig tenir la sort de treballar amb tu. Admiro la teva claretat d’idees quan treballes i la teva capacitat d’organització. El saber distingir els experiments idonis i el saber ensenyar tan bé, amb paciència. Gràcies també per la teva amistat i pels teus consells. Mireia, les converses amb tu eren i són encara un luxe per a mi. Moltes gràcies per tot.

Judit. He tingut la sort de conèixe’t. Hem compartit moltes coses i hem parlat encara de més coses. Sé que sempre estaràs amb mi. Gràcies. Ànims Judit, que ja et queda poc a tu també.

Gemma!!!! La vida és un mocador i és ben veritat. No saps el què ha significat que ens haguem retrobat després de tants anys. Gràcies per aquest últim any, pels riures, pels contes, sobretot el de l’elefant i la formigueta, per “oh lala, de boing boing”, pels cafès, però sobretot, per la comprensió i per escoltar-me.

Eva, Irantzu i Carme. Ho sabeu, no necessiteu que us ho digui. Us estimo molt. Sou vosaltres qui heu estat des de sempre al meu costat, compartint la vida, els moments bons i els moments dolents. Gràcies per ser amb mi. *Irantzu, eskerrik asko, nahiz eta orain urruti bizi.* Carme i Susana, fa menys que us conec però gràcies pel bon humor, per la vostra senzillesa, el riure i els moments compartits d’aquests anys. Nuria, gracias por “la Gràcia

del Vermut”, por los paseos por Montgat, por “los impresionistas”. Gracias por tu visión más realista de la vida.

Oncles!!!! Tia Rosa i Oncle Antonio us estimo. Gràcies, no em sento tan sola perquè sé que esteu amb mi. Cosí Josep, gràcies per escoltar-me. Però, per sobretot, gràcies a tots tres per posar-me al dia de les notícies que passen al món, per compartir tants records amb mi i per fer-me saber que sempre puc comptar amb vosaltres.

Aroa, cuando pienso en diferentes momentos de mi vida, casi siempre estás tú. Eres muy importante para mí. Hace tanto que nos conocemos, que ya ni me acuerdo (ja,ja). Hemos compartido tanto: historias, lugares, charlas filosóficas o científicas, comidas inolvidables, buceo en Llançà, excursiones... no somos iguales y sé que por eso nos entendemos tan bien. Consigues darme tranquilidad, alegría, despreocupación y pasión por la vida, gracias por todo. Y Sergio, gracias por las discusiones sobre la educación, por el teorema de Fermat (¿aceptamos teoría, pues?), por la definición de planeta doble, y por hacerme parar, razonar y luego exponer las ideas. Gracias a ti también por todo. Os quiero.

Noemi, mi querida hermanita. Muchas veces sé que no hace falta que hable, porque me conoces tan bien que no tengo necesidad de decir cómo me siento. Pero ahora, querría decirte que te quiero mucho y quiero darte las gracias por estar siempre conmigo y por ayudarme de forma incondicional, aunque no estés a mi lado.

*Els meus pares.* Mama, eres pura fuerza y energía. Siempre he admirado tu determinación, tu perseverancia y tu fuerza de voluntad para conseguir lo que te proponías. Gracias por ayudarme desde siempre y por hacerme amar los libros, esta etapa final ha sido fácil gracias a eso. Papa, la teva tranquil·litat m’ajuda a pensar amb calma les coses, i que, per fer-les bé, tot requereix el seu temps. Gràcies als dos per la vostra guia i pel vostre suport. Sóc com sóc gràcies a vosaltres. Us estimo molt.



# ÍNDEX



## INTRODUCCIÓ

1. EL CICLE CEL·LULAR.....	3
1.1 La maquinària reguladora del cicle cel·lular .....	4
1.1.1 Proteïnes quinasa dependents de ciclina.....	4
1.1.2 Mecanismes de regulació de les CDKs .....	4
Ciclins .....	5
Regulació de les CDKs per modificacions post-traduccionals.....	6
Proteïnes inhibidores de les CDKs .....	8
Localització subcel·lular de les CDKs .....	8
1.2 Els sistemes de vigilància del cicle cel·lular.....	9
1.3 El control del cicle cel·lular per ubiquitinització .....	13
1.3.1 Sistema proteasoma-ubiquitina .....	13
1.3.2 SCF i APC/C: principals protagonistes durant el cicle cel·lular .....	14
1.3.3 La proteòlisi dependent d'ubiquitina durant el cicle cel·lular.....	15
1.3.4 La ubiquitinització i els <i>checkpoints</i> .....	16
1.4 Què podem aprendre dels ratolins <i>knockout</i> ? .....	17
2. LA CICLINA A.....	20
2.1 Estructura i localització de la ciclina A .....	20
2.2 Síntesi i degradació de la ciclina A .....	21
2.3 Funcions de la ciclina A.....	22
3. BALANÇ ACETILACIÓ/DEACETILACIÓ.....	24
3.1 Histona acetiltransferases .....	25
3.1.1 Família de les acetiltransferases. Generalitats i funcions .....	25
3.1.2 Regulació de les acetiltransferases .....	29
3.1.3 Acetiltransferases, leucèmia i altres malalties .....	29
3.1.4 P/CAF. Característiques generals .....	30
Regulació de l'activitat de la P/CAF i interacció amb ligands.....	31
3.2 Histona deacetilases.....	32
3.2.1 Característiques de les HDACs clàssiques i les Sirtuïnes.....	32

3.2.2	Funcions de les HDACs .....	35
3.2.3	Regulació de les HDACs.....	38
3.2.3.1	Regulació de les HDACs per la formació de complexos proteics.....	38
3.2.3.2	Modificacions post-traduccionals de les HDACs.....	39
3.2.3.3	Localització subcel·lular de les HDACs.....	41
3.2.3.4	Canvi en l'expressió gènica de les HDACs .....	41
3.2.3.5	Disponibilitat de cofactors metabòlics per a l'activació de les HDACs .....	41
3.2.3.6	Processament proteolític de les HDACs.....	42
3.2.4	Alteracions de les HDACs. Càncer i altres malalties .....	43
3.2.5	Inhibidors de les HDACs (HDACi).....	44
3.2.5.1	Efectes biològics dels HDACi a través de la regulació de l'expressió gènica.....	46
3.2.5.2	Efectes biològics dels HDACi sobre proteïnes.....	48
<b>ANTECEDENTS</b> .....		49
<b>OBJECTIUS</b> .....		57
<b>RESULTATS</b> .....		61
1.	SCREENING DE LA INTERACCIÓ DE LES HDACs AMB LA CICLINA A ...	63
2.	INTERACCIÓ DELS MEMBRES DE LA CLASE I DE LA FAMÍLIA DE LES HDACs AMB LA CICLINA A.....	64
3.	LA HDAC3 ALTERA ELS NIVELLS DE LA CICLINA A.....	67
4.	LA HDAC1 I EL CICLE CEL·LULAR.....	68
4.1	Interacció al llarg del cicle cel·lular entre la ciclina A i la HDAC1.....	68
4.2	Activitat deacetilasa de la HDAC1 .....	69
4.3	Efecte de la disminució de la HDAC1 sobre altres proteïnes del cicle cel·lular .....	70
5.	ANÀLISI FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓ DE LA HDAC3 AMB LA CICLINA A.....	72

5.1	Interacció de la ciclina A i la HDAC3 endògena.....	72
5.2	La HDAC3 deacetila la ciclina A.....	73
5.3	Efecte de la HDAC3 sobre l'estabilitat de la ciclina A .....	75
5.3.1	La HDAC3 regula la vida mitja de la ciclina A.....	75
5.3.2	La disminució de la HDAC3 no és capaç d'induir la reducció dels nivells d'un mutant de la ciclina A no acetilable.....	77
5.4	Activitat de la HDAC3 durant el cicle cel·lular.....	79
5.4.1	Interacció entre la HDAC3 i la ciclina A al llarg del cicle cel·lular .....	79
5.4.2	Activitat deacetilasa de la HDAC3.....	80
5.4.3	Efecte del shRNA HDAC3 sobre el cicle cel·lular .....	81
5.5	Regulació de la HDAC3 .....	83
5.5.1	Regulació de la HDAC3 per HDACs .....	84
5.5.2	Regulació de la HDAC3 per fosforilació.....	86

## ANNEX I

1.	HDAC2 I EL CICLE CEL·LULAR .....	91
1.1	Efecte de la disminució de la HDAC2 sobre altres proteïnes del cicle cel·lular .....	91
1.2	Increment de l'activitat de la CDK2 a les cèl·lules <i>knockdown</i> de la HDAC2 .....	92
1.3	p27 podria ser una diana de la HDAC2? .....	93

## DISCUSSIÓ

1.	LES DEACETILASES HDAC1 I HDAC2.....	99
1.1	Relació funcional de la HDAC1 amb la ciclina A .....	101
1.1.1	La ciclina A i la HDAC1 colocalitzen.....	101
1.1.2	La ciclina A i la HDAC1 interaccionen a la fase G <sub>1</sub> i G <sub>1</sub> /S del cicle cel·lular.....	103
1.2	Paper de la HDAC2 en el cicle cel·lular .....	104
1.2.1	La ciclina A interacciona <i>in vivo</i> amb la HDAC2.....	104
1.2.2	La HDAC2 altera l'activitat quinasa de la CDK2 .....	105
2.	LA DEACETILASA HDAC3 .....	106



2.1 Relació funcional de la HDAC3 amb la ciclina A .....	108
2.1.1 La HDAC3 deacetila la ciclina A .....	108
2.1.2 La HDAC3 afecta la vida mitja de la ciclina A.....	110
2.1.3 La HDAC3 durant el cicle cel·lular.....	110
2.1.4 La regulació de la HDAC3.....	110
3. MODEL DE REGULACIÓ DE LA CICLINA A .....	112
4. COMPLEX CDK2/CICLINA A A LES FASES S i G <sub>2</sub> /M .....	113
<b>CONCLUSIONS</b> .....	115
<b>ANNEX II</b> .....	119
<b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	149
<b>TÈCNIQUES GENERALS</b>	
1. CULTIUS GENERALS	
1.1 Models cel·lulars.....	151
1.2 Manteniment de les cèl·lules en cultiu .....	151
1.3 Medis i suplementos .....	152
1.4 La sembra de les cèl·lules.....	153
1.5 Congelació i descongelació .....	153
1.6 Transfecció de les cèl·lules .....	155
1.7 Sincronització de les cèl·lules .....	155
1.8 Obtenció de lisats cel·lulars .....	156
1.9 Quantificació de proteïnes .....	157
2. CULTIUS BACTERIANS	
2.1 Soques i medis de cultiu.....	160
2.2 Transformació bacteriana.....	160
2.3 Obtenció i purificació de DNA.....	161
2.4 Expressió i purificació de proteïnes a <i>E.coli</i> .....	164
3. ELECTROFORESI, TRANSFERÈNCIA I IMMUNODETECCIÓ	
3.1 Electroforesi de proteïnes en una dimensió .....	168
3.2 Tinció de gels d'electroforesi .....	171

3.3 <i>Western blot</i> .....	171
-------------------------------	-----

## **TÈCNiques ESPECÍFIQUES**

4. ANÀLISI DE L'ACETILACIÓ/DEACETILACIÓ DE PROTEÏNES	
4.1 Acetilació de histones .....	176
4.2 Deacetilació de histones .....	177
4.3 Deacetilació de proteïnes no histones .....	178
5. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES	
5.1 <i>Pull down</i> .....	179
5.2 Immunoprecipitació .....	182
6. ASSAJOS D'ACTIVITAT QUINASA.....	185
7. DETERMINACIÓ DE LA VIDA MITJA .....	186
8. ANÀLISI DE LES FASES DEL CICLE CEL·LULAR.....	186
9. IMMUNOCITOQUÍMICA PER A MICROSCOPIA ÒPTICA O CONFOCAL....	187
10. UBIQUITINITZACIÓ DE PROTEÏNES	
10.1 Detecció de la ubiquitinització <i>in vivo</i> .....	188
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	189
<b>ABREVIATURES</b> .....	217



# INTRODUCCIÓ

More often than not, questions beginning with “Why” are inane and of no service in scientific discourse. In biology, they sometimes make sense. If we ask why cells must divide, the answer can be given in terms of what happens if they do not. The answer is that they die, no matter what criterion of death we apply.

*Dan Mazia*

## 1. EL CICLE CEL·LULAR

La divisió cel·lular és un procés que compren la replicació del DNA seguit de la divisió del nucli i la partició del citoplasma (citocinesi) per tal de generar dues cèl·lules genèticament idèntiques.

El cicle cel·lular consta de diferents fases: la fase  $G_1$ , la fase S (on té lloc la replicació del DNA), la fase  $G_2$  i finalment, la fase M o mitosi (divisió de la cèl·lula que inclou profase, prometafase, metafase, anafase, telofase i la citocinesi) (revisat a (Norbury & Nurse 1992)). La fase  $G_1$  ocorre entre la mitosi i la replicació del DNA i la fase  $G_2$ , entre les fases S i M. La fase  $G_1$  és un període en què moltes senyals, bàsicament extracel·lulars, s'integren i s'interpreten per decidir si el cicle cel·lular progressa o no. Després de la separació en dues cèl·lules filles, aquestes poden continuar el cicle cel·lular entrant a la fase  $G_1$  o bé parant de proliferar. Les cèl·lules que escullen la darrera opció entren en un estat de quiescència o  $G_0$  (figura1).

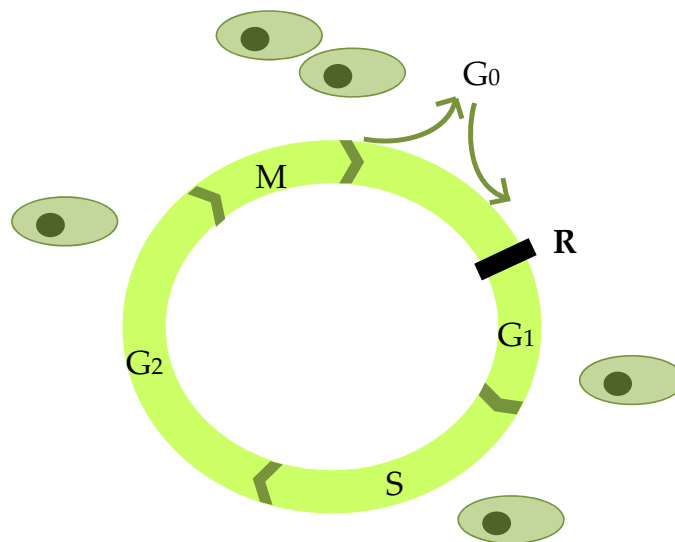


Figura 1 | Esquema de les diferents fases del cicle cel·lular.

## 1.1 LA MAQUINÀRIA REGULADORA DEL CICLE CEL·LULAR

La transició a través de les diferents fases del cicle cel·lular és regulada per l'activació i la inactivació temporal de complexos formats per una subunitat catalítica, la CDK (*Cyclin-dependent kinase*), que és una proteïna serina/treonina quinasa i per una subunitat reguladora, anomenada ciclina. Diferents combinacions de CDKs-ciclins fosforilen i per tant alteren la funció dels seus substrats, específicament requerits per a la correcta progressió de cada fase del cicle cel·lular (D'Urso, 1990; Solomon, 1990; Morgan, 1995; Nurse, 2000). Els mecanismes de control del cicle cel·lular s'han conservat al llarg de l'evolució (revisat a (Hunt et al. 2011)).

### 1.1.1 Proteïnes quinasa dependents de ciclina

Les CDKs formen una gran família de quinases d'un pes molecular d'aproximadament uns 30kDa. Els membres millors caracteritzats de la família estan implicats en el control de la progressió del cicle cel·lular. Estan descrits 11 gens que codifiquen CDKs (revisat a (Malumbres & Barbacid 2005)), dels quals CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6 tenen un paper clau durant el cicle cel·lular. La progressió a través de G<sub>1</sub> és regulada per un complex mecanisme que implica al menys tres CDKs: CDK4, CDK6 i CDK2. La fase S, la regula la CDK2 i la fase M, la CDK1. CDK7 és un component de la CAK (*Cdk-activating kinase*), la qual fosforila i possiblement activa totes les altres CDKs implicades en la regulació del cicle subcel·lular.

### 1.1.2 Regulació de les CDKs

Els nivells d'aquestes proteïnes són relativament constants al llarg del cicle cel·lular, de tal manera que la seva activitat es regula a través de diferents mecanismes. Aquests inclouen: la unió a subunitats activadores anomenades ciclins, les modificacions post-traduccionals com la fosforilació i l'acetilació, la unió a proteïnes inhibidores (CKIs) i la localització subcel·lular.

## Ciclins

Les ciclins formen una família de proteïnes molt diverses que tenen un pes molecular entre 35 i 90kDa. S'anomenen ciclins degut a que són sintetitzades i destruïdes de forma cíclica al llarg del cicle cel·lular; per tant, hi ha dos mecanismes principals de control de les ciclins: la regulació transcripcional i la degradació proteica. Els membres més distants comparteixen poc a nivell de la seqüència primària de la proteïna. La identitat en la seqüència sembla concentrada en una regió d'uns 100 aminoàcids, anomenada *cyclin box*, la qual és necessària per a la unió i activació de les CDKs (Kobayachi, 1992; Lees & Harlow 1993). L'anàlisi del genoma ha identificat fins a 29 gens que codifiquen proteïnes que comparteixen el *cyclin box*, moltes de les quals no s'uneixen a CDKs. De totes aquestes, les que desenvolupen un paper clar durant el cicle cel·lular són: la ciclina D, la ciclina E, la ciclina A i la ciclina B (revisat a (Malumbres & Barbacid 2005)). Cadascun d'aquests tipus de ciclins presenta diferents variants. Per exemple, les ciclins de tipus D (D1, D2 i D3) s'expressen a molts tipus cel·lulars i teixits, essent la D1, la majoritària (Waclaw & Chatot 2004).

Diferents complexos CDKs-ciclins regulen específicament cadascuna de les fases del cicle cel·lular. Concretament, la progressió a través de la fase G<sub>1</sub> i transició a la fase S és controlada per CDK4/6-ciclina D i CDK2-ciclina E (Weinberg 1995; Sherr, 1996), la fase S és regulada pel complex CDK2-ciclina E/ciclina A (Pagano et al. 1992; Sherr 1994; Krude et al. 1997) i finalment l'entrada a la fase M i progressió mitòtica és regulada pels complexos CDK1-ciclina A/B (Furuno et al. 1999; Nigg 2001; Riabowol, 1989) (veure figura 2).



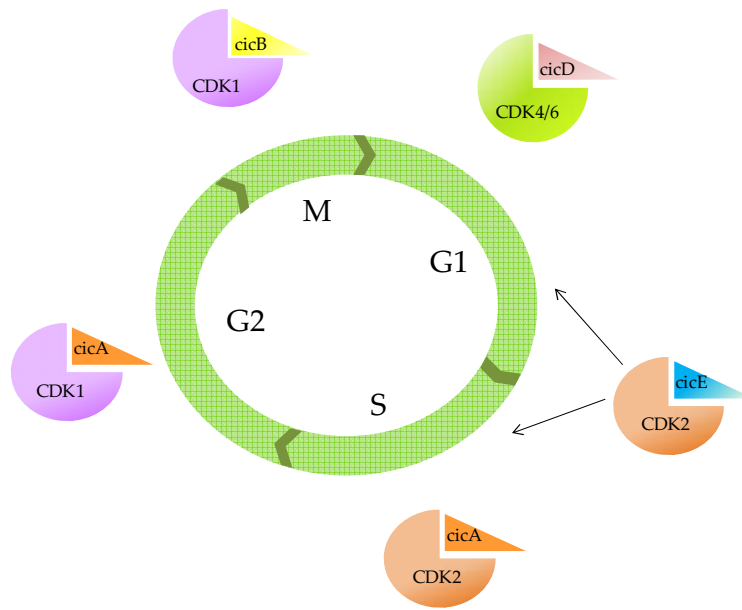


Figura 2 | **Esquema del cicle cel·lular.** Les diferents fases del cicle cel·lular són controlades per diferents complexos CDKs/ciclina.

---

L'activació de les CDKs requereix la unió a la subunitat reguladora, la ciclina, encara que les característiques bioquímiques de cada complex varien. Per exemple, els complexos CDK1-ciclina B, CDK2-ciclina A i CDK2-ciclina E interaccionen amb elevada afinitat sense la presència d'altres proteïnes o modificacions (Desai et al. 1995). En canvi, els complexos CDK1-ciclina A i CDK7-ciclina H (CAK) no s'uneixen fortament fins que la CDK no s'ha fosforilat a la treonina conservada del T-loop (Ducommun et al. 1991; Desai et al. 1995; Fisher RP et al. 1995). Inclús en el cas de la CDK7-ciclina H, l'activació es promou gràcies a la unió de la proteïna Mat1, resultant doncs, un complex trimèric el qual és actiu sense la necessitat de la fosforilació (Nigg 1996).

### **Regulació de les CDKs per modificacions post-traduccionals**

Una de les modificacions que pateixen les CDKs són fosforilacions/defosforilacions activadores o inhibidores. Mentre que les quinases Wee1 (McGowan & Russell P 1993) i Myt1 (Mueller, 1995) inhibeixen l'activitat de la CDK fosforilant els residus de tirosina 15

i treonina 14 (Gould & Nurse, 1989), les fosfatases Cdc25A, Cdc25B i Cdc25C activen la CDK defosforilant els mateixos aminoàcids (Izumi et al. 1992). A més, els complexos CDKs-ciclina necessiten estar fosforilats per la CAK en un residu de treonina (T172 en el cas de la CDK4 i T160 en el cas de la CDK2) en el T-loop de la subunitat CDK (Solomon et al. 1993; Poon et al. 1993; Fesquet et al. 1993; Fisher & Morgan, 1994). Si ambdues fosforilacions existeixen (activadores i inhibidores), el resultat és una quinasa inactiva (figura 3).

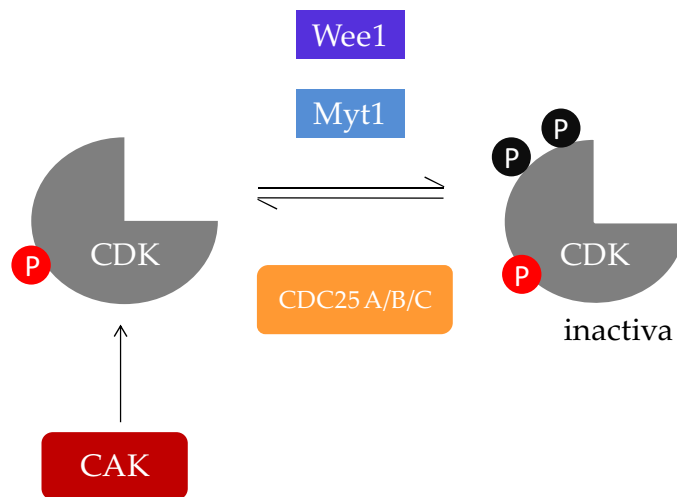


Figura 3 | El balanç de fosforilacions/defosforilacions estableix l'estat d'activació de la CDK.

Una altra de les modificacions post-traduccionals que s'ha descrit com a reguladora de la seva activitat és l'acetilació. En un treball recent, es demostra que la P/CAF acetila la CDK2 a la lisina 33 localitzada al seu centre catalític, inhibint d'aquesta manera, la seva activitat (Mateo et al. 2009(a)).

## Proteïnes inhibidores de les CDKs (CKIs)

Un altre nivell de regulació dels complexos CDK-ciclina és a través de la unió a proteïnes. Existeixen dues famílies d'inhibidors de CDKs definides segons els seus orígens evolutius, la seva estructura i l'especificitat *versus* la CDK. La família gènica INK4 inclou p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> i p19<sup>INK4d</sup>, els quals s'uneixen a CDK4 i CDK6 inhibint la seva activitat quinasa i no permeten que interaccionin amb les ciclins de tipus D (Sherr & Roberts, 1999). La família Cip/Kip (p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> i p57<sup>Kip2</sup>) s'uneix tant a la ciclina com a la CDK i pot modular les activitats dels complexos CDK-ciclina D/E/A/B (Sherr & Roberts, 1999). Aquestes proteïnes també modulen la progressió del cycle cel·lular independentment de la unió a CDKs i ciclins. Per exemple, s'ha trobat que p21 i p57 interaccionen amb PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) bloquejant la síntesi de DNA (Luo, 1995; Watanabe, 1998).

La fosforilació de diversos aminoàcids controla diversos aspectes d'aquests inhibidors, no només alterant l'afinitat pels seus substrats, sinó també afectant la seva estabilitat (revisat a (Borriello et al. 2007)) i la seva localització subcel·lular. Per exemple, la fosforilació de la Thr-157 o Thr-198 a p27 causa la seva retenció al citoplasma associant-se a la proteïna 14-3-3 (Liang J et al. 2002).

Malgrat que p21, p27 i p57 van ser considerats inicialment com supressors de tumors, ja que tenien la capacitat d'aturar el cycle cel·lular, cada vegada més, s'està demostrant la seva implicació en la regulació transcripcional, apoptosi, migració i dinàmica del citoesquelet (Vlachos et al. 2007; Sherr & Roberts 1999; Tanaka et al. 2002; Yan et al. 1997).

## Localització subcel·lular de les CDKs

La subunitat reguladora del complex no només té un paper important en l'activació de la CDK, sinó que també és crítica per dirigir l'activitat quinasa en un determinat compartiment. Les ciclins són dirigides als seus substrats a través de senyals que regulen tant la localització subcel·lular com la unió al substrat determinat (Zhu L et al. 1995; Adams et al. 1996; Chen J et al. 1996). La ciclina B resideix principalment al

citoplasma (Gallant, 1995), mentre que la ciclina A, D i E són nuclears (Sherr, 1993; Pines & Hunter 1994; Ohtsubo et al. 1995). En el cas de la CDK2-ciclina A, per exemple, s'ha vist que fosforila dianes tant nuclears com citoplasmàtiques, inclús dianes implicades en la duplicació del centrosomes (Meraldi et al. 1999; Jackman et al. 2002). Es pot pensar, doncs, que el complex viatja entre nucli i el citoplasma. A més, cal tenir en compte que les diferents variants de cada tipus de ciclina poden tenir localitzacions cel·lulars preferents.

La ciclina B es manté ancorada al citoplasma juntament amb la CDK1 a través del seu extrem N-terminal durant les fases S i G<sub>2</sub>. Al final de la profase, la ciclina B és ràpidament translocada al nucli. Aquesta importació nuclear requereix la fosforilació en la seqüència de retenció citoplasmàtica (CRS), la qual també inclou la seqüència d'exportació nuclear (NES) (Jackman et al. 2003).

## **1.2 SISTEMES DE VIGILÀNCIA DEL CICLE CEL·LULAR (CHECKPOINTS)**

El cicle cel·lular és constantment controlat pels *checkpoints*, els quals detecten danys o alteracions en fases específiques del cicle cel·lular. Aquests punts de control eviten l'entrada a una nova fase del cicle cel·lular fins que no s'ha completat de forma satisfactòria la fase prèvia.

### **Punt de Restricció (R)**

Recentment, s'ha proposat un model (Foster et al. 2011) en el qual durant la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular hi ha presents dos punts de control. Un és el punt de restricció (R), que comprova els nivells dels factors de creixement necessaris per a la progressió del cicle cel·lular i que per tant suprimeix el retorn cap a l'estat de quiescència. Aquest punt de restricció va ser originalment descrit per Pardee (Pardee 1974). Al final de la fase G<sub>1</sub>, es proposa un altre punt de control de creixement cel·lular, on la cèl·lula s'aturaria en absència de suficients nutrients per poder doblar la seva massa, abans de comprometre's

a replicar el seu genoma i dividir-se. Aquest punt de control està relacionat amb el *checkpoint* de llevat conegut com START (Hartwell et al. 1974) (figura 4).

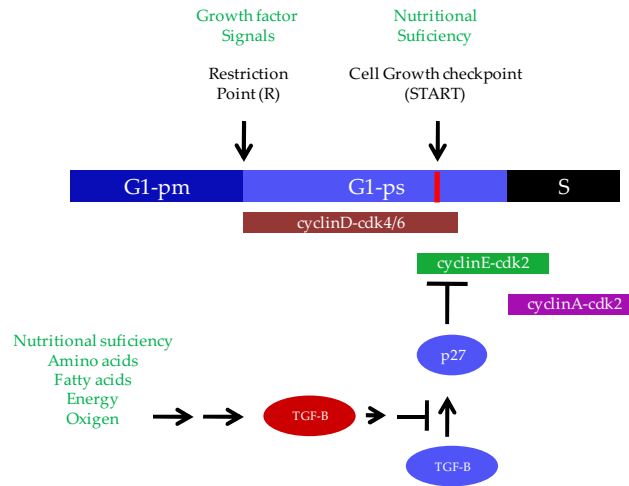


Figura 4 | Punts de control de la fase G1. (Foster et al. 2010)

### Checkpoint de fase G<sub>1</sub>/S

En resposta a dany al DNA que es produeix durant la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular, s'activa una via de senyalització que inclou: ATM (ATR)/CHK2(CHK1)-p53/MDM2-p21. Aquesta via és capaç de induir una aturada sostinguda o inclús permanent en G<sub>1</sub> (Bartek & Lukas 2003). ATM/ATR fosforilen p53 en el seu domini de transactivació i aquesta modificació fa que la p53 sigui més estable i que, per tant, s'acumuli a la cèl·lula. La principal diana de p53 és p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Kastan & Lim 2000), la qual inhibeix CDK2-ciclina E i causa una aturada a G<sub>1</sub>. Això provoca que no comenci la síntesi de DNA degut a la repressió transcripcional de gens de la fase S pels complexos pRB/E2F (Massagué 2004).

### **Checkpoint de fase S**

El *checkpoint* de fase S també controla la replicació dels cromosomes i les vies de reparació del DNA per tal de preservar la integritat genòmica quan hi ha dany al DNA (revisat a (Labib & Piccoli 2011)). En aquest cas, CHK1 inhibeix la fosfatasa CDC25 causant la seva exclusió nuclear o la seva degradació. Això fa que les CDKs conservin les fosforilacions inhibidores. La inhibició de l'activitat de CDK2 bloqueja la localització de CDC45 a la cromatina. La CDC45 és una proteïna necessària pel reclutament de la DNA polimerasa  $\alpha$  en els complexos pre-replicatius (Bartek et al. 2004).

### **Checkpoint de G<sub>2</sub>/M**

Aquest *checkpoint* impedeix l'inici de la mitosi si s'ha produït dany al DNA durant la fase G<sub>2</sub> o bé si es progressa a través de la fase G<sub>2</sub> amb DNA no reparat que prové de la fase G<sub>1</sub> o S. La principal diana del *checkpoint* de fase G<sub>2</sub> és l'activitat del complex CDK1-ciclina B, la qual és inhibida per la seva degradació o pel canvi de localització cel·lular de CDC25 (Nyberg et al. 2002). El manteniment del *checkpoint* de G<sub>2</sub> probablement és degut als programes de transcripció regulats per BRCA1 i p53, que condueixen a la regulació a l'alça d'inhibidors de CDKs com p21, GADD45  $\alpha$  (*growth arrest and DNA-damage inducible 45 alpha*) i les proteïnes 14-3-3 (Taylor & Stark 2001) (figura 5).

### **Checkpoint de fus mitòtic**

És un mecanisme de control, l'activitat del qual assegura la perfecta segregació cromosòmica durant la mitosi (revisat a (Musacchio 2011)). Hi ha una sèrie de components molt ben caracteritzats que inclouen les quinases Bub1, BubR1 i Mps1 (Musacchio & Salmon 2007). Tres quinases addicionals, Prp4, CHK1 i Tao1 també s'han proposat com a components del *checkpoint* (Montembault et al. 2007; Draviam et al. 2007). Recentment però, s'ha qüestionat el paper de Tao1 (Hübner et al. 2010; Westhorpe et al. 2010). També participen en el *checkpoint* les proteïnes Mad1, Mad2 i les tres subunitats del complex Rod, Zwilch i ZW10 (RZZ). Aquestes proteïnes no presenten activitat

catalítica però estan implicades en la interacció proteïna-proteïna (Musacchio & Salmon 2007). Totes plegades, les proteïnes del *checkpoint* contribueixen a la formació del complex efector del *checkpoint*, anomenat *mitotic checkpoint complex (MCC)*. MCC protegeix la ciclina B i la securina de la ubiquitinització i això impedeix la seva degradació i finalment, inhibeix l'inici de la mitosi.

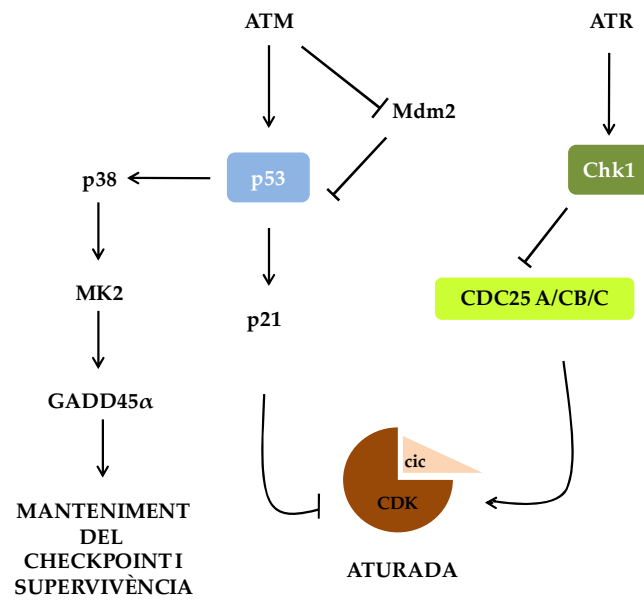


Figura 5 | **Activació del *checkpoint*.** L'activació de CHK1 per ATR regula CDC25 A/B/C la qual porta a la fosforilació inhibidora de CDK, causant una aturada del cicle cel·lular. p53 s'estabilitza per modificacions post-traduccional, això porta a l'increment de la transcripció de p21, la qual reprimeix la transcripció de ciclina, i per tant la inactivació del complex CDK/ciclina. A més, les cèl·lules activen la via de p38/MK2 que està implicada en el manteniment del *checkpoint*. (Adaptat de (Medema & Macu 2011)).

## 1.3 CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR PER UBIQUITINITZACIÓ

La ubiquitinització de proteïnes és un mecanisme que participa activament en diferents moments del cicle cel·lular. Per una banda, està regulant el propi procés de progressió del cicle cel·lular, però, per altra banda, la ubiquitinització també regula els *checkpoints*, els quals asseguren una correcta divisió cel·lular (revisat a (Wickliffe et al. 2009)).

### 1.3.1 Sistema proteasoma-ubiquitina

Durant el procés de la ubiquitinització, la ubiquitina, una petita proteïna de 8KDa, és transferida de manera dependent d'ATP a E1, enzim activador de la ubiquitina. Aquesta ubiquitina activada és llavors transferida a E2, enzim conjugador d'ubiquitines. Finalment, la ubiquitina és unida covalentment a la proteïna diana per E3 ubiquitina ligasa, conduint a la formació de cadenes de poliubiquitines. La proteïna poliubiquitinitzada és llavors reconeguda pel proteasoma 26S i destruïda d'una manera dependent d'ATP (figura 6). Existeixen moltes E3 ubiquitina ligases, les quals es divideixen en 4 classes: de tipus HECT, de tipus PHD-finger, de tipus U-box i finalment les de tipus RING-finger. Aquesta última està dividida en quatre subfamílies, inclosa la *cullin-basedE3*, la qual és una de les més nombroses. En aquest grup trobem la SCF (*SKP1-CUL1-F-box-protein*) i l'APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*).



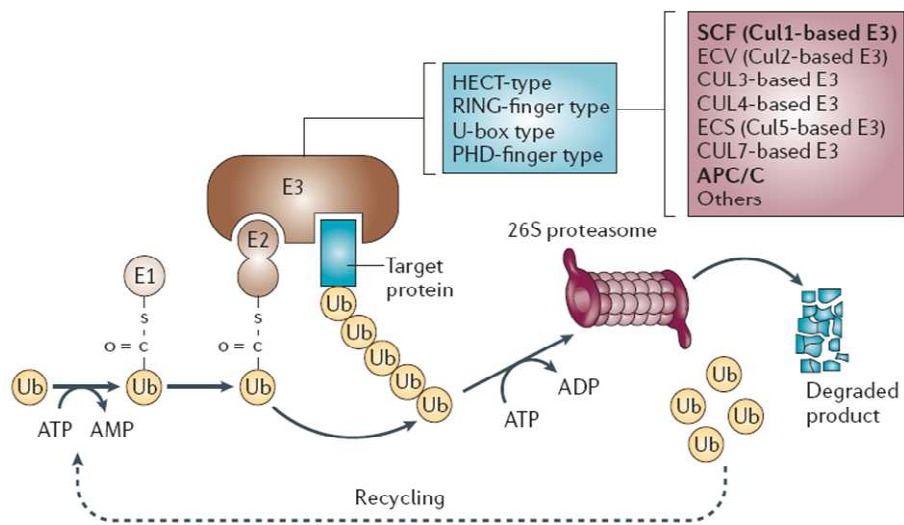


Figura 6 | Esquema de la via ubiquitina-proteasoma. (Nakayama & Nakayama 2006).

La ubiquitinació és un procés reversible i l'eliminació d'ubiquitines és realitzada pels enzims deubiquitinants (DUBs, *deubiquitinating enzymes*). Com a reguladors de la proliferació, aquests enzims també estan controlats durant la progressió del cicle cel·lular. Entre els mecanismes de regulació trobem: reclutament d'altres proteïnes, regulació dels seus nivells d'expressió, modificacions post-traduccional o bé, la seva degradació (revisat a (Wickliffe et al. 2009)).

### 1.3.2 SCF i APC/C: principals protagonistes durant el cicle cel·lular

SCF i APC/C són complexos ubiquitina ligasa essencials per a la proliferació cel·lular en tots els eucariotes. En cèl·lules en divisió, l'APC/C actua durant la mitosi i la fase G<sub>1</sub>, mentre que SCF actua a totes les fases del cicle cel·lular. Malgrat les diferències en la seva

regulació temporal, APC/C i SCF són molt semblants en la seva estructura. Ambdós complexos proteics presenten activitat catalítica proporcionada per Rbx1 o Ro52 a SCF (Petroski & Deshaies 2005; Sabile et al. 2006)) i per Apc11 a APC/C (Tang Z et al. 2001(a)) i també contenen coactivadors específics necessaris per unir els seus substrats; les proteïnes Fbox en el cas d'SCF (Jin J et al. 2004) i cdc20/cdh1 en el cas d'APC/C (Peters JM 2006; Yu H et al. 2007). Però, mentre que SCF només ubiquitina proteïnes que han estat modificades post-traduccionalment, els substrats de l'APC/C, generalment, no estan modificats. L'APC/C és activat durant la mitosi a través de la fosforilació de certes subunitats (Kraft et al. 2003) i és inactivat al final de la fase G<sub>1</sub> per la degradació del seu E2 específic, UbcH10 (Rape & Kirschner 2004), per la degradació i fosforilació inhibidora dels seus cofactors cdc20/Cdh1, i per l'expressió del seu inhibidor Emi1.

S'ha vist que cdc20 és imprescindible durant la mitosi, mentre que cdh1 no ho és. Malgrat tot, l'absència de cdh1 causa complicacions alhora de completar la divisió cel·lular, causant inestabilitat genòmica. Els *knockout* de cdc20 i cdh1 causen letalitat embrionària (Li M et al. 2007; Li M et al. 2008).

### **1.3.3 La proteòlisi dependent d'ubiquitina en la progressió del cicle cel·lular**

Un exemple molt ben caracteritzat en què la proteòlisi dependent d'ubiquitina causa una transició unidireccional de fases és la sortida de mitosi, la qual depèn de la degradació de ciclins (Glotzer et al. 1991). Les ciclins de tipus A i de tipus B activen la CDK1. La ubiquitinització d'ambdues ciclins per l'APC/C i la seva eficient degradació pel proteasoma fa que la CDK1 ja no sigui activa i promou la sortida de mitosi. Si aquest fet no es produeix correctament, les cèl·lules s'aturen a mitosi.

No només hi ha un ordre entre fases del cicle cel·lular, sinó que dins d'una mateixa fase del cicle cel·lular hi ha una seqüència de degradació proteica. També es pot explicar fàcilment durant la mitosi, durant la qual, l'APC/C a part de la degradació de les ciclins abans mencionades també controla altres quinases mitòtiques organitzadores del fus, proteïnes del centrosoma, quinesines, reguladors de la citocinesi,... L'APC/C

ubiquitinitza els seus substrats d'una forma seqüencial, anomenada "ordre dels substrats" (Jin L et al. 2008; Rape et al. 2006). Aquesta seqüència de reaccions està conservada al llarg de l'evolució (Mathe et al. 2004; Parry & Farrell 2001).

### 1.3.4 La ubiquitinització i els *checkpoints*

El *checkpoint* de fus mitòtic s'activa quan manca tensió entre les cromàtides germanes o bé quan només hi ha unió de microtúbuls a un sol cinetocor. La diana del *checkpoint* del fus mitòtic és *cdc20*, coactivador de l'APC/C. *Cdc20* és segrestada juntament amb els seus inhibidors Mad2 i BubR1 (Fang et al. 1998; Tang Z et al. 2001(b)). Aquest complex és molt estable i això fa que l'APC/C sigui inactiu i les cèl·lules es mantinguin aturades a metafase. Un cop els cromosomes ja han aconseguit la unió bipolar al fus mitòtic, la UbcH10 (E2 ligasa de l'APC/C) catalitza la ubiquitinització de la *cdc20* permeten que es dissocï del complex trimèric on estava retingut i que llavors l'APC/C torni a ser actiu. La separació de les cromàtides germanes és llavors, iniciat. En aquest cas, la ubiquitinització no comporta la degradació de la proteïna, sinó uns canvis conformacionals que permeten l'alliberació del complex.

Com a resum, la ubiquitinització és un regulador essencial de la progressió del cicle cel·lular a tots els eucariotes. Pot exercir el seu control alterant l'abundància o l'activitat de proteïnes modificades. La pròpia ubiquitinització es troba altament regulada. A la figura 7 hi ha un esquema de diferents exemples de proteïnes que controlen el cicle cel·lular i que han estat modificades per ubiquitinització.

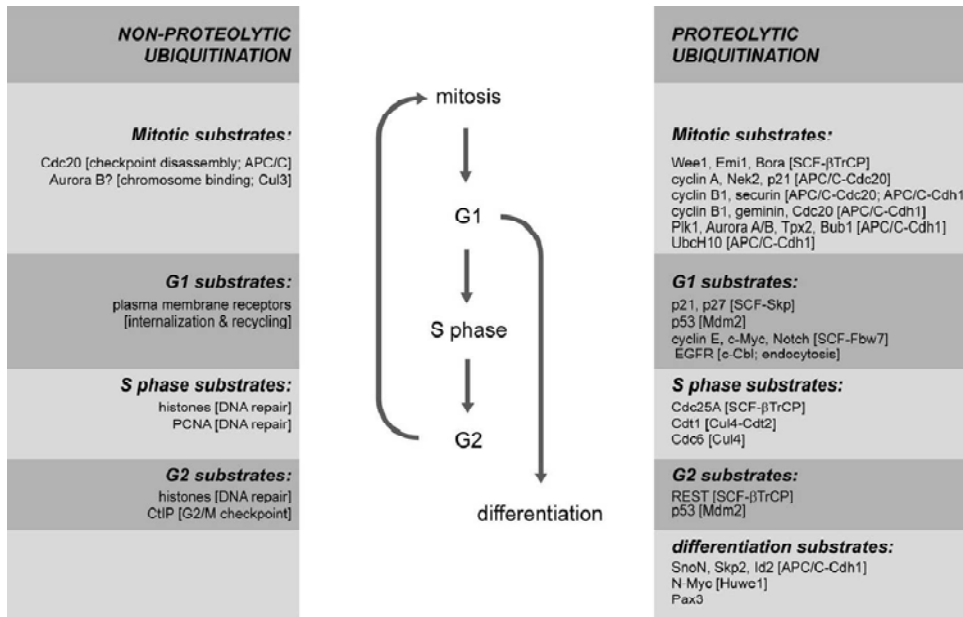


Figura 7 | Exemples de proteïnes modificades per ubiquitinització i que controlen el cicle cel·lular. A l'esquerra de la figura, trobem substrats ubiquitinitzats, la modificació dels quals no afecta la seva degradació. En parèntesi s'indica la funció de la modificació. A la dreta, trobem exemples de proteïnes que són degradades un cop ubiquitinitzades i en parèntesi s'indica la ubiquitina ligasa responsable. (Wickliffe, 2009).

## 1.4 QUÈ PODEM APRENDRE DELS RATOLINS *KNOCKOUT*?

La presència de múltiples CDKs i ciclins a eucariotes superiors podria fer pensar que cada complex CDK/ciclina realitza funcions úniques en determinades fases del cicle cel·lular. Però després de més d'una dècada de treball exhaustiu amb models de ratolins *knockout* de reguladors del cicle cel·lular, el model clàssic de regulació del cicle cel·lular ha canviat radicalment.

Estudis previs han demostrat que els ratolins sobreviuen en absència de CDKs interfàsiques (CDK2, CDK3, CDK4 i CDK6) (Ye X et al. 2001; Rane et al. 1999; Tsutsui et al. 1999; Ortega et al. 2003; Berthet et al. 2003; Malumbres et al. 2004). Fins i tot, la

majoria de ratolins proliferen en absència de dos o inclús tres CDKs interfàsiques (Malumbres et al. 2004; Berthet et al. 2006; Barrière et al. 2007). Resultats semblants s'han trobat quan es deplecionen les ciclines de tipus D i tipus E (Kozar et al. 2004; Geng et al. 2007; Geng et al. 2003; Parisi et al. 2003). La delecio de la ciclina A2 causa letalitat embrionària (Murphy M et al. 1997). A la taula 1 es pot observar un resum de l'efecte de la depleció de diferents CDKs i ciclines.

Taula 1 | **Fenotips dels ratolins amb CDKs i ciclines delecionades.** Adaptat de (Sherr & Roberts, 2004; Malumbres & Barbacid, 2005)

Gen delecionat	Viabilitat	Fenotip
CDK1	Letal	
CDK2	Viable	Esterilitats dels dos sexes degut a defectes meiòtics
CDK3	Viable	Normal
CDK4	Viable	Tumors epitelials i mesenquimals
CDK6	Viable	Desenvolupament defectuós del llinatge eritroid
CDK2/CDK6	Viable	Mateix fenotip que els mutants senzills
CDK4/CDK6	Letalitat embrionària tardana	Proliferació limitada dels precursors hematopoètics
CICLINA D1	Viable	Tamany petit, retinopaties i neuropaties
CICLINA D2	Viable	Esterilitat femenina. Desenvolupament cerebelar anormal
CICLINA D3	Viable	Timus hipoblàstic
CICLINA D2 I D3	Letalitat embrionària abans de E18.5	Mortalitat deguda a una anèmia megaloblàstica
CICLINA D1 I D3	Moren a P1, alguns sobreviuen fins a 2 mesos	Neuropaties
CICLINA D1 I D2	Viables, però moren en les tres primeres setmanes postnatales	Creixement retardat i coordinació perjudicada

Gen deletat	Viabilitat	Fenotip
CICLINA E1	Viable	Normal a grans trets
CICLINA E2	Viable	Infertilitat masculina
CICLINA E1 I E2	Letalitat embrionària a E11.5	Anormalitats cardíaques
CICLINA A1	Viable	Infertilitat masculina
CICLINA A2	Letalitat embrionària	
CICLINA B1	Letalitat embrionària a E10.5	
CICLINA B2	Viable	Fèrtil

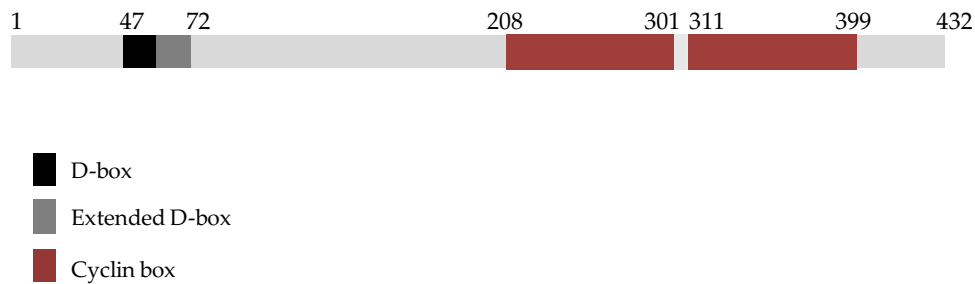
En un treball recent, s'ha demostrat que embrions als quals els hi manquen totes les CDKs interfàsiques (CDK2, CDK4 i CDK6) i per tant, només tenen CDK1, es desenvolupen fins E12.5 (Santamaría et al. 2007). En aquests embrions, CDK1 és capaç d'unir-se a totes les ciclines, fosforilar la proteïna pRB i controlar l'expressió de gens regulats pel factor de transcripció E2F. Quan es deleta CDK1, els embrions de ratolí s'aturen a l'estadi de divisió d'una a dues cèl·lules. Aquests resultats indicarien que CDK1 seria la única CDK essencial durant el cicle cel·lular.

La importància de les proteïnes inhibidores Cip/Kip durant el cicle cel·lular es pot aclarir parcialment a partir del fenotip dels *knockout* (KO) de cadascun dels seus membres. Els p27 KO per exemple presenten un increment general de la mida de l'animal i una hiperplàsia de múltiples òrgans, revelant la importància de p27 durant el creixement (Fero et al. 1996). Malgrat que el ratolins KO de p21 no presenten un desordre hiperproliferatiu molt alterat, les cèl·lules p21<sup>-/-</sup> no aconsegueixen aturar el cicle cel·lular quan hi ha dany al DNA i aconsegueixen una elevada densitat de saturació (Deng C et al. 1995). Els embrions als quals els hi manca la p57, presenten una hiperplàsia a molts òrgans i diferenciació retardada, probablement degut a què no poden sortir del cicle cel·lular en el moment adequat (Zhang P et al. 1997).

## 2. LA CICLINA A

### 2.1 ESTRUCTURA I LOCALITZACIÓ DE LA CICLINA A

La ciclina A va ser una de les primeres ciclines a ser identificades. És una proteïna de 432 aminoàcids (aa). L'estructura cristal·litzada de la ciclina A, tant l'aïllada com l'associada a la CDK2 (Jeffrey et al. 1995; Brown et al. 1995), es caracteritza per ser una estructura globular rígida, excepte la seva part N-terminal. La part globular de la proteïna compren dos subdominis: el *cyclin box*, d'uns 100 aa, conservat en totes les ciclines, que és una regió hidrofòbica imprescindible per a la unió i activació de les CDKs (Lees & Harlow 1993; Kobayashi et al. 1992); i una regió molt semblant a la *cyclin box* quant al plegament, però no en seqüència d'aminoàcids. Ambdues consisteixen en 5  $\alpha$  hèlixs. Hi ha una  $\alpha$  hèlix addicional en la meitat N-terminal de la proteïna (Jeffrey et al. 1995; Brown et al. 1995). La ciclina A presenta a la part N-terminal la *destruction box* (D-box), necessària per a la degradació de la proteïna (47 al 57) i la *extended destruction box* (58 al 72) (figura 1.7).



**Figura 8** | Esquema dels dominis de la ciclina A

---

Existeixen dues ciclines de tipus A a eucariotes superiors; la A1 (forma embrionària) i la A2 (forma somàtica). La deleció de la ciclina A1 a ratolins porta a un bloqueig de la primera divisió meiótica a ratolins mascles (Liu D et al. 1998) i la deleció de la ciclina A2 causa letalitat embrionària (Murphy M et al. 1997). Utilitzant ratolins condicionals de la

ciclina A2 s'ha descrit recentment el requeriment de la proteïna per l'establiment del llinatge hematopoètic (Kalaszczyńska, 2009).

La ciclina A és una proteïna nuclear, però tal com hem explicat anteriorment, també s'ha vist que pot jugar un paper en el citoplasma regulant la duplicació dels centrosomes (Meraldi et al. 1999). En aquest context, val la pena mencionar que s'ha descrit l'associació entre la proteïna SCAPER i la ciclina A exclusivament al citoplasma (Tsang et al. 2007). La ciclina A no presenta senyal de localització nuclear (NLS) i s'ha proposat que la seva localització correlacionaria amb la capacitat de formar complexos amb la CDK (Maridor et al. 1993). Però també s'ha de tenir en compte que la CDK2 tampoc presenta una NLS. S'ha proposat que la localització nuclear de la ciclina A podria ser per la interacció amb la p107 (Gallant, 1995). Altres proteïnes que podrien ser candidates serien: p130, p21 o altres membres de la família E2F.

## 2.2 SÍNTESI I DEGRADACIÓ DE LA CICLINA A

La ciclina A (a partir d'ara ens referirem només a la ciclina A2) està fortament regulada a nivell transcripcional durant el cicle cel·lular (Huet et al. 1996; Coisy et al. 2004). El seu mRNA incrementa a la transició G<sub>1</sub>/S, s'acumula al llarg de la fase G<sub>2</sub> i desapareix durant la mitosi, una mica abans que la ciclina B (Pines, 1990). Durant la transició G<sub>1</sub>/S, els nivells de la ciclina A són regulats tant per factors de creixement, TGF- $\beta$ , com per interaccions cel·lulars amb la matriu extracel·lular (Philips et al. 2000). La repressió de la ciclina A implica complexos d'unió al promotor, els quals inclouen proteïnes relacionades amb E2F i pRB i també factors remodelants de la cromatina com Brahma/SNF2 $\alpha$  (Coisy et al. 2004).

La destrucció de la ciclina A en el moment adequat és necessària per a la sortida de la mitosi. La sobreexpressió de la ciclina A provoca un retard en l'alineament dels cromosomes i en la segregació de les cromàtides germanes (den Elzen & Pines 2001) i la sobreexpressió d'un mutant estable de la ciclina A atura les cèl·lules a l'anafase (Geley et al. 2001).



Tal com hem vist anteriorment, les ciclines A i B es degraden a través del complex APC/C. Malgrat el fet que la ciclina A i la ciclina B es degraden pel mateix mecanisme, hi ha clares diferències durant el procés. El més important de tot és que la ciclina A desapareix abans que la ciclina B durant el cicle cel·lular. A més, l'activació del *checkpoint* de fus mitòtic, el qual retrasa la transició metafase-anafase fins que els cromosomes s'han unit al fus mitòtic, inhibeix la degradació de la ciclina B però no de la ciclina A (Hunt, 1992). El que també se sap és que la *D-box* de la ciclina A no és suficient per a la destrucció de la proteïna, i que la seqüència addicional (*extended D-box*) també és necessària (den Elzen & Pines 2001; Geley et al. 2001). Recentement, s'ha descrit la necessitat de l'acetilació de quatre residus de lisina situats a la regió N-terminal com a pas previ per a la seva ubiquitinització i posterior degradació proteica (Mateo et al. 2009 (b)).

## 2.3 FUNCIONS DE LA CICLINA A

La ciclina A és essencial al menys durant dues fases del cicle cel·lular: durant la fase S, quan activa la CDK2, i durant la transició de G<sub>2</sub>/M, quan activa la CDK1.

### Funcions de la ciclina A a la fase S

La sobreexpressió de la ciclina A provoca l'avançament de l'entrada a la fase S (Resnitzky et al. 1995). Contràriament, la microinjecció d'anticossos anti-ciclina A o el tractament amb RNA antisense a la fase G<sub>1</sub> evita l'entrada a la fase S (Girard et al. 1991). S'ha proposat que el complex CDK2/ciclina A es necessita per l'inici de la replicació, activació de complexos preexistents de replicació i/o prevenció de la re-replicació (Saha et al. 1998; Petersen et al. 1999; Coverley et al. 2002). Com a suport de tots aquests mecanismes, s'ha trobat la ciclina A associada als focus de replicació i s'ha vist que uneix i fosforila proteïnes del complex d'origen de replicació a extractes de *Xenopus* (Cardoso et al. 1993). També s'ha observat que la ciclina A s'associa i fosforila cdc6, provocant la seva

exportació nuclear i degradació i per tant evitant la re-replicació (Saha et al. 1998; Petersen et al. 1999) (figura 9).

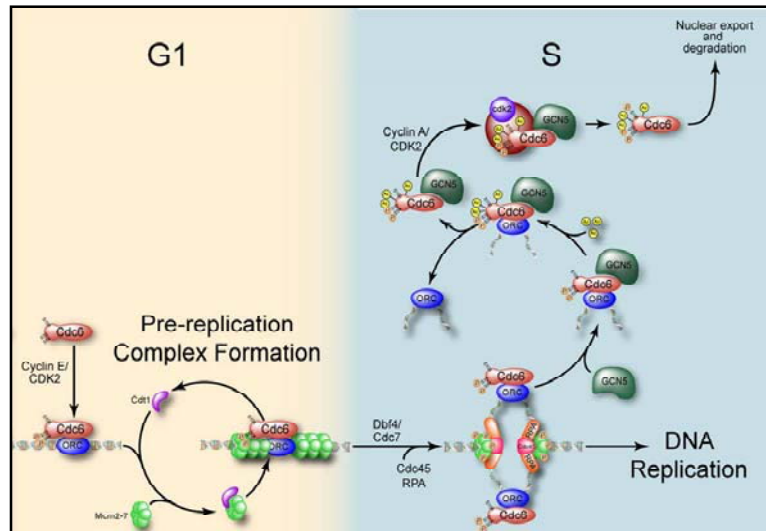


Figura 9 | Esquema de la formació dels complexos de pre-replicació i la implicació de la CDK2/ciclina A. (<http://www4.utsouthwestern.edu/mumbylab/Projects.htm>)

### **Funcions de la ciclina A al final de la fase G<sub>2</sub>**

Al final de la fase G<sub>2</sub>, la ciclina A relocalitza als centrosomes en el citoplasma, on s'uneix als pols del fus mitòtic. Un estudi ha demostrat la implicació de la ciclina A en l'activació del complex promotor de la fase M, format per la CDK1 i la ciclina B que regula la transició G<sub>2</sub>/M (Fung et al. 2007). Finalment, la fosforilació de la cdh1 per la CDK/ciclina A evita la formació de l'APC<sup>cdh1</sup> i per tant retarda la ubiquitinització i degradació de la ciclina B (Lukas C et al. 1999; Sørensen et al. 2001).

### **Funcions de la ciclina A a la fase M**

Els mecanismes pels quals la ciclina A promou l'entrada i la progressió a través de la mitosi no estan clars degut al solapament amb el complex CDK1/ciclina B. Malgrat tot,

està clar que la ciclina A juga un paper determinant a l'entrada a mitosi, ja que la microinjecció d'anticossos anti-ciclina A a la fase G<sub>2</sub> pot evitar la progressió cap a la fase M (Pagano et al. 1992). La microinjecció del complex recombinant CDK2/ciclina A a la fase G<sub>2</sub> accelera l'entrada a mitosi (Furuno et al. 1999). A més, la CDK2/ciclina A també es necessita per a la progressió de la mitosi fins a la profase, ja que la inhibició de la quinasa amb un inhibidor de CDK provoca un retorn cap a la interfase de les cèl·lules que es troben a la profase inicial (Furuno et al. 1999) (com inhibidor de la CDK utilitzen una proteïna de fusió que inclou els 90 primers aminoàcids de la p21 unida a GST i analitzen la inhibició respecte a CDK2 i CDK1 i veuen que CDK2 és molt més sensible a l'inhibidor).

### **Funcions de la ciclina A independents de CDK**

Quan s'obtenen cèl·lules *knockdown* de ciclina A, a part d'observar acumulació de cèl·lules durant la transició de G<sub>2</sub>/M, el que reflecteix un retard en l'entrada a la mitosi; també s'observen importants canvis morfològics, com l'increment del volum i diàmetre cel·lular que reflecteix modificacions del citoesquelet, en particular la redistribució de les fibres d'actina i la vinculina (Arsic et al. 2012). Aquest paper de la ciclina A en la distribució dels filaments d'actina és independent de la unió a CDK, ja que està mediat per la unió directa a RhoA i per la regulació de la captació del GTP. Consistent amb això, la depleció de la ciclina A altera l'activació de RhoA, el que comporta un increment de la motilitat cel·lular i la invasivitat, efectes que són revertits per l'expressió de la ciclina A WT o per un mutant incapaç d'unir-se i activar CDK.

### **3. BALANÇ ACETILACIÓ/DEACETILACIÓ**

L'acetilació al grup ε-amino del residu de lisina és una modificació post-traduccional molt important que té lloc tant a histones com a factors de transcripció i a d'altres proteïnes. És una modificació reversible, a diferència de l'acetilació del grup α-amino, la qual generalment és irreversible. L'acetilació neutralitza la càrrega positiva del residu de

lisina, per tant la modificació pot afectar la interacció de la lisina amb el DNA, RNA i altres proteïnes. Als residus de lisina també tenen lloc altres modificacions post-traduccionals tals com la ubiquitinització, sumoilació, neddilació,... de tal forma que aquestes competeixen pel mateix residu.

L'equilibri dinàmic de l'acetilació *in vivo* és controlat per les accions oposades de les acetiltransferases i deacetilases. Degut a què originalment l'acetilació va ser caracteritzada a histones, les lisina acetiltransferases i deacetilases són conegudes com histona acetiltransferases (HATs) i histona deacetilases (HDACs).

### 3.1 HISTONA ACETILTRANSFERASES

#### 3.1.1 Família de les acetiltransferases. Generalitats i funcions

Segons la similitud en la seva seqüència, les HATs poden ser organitzades en diferents grups (taula 2).

Taula 2 | Esquema de les diferents HATs

Família	HAT	Organisme	Substrat	Funció
Gcn5/PCAF	Gcn5	<i>S. cerevisiae</i>	H4/H2B	CT
	PCAF	Mamífers	H3/H4, TFs, E1A,TAT	CT
	GCN5L	Cucs a mamífers	H3/H4, TFs	CT
	Elp3	<i>S. cerevisiae</i> a mamífers	Histones	Elongació de la transcripció, lisina demetilasa?
	Hat1	<i>S. cerevisiae</i> a mamífers	H4	Deposició histones, organització cromatina, silenciament gènic
	Nut1	<i>S. cerevisiae</i>	H3/H4	Iniciació transcripció
	Hpa2 Hpa3	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i>	H3/H4	Desconeguda Desconeguda

Introducció

Família	HAT	Organisme	Substrat	Funció
p300/CBP	CBP	<i>C. elegans</i>	Histones, TFs, E1A	CT
	p300	Mamífers	Histones, TFs, E1A, TAT	CT
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	CT i control del cicle cel·lular
	Mof	<i>Drosophila</i>	H4 K16	Compensació dosi gènica
	Chameau	<i>Drosophila</i>		Silenciament gènic dependent de PcG
	Enok	<i>Drosophila</i>		Proliferació del neuroblast
	TIP60	Mamífers	H3/H4, receptor andrògens	Regulador transcripcional, reparació DNA i apoptosis
p160	MOF	Mamífers	H4	CT
	HBO1	Mamífers	H3/H4	Replicació DNA i corepressor transcripcional
	MOZ	Mamífers	H3/H4	CT
	MORF	Mamífers	H3/H4	CT
	SRC-1	Mamífers	H3/H4	CT
	ACTR	Mamífers	H3/H4	CT
	CIITA	Mamífers	H4	CT
ATF2	Mamífers	H4/H2B	Activador transcripcional	
TAF <sub>II</sub> 250	TAF <sub>II</sub> 230	<i>Drosophila</i>	H3/H4	Iniciació transcripció
	TAF <sub>II</sub> 250	Mamífers	H3/H4	Iniciació transcripció, ubiquitina ligasa
TFIIIC	TFIIIC subunitats	<i>S. cerevisiae</i> a mamífers	H3/H4	Iniciació transcripció
CDY	CDY	Humans	H4	Transició histon a protamina durant espermatogènesi
	CDYL	Mamífers	H4	
TFIIB	TFIIB	<i>S. cerevisiae</i> a mamífers	TFIIB	Iniciació transcripció

Família	HAT	Organisme	Substrat	Funció
MCM3AP	MCM3AP	Mamífers	MCM3	Iniciació replicació DNA
Eco1	Eco1	Mamífers	Subunitats de la cohesina	Cohesió de les cromàtides germanes
ARD1	ARD1	Mamífers	HIF1 $\alpha$	pVHL associació, ubiquitinització i degradació

TF, factor de transcripció; CT, coactivador transcripcional (Adaptat de (Yang, 2004))

Hi ha 3 famílies majoritàries: la família GNAT (*GCN5-related N-acetyltransferases*), la família p300/CBP (*p300 and cyclic AMP response element-binding protein (CBP)*) i la família MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60). A més, existeixen més d'una dotzena de proteïnes que presenten activitat acetiltransferasa.

La família GNAT compren HATs que presenten similitud de seqüència i estructural amb Gcn5 (revisat a (Roth et al. 2001)). Presenten una regió N-terminal de longitud variable, una domini acetiltransferasa, una regió que interacciona amb el coactivador Ada2, i un bromodomini a l'extrem C-terminal. També formen part d'aquesta família, Hat1, Elp3, Nut1 i Hpa2. Els seus membres són importants en la regulació del creixement cel·lular i desenvolupament, tal com demostra la letalitat embrionària del *knockout* de Gcn5 (Xu W et al. 2000). També estan implicats en la regulació transcripcional i en la reparació del DNA (Nagy & Tora 2007).

La família p300/CBP consta de proteïnes implicades en la proliferació cel·lular, regulació del cicle cel·lular, apoptosi, diferenciació i resposta a dany al DNA (Giles et al. 1998; Goodman & Smolik 2000; Chan & La Thangue 2001). Aquestes proteïnes actuen com un pont entre els factors de transcripció que s'uneixen al DNA i la maquinària transcripcional basal. A més, la superfície d'aquestes proteïnes serveix com plataforma per a la nucleació de varis factors de transcripció implicats en diversos processos cel·lulars. El model clàssic està basat en els experiments sobre el promotor de l'interferó- $\beta$  en resposta a la infecció viral (Merika et al. 1998). Un cop estimulat l'interferó- $\beta$ , aquest

s'uneix a la superfície de p300, captant factors de transcripció com NF- $\kappa$ B, IRF1, ATF2/c-Jun i la proteïna estructural HMGI. El paper de p300 en aquesta resposta és crític, ja que implica la unió d'una sèrie de proteïnes juntament amb la RNA polimerasa per a executar una resposta ràpida i breu en l'activació del gen de l'interferó- $\beta$ . Els *knockout* de CBP i p300 són letals embrionaris (Yao T.P. et al. 1998; Oike et al. 1999).

La família MYST és més gran, més diversa i no tan ben caracteritzada. Els seus membres juguen papers importants en la regulació gènica, reparació del DNA, cicle cel·lular, homeòstasi de les cèl·lules embrionàries i desenvolupament (Avvakumov & Coté 2007; Saksouk et al. 2008; Voss & Thomas, 2009). Molts d'aquests processos són duts a terme a través de l'acetilació de histones, malgrat que hi ha certes vies en què el paper de MYST és independent d'aquesta acetilació. Exemples són TIP60 i p53. TIP60 acetila p53 a la lisina K120, activant-la, i això modula el balanç entre l'aturada de cicle cel·lular i l'apoptosi (Sykes et al. 2006; Tang Y et al. 2006). Per això, s'ha proposat que TIP60 podria regular l'apoptosi independentment de la regulació transcripcional (Sykes et al. 2009). A la vegada, però, s'ha observat que TIP60 està implicada en l'activació de p53 (Berns et al. 2004), i que aquest fet pot activar la transcripció dependent de p53 (Legube et al. 2004). Mentre que TIP60 és important per l'expressió de proteïnes inhibidores de cicle cel·lular i gens proapoptòtics dependents de p53, l'acetilació de p53 per TIP60 és necessària només per a certs promotors de gens proapoptòtics com *Puma* i *Bax* (Sykes et al. 2006; Tang Y et al. 2006). En concordància amb aquests resultats, un mutant no acetilable de p53 té alterada la via de l'apoptosi mentre que l'aturada del cicle cel·lular es manté normal (Sykes et al. 2006). Experiments de ChIP utilitzant p53 WT i p53 mutant no acetilable mostren que el mutant no acetilable es recluta als promotors dels gens *Puma* i *Bax*. Malgrat tot, no s'indueix la transcripció. Una explicació podria ser que l'acetilació permetria el reclutament de coactivadors transcripcionals específics (Sykes et al. 2006).

### 3.1.2 Regulació de les histona acetiltransferases

Hi ha una sèrie de mecanismes implicats en la regulació de les HATs. Primer, com a cofactor essencial per a les HATs, l'acetilCoA estabilitza GCN5 i P/CAF (Herrera et al. 1997). Segon, la formació dels complexos multiproteics modula l'activitat i l'especificitat de substrat. Aquests complexos són més actius que no pas les subunitats catalítiques aïllades i presenten especificitat de substrat (Grant P.A. et al. 1997). Totes les proteïnes que el conformen també ajuden a coordinar les múltiples funcions (enzimàtiques i d'unió) que realitza el complex. Per exemple, el complex NuA4 conté no només la HAT, TIP60, sinó també ATM, una quinasa relacionada amb dany al DNA. En resposta a dany al DNA, TIP60 acetila ATM, i aquesta fosforila CHK2 i p53 (Sun Y et al. 2005; Sun Y, et al. 2007). Inclús, una mateixa HAT pot ser present en més d'un complex. Tercer, les activitats enzimàtiques de P/CAF, p300 i CBP són regulades per la interacció amb diferents proteïnes com MDM2 (Jin Y et al. 2002). Quart, com a proteïnes que són, les HATs poden patir modificacions post-traduccionals com fosforilació (Kawasaki et al. 2000), acetilació (Chen H et al. 1999), ubiquitinització (Poizat et al. 2000) i sumoilació (Girdwood et al. 2003). Cinquè, les HATs són degradades per les caspases, calpaïnes i pel proteasoma (Poizat et al. 2000). Sisè, la localització subcel·lular també és un mecanisme regulador molt important. Per exemple la HAT1 s'uneix a la proteïna 14-3-3, el que implica la localització citoplasmàtica (Imhof & Wolffe 1999). Finalment, algunes acetiltransferases podrien estar regulades per senyals nuclears degut a que presenten *PHD-fingers*, els quals estan implicats en la unió a fosfoinositol. Això podria proporcionar mòduls estructurals per integrar senyals lipídiques nuclears (Gozani et al. 2003).

### 3.1.3 HATs, leucèmia i altres malalties

Degut a la implicació de les acetiltransferases en diferents processos cel·lulars, molts estudis genètics i moleculars han demostrat la importància en diferents patologies. Per exemple, quant a la relació amb la oncogènesi, s'ha vist que la proteïna E1A interacciona amb la P/CAF (Carrozza et al. 2003). O que p300, CBP i P/CAF s'associen i modifiquen



diversos factors de transcripció, com p53, pRB o E2F, els quals controlen diferents programes cel·lulars (Nakatani 2001).

p300 i CBP han estat considerats supressors de tumors (Giordano & Avantaggiati 1999). Consistent amb això, la mutació monoal·lèlica del locus *CBP* és la base genètica del síndrome Rubinstein-Taybi i els pacients amb aquest síndrome presenten un risc incrementat de desenvolupar tumors malignes (Petrij 1995).

Estudis d'anormalitats cromosòmiques a pacients amb leucèmia han proporcionat informació addicional per a la implicació directa de les HATs en càncer. Els gens *CBP* i *p300* estan localitzats als cromosomes 16p13 i 22q13, respectivament, i s'ha vist que s'alteren durant la translocació cromosòmica associada amb la leucèmia i el síndrome mielodisplàsic. Les translocacions cromosòmiques que impliquen *CBP* són més comunes que les que afecten a *p300*. Ja que molts rearranjaments afecten el mateix interval genòmic de 13kb, es pensa que hi ha un element inestable genòmic que provoca aquesta elevada freqüència (Giles et al. 1997).

### 3.1.4 P/CAF. Característiques generals

P/CAF (*p300/CBP-associated factor*) va ser la primera HAT identificada a metazous (Brownell et al. 1996). És una proteïna de 832 aminoàcids. La part N-terminal és específica de metazous i interacciona amb p300/CBP (Yang, 1996). La part C-terminal conté dos dominis conservats: el domini AT (acetiltransferasa) i el bromodomini (es troba a moltes proteïnes associades a la cromatina i s'utilitza per al reconeixement dels residus acetilats) (Dhalluin et al. 1999). La regió central de l'AT controla la unió i catàlisi de l'acetilCoA (Clements et al. 1999), mentre que els extrems de l'AT sembla que regulen la unió específica del substrat (Poux & Marmorstein 2003) (figura 10).

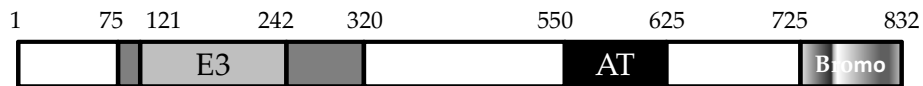


Figura 10 | **Estructura de la P/CAF.** El domini acetiltransferasa (AT) està marcat en negre i el bromodomini (bromo) està difuminat. El domini ubiquitina ligasa E3 (Linares, 2007) es troba dins el domini d'homologia de P/CAF (*P/CAF homology domain*). Els números indiquen les posicions dels aminoàcids (Adaptat de (Nagy & Tora 2007)).

---

Malgrat que la manca de P/CAF a les cèl·lules DT40 no afecta el creixement cel·lular, la de Gcn5 (membre de la família de GNAT i que comparteix un 75% de similitud amb la P/CAF) provoca un retard en el creixement cel·lular (Kikuchi et al. 2005). També s'ha de dir que a les cèl·lules que no tenen Gcn5, els nivells de P/CAF estan incrementats. Això podria suggerir papers compensatoris.

Ratolins *knockout* de P/CAF es desenvolupen de forma normal (Yamauchi T et al. 2000). Un anàlisi més acurat demostra una deficiència a curt termini en la memòria i una resposta aguda a l'estrès (Maurice et al. 2008).

La P/CAF realitza diferents funcions entre les que destaquem: la de coactivador transcripcional a través de l'acetilació de factors de transcripció com per exemple p53, (Nagy & Tora 2007), i també participa en la reparació del DNA, en la proliferació i diferenciació cel·lular i en l'apoptosi.

## Regulació de l'activitat de la P/CAF i interacció amb ligands

L'autoacetilació de la P/CAF sembla incrementar la seva estabilitat, la seva activitat acetilasa (Santos-Rosa et al. 2003), i la seva localització nuclear (Blanco-García et al. 2009). La deacetilació de P/CAF per la HDAC3 i en menor grau per HDAC1, HDAC2 i HDAC4 condueix a l'acumulació citoplasmàtica de P/CAF (Blanco-García et al. 2009). També s'ha demostrat que la oncoproteïna viral E1A inhibeix directament l'activitat de la P/CAF (Hamamori et al. 1999).

A humans, la P/CAF forma part d'almenys un complex multiproteic que conté més de 20 proteïnes associades (Ogryzko et al. 1998). Les subunitats no catalítiques del complex afecten l'activitat catalítica de la P/CAF (revisat a (Nagy & Tora 2007)), la seva localització subcel·lular (Craig et al. 2003) i els nivells del seu mRNA (Masumi et al. 1999), o també la seva estabilitat.

## 3.2 HISTONA DEACETILASES

Les HDACs eliminen el grup acetil del residu de lisina tant d'histones com de proteïnes no histones. L'any 1996, es va purificar la primera HDAC (ara coneguda com HDAC1), d'extractes nuclears i van descobrir que era ortòleg de Rpd3 (*reduced potassium dependency 3*) de llevat (Taunton 1996). Hi ha divuit HDACs, classificades en dues famílies: les HDACs clàssiques i les Sirtuïnes o classe III, dependent de la similitud de seqüència respecte als ortòlegs de llevat, Rpd3, Hda1 (*histone deacetylase 1*) i Sir2 (*silent information regulator 2*), respectivament (de Ruijter et al. 2003; Gregoretti et al. 2004) (taula 3).

### 3.2.1 Característiques de les HDACs clàssiques i les Sirtuïnes

La família de les HDACs clàssiques inclouen la classe I, II i IV. Requereixen l'ió  $Zn^{2+}$  per ser actives enzimàticament.

Les HDACs de la classe I s'expressen ubiqüament i majoritàriament són nuclears. Excepte HDCA8, els altres membres formen part de complexos multiproteics: HDAC1 i HDAC2 formen part dels complexos Sin3, Nurd, CoREST (Ahringer 2000) i HDAC3 forma part del complex N-CoR/SMRT (Wen et al. 2000). Aquests complexos s'uneixen a factors de transcripció i cromatina, regulen la transcripció i coordinen programes epigenètics (revisat a (Witt et al. 2009)).

Els membres de la classe II es defineixen per un domini N-terminal que és important per a la regulació del seu transport nucli-citoplasma i per a la unió específica al DNA. Aquest tràfic cel·lular és regulat per senyals intrínseques nuclears d'importació i exportació, igual

que per llocs d'unió a les proteïnes 14-3-3 i MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*)(Mckinsey et al. 2000). A diferència dels membres de la classe II2a, HDAC6 conté dos dominis deacetilasa en tàndem i un ZnF (*zinc finger*) a l'extrem C-terminal. És la deacetilasa citoplasmàtica majoritària i actua sobre la tubulina, per tant regula la motilitat cel·lular i l'adhesió (Hubbert et al. 2002). El domini ZnF pot unir la ubiquitina. L'altre membre de la classe IIb, HDAC10, presenta un domini molt similar al primer domini deacetilasa de la HDAC6, mentre que l'extrem C-terminal és ric en leucina (revisat a (Yang and Seto, 2004)).

La classe IV només inclou la HDAC11, estructuralment relacionada amb les dues classes anteriors. Es disposa de molt poca informació de la seva expressió. Quant a la funció, s'ha vist que HDAC11 regula el balanç entre la tolerància i l'activació del sistema immune a cèl·lules T CD4<sup>+</sup> (Villagra et al. 2009) i també juga un paper en la diferenciació oligodendrocítica (Liu H et al. 2009).

Finalment, les sirtuïnes són una família molt conservada. L'activitat enzimàtica dels seus membres depèn del cofactor NAD<sup>+</sup>. La seva localització pot ser nuclear, citoplasmàtica o mitocondrial. Els seus membres també poden patir modificacions post-traduccionals com fosforilació i sumoilació. Funcionalment estan relacionades amb estabilitat genòmica, tumorigènesi, metabolisme energètic i resistència a l'estrès cel·lular (Finkel et al. 2009).

Taula 3 | **Distribució dels diferents membres de les HDACs clàssiques.** Ens indica les diferents famílies, la distribució, les modificacions post-traduccionals que es coneixen fins ara, l'expressió a teixits i finalment el fenotip del *knockout*. N, nucli; C, citoplasma; Mit, mitocondri; Ac, acetilació; P, fosforilació; S, sumoilació; Ub, ubiquitinització; nd, no dades

	<b>Membre de la família HDAC</b>	<b>Distribució</b>	<b>Modificacions post-traduccionals</b>	<b>Expressió a teixits</b>	<b>Fenotip del ratolí <i>knockout</i></b>
Classe I	HDAC1	N	Ac, P,S, Ub	Ubiqua	Letal embrionari a E9.5
	HDAC2	N	Ac,P, Ub	Ubiqua	Viable fins a període perinatal
	HDAC3	N/C	P	Ubiqua	Letal embrionari abans de E9.5
	HDAC8	N	P, S	Ubiqua	Viable fins període perinatal
Classe IIa	HDAC4	N/C	P, S, Ub	Cor, múscul llis i cervell	Viable
	HDAC5	N/C	P, Ub	Cor, múscul llis i cervell	Hipertròfia miocardiaca
	HDAC7	N/C	P	Cor, placenta, pàncrees, múscul llis	Letal embrionari
	HDAC9	N/C	P, S	Múscul llis, cervell	Viable al nèixer, hipertròfia espontània miocardiaca
Classe IIb	HDAC6	N/C	P, S, Ub	Ronyó, fetge, cor, pàncrees	Viable
	HDAC10	N/C	nd	Melsa, ronyó, fetge	nd
Classe IV	HDAC11	N	nd	Cor, múscul llis i cervell	nd

### 3.2.2 Funcions de les HDACs

En general, l'acetilació s'ha relacionat amb l'activació de la transcripció (Allfrey et al. 1964), mentre que la deacetilació s'ha relacionat amb la repressió transcripcional (Peterson 2002). A més d'aquest paper inicial que se'ls hi va donar a les HDACs, cada vegada ha estat més clar que aquestes proteïnes tenen funcions independents de la deacetilació de les histones. Entre les funcions que regulen podem destacar el control del cicle cel·lular, la supervivència cel·lular i la diferenciació cel·lular (figura 11).

Específicament, el *knockdown* de la HDAC1 pot causar una aturada a la fase G<sub>1</sub> o a la transició de la fase G<sub>2</sub>/M, causant una pèrdua de cèl·lules mitòtiques i un increment en les cèl·lules apoptòtiques (Senese et al. 2007).

La HDAC4 té un paper central en la formació de l'esquelet (Vega et al. 2004). La majoria dels ossos de l'esquelet dels vertebrats es formen a partir d'un motlle cartilaginós on els condrocits (tipus cel·lular que produeix i manté la matriu cartilaginosa) pateixen hipertròfia, seguit d'apoptosi. Després, els osteoblasts (tipus cel·lular responsable de la formació de l'os), vasos sanguinis i altres tipus cel·lulars invaeixen i produeixen la matriu madura de l'os (Karsenty 2003). La HDAC4 s'expressa a condrocits prehipertròfics *in vivo*, i els ratolins amb una delecció global de la HDAC4 moren durant la primera setmana de vida degut a una ossificació ectòpica del cartíleg endocondral, el que evita l'expansió de la caixa toràcica i fa que no puguin respirar. Aquest fenotip letal va acompanyat d'una hipertròfia precoç dels condrocits, resultant en la conversió dels elements esquelètics cartilaginosa en os ossificat. RUNX2 (*Runt related transcription factor 2*) i MEF2C que interacciona amb HDAC4, tenen papers en el control de la hipertròfia del condrocit i la formació de l'os. També s'ha vist que la HDAC4 s'uneix a 53BP1 i per tant podria regular la reparació del DNA (Kao et al. 2003).

La HDAC6 deacetila la  $\alpha$  tubulina i s'associa amb microtúbuls (Hubbert et al. 2002). La sobreexpressió de la HDAC6 causa la deacetilació de la  $\alpha$  tubulina, i el tractament amb RNA d'interferència de la HDAC6 provoca un increment de la seva acetilació. A més, la HDAC6 podria regular l'adhesió cel·lular (Tran et al. 2007), la formació de la sinapsi immune (regió de contacte entre la cèl·lula T i les cèl·lules dianes, i on s'activa la cèl·lula T) i el transport al llarg dels microtúbuls (Reed et al. 2006). La HDAC6 també té un paper

en la reabsorció de cilis primaris (Pugacheva et al. 2007). La fosforilació de la HDAC6 per la quinasa Aurora A activa la HDAC6 i promou la desorganització ciliar (Linding et al. 2007; Pugacheva et al. 2007).

També s'ha vist que la HDAC6 és un component dels agregosomes (agregats insolubles de proteïnes mal plegades) i que la HDAC6 incrementa l'eliminació de diversos substrats que s'acumulen als agregosomes a través de l'autofàgia, una via de degradació mediada pels lisosomes (Pandey et al. 2007; Iwata et al. 2005). L'autofàgia s'indueix si la via del proteasoma no funciona correctament, i aquesta inducció recuperaria un dels efectes que es donen durant la neurodegeneració, que és l'acumulació de dipòsits proteics deguts a aquest mal funcionament (Pandey et al. 2007).

El *knockout* de la HDAC5 i el de la HDAC9 són viables, però el doble mutant presenta defectes septals ventriculars letals, els quals típicament resulten d'anormalitats en el creixement i maduració dels cardiomiòcits. Donada la interacció entre les HDACs de classe II i MEF2 i el paper central de MEF2 en el control de la diferenciació dels cardiomiòcits, el desenvolupament dels defectes cardíacs en els doble mutants probablement resulta de la superactivació de MEF2. A més, les HDACs de classe II formen part de complexos multiproteics que modulen les activitats de molts altres factors implicats en el creixement miocardià com el factor de resposta al sèrum, la miocardina o CAMTA2 (*calmodulin binding transcription activator 2*) (Song K et al. 2006).

Durant l'embriogènesi, la HDAC7 s'expressa específicament a cèl·lules endotelials que formen la capa interna del sistema cardiovascular (Chang S et al. 2006). La deleció genètica de la HDAC7 causa letalitat embrionària, degut a la pèrdua de la integritat de les interaccions cel·lulars-endotelials i el consegüent trencament dels vasos sanguinis. La disrupció vascular va acompanyada de l'increment de la MMP10 (*matrix metalloproteinase 10*), una proteasa que és secretada per les cèl·lules endotelials i que degrada la matriu extracel·lular, alterant les interaccions cèl·lula-múscul llis i cèl·lula-endoteli. A la vegada, TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) és regulat a la baixa a les cèl·lules endotelials (Chang S et al. 2006). La implicació de la HDAC7 en el control de l'expressió de MMP10 i la integritat vascular està relacionada amb molts desordres vasculars, com l'aterosclerosi i

l'aneurisme. La HDAC7 també juga un paper específic en l'expansió clonal de les cèl·lules T a través de la supressió de l'apoptosi dependent de Nur-77 (Dequiedt et al. 2003).

La HDAC8 s'expressa a múscul llis, on s'associa amb l' $\alpha$ -actina i és essencial per a la contracció muscular (Waltregny et al. 2005). També regula l'activitat telomerasa (Lee H et al. 2006). Finalment, s'ha establert una relació entre la sobreexpressió transcripcional de la HDAC8 i estadis avançats o metastàsics de neuroblastoma infantil (Oehme et al. 2009).

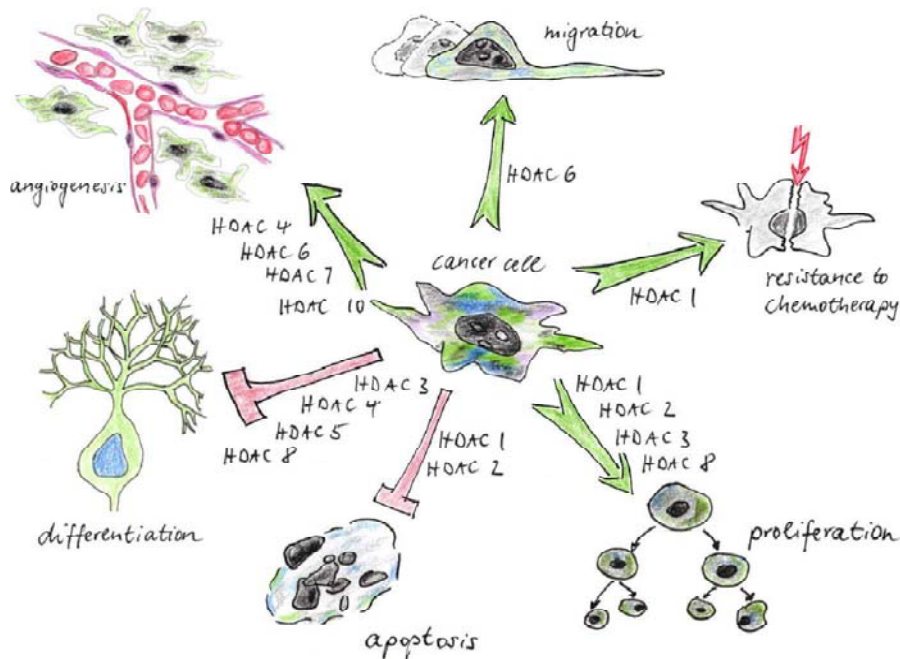


Figura 11 | Els membres de la família de les HDACs controlen punts molt importants de la biologia del càncer. (Witt et al. 2009)



### 3.2.3 Regulació de les HDACs

Com a proteïnes que realitzen papers fisiològics tan importants, les activitats de les HDACs estan altament regulades per múltiples mecanismes (figura 12).

#### 3.2.3.1 Regulació de les HDACs per la formació de complexos proteics

Moltes HDACs existeixen en complexos multiproteics, i la majoria d'elles, sinó totes, interaccionen amb altres proteïnes cel·lulars. La majoria de les HDACs recombinants purificades són enzimàticament inactives (Carmen et al. 1999). Per això, qualsevol proteïna que s'associï amb les HDACs tindria la capacitat de regular l'activitat deacetilasa. De la mateixa manera, les HDACs, en general, no presenten capacitat d'unió al DNA, per tant, qualsevol proteïna amb dominis d'unió al DNA que dirigeixi la HDAC al DNA o a les histones pot afectar la seva funció.

El millor exemple de la regulació per interacció entre proteïnes seria la HDAC3. Estudis previs han demostrat que corepressors transcripcionals nuclears com SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptor*) i N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) funcionen com plataformes per al reclutament de les HDACs (Alland et al. 1997). En el cas de la HDAC3, però, la interacció entre la HDAC3 i SMRT/N-CoR provoca l'estimulació de l'activitat enzimàtica (Wen et al. 2000). No s'observa un increment de l'activitat amb un mutant d'N-CoR que no pot unir HDAC3. L'activació de la HDAC3 és mediada pel domini DAD (*deacetylase-activating domain*) present a SMRT i N-CoR. Es va veure que aquest domini era necessari i suficient per a l'activació de l'activitat de la HDAC3 en experiments de reconstitució utilitzant components purificats (Wen et al. 2000).

A més, també s'ha vist que SMRT/N-CoR també presenten dominis SANT (domini putatiu d'unió al DNA present a molts reguladors transcripcionals). Aquests corepressors presenten dos dominis SANT, dels quals només un és necessari per a l'activació de la HDAC. En el cas d'SMRT, el segon domini SANT regula la HDAC3 unint-la a les histones (Yu J et al. 2003). Si es deleta el domini SANT, es perd l'activitat de la HDAC3.

### 3.2.3.2 Modificacions post-traduccionals de les HDACs

#### Fosforilació

Està demostrat que la HDAC1 es fosforila *in vitro* a Ser<sup>421</sup> i Ser<sup>423</sup> (Pflum et al. 2001). La mutació d'aquestes serines a alanines (obtenció d'un mutant considerat no fosforilable), redueix tant l'activitat enzimàtica com la transcripcional. Resultats semblants s'han obtingut amb un mutant que té delecionada la part C-terminal. Un fet molt important és que la formació del complex amb les proteïnes RbAp48, MTA-2, mSin3A i CoREST es troba perjudicada en aquests mutants. Això es podria explicar de dues maneres, o bé perquè la fosforilació de la HDAC1 pot alterar la seva conformació i fer-la més favorable. O bé, que la fosforilació podria incrementar l'abilitat de la HDAC1 per interaccionar amb proteïnes, com MTA-2, la qual pot induir l'activitat.

La fosforilació de la HDAC2 ocorre a múltiples residus de serina localitzats al final de l'extrem Carboxil (Chang Tsai & Seto 2002). S'ha demostrat que la fosforilació de la HDAC2 és necessària tant per l'activitat enzimàtica com per a l'associació amb els corepressors mSin3 i Mi2.

S'ha trobat que les HDAC1, HDAC6 i HDAC10 formen part de complexos actius de fosfatases, mentre que les HDAC2, HDAC3, HDAC4 i HDAC5 no formen part d'aquests complexos (Brush et al. 2004).

#### Acetilació

La HDAC1 s'ha trobat acetilada associada amb GR (*glucocorticoid receptor*) durant la regulació a la baixa del promotor (Qiu Y et al. 2006). En canvi, l'estat d'acetilació de tot el *pool* de HDAC1 escassament incrementa durant el tractament amb dexametasona. p300 acetila la HDAC1 a diferents residus de lisina: 218, 220, 432, 438, 439 i 441. Els mutants en els quals les lisines van ser substituïdes per glutamina (mutant considerat pseudoacetilat), no presentaven activitat deacetilasa *in vitro*. Els mutants en els quals les lisines van ser substituïdes per alanina (mutant considerat no acetilable), tampoc presentaven activitat enzimàtica. Per tant, l'acetilació de la HDAC1 és un procés regulador que governa les interaccions proteïques i la HDAC1 es necessita per a la deacetilació de components de transcripció durant l'estimulació inicial del receptor del glucocorticoid (Qiu Y et al. 2006).

### **Ubiquitinització**

El tractament amb glucocorticoids indueix la ubiquitinització i degradació via proteasoma de la HDAC1 (Wiper-Bergeron et al. 2003). A més, la citocina pro-inflamatòria TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) també disminueix els nivells de la proteïna via ubiquitinització i degradació proteosomal (Vashisht Gopal et al. 2006). La degradació de la HDAC1 induïda per TNF- $\alpha$  no passava a cèl·lules deficientes per IKK2 (*inhibitory  $k\beta$  kinase IKK $\beta$* ), indicant una connexió entre els nivells de la HDAC1 i la fosforilació.

HDAC6 interacciona amb la ubiquitina i amb altres proteïnes de la via de la ubiquitinització (Seigneurin-Berny et al. 2001). HDAC5 i HDAC6 són poliubiquitinitzades, però no són degradades pel proteasoma i també s'ha vist que la HDAC6 s'associa amb enzims deubiquitinitzants (Hook et al. 2002). Per tant, la implicació de la HDAC6 amb la neteja d'agregats de proteïnes mal plegades i la seva unió amb la ubiquitina i altres proteïnes de la via de la ubiquitinització podria explicar els forts efectes citotòxics que s'observen quan la HDAC6 és inhibida (Kawaguchi et al. 2003; Boyault et al. 2007).

### **Sumoilació**

Dos estudis independents demostren que la HDAC1 es sumoila (Colombo et al. 2002; David et al. 2002) tant *in vitro* com *in vivo* a les lisines Lys<sup>444</sup> i Lys<sup>476</sup>. Difereixen, però, en l'efecte funcional de la modificació. En un dels treballs, mutant les lisines implicades i per tant obtenint una proteïna que no es pot sumoilar, es redueix de forma dràstica la repressió transcripcional mediada per la HDAC1 (David et al. 2002), mentre que l'activitat repressora i enzimàtica del mateix mutant en l'altre estudi no presenta molts canvis (Colombo et al. 2002).

La sumoilació de la HDCA4 provoca una disminució de l'activitat deacetilasa (Kirsh et al. 2002). Aquest estudi demostra que la localització nuclear de la HDAC4 és un requisit previ per a la sumoilació de la HDAC4 i que el complex proteic del porus nuclear RanBP2 catalitza la modificació.

### 3.2.3.3 Localització subcel·lular de les HDACs

Les HDAC4, 5, 7 i 9 s'associen a proteïnes 14-3-3 i aquesta unió és dependent de fosforilació a residus de serina conservats a l'extrem NH<sub>2</sub>. La desrepressió de la transcripció dependent de MEF2 pel segrest de les HDACs està ben caracteritzada. Mutacions a les serines conservades a la regió N-terminal de la HDAC4 i HDAC5 elimina l'associació amb les proteïnes 14-3-3 i d'aquesta manera es potencia la repressió de la transcripció dependent de MEF2A.

La HDAC4 presenta un domini NES (*nuclear export signal*) (Mckinsey et al. 2001). Tant la unió de 14-3-3 com la senyal d'exportació són necessàries per a la retenció citoplasmàtica de la HDAC4. També s'ha mapat una NLS (*nuclear localization signal*) a HDAC4, 5, 7, i 9 i la unió a 14-3-3 s'ha proposat que emmascari la NLS, i per tant inhibeixi la localització nuclear (Wang & Yang 2001). 14-3-3 també interfereix amb l'associació de la importina- $\alpha$  amb la HDAC4 (Grozinger & Schreiber 2000).

### 3.2.3.4 Canvis en l'expressió gènica de les HDACs

L'expressió del mRNA de la HDAC3 és activada per PHA, PMA i  $\alpha$ CD3, però reprimida per GMCSF (Dangond et al. 1998). La HDAC3 presenta una forma d'splicing en què manca l'exó 3 (Gray, 2003). A part de la HDAC3, la HDAC9 i la HDCA10 també presenten formes d'splicing (Fischer et al. 2002; Guardiola & Yao 2002). MITR (*MEF-2 interacting transcription repressor*), una forma d'splicing de la HDAC9 que compren només la part del domini N-terminal altera eficientment la transcripció dependent de MEF2 (Zhou X et al. 2000; Zhang C.L. et al. 2001).

### 3.2.3.5 Disponibilitat de cofactors metabòlics per a l'activació de les HDACs

Tal com hem vist abans, les sirtuïnes requereixen el cofactor NAD<sup>+</sup> per tal de ser enzimàticament actives. Es proposen dos models per a l'activació de les SIR2; incrementar la *ratio* NAD<sup>+</sup>/NADH, pujant NAD<sup>+</sup> o disminuint els nivells de NADH, un competidor de la SIR2 (Lin et al. 2004), o bé, disminuint els nivells de nicotinamida (un

inhibidor de SIR2) (Bitterman et al. 2002). En qualsevol dels casos, el  $\text{NAD}^+$  regula la classe III de les HDACs en resposta a l'estat metabòlic de la cèl·lula.

### 3.2.3.6 Processament proteolític de les HDACs

SIRT3 humana és sintetitzada com a precursor inactiu, el qual és importat al mitocondri i a través d'una peptidasa es genera la forma activa (Schwer et al. 2002). El complex corepressor HDAC1/mSin3A pot ser deplecionat si la HDAC1 es degrada durant la diferenciació preadipocítica induïda per esteroids (Wiper-Bergeron et al. 2003).

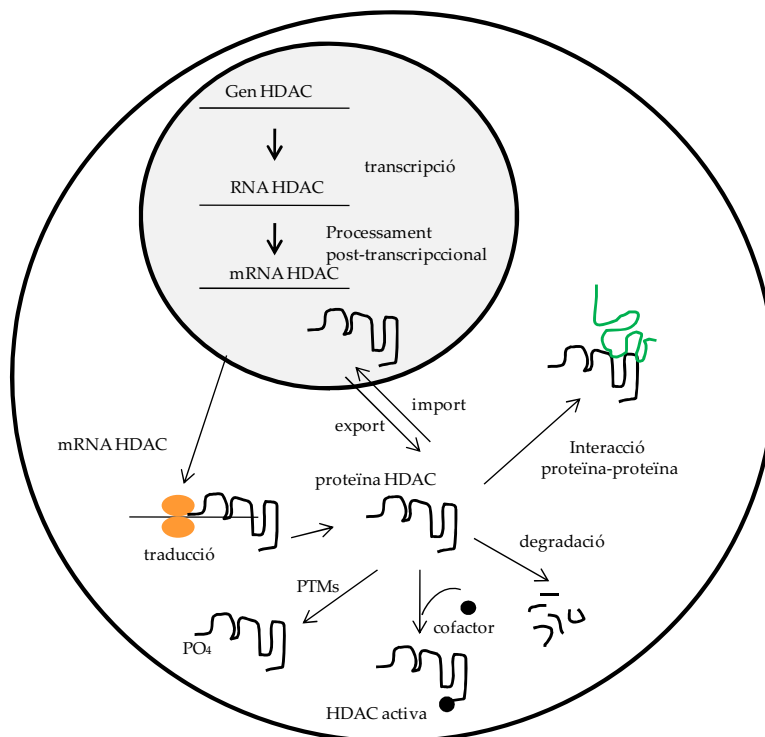


Figura 12 | Esquema que simplifica els diferents mecanismes de regulació de les HDACs. Per simplificar, PTMs (modificacions post-traduccionals) i les interaccions proteïna-proteïna es mostren al compartiment citoplasmàtic, però realment moltes ocorren al nucli.

### 3.2.4 Alteracions de les HDACs. Càncer i altres malalties

Molts estudis s'han centrat en el reclutament aberrant de les HDACs als promotors a través de la seva associació amb proteïnes oncogèniques d'unió al DNA que resulten de la translocació cromosomal, o amb factors de transcripció sobreexpressats que interaccionen amb les HDACs. Per exemple, les proteïnes oncogèniques de fusió PML-RAR $\alpha$ , (*Promyelocytic leukaemia-Retinoic acid receptor $\alpha$* ), PLZL-RAR $\alpha$  (*Promyelocytic leukaemia zing finger-Retinoic acid receptor $\alpha$* ) i AML1-ETO (*Acute myeloid leukaemia1-Eight twenty one protein*) indueixen APL (leucèmia promielocítica aguda) i AML (leucèmia mieloide aguda) reclutant complexos que contenen HDACs i que reprimeixen constitutivament gens diana (Pandolfi et al. 2001; Lin et al. 2001). BCL6 (*B-cell lymphoma 6*) és un factor de transcripció sobreexpressat en el 40% de limfomes difosos de cèl·lules B (DLBCLs), el qual recluta HDAC2 per a reprimir gens com p21. BCL6 presenta un estat basal d'acetilació baix, i el tractament de DLBCLs amb inhibidors de deacetilases causa una hiperacetilació de BCL6, alliberant HDAC2, reactivant gens abans suprimits i l'apoptosi de les cèl·lules tumorals (Pasqualucci et al. 2003).

A part del reclutament aberrant de les HDACs a loci específics, també s'ha descrit l'expressió alterada de diferents HDACs. Per exemple, la sobreexpressió de la HDAC1 o HDAC2 o HDAC6 s'ha descrit a molts tumors sòlids, com els de cervell, mama, pròstata i gàstric (Halkidou et al. 2004; Song J et al. 2005; Zhang Z et al. 2005).

Actualment es disposa de molta informació que indica que la HDAC6 juga un paper en la neurodegeneració. Es requereix per a la formació dels agregosomes i és present en els cossos de Lewy que estan associats amb desordres neurodegeneratius com la malaltia de Parkinson i la demència (Kawaguchi et al. 2003). El mal funcionament de l'autofàgia com a conseqüència de la disminució de l'activitat de la HDAC6 podria predisposar a la neurodegeneració (Pandey et al. 2007). Per una altra banda, la inhibició de la HDAC6 promou l'acetilació de la tubulina i això facilita el transport vesicular dependent de microtúbuls. D'aquesta manera es compensa el transport deficitari en la malaltia de Hungtinton (Dompierre et al. 2007).

### 3.2.5 Inhibidors de les HDACs (HDACi).

El paper de l'acetilació i la deacetilació en tants aspectes del desenvolupament i la homeòstasi de teixits podria suggerir que la inhibició sistèmica de les HDACs amb inhibidors farmacològics podria causar efectes no específics i catastròfics. Per tant, sobta que la inhibició sigui bastant ben tolerada *in vivo*. Degut als fenotips tan severs observats dels *knockout* de ratolí, perquè els inhibidors són tan ben acceptats? Podria ser perquè una deleció resulta en la completa absència de l'enzim, mentre que els inhibidors no causen una completa inhibició de l'activitat. O, potser, la més important, que les HDACs participen en complexos transcripcionals multiproteics. Així doncs, la deleció del gen, causa l'alteració de tot el complex, mentre que l'inhibidor només modifica l'activitat de l'enzim.

Els inhibidors poden induir aturada del creixement, diferenciació i/o apoptosi de les cèl·lules transformades i per tant, poden ser agents terapèutics pel tractament de diferents formes de càncer (McLaughlin et al. 2003). Estudis *in vitro* mostren que les cèl·lules transformades són deu vegades més sensibles als HDACi que les cèl·lules normals, proporcionant informació valuosa quant a l'especificitat de la mort de cèl·lules tumorals (Dokmanovic & Marks 2005). També s'ha vist que els efectes dels HDACi poden ser dependents del tipus cel·lular, i que diversos HDACi, estructuralment diferents, poden tenir diferents efectes al mateix tipus cel·lular.

HDACi es divideixen en diferents grups segons la seva estructura química (taula 4), i no tots presenten la mateixa eficiència a l'hora d'inhibir l'activitat de les HDACs. El seu mecanisme d'acció consisteix en la unió a la butxaca activa de les HDACs i quelar l'ió zinc que es troba a la base (Finnin et al. 1999).

Taula 4 | **Llista d'inhibidors de les HDACs** N/D no dades (Adaptat de (Bolden, 2006)).

Grup	Compost	Assajos clínics
Àcid hydroxàmic	TSA (Trichostatin A)	N/D
Compostos derivats	SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid)	Fase I,II,III
	CBHA (M-carboxycinamic acid bis-hydroxamide)	N/D
	ABHA (Azelaic bis-hydroxamic acid)	N/D
	NVP-LAQ824	Fase I
	LBH589	Fase I
	Oxamflatin	N/D
	Pyroxamide	Fase I
	Scriptaid	N/D
	PXD101	Fase I
	Pèptids cíclics	Apicidin
Trapoxin		N/D
CHAPs		N/D
Desipeptide (FK228, FR901228)		Fase I,II
Àcids grassos de cadena curta	VPA (acid valproic)	Fase I,II
	PB (Phenybutyrate)	N/D
	PA (Phenyacetate)	N/D
	SB (Sodium butyrate)	Fase I,II
	MS-275	Fase I,II
Benzamides sintètiques	CI-994 (N-acetyldinaline)	Fase I,II,III
Ketones	Alpha-ketomides	N/D
	Trifluoromethyl ketone	N/D

Dos HDACi han estat aprovats per US FDA per al tractament del limfoma cutani de cèl·lules T, SAHA o vorinostat, el 2006 (Grant et al. 2007) i l'istodax el 2009 (Statbite 2010); mentre que altres inhibidors ja es troben en assajos clínics de malalties hematològiques (Lane & Chabner 2009).



### 3.2.5.1 Efectes biològics dels HDACi a través de la regulació de l'expressió gènica

#### **Apoptosi induïda per HDACi**

Els HDACi indueixen mort cel·lular tumoral amb totes les característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi. Estudis han demostrat que diferents membres de la superfamília del receptor del TNF i els seus ligands (via extrínseca) són transcripcionalment activats després del tractament amb HDACi (Johnstone 2002; Minucci 2006). Però també hi ha estudis que recolzen el paper de la via intrínseca o mitocondrial apoptòtica en la mort cel·lular mediada per HDACi. S'ha descrit recentment que limfomes primaris de cèl·lules B que sobreexpressen BCL2 (proteïna que bloqueja la via intrínseca) són completament resistents a SAHA i LBH589 *in vivo*, indicant que la via apoptòtica intrínseca és un requisit pels efectes terapèutics dels HDACi, al menys en el model de ratolí singènic del limfoma de Burkitt (Ellis et al, 2009).

#### **Aturada del cicle cel·lular**

Els HDACi van ser descoberts com a conseqüència de la seva capacitat d'induir diferenciació cel·lular. Aquest efecte està associat amb l'aturada del cicle cel·lular a la transició G<sub>1</sub>/S mediada per la inducció de l'expressió de p21 dependent de p53 (Vrana et al. 1999). Tots els inhibidors estudiats fins ara, amb la possible excepció de la tubacina (inhibidor específic de la HDAC6), poden induir aturada a la transició G<sub>1</sub>/S (Haggarty et al. 2003; Gabrielli et al. 2002).

Els HDACi també poden mediar l'aturada a la transició G<sub>2</sub>/M per l'activació del *checkpoint* de G<sub>2</sub>/M, encara que és un fet rar (Qiu L et al. 2000). En certes circumstàncies, la pèrdua del *checkpoint* de G<sub>2</sub>/M pot determinar la sensibilitat de les cèl·lules als HDACi per tal d'induir l'apoptosi. Les cèl·lules tractades amb HDACi inicialment s'acumulen a la transició G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular, però la majoria de les cèl·lules tumorals presenten un

*checkpoint* de G<sub>2</sub>/M defectuós, per això acaben travessar el *checkpoint* i patint apoptosi (Peart et al. 2003).

### **Angiogènesi tumoral, metàstasi i invasió**

Els HDACi presenten tant *in vitro* com *in vivo* activitats anti-angiogèniques, anti-invasives i immunomoduladores que contribueixen a la inhibició del desenvolupament i progressió del tumor. Les propietats anti-angiogèniques dels HDACi estan associades amb la disminució de l'expressió de gens pro-angiogènics com VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HIF1 $\alpha$  (*hipoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) i eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) el qual és equivalent als efectes inhibitoris de la neo-angiogènesi tant *in vitro* com *in vivo* (Pili et al. 2001; Deroanne et al. 2002). A més, els HDACi també regulen a la baixa l'expressió de CXCR4 (*chemokine (C-X-C motif) receptor 4*), el qual és important per a la captació de progenitors del moll de l'os i de cèl·lules endotelials circulants cap als llocs d'angiogènesi, tant a cèl·lules endotelials no transformades com a línies tumorals (Qian et al. 2006); Crazzolara, 2002). Finalment, també s'ha demostrat la supressió de la diferenciació dels progenitors endotelials (Qian et al. 2006).

El possible efecte anti-metastàtic dels HDACis, seria degut a la supressió de MMPs (metalloproteases de la matriu), com MMP2 i MMP9 i per la regulació a l'alça de TIMP1 (*tissue inhibitor of MMP*) i TIMP2 i/o per la inducció de l'expressió de RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*), glicoproteïna de membrana que regula negativament l'activitat de MMP2 (Liu et al. 2003). Un estudi *in vivo* demostra que el butirat sòdic inhibeix la metàstasi en els carcinomes hepatocel·lulars (Coradini et al. 2004).

### **Efectes immunomoduladors**

Els HDACi poden augmentar la immunogenicitat de les cèl·lules tumorals regulant a l'alça l'expressió de proteïnes com les del complex major d'histocompatibilitat (MHC I i II) o proteïnes d'adhesió i co-estimuladores com CD40, CD80, CD86 i ICAM 1 (*intercellular adhesion molecule 1*) (Maeda et al. 2000; Magner et al. 2000). A més, també indueixen l'expressió de MICA i MICB (MHC class I chain-related molecules) a la

superfície de cèl·lules tumorals (Armeanu et al. 2005). MICA i MICB s'uneixen al immunoreceptor activador NEG2D (*natural killer protein group 2*) a la superfície de cèl·lules NK, cèl·lules  $\gamma\delta$  i cèl·lules T CD8<sup>+</sup>. Cèl·lules d'hepatocarcinoma cel·lular tractades amb HDACi, però no hepatòcits normals, mostren un increment de MICA i MICB, i són eficientment lisades per les cèl·lules NK dependent de NEG2D (Armeanu et al. 2005).

### 3.2.5.2 Efectes biològics dels HDACi sobre proteïnes

S'ha observat que l'activitat reguladora de factors de transcripció com E2F1, p53, STAT1, STAT3 i NF- $\kappa$ B pot ser modificada a través de l'acetilació i deacetilació directa dels propis factors, i tots aquests són hiperacetilats en resposta a HDACi (Gu 1997; Martínez-Balbás et al. 2000). Per tant, l'expressió de les proteïnes diana d'aquests factors pot estar afectada.

Els HDACi poden regular l'activitat de p53 per tal d'induir una resposta pro-apoptòtica. p53 és un inductor important de la via intrínseca apoptòtica a través de l'activació transcripcional de gens pro-apoptòtics com *Bax*, *Puma* i *Noxa*, i a través de la unió directa a Bax i BCL2 (Chipuk 2006). La hiperacetilació de p53 estabilitza la proteïna (Xu 2003) i potencia la unió al DNA, el que incrementa l'expressió de gens diana com *Noxa* per iniciar l'apoptosi (Terui et al. 2003).

## **ANTECEDENTS**



El treball de Mateo et al., *Degradation of cyclin A is regulated by acetylation*, publicat el 2009 pel nostre grup de recerca, descriu que la ciclina A s'acetila per l'acetilasa P/CAF i que la conseqüència d'aquesta acetilació és la degradació de la proteïna (adjuntat article a annex II) (Mateo et al. 2009 (b)).

## RESUM DEL TREBALL

Per tal d'observar si la ciclina A s'acetilava es van transfectar cèl·lules amb la ciclina A ectòpica. Es va immunoprecipitar (IP) la ciclina A amb anticossos HA o IgG en el cas del control negatiu i per western blot (WB), emprant un anticòs anti-acetil lisina, es va detectar la ciclina A acetilada (figura 1).

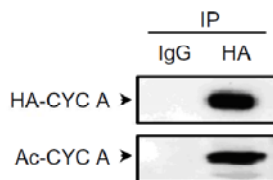


Figura 1 | La ciclina A s'acetila *in vivo*.

Per experiments d'acetilació *in vitro* s'havia demostrat que la P/CAF acetilava la ciclina A. Així doncs, per comprovar *in vivo* que P/CAF també era la responsable de l'acetilació, es van disminuir els nivells de la P/CAF utilitzant shRNA. Tal com es veu a la figura 2, el shRNA contra la P/CAF provoca una dràstica disminució dels nivells d'aquesta proteïna. A les cèl·lules tractades amb els shRNA de P/CAF 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 shRNA control.

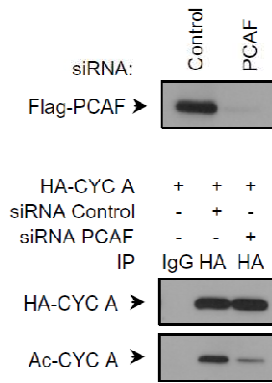


Figura 2 | **P/CAF acetila la ciclina A *in vivo***. Cèl·lules HCT-116 van ser transfectades amb HA-ciclina A i shRNA control o P/CAF. Les cèl·lules es van lisar i es van realitzar IPs amb anticossos anti HA o IgG com a control. Les mostres es van resoldre en un gel SDS-acrilamida i després van ser analitzades per WB.

Tot seguit vam voler determinar en quin punt del cicle cel·lular es produïa la interacció entre aquestes dues proteïnes. Per això vam transfectar cèl·lules HeLa amb YFP-P/CAF i HA-ciclina A i les vam sincronitzar utilitzant un doble bloqueig de timidina i el tractament amb nocodazol (materials i mètodes). Finalment vam realitzar immunoprecipitacions (IPs) amb els extractes cel·lulars utilitzant anti-HA i analitzant les mostres per WB. Al panell de l'esquerre de la figura 3, observem els nivells proteics de les diferents proteïnes que hem estudiat. Els nivells de la CDK2 són pràcticament iguals al llarg del cicle cel·lular, mentre que els nivells de la ciclina A i de P/CAF són més alts a les fases S i G<sub>2</sub>/M. També és en aquestes dues fases quan la ciclina A està acetilada, tal com s'observa al panell de la dreta.

Posteriorment, es van determinar, tant *in vitro* com *in vivo*, quines eren les lisines que P/CAF acetilava. Va resultar que eren les lisines 54, 68, 95 i 112, les quals estan incloses dins de la regió N-terminal de la proteïna. Per tal d'estudiar l'efecte de l'acetilació sobre la proteïna es va generar un mutant considerat no acetilable, ciclina A 4R, en què les 4 lisines mencionades han estat mutades a arginines. Es va estudiar la vida mitja d'aquest mutant i es va observar que era molt més estable que la ciclina A WT tal com es pot observar a la figura 4.

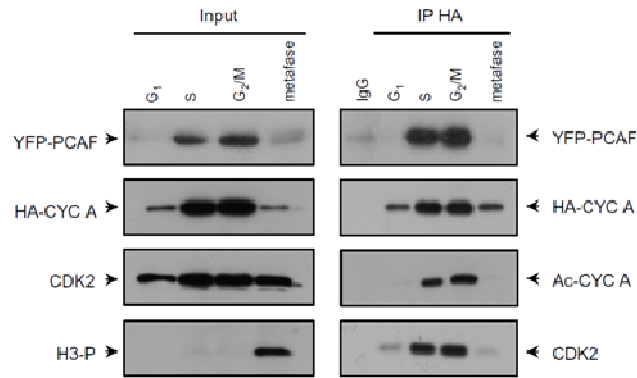


Figura 3 | **Ciclina A i P/CAF interaccionen a les fases S i G<sub>2</sub>/M del cycle cel·lular.** Cèl·lules HeLa transfectedes amb HA-ciclina A i YFP-PCAF van ser sincronitzades amb timidina i nocodazol. Es van recollir mostres de diferents fases del cycle cel·lular i els nivells de determinades proteïnes es van analitzar per WB (panel esquerre). Els extractes cel·lulars es van sotmetre a IP amb anticossos anti-HA o IgG com control, i l'anàlisi per WB de les proteïnes precipitades es pot observar al panell dret.

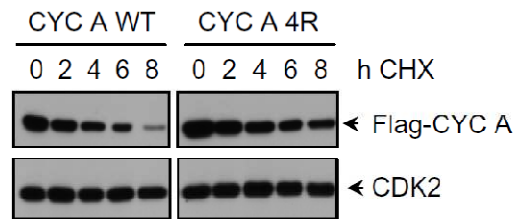


Figura 4 | **Vida mitja de la ciclina A WT versus 4R.** Cèl·lules HeLa van ser transfectedes amb ciclina A WT o 4R i 24h post transfecció van ser tractades amb cicloheximida (CHX) durant el temps indicats. Els extractes van ser analitzats per WB amb anticossos anti-Flag i anti-CDK2.

La comprovació de que l'acetilació era important per a la degradació de la ciclina A va ser demostrada quan vam estudiar la vida mitja de la ciclina A en cèl·lules que havien estat tractades amb inhibidors de les deacetilases. Tal com es pot veure a la figura 5, la vida



mitja de la ciclina A en cèl·lules tractades amb els inhibidors és molt menor que no pas les no tractades.

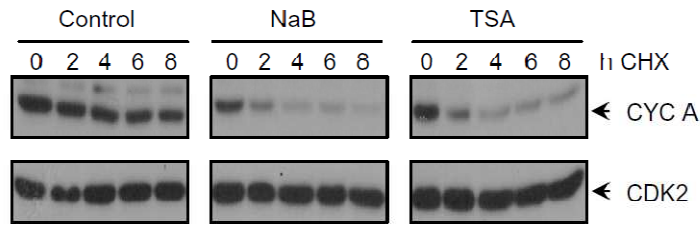


Figura 5 | **Vida mitja de la ciclina A en presència d'inhibidors de deacetilases.** Cèl·lules HCT-116 van ser tractades amb els inhibidors NaB i TSA o amb DMSO (vehicle de la solució de TSA) com a control. Després de 16h de tractament, els extractes cel·lulars es van analitzar per WB utilitzant anticossos contra la ciclina A i la CDK2, utilitzada com control de càrrega.

Tots aquests resultats mostraven que l'acetilació potser podria conduir a la degradació de la proteïna. La ciclina A es degrada via proteasoma, llavors ens vam plantejar estudiar si la ubiquitinització i l'acetilació de la ciclina A es produïen alhora. La ciclina A s'expressa a la fase S i es degrada a la prometafase mitòtica. Per tant, vam transfectar cèl·lules HeLa i les vam sincronitzar a la fase S amb un doble bloqueig de timidina, les vam alliberar afegint medi fresc fins que arribessin a la mitosi i alhora vam afegir un inhibidor del proteasoma (ALLN), pel tal de poder veure formes poliubiquitinitzades de la ciclina A. Els extractes cel·lulars dels diferents punts van ser sotmesos a IP amb anti-Flag i posteriorment van ser analitzats per WB. Com es pot veure a la figura 6, l'acetilació i la ubiquitinització de la ciclina A es donen alhora.

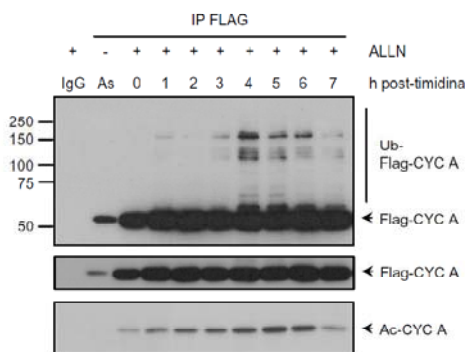


Figura 6 | **L'acetilació i ubiquitinització es donen simultàniament.** La figura mostra l'anàlisi per WB de les mostres amb anticossos anti-Flag (panell superior) i anti acetil-lisina (panell inferior). Una exposició curta del WB anti-Flag es mostra al panell del mig com control de càrrega. Al segon carril es mostra un control de cèl·lules asincròniques no tractades amb ALLN per comprovar que la droga funciona.

Finalment, amb tots els experiments que teníem volíem demostrar si l'acetilació era un senyal que portés a la proteïna a degradar-se i per això vam fer assajos d'ubiquitinització *in vivo*. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb la FL-ciclina A WT, FL-ciclina A 4R i un mutant FL-ciclina A 4Q (considerat pseudoacetilat) juntament amb HA-ubiquitina. Més tard, les cèl·lules van ser tractades amb l'inhibidor del proteasoma ALLN. La figura 7 mostra que la ciclina A WT es pot ubiquitinitzar, mentre que la ciclina A 4R presenta un grau molt menor d'ubiquitinització.

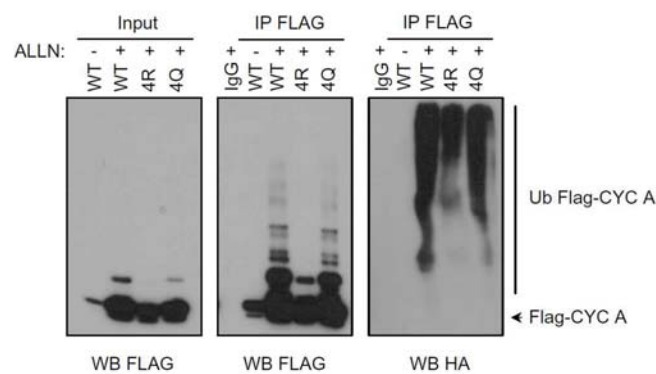


Figura 7 | **Ubiquitinització *in vivo* de ciclina A WT, 4R i 4Q.** Les cèl·lules HeLa van ser transfectades amb HA-ubiquitina i FL-ciclina A WT, FL-ciclina 4R o FL-ciclina A 4Q. Més tard van ser tractades amb ALLN durant 16h. Llavors, les cèl·lules van ser lisades i sotmeses a immunoprecipitació (IP) amb anti-Flag o IgG com control. Les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag (panell del mig) i anti-HA (panell dret). Al panell de l'esquerre hi ha 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.

## INTERACCIÓ DE LA CICLINA A AMB HISTONA DEACETILASES (HDACs)

L'acetilació de les proteïnes és un procés dinàmic, que *in vivo* està controlat per les acetilases i les deacetilases. Per aquesta raó, mitjançant assajos de *pull down* es va determinar la possible interacció entre la ciclina A, la CDK2 i la p27 amb alguna deacetilasa. Tal com es pot veure a la figura 8, la HDAC1 interacciona amb la CDK2, la ciclina A i la p27, mentre que la HDAC2 només interacciona amb la CDK2.

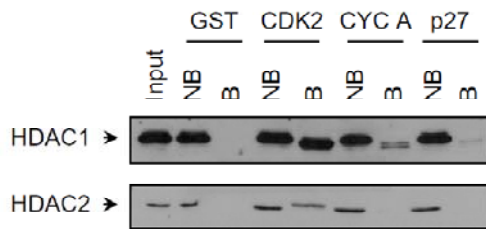


Figura 8 | **Interacció de diferents proteïnes de cicle cel·lular amb la HDAC1 i la HDAC2.** Experiment de *pull down* fet amb proteïnes purificades (CDK2, ciclina A i p27) acoblades a boles de CNBr-sefarosa. Van ser incubades amb extracte de cèl·lules HCT-116. Després van ser resoltes en un gel SDS-acrilamida. Imatge cedida per la Dra. Francesca Mateo.

**OBJECTIUS**

*Objectius*

## **OBJECTIU GENERAL**

Com a objectiu general del projecte ens vam proposar determinar quina era la histona deacetilasa responsable de la deacetilació de la ciclina A, i per tant, responsable de la regulació de la seva estabilitat.

## **OBJECTIUS CONCRETS**

1. Estudiar la interacció entre la ciclina A i els membres de les HDACs clàssiques.
2. Estudiar el paper de la HDAC1 durant el cicle cel·lular.
3. Determinar el paper de la HDAC3 sobre l'estabilitat de la ciclina A.
4. Estudiar la regulació de la HDAC3 durant la mitosi.

*Objectius*

## **RESULTATS**



L'experiència més maca que podem tenir és la del misteri. És l'emoció fonamental que es troba al fons del veritable art i la veritable ciència. Qui no ho sàpiga i ja no es pugui fer preguntes, no podrà meravellar-se; és com si estigués mort i els seus ulls, tancats.

*Albert Einstein*

## 1. SCREENING DE LA INTERACCIÓ DE LES HDACs AMB LA CICLINA A

En primer lloc, vam realitzar experiments d'immunoprecipitació de la ciclina A en extractes de diferents tipus cel·lulars. Tot seguit es va fer l'estudi de la coimmunoprecipitació amb els diferents membres de la família de les HDACs. Primer de tot, es van comprovar els anticossos en diferents línies cel·lulars. No funcionaven igual de bé, per això les IPs estan fetes on els anticossos han funcionat millor. Només vam disposar dels plàsmids de la FL-HDAC1, FL-HDAC2 i FL-HDAC3; en els altres casos, vam treballar amb la proteïna endògena.

Tal com es pot observar a la figura 1, es va immunoprecipitar la ciclina A i es va veure la coimmunoprecipitació amb la HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC4 mentre que no coimmunoprecipitava amb la HDAC8, HDAC9, HDAC11 i Sirt 1 (WB no es troba a la figura). No vam analitzar la interacció amb la resta de les deacetilases perquè els anticossos no acabaven de funcionar. En el cas (a) també vam observar la cointeracció amb CDK2 i això és normal ja que la ciclina A i la CDK2 formen un complex.

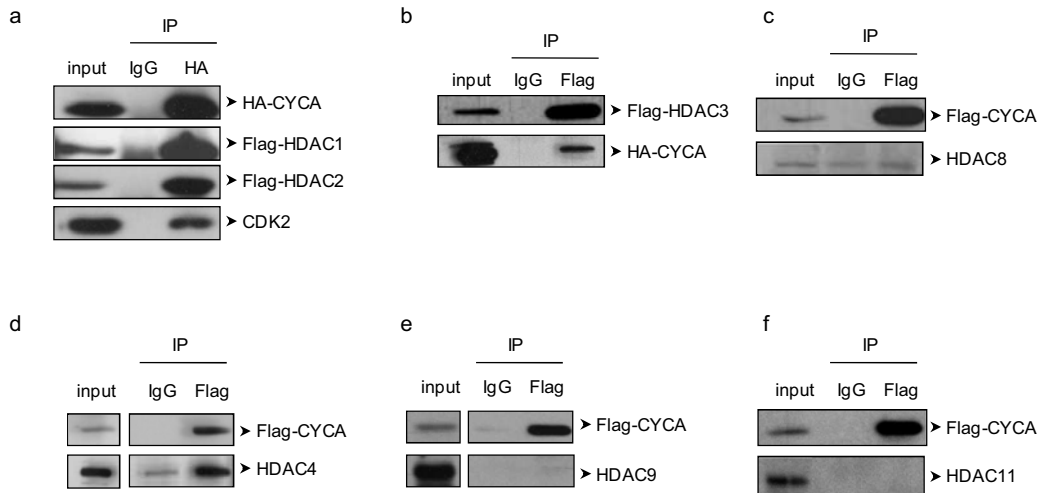


Figura 1 | **Interacció de la ciclina A ectòpica amb diferents membres de la família de les HDACs.** (a) Cèl·lules HEK-293T van ser transfectades amb HA-ciclina A i FL-HDAC1 o FL-HDAC2. Els extractes cel·lulars van ser sotmesos a IP amb anti-HA o IgG utilitzat com control i les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-HA i anti-Flag. (b) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb Flag-HDAC3 i HA-ciclina A. Les mostres van ser immunoprecipitades amb anti-Flag o IgG com a control negatiu i les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-HA i anti-Flag. (c) NIH3T3 van ser transfectades amb Flag-ciclina A. Posteriorment, es va realitzar la immunoprecipitació amb anti-Flag i les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag i anti HDAC8. (d) En aquest cas, cèl·lules Hek-293T van ser tractades de la mateixa manera que en (c), però l'anàlisi va ser amb anticossos contra HDAC4. (e) Cèl·lules HeLa tractades de la mateixa manera que en (c). Les mostres van ser analitzades amb anticossos contra HDAC9. (f) Cèl·lules HeLa tractades de la mateixa manera que en (c). Les mostres van ser analitzades amb anticossos contra HDAC11.

---

## 2. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE LA CICLINA A I ELS MEMBRES DE LA CLASSE I DE LA FAMÍLIA DE LES HDACs CLÀSSIQUES

Tal com hem explicat en l'apartat dels antecedents, per experiments de *pull down* es va observar que la ciclina A interaccionava amb la HDAC1. Aquesta primera aproximació i el fet que tres dels quatre membres de la classe I de la família de les HDACs també interaccionin amb la ciclina A ens va fer aprofundir en la relació d'aquestes proteïnes.

Primer de tot, vam estudiar la localització subcel·lular de la HDAC1, HDAC2 i HDAC3. Per tal motiu, vam realitzar una immunocitoquímica utilitzant cèl·lules HeLa, fixades i incubades amb anticossos contra ciclina A, HDAC1, 2 i 3. Tal com es pot observar a la figura 2, la ciclina A colocalitza amb la HDAC1, HDAC2 i HDAC3, bàsicament al nucli.

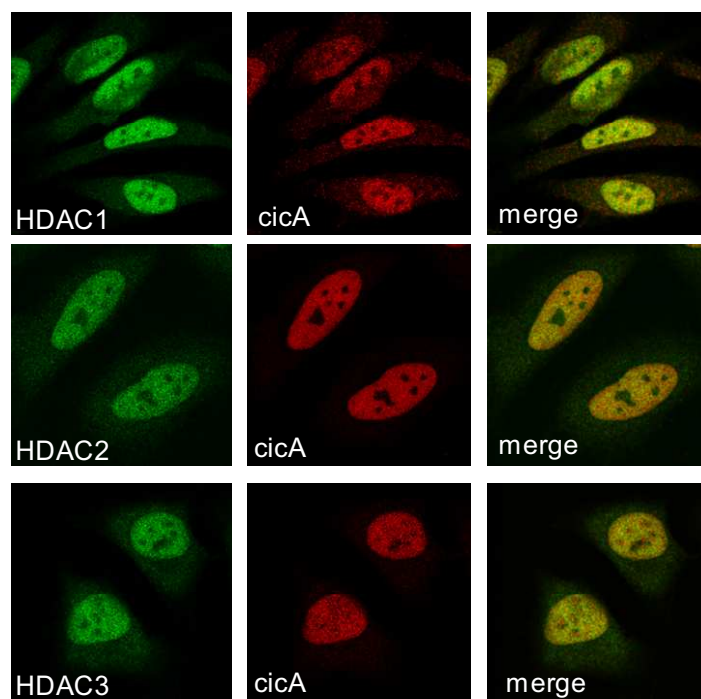


Figura 2 | **Ciclina A colocalitza amb la HDAC1, HDAC2 i HDAC3.** Cèl·lules HeLa van ser fixades (veure “Materials i mètodes”), incubades amb anticossos contra ciclina A, HDAC1, HDAC2 i HDAC3 i observades al microscopi de fluorescència.

Per experiments de coimmunoprecipitació sabem que les proteïnes interaccionaven, però, per saber si aquesta interacció era directa o no, vam fer columnes de ciclina A purificada unida a boles de CNBr-sefarosa. Aquestes boles van ser incubades amb proteïna purificada de HDAC1 (51-482aa), HDAC2 i HDAC3. En aquest experiment s’han utilitzat les proteïnes senceres, excepte en el cas de HDAC1, de la qual disposàvem del fragment que comprenia els aminoàcids 51-482. La figura 3 (a) ens mostra que la HDAC1 (51-482aa) i la HDAC3 interaccionen de forma directa amb la ciclina A; mentre que la HDAC2, no.

El següent pas va ser intentar trobar la zona d'interacció de la ciclina A amb les HDACs. Estudis previs delimiten la regió dels primers 171 aminoàcids (aa) de la ciclina A com la zona on estan compresos els dominis implicats en la seva acetilació i degradació (den Elzen & Pines 2001; Geley et al. 2001; Mateo et al. 2009(b)). Per això vam obtenir proteïnes purificades d'aquestes dues regions; ciclina A 1-171 i ciclina A 171-432. Les vam acoblar a boles CNBr-sefarosa i vam realitzar experiments de *pull down*, incubant-les amb HDAC1 (51-482) i HDAC3 purificades. Tal com veiem a la figura 3(b), la interacció de la ciclina A amb la HDAC1 es perd, deduïnt que els aminoàcids que es troben al voltant de l'aminoàcid 171 són importants per a la interacció. Per altra banda, veiem que la ciclina A interacciona amb la HDAC3 a través de la regió 1-171. Resultat que ens animava força ja que aquesta regió era important per a la seva acetilació i degradació i això volia dir que possiblement la HDAC3 tindria un paper rellevant en l'estabilitat de la ciclina A.

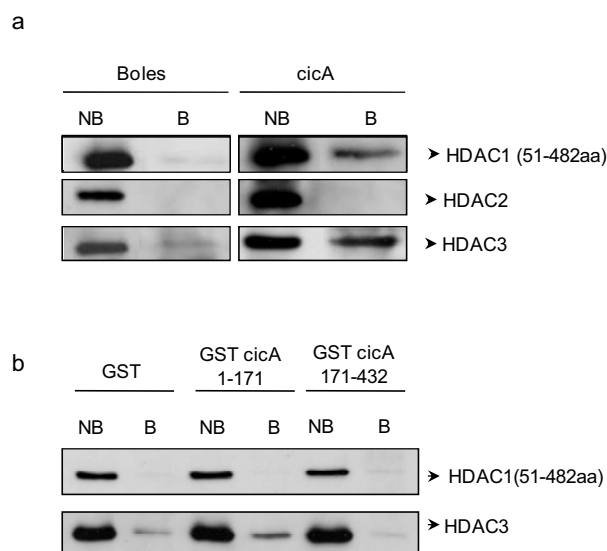


Figura 3 | **La ciclina A interacciona de forma directa amb la HDAC1 (51-482) i amb la HDAC3.** (a) Es va obtenir ciclina A purificada i es va acoblar a boles de CNBr-sefarosa. Es van incubar les boles amb HDAC1 (51-482), HDAC2 i HDAC3 purificades, els eluïts van ser resolts en un gel SDS-acrilamida i van ser analitzats per WB amb anti-HDAC1, 2 i 3. (b) En aquest cas, es van obtenir els dos fragments purificats de la ciclina A 1-171 i 171-432, van ser acoblats a boles de CNBr-sefarosa i es van realitzar experiments de *pull down*. Les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti HDAC1 i 3.

### 3. HDAC3 ALTERA ELS NIVELLS DE LA CICLINA A

Per determinar quina de les tres deacetilases era la responsable de la deacetilació de la ciclina A, vam fer experiments de depleció de les proteïnes en qüestió. Per això, vam transfectar cèl·lules HeLa amb shRNA dirigits contra la HDAC1, HDAC2 i HDAC3. En les cèl·lules transfectades amb el shRNA dirigit contra HDAC1 no vam observar alteració de la ciclina A respecte el control. En les cèl·lules transfectades amb el shRNA HDAC2 tampoc vam observar alteració de la ciclina A (figura 4a). Mentre que, quan disminuïem els nivells de la HDAC3 vam observar una disminució en els nivells de la ciclina A (figura 4b). Això ens indicava que HDAC3 podria estar implicada en l'estabilitat de la ciclina A.

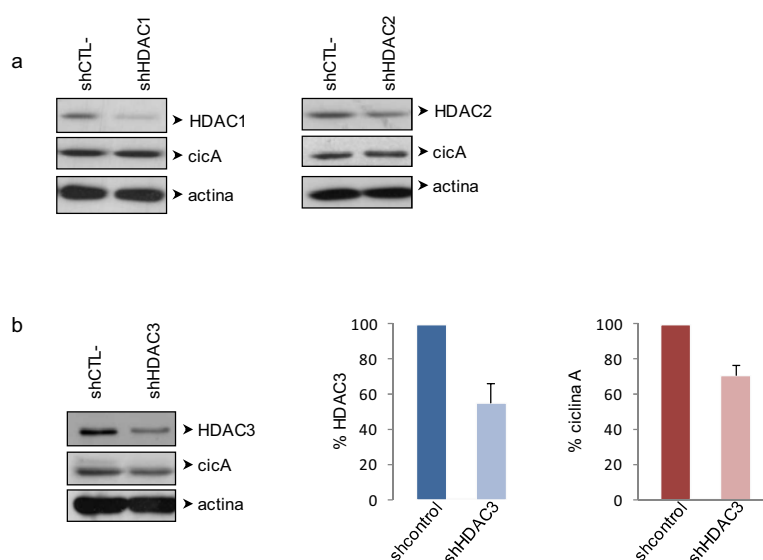


Figura 4 | **La HDAC3 altera els nivells de la ciclina A.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shRNA control o shRNA HDAC1, 2 o 3. Posteriorment les cèl·lules van ser lisades i les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti ciclina A, HDAC1, 2 i 3. L'actina es va utilitzar com control de càrrega. A l'apartat (a) observem que la disminució de la HDAC1 i HDAC2 no provoca canvis en els nivells de la ciclina A, mentre que a l'apartat (b) observem la disminució dels nivells de la ciclina A a causa de la depleció de la HDAC3. La primera gràfica representa les dades de la disminució de la HDAC3  $\pm$ SE corresponents a 3 experiments independents i la gràfica de la dreta representa les dades de la disminució de la ciclina A  $\pm$ SE corresponents a 3 experiments independents.

## 4. HDAC1 I EL CICLE CEL·LULAR

Els experiments de interacció ens han demostrat que la ciclina A i la HDAC1 interaccionen *in vivo* i de forma directa, però que no afecten els nivells de la ciclina A quan deplecionem els nivells de la HDAC1 (figures 1, 2, 3 i 4). Tot i això, vam decidir aprofundir una mica més en la relació entre aquestes dues proteïnes.

### 1.1 INTERACCIÓ AL LLARG DEL CICLE CEL·LULAR ENTRE LA CICLINA A I LA HDAC1

Primer de tot, vam voler determinar en quin moment del cicle cel·lular interaccionaven la ciclina A i la HDAC1. Per això vam transfectar la HA-ciclina A i la FL-HDAC1 a cèl·lules HeLa sincronitzades a diferents fases del cicle cel·lular. En aquest experiment, la obtenció de les cèl·lules a les diferents fases va ser una mica diferent respecte altres experiments. Per tal d'obtenir extractes cel·lulars de la fase M, les cèl·lules van ser tractades amb nocodazol durant 16h i recollides en aquell moment. Per a obtenir cèl·lules a la fase G<sub>1</sub>, les cèl·lules van ser tractades també amb nocodazol, després van ser rentades i posades amb medi fresc a l'incubador durant 3h, moment en què van ser recollides. Finalment, la obtenció de cèl·lules a la fase G<sub>1</sub>/S, va ser de la mateixa manera que per a obtenir les cèl·lules de la fase G<sub>1</sub>, però en lloc de deixar-les 3h, es van deixar 9h. La fase S del cicle va ser obtinguda amb un doble bloqueig de timidina i les cèl·lules de la fase G<sub>2</sub>/M van ser obtingudes sincronitzant amb un doble bloqueig de timidina, rentades i posades a l'incubador amb medi fresc durant 4h, moment en el qual van ser recollides. A l'esquerra de la figura 5, es mostren els nivells de les dues proteïnes durant el cicle. Tal com hem vist, la ciclina A comença a expressar-se a la fase S i es degrada a l'inici de la mitosi. Pel que fa a la HDAC1, sembla que els seus nivells no es veuen alterats durant el cicle cel·lular. La interacció entre la ciclina i la HDAC1 es produeix a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular, tal com es veu a la dreta de la imatge.

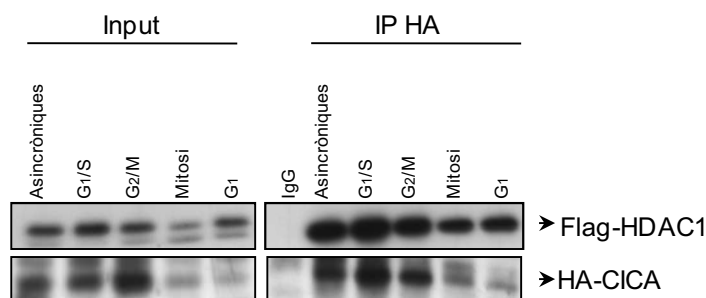


Figura 5 | **La HDAC1 i la ciclina A interaccionen sobretot a la fase G<sub>1</sub> del cicle.** Cèl·lules HeLa van ser sincronitzades a les diferents fases del cicle cel·lular i cotransfectades amb HA-ciclina A i FL-HDAC1. Les mostres van ser sotmeses a immunoprecipitació (IP) amb anti-HA i més tard analitzades per WB amb anti-HA i anti-Flag.

## 1.2 ACTIVITAT DEACETILASA DE LA HDAC1

El següent pas va ser estudiar la seva activitat, majoritàriament, a la fase G<sub>1</sub>/S i també a la G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC1 i sincronitzades amb un doble bloqueig de timidina per a obtenir mostres d'aquestes dues fases. Cèl·lules sincronitzades a la fase G<sub>1</sub>/S s'obtenien agafant-les just després del doble bloqueig de timidina i cèl·lules sincronitzades a la fase G<sub>2</sub>/M s'obtenien bloquejant-les amb un doble bloqueig de timidina (veure materials i mètodes), rentant-les un parell de vegades i deixant-les a l'incubador amb medi fresc durant quatre hores, moment en el qual es recollien. Aquestes mostres van ser sotmeses a IP utilitzant un anti-Flag o IgG com control negatiu. Les boles a les quals s'havia unit la FL-HDAC1 van ser incubades amb lisats de cèl·lules HeLa que havien estat tractades durant 16h amb 3µM de TSA. Aquest tractament amb TSA proporciona una font d'histones acetilades, majoritàriament H<sub>4</sub> acetilada. Després de l'assaig de deacetilació *in vitro*, les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-acetil lisina. Tal com es pot observar a la figura 6, la HDAC1 presenta màxima activitat a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular.



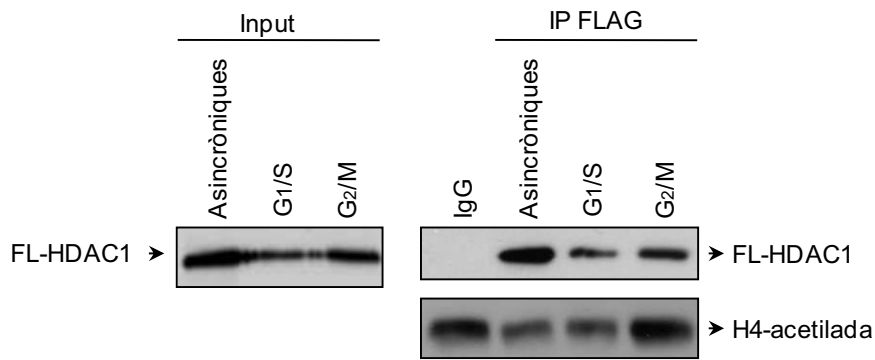


Figura 6 | **HDAC1 és més activa a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC1 i sincronitzades per tal d'obtenir mostres de les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M. Aquestes mostres van ser lisades i sotmeses a IP utilitzant anti-Flag o IgG com a control. Posteriorment, van ser incubades amb un lisat de cèl·lules HeLa tractades amb TSA durant 16h. Un cop fet l'assaig de deacetilació *in vitro*, les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag i anti-acetil lisina.

### 1.3 EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DE LA HDAC1 SOBRE ALTRES PROTEÏNES DEL CICLE CEL·LULAR.

El fet que la HDAC1 presentés màxima activitat deacetilasa a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular ens va animar a estudiar l'efecte de la disminució de la HDAC1 sobre el cicle cel·lular. Per això, vam obtenir *knockdown* estables de la HDAC1. Vam transfectar cèl·lules HeLa amb shHDAC1 o shcontrol. Les vam seleccionar amb puromicina i al cap d'uns 20 dies, els *knockdown* obtinguts van ser comprovats per WB (esquerra de la figura 7). Està descrit que la manca de HDAC1 provoca un bloqueig a la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular (Senese, 2007). Per aquest motiu, el que vam fer va ser sincronitzar els nostres *knockdown* de HDAC1 i els control amb un doble bloqueig de timidina per aturar-les a G<sub>1</sub>/S, i llavors observar com progressaven al llarg del cicle cel·lular. Tal com veieu a la figura 7, els *knockdown* de la HDAC1 els hi costa sortir de la fase G<sub>1</sub>.

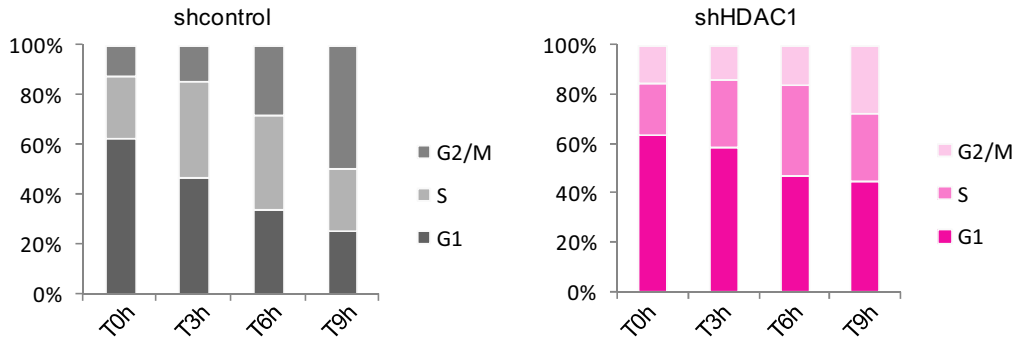
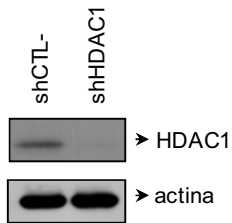


Figura 7 | **El knockdown de la HDAC1 provoca una aturada a la fase G1 del cycle cel·lular.** Els *knockdown* estables de la HDAC1 o control van ser sincronitzats amb un doble bloqueig de timidina. Les cèl·lules van ser rentades i posades a l'incubador amb medir fresc. Posteriorment, les mostres van ser recollides a les hores que mostra la gràfica, fixades (veure materials i mètodes) i preparades per ser analitzades per FACs. Una part de la mostra va ser analitzada per WB per comprovar l'eficiència del shRNA HDAC1, tal com es pot veure a l'esquerra de la figura. L'actina va ser utilitzada com control de càrrega.



Un cop vist l'efecte sobre el cycle cel·lular, vam estudiar si la manca de la HDAC1 provocava algun efecte sobre alguna altra proteïna de totes les que estàvem estudiant. En els *knockdown* estables de la HDAC1 i control vam determinar els nivells de les proteïnes que es poden veure a la figura 8. Observem que els nivells de la HDAC2 incrementen. Pel que fa a la resta de proteïnes sembla que la disminució de la HDAC1 no altera els seus nivells.

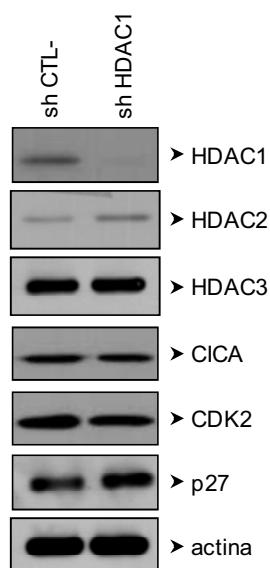


Figura 8 | Nivells de diferents proteïnes a cèl·lules *knockdown* estables de HDAC1 i control. Mostres de cèl·lules HDAC1<sup>-</sup> versus control van ser analitzades per WB amb anticossos contra les diferents proteïnes.

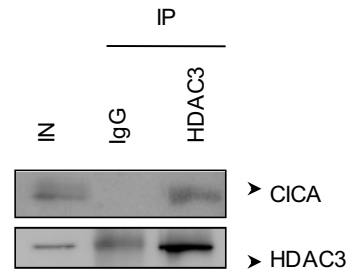
## 5. ANÀLISI FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓ DE LA HDAC3 AMB LA CICLINA A

### 5.1 INTERACCIÓ DE LA CICLINA A I HDAC3 ENDÒGENES

El nostre objectiu a partir d'aquest moment va ser intentar analitzar si la HDAC3 deacetilava la ciclina A o no.

En primer lloc, vam estudiar la interacció de les proteïnes endògenes. Per tant, vam fer immunoprecipitacions de lisats de cèl·lules HeLa utilitzant un anticòs contra la HDAC3. Després vam detectar la cointeracció amb anticòs anti-ciclina A. Tal com es pot apreciar a la figura 9, la HDAC3 i la ciclina A endògenes interaccionen.

Figura 9 | **HDAC3 i ciclina A interaccionen.** Lisats de cèl·lules HeLa van ser immunoprecipitats (IPs) amb anticossos contra HDAC3 o IgG utilitzat com control. Les mostres van ser analitzades per WB utilitzant anti-HDAC3 i anti-ciclina A.



## 5.2 LA HDAC3 DEACETILA LA CICLINA A

Un cop establert que la HDAC3 interaccionava amb la ciclina A i que disminuint la HDAC3, es produïa una reducció de la quantitat de la ciclina A, vam voler analitzar si la HDAC3 deacetilava la ciclina A.

Per abordar aquesta qüestió, vam transfectar cèl·lules HeLa amb FL-HDAC3 per veure si aquest fet afectava els nivells d'acetilació de la ciclina A. Cal destacar que per observar l'acetilació de la ciclina A hem hagut de contranfectar la YFP-P/CAF amb la HA-ciclina A. Al panell de l'esquerra de la figura 10 s'indiquen els nivells d'expressió de les proteïnes ectòpiques. A la dreta de la imatge s'observa que el nivell d'acetilació de la ciclina A es troba disminuït quan se sobreexpressa la HDAC3.

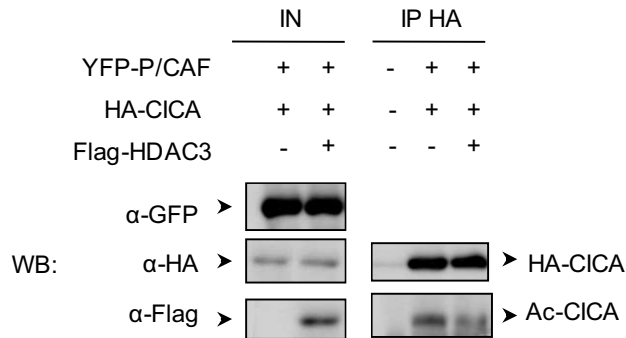


Figura 10 | **FL-HDAC3 deacetila la ciclina A.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb els plàsmids corresponents i els lisats van ser sotmesos a immunoprecipitació (IP) utilitzant un anti-HA. Les mostres van ser analitzades per WB utilitzant anti-GFP, anti-HA, anti-Flag i anti-acetil lisina.

Una segona aproximació per acabar de comprovar el paper de la HDAC3 era disminuir els nivells de la HDAC3 i determinar l'acetilació de la ciclina A. En aquest cas, cèl·lules HeLa van ser cotransfectades amb el shRNA HDAC3 o control i amb HA-ciclina A. Els resultats indiquen que la reducció de la HDAC3 incrementa l'acetilació de la ciclina A, indicant que la HDAC3 regula negativament l'acetilació de la ciclina A *in vivo* (figura 11).

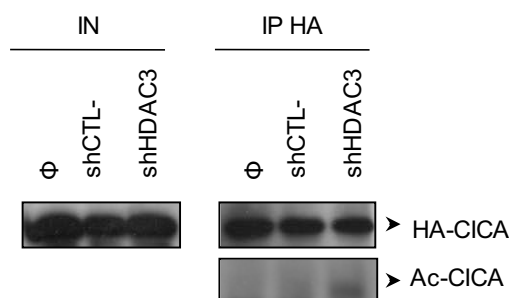


Figura 11 | **La depleció de la HDAC3 incrementa els nivells de l'acetilació de la ciclina A.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shRNA HDAC3 o shRNA control i HA-ciclina A. 60h post transfecció les cèl·lules van ser tractades amb tampó de lisi. Els lisats van ser sotmesos a immunoprecipitació amb anti-HA i les mostres van ser analitzades per WB amb anti-HA, anti-HDAC3 i anti-acetil lisina.

Finalment, vam examinar la deacetilació directa de la ciclina A *in vitro* per la HDAC3. Així doncs, la FL-HDAC3 va ser expressada en cèl·lules HeLa i després immunoprecipitada amb anticòs anti-Flag conjugat amb boles d'agarosa. Les mostres corresponents al control negatiu utilitzant IgG i la immunoprecipitada amb anti-Flag van ser incubades amb HA-ciclina A acetilada, la qual va ser expressada i immunoprecipitada de cèl·lules HeLa utilitzant anti-HA i posteriorment incubades amb boles d'agarosa de proteïna A. Per tal d'obtenir mostra de ciclina A acetilada, les cèl·lules van ser transfectades amb HA-ciclina A i tractades durant 16h amb 3µM de TSA, un inhibidor

general de deacetilases. Tal com podem observar a la figura 12, la HDAC3 deacetila la ciclina A *in vitro*.

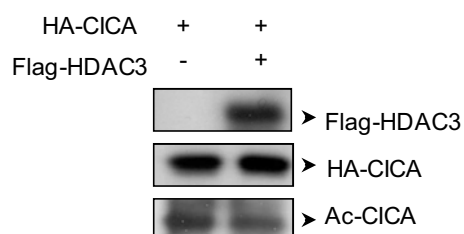


Figura 12 | **Deacetilació *in vitro* de la HA-ciclina A per la FL-HDAC3.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3. Els lisats van ser sotmesos a immunoprecipitació amb anti-Flag o IgG utilitzat com control. Aquestes mostres immunoprecipitades van ser incubades amb HA-ciclina A, que prèviament havia estat transfectada a cèl·lules HeLa tractades amb 3 $\mu$ M TSA durant 16h. Un cop fet l'assaig de deacetilació (veure materials i mètodes), les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag, anti-HA i anti-acetil lisina.

## 5.3 EFECTE DE LA HDAC3 SOBRE L'ESTABILITAT DE LA CICLINA A

### 5.3.1 La HDAC3 regula la vida mitja de la ciclina A

Recentment, s'ha descrit que la vida mitja de la ciclina A acetilada es molt més curta que la ciclina A no acetilada (Mateo et al. 2009(b)). Per tant, el que vam fer va ser estudiar la vida mitja de la ciclina A quan disminuïem els nivells de la HDAC3 en comparació a quan no alteràvem els nivells de la HDAC3. En aquest cas, esperàvem que la vida mitja de la ciclina A també fos més curta perquè els nostres experiments demostraven que la disminució de la HDAC3 incrementava l'acetilació de la ciclina A. Per aquest motiu, vam transfectar cèl·lules HeLa, que havien estat sincronitzades a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular amb un doble bloqueig de timidina, amb shRNA control o shRNA HDAC3.

Posteriorment, les cèl·lules van ser tractades amb cicloheximida durant els temps indicats a la figura 13. Les cèl·lules van ser sincronitzades a la fase G<sub>1</sub>/S i alliberades perquè es pogués observar amb major claredat l'efecte de la disminució de la HDAC3 en un fase on no hauria d'haver disminuït. El resultat indica que la vida mitja de la ciclina A en condicions de baixos nivells de la HDAC3 és molt més curta (figura 13).

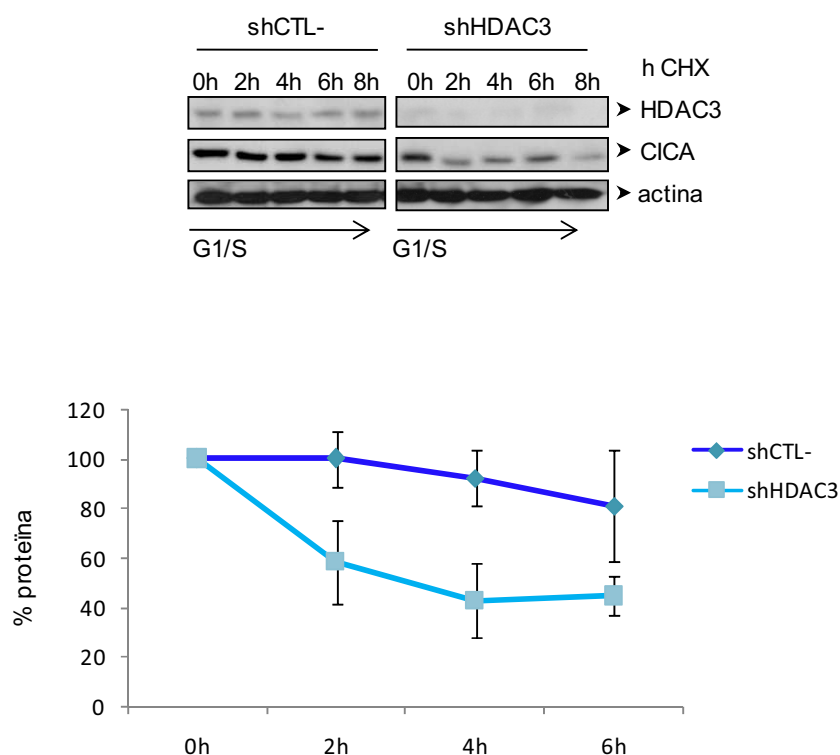


Figura 13 | **La disminució de la HDAC3 fa que la vida mitja de la ciclina A sigui més curta.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shRNA HDAC3 o shRNA control. Posteriorment, van ser sincronitzades a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular amb un doble bloqueig de timidina i alliberades amb medi fresc. Alhora van ser tractades durant els temps indicats amb cicloheximida. Les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-ciclina A i anti-HDAC3. L'actina va ser utilitzada com control de càrrega. Al panel inferior trobem una gràfica amb la quantificació de la disminució de la ciclina A  $\pm$ SE de 3 experiments independents.

### **5.3.2 La disminució de la HDAC3 no és capaç d'induir la reducció dels nivells d'un mutant de la ciclina A no acetilable**

Recordem que l'acetilació de la ciclina A era un senyal perquè la ciclina A es degradés, per això, el nostre següent pas va ser estudiar la repercussió que podria tenir la manca de la HDAC3 sobre un mutant no acetilable de la ciclina A, la ciclina A 4R (descriu a (Mateo et al. 2009(b)), les quatre lisines que són susceptibles d'acetilar-se han estat mutades a arginines, és un mutant considerat no acetilable) i que per tant, no es degradés. A més, vam construir un mutant que no tingués cap regió implicada en la degradació de la ciclina A, ciclina A 171-432.

El que vam fer va ser transfectar cèl·lules HeLa amb shRNA HDAC3 o shRNA control conjuntament amb FL-ciclina A WT, FL-ciclina A 4R o FL-ciclina A 171-432. La figura 14 ens mostra que mentre que la ciclina A WT es degrada quan disminuïm els nivells de la HDAC3, tal com hem vist en experiments anteriors, els mutants ciclina A 4R i ciclina A 171-432 són inclús més estables que la WT. Hi ha dues possibles explicacions per aquest resultat. La primera seria que tal com està descrit al treball de (Mateo et al. 2009(b)), el mutant 4R, considerat no degradable, provoca una aturada a la fase G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular, i per aquest motiu no es podria eliminar. O bé, podria ser que en aquest experiment, hem eliminat la HDAC3, però la P/CAF, l'acetilasa principal responsable de l'acetilació de la ciclina A, es troba intacta. Per tant, en el cas de la ciclina A WT, aquesta es degrada perquè la P/CAF l'acetila, senyal previ per a la seva futura degradació. Però en el cas de la ciclina A 4R, en què les lisines han estat mutades a arginines, o inclús en el mutant que no inclou regions importants per a la degradació, la P/CAF no podria actuar i per tant esperaríem que les proteïnes no es poguessin acetilar i que a causa d'això, no es degradessin.



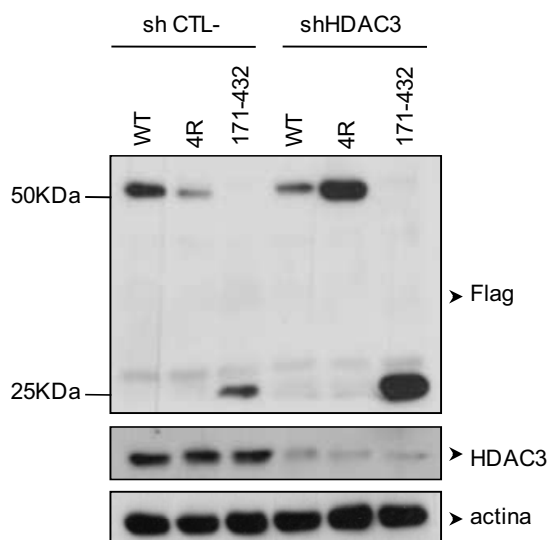


Figura 14 | **HDAC3 no afecta el mutant FL-ciclina A 4R ni el mutant FL-ciclina A 171-432.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shRNA HDAC3 o control. Posteriorment, van ser transfectades amb FL-ciclina A WT, 4R o 171-432. Les mostres van ser lisades i analitzades per WB contra HDAC3 i Flag.

La degradació de la ciclina A té lloc durant la mitosi, per això vam analitzar el que succeïa amb les ciclines A mutants durant aquesta fase del cicle cel·lular. Així doncs, vam comparar els nivells de la ciclina A a cèl·lules asincròniques *versus* els nivells de la ciclina A a cèl·lules sincronitzades a mitosi. Vam transfectar HeLa asincròniques i HeLa sincronitzades a metafase amb nocodazol amb FL-ciclina A WT, FL-ciclina A 4R o FL-ciclina A 171-432. La figura 15 ens mostra que la ciclina A WT es degrada a la mitosi mentre que el mutant 4R no es degrada amb la mateixa eficiència. Pel que fa al mutant ciclina A 171-432 sembla que no està afectat.

Un possible raonament per al fet que la ciclina A 4R es degrada una mica seria que la ciclina A 4R encara es pot ubiquitinitzar, encara que de forma menys eficient. Hem demostrat que l'acetilació de quatre residus de lisina (54, 68, 95 i 112) és important per a la degradació de la proteïna. A més, vam observar que el mutant ciclina A 4R es podia ubiquitinitzar, mitjançant assajos d'ubiquitinització *in vivo* (Mateo et al. 2009(b)). En concordància amb aquests resultats, hi ha un treball de (Fung et al. 2005) en què descriuen les lisines 37, 54 i 68 com a llocs d'ubiquitinització. El nostre mutant ciclina A

4R no té alterada la lisina 37, per tant, es pot ubiquitinitzar parcialment. Això explicaria el fet que a la mitosi el mutant 4R es degradés però de forma menys eficient.

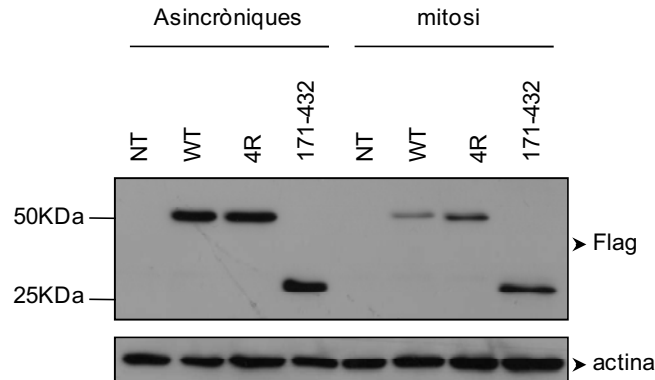


Figura 15 | FL-Ciclina A WT es degrada a la mitosi i la FL-ciclina A 4R ho fa de forma menys eficient. Cèl·lules HeLa asincròniques i sincronitzades amb nocodazol durant 16h, van ser transfectades amb els plàsmids corresponents. Les mostres van ser recollides i analitzades per WB amb anti-Flag. L'actina va ser utilitzada com control de càrrega.

## 5.4 ACTIVITAT DE LA HDAC3 DURANT EL CICLE CEL·LULAR

### 5.4.1 Interacció entre la HDAC3 i la ciclina A a les diferents fases del cicle cel·lular

El següent pas va ser estudiar la interacció entre la HDAC3 i la ciclina A al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular. Vam transfectar cèl·lules HeLa amb FL-HDAC3 i HA-ciclina A i les vam sincronitzar utilitzant timidina i nocodazol. Per obtenir cèl·lules a la fase G<sub>1</sub>/S vam sincronitzar-les amb un doble bloqueig de timidina. Cèl·lules a la fase G<sub>2</sub>/M es van obtenir sincronitzant-les amb un doble bloqueig de timidina, es van rentar i després es van deixar que progressessin al llarg del cicle cel·lular durant 4h amb medi fresc, al cap de les quals es van recollir mostres. La fase M s'obté tractant les cèl·lules amb nocodazol durant 16h i la fase G<sub>1</sub>, s'obté alliberant aquestes cèl·lules que han estat

tractades amb nocodazol durant 16h, després rentades i deixades en medi fresc durant 6h. Es van realitzar IPs de les diferents mostres utilitzant anti-Flag i es van analitzar per WB. A l'esquerra de la figura 16, s'indiquen els nivells de les dues proteïnes que vam estudiar. Tal com està descrit, els nivells de la HA-ciclina A són elevats a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M, mentre que a la prometafase la ciclina A es degrada. Pel que fa a la FL-HDAC3 presenta un patró similar d'expressió. La interacció entre aquestes dues proteïnes es pot observar a la dreta de la figura i ens mostra que la màxima interacció proteica es produeix a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M.

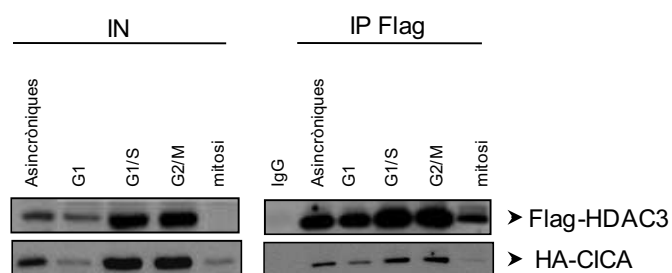


Figura 16 | HA-ciclina A i FL-HDAC3 interaccionen a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular. Vam transfectar cèl·lules HeLa amb FL-HDAC3 i HA-ciclina A i sincronitzades amb timidina i nocodazol per obtenir mostres de les diferents fases del cicle cel·lular. Les mostres van ser sotmeses a immunoprecipitació (IP) utilitzant anti-Flag o IgG com control i analitzades per WB amb anticossos contra Flag i HA.

#### 5.4.2 Activitat deacetilasa *in vitro* de la HDAC3 a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular

La HDAC3 presenta nivells elevats d'expressió sobretot a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular, per aquest motiu vam voler estudiar la seva activitat en aquestes dues fases. Les cèl·lules van ser processades de la mateixa manera que a la figura 6. La figura 17 ens

mostra que la HDAC3 presenta activitat deacetilasa semblant tant a la fase G<sub>1</sub>/S com a la fase G<sub>2</sub>/M.

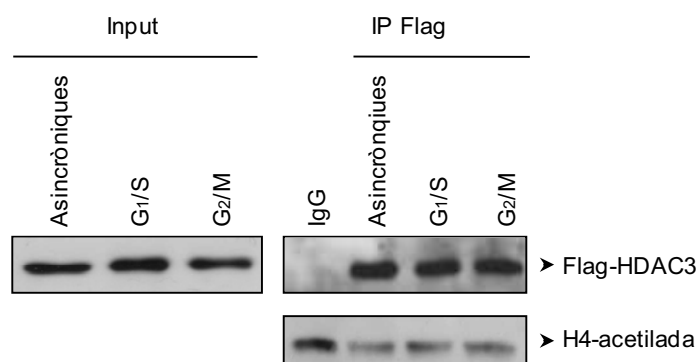


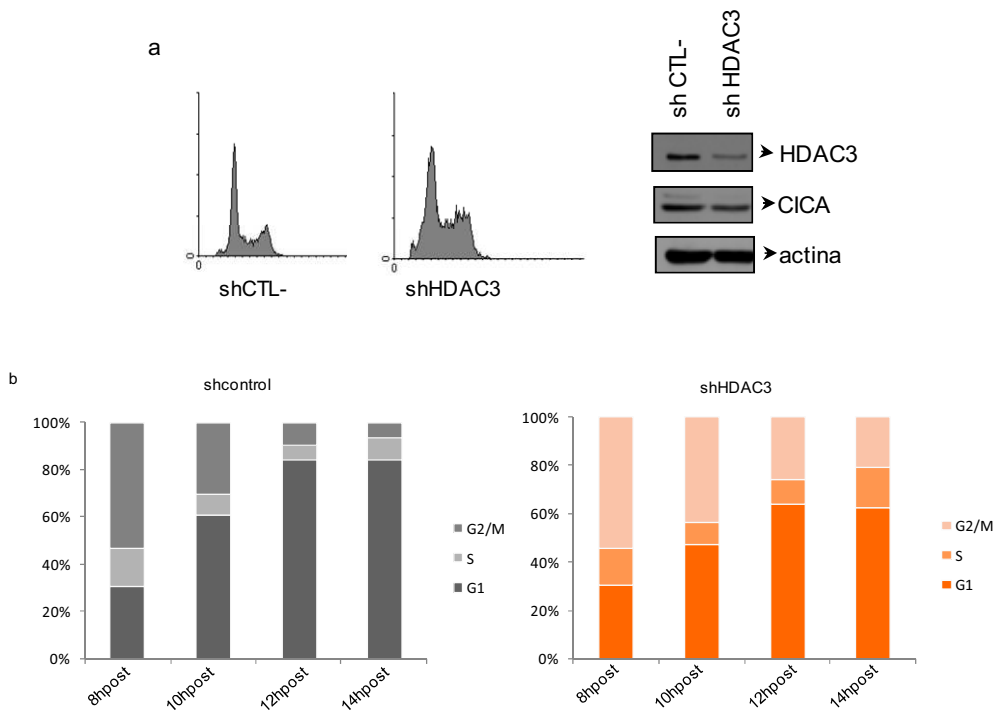
Figura 17 | **Assaig de deacetilació *in vitro* de la FL-HDAC3.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3 i sincronitzades per tal d'obtenir mostres de la fase G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular. Aquestes mostres van ser lisades i sotmeses a IP utilitzant anti-Flag o IgG com control. Posteriorment, van ser incubades amb lisat de cèl·lules HeLa tractades amb 3μM de TSA durant 16h. Un cop fet l'assaig de deacetilació (veure materials i mètodes), les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos anti-Flag i anti-acetil lisina.

### 5.4.3 Efecte del shRNA de HDAC3 sobre el cicle cel·lular

Com que la HDAC3 regula els nivells de la ciclina A vam voler analitzar l'efecte de la disminució de la HDAC3 sobre la progressió del cicle cel·lular. Així doncs, vam transfectar cèl·lules HeLa amb shRNA HDAC3 o control, les vam fixar i les vam analitzar per citometria de flux. Tal com es pot observar a la figura 18 (a), les cèl·lules transfectades amb shHDAC3 presenten una acumulació a la fase G<sub>2</sub>/M respecte a les cèl·lules transfectades amb shRNA control.

Per a comprovar que les cèl·lules que tenien nivells baixos d'HDAC3 presentaven dificultats per progressar a través de la fase G<sub>2</sub>/M, vam transfectar cèl·lules HeLa amb shHDAC3 o control alhora que les vam sincronitzar amb un doble bloqueig de timidina

per aconseguir-les tenir a la fase G<sub>1</sub>/S. Llavors es van rentar i es van posar amb medi fresc perquè progressessin al llarg del cicle cel·lular. 8h més tard, moment en el qual havien d'estar a la fase G<sub>2</sub>/M es van començar a agafar cèl·lules cada dues hores, fins a un total de 14h post alliberament de la timidina. Aleshores, es van fixar i es van analitzar per FACs. A la figura 18 (b) observem que les cèl·lules shHDAC3 presenten un retard en la sortida de la fase G<sub>2</sub>/M i també observem un increment de cèl·lules apoptòtiques. Una interpretació d'aquests resultats podria ser que la disminució de la HDAC3 provoca una disminució de la ciclina A i per això no pot progressar correctament a través de la mitosi.



**Figura 18 | La depleció de la HDAC3 provoca una aturada a G<sub>2</sub>/M.** (a) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shRNA HDAC3 o control. 60h post transfecció van ser recollides i fixades (veure materials i mètodes) i preparades per ser analitzades per FACs. Una part de la mostra va ser analitzada per WB per comprovar l'eficiència del shRNA HDAC3, tal com es pot veure a la dreta de la figura. L'actina va ser utilitzada com control de càrrega. (b) Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shHDAC3 o control. Alhora van ser sincronitzades a la fase G<sub>1</sub>/S amb un doble bloqueig de timidina. Moment en el qual les cèl·lules van ser rentades i tornades a l'incubador amb medi fresc. 8 hores més tard, es van començar a agafar mostres per ser analitzades pel FACs.

## 5.5 REGULACIÓ DE LA HDAC3

A la figura 16 hem observat que la HDAC3 es degradava a la mitosi. Per tant, hem volgut estudiar si aquesta degradació es produeix via proteasoma. Per això, vam tractar cèl·lules transfectades amb FL-HDAC3 i asincròniques o sincronitzades a mitosi, amb ALLN, un inhibidor del proteasoma. Tal com podeu observar a la figura 19, la FL-HDAC3 es degrada a mitosi, però quan les tractem amb l'ALLN, observem que la HDAC3 no es degrada i trobem acumulació de la proteïna.

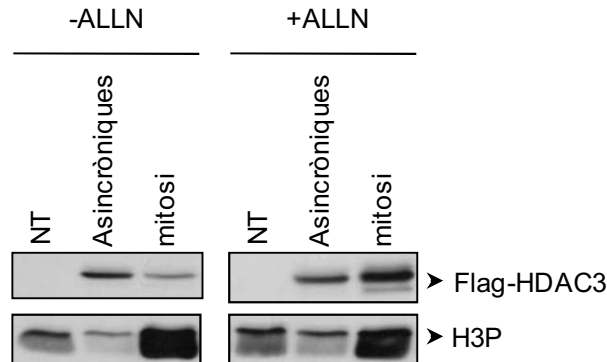


Figura 19 | **ALLN recupera els nivells de la HDAC3 a mitosi.** Cèl·lules HeLa, asincròniques i sincronitzades amb nocodazol per obtenir cèl·lules a mitosi, van ser transfectades amb FL-HDAC3. Més tard, van ser tractades amb 100µM d'ALLN o DMSO (vehicle de la solució de l'ALLN), un inhibidor del proteasoma, durant 16h. Les mostres van ser recollides i es van analitzar els nivells de la FL-HDAC3 amb anti-Flag. La hitona H3 fosforilada (H3P) es va utilitzar com control de sincronització de cèl·lules mitòtiques.

També vam analitzar si l'acumulació de la HDAC3 quan tractàvem amb ALLN afectava o no els nivells de ciclina A. Així doncs, vam transfectar cèl·lules amb shHDAC3 o shcontrol. Posteriorment, vam tractar-les amb ALLN i tal com s'observa a la figura 20, els nivells de la ciclina A també reverteixen. Per tant, la ciclina A així com la HDAC3 es degraden via proteasoma.

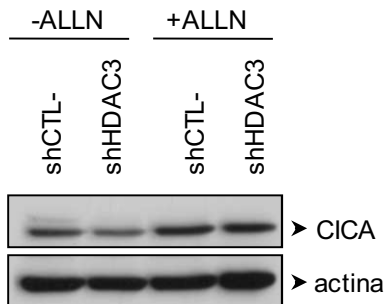


Figura 20 | **ALLN recupera els nivells de la ciclina A.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shHDAC3 o shcontrol. Més tard van ser tractades amb 100  $\mu$ M d'ALLN o DMSO durant 16h. Les mostres van ser recollides i es van analitzar els nivells de la ciclina A i de l'actina, utilitzat com control de càrrega.

En el nostre cas particular d'estudi, la ciclina A interacciona amb una sèrie de proteïnes que inclou la CDK2, la P/CAF, la HDAC1, la HDAC2, la HDAC3, la HDAC4 i la p27. Entre totes aquestes proteïnes trobem que algunes presenten activitat quinasa, com la CDK2, altres presenten activitat acetilasa, com la P/CAF i altres presenten activitat deacetilasa, com les diferents HDACs.

Amb tot això, ens vam plantejar si la HDAC3 podia estar regulada per acetilació/deacetilació (ja que estava present la P/CAF i altres deacetilases) o bé per fosforilació (ja fos per la CDK2 o bé, la CDK1).

### 5.5.1 Regulació de la HDAC3 per HDACs

Fins ara no s'ha descrit que la HDAC3 es pugui acetilar. Per això, vam fer una primera aproximació intentant determinar si la HDAC3 s'acetilava a G<sub>1</sub>/S o bé a G<sub>2</sub>/M, moment en el qual els seus nivells són més elevats. Per això, vam transfectar cèl·lules HeLa amb FL-HDAC3 sincronitzades amb un doble bloqueig de timidina i vam analitzar el seu nivell d'acetilació. El que podem observar a la figura 21 és que no detectem nivells d'acetilació de la HDAC3. Això, però, no ens confirma que la HDAC3 no s'acetili, ja que els anticossos anti-acetil lisina no sempre ens han funcionat bé.

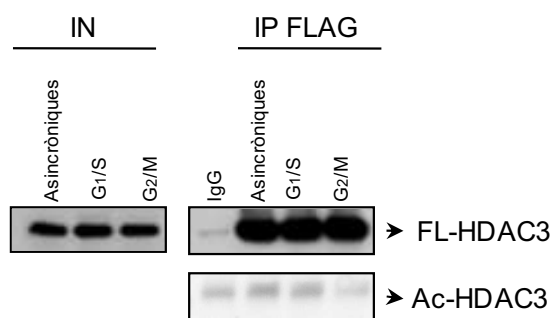


Figura 21 | **Estat d'acetilació de la HDAC3.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb la FL-HDAC3 i sincronitzades a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle o bé sense sincronitzar. Les mostres van ser tractades per sotmetre-les a immunoprecipitació (IP) amb anti-Flag i després analitzades per WB amb anti-Flag i anti-acetil lisina.

Degut a què no vam poder determinar si la HDAC3 s'acetilava o no utilitzant anticossos anti-acetil lisina, vam decidir utilitzar TSA. En el suposat cas que la HDAC3 s'acetilés, i que aquesta modificació estigués relacionada amb la seva estabilitat, potser els seus nivells es veurien alterats quan afegíssim TSA. Aquesta era una aproximació més senzilla d'assolir. Per tal motiu, cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3. Alhora van ser tractades amb o sense TSA. Els resultats de la figura 22 (els quatre primers carrils) ens indiquen que hi ha una certa alteració en els nivells de la HDAC3 i que per tant, la proteïna podria estar regulada per HDACs. A més, experiments previs fets al laboratori feien sospitar d'una relació entre la HDAC3 i la HDAC4. Per això vam transfectar també la HDAC4. Tal com veieu en els dos últims carrils, quan transfectem les cèl·lules amb la HDAC4, observem una disminució en els nivells de la HDAC3.



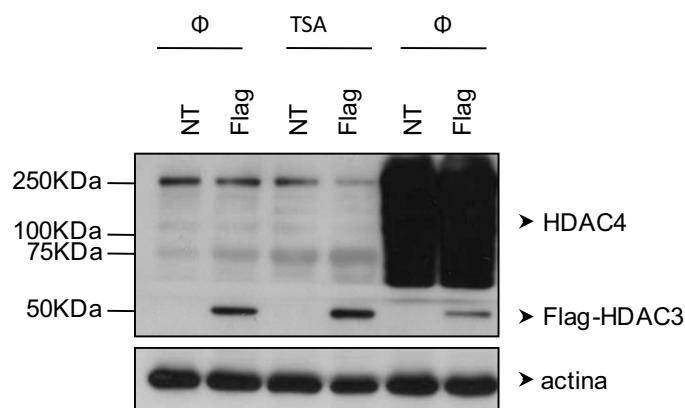


Figura 22 | **HDAC3 es regula per les HDACs, ja sigui de forma directa o indirecta.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3. Alhora van ser tractades amb 3 $\mu$ M TSA o DMSO (vehicle de la solució del TSA) durant 16h. Els dos últims carrils són cèl·lules HeLa transfectades amb FL-HDAC3 i 24h post-transfecció, es van transfectar amb HDAC4. Les mostres van ser analitzades per WB amb anticossos contra Flag, HDAC4 i actina.

### 5.5.2 Regulació de la HDAC3 per fosforilació

Per assolir el nostre segon objectiu de determinar la regulació de la HDAC3, és a dir, estudiar si la HDAC3 podia estar regulada per fosforilació, vam fer servir roscovitina, un inhibidor de CDKs. Les condicions experimentals van ser les mateixes que en l'anterior experiment, però en aquest cas, van ser tractades amb roscovitina durant 16h. Tal com mostra la figura 23, els nivells de la HDAC3 disminueixen quan s'han tractat les cèl·lules amb roscovitina. Aquest resultat confirmava la regulació de la HDAC3 per fosforilació.

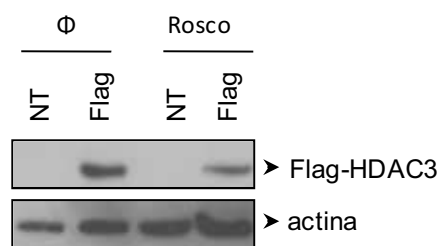


Figura 23 | **La HDAC3 està regulada per fosforilació.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3. Alhora van ser tractades amb 20µM de roscovitina o DMSO (vehicle de la solució de la roscovitina) durant 16h. Després del tractament, les mostres van ser recollides i analitzades per WB amb anticossos anti-Flag. L'actina es va utilitzar com control de càrrega.

---

Així doncs, el que vam fer després va ser transfectar cèl·lules HeLa amb FL-CDK2 i HA-ciclina A, per comprovar si podíem revertir els efectes que causava la roscovitina, és a dir, si podíem incrementar els nivells de la HDAC3. Veiem a la imatge 24 que la cotransfecció amb la CDK2 i la ciclina A provoca un increment en els nivells de la HDAC3.

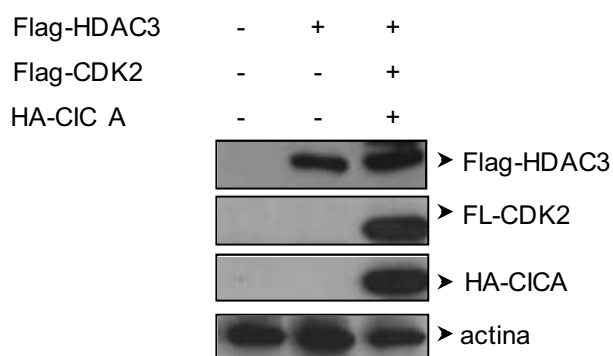


Figura 24 | **La transfecció de la FL-CDK2 i la HA-CICA incrementa els nivells de la HDAC3.** Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3, FL-CDK2 i HA-ciclina A. 24h post-transfecció, es van recollir les cèl·lules i es van analitzar per WB amb anticossos contra Flag, HA i actina, utilitzat com control de càrrega.

---



## **ANNEX I**



## 1. HDAC2 I EL CICLE CEL·LULAR

### 1.1 EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DE LA HDAC2 SOBRE ALTRES PROTEÏNES DEL CICLE CEL·LULAR

De la mateixa manera que vam fer amb la HDAC1, vam voler estudiar l'efecte de la disminució de la HDAC2 sobre el cicle cel·lular i sobre altres proteïnes.

Vam obtenir *knockdown* estables de la HDAC2 i vam analitzar l'efecte sobre el cicle cel·lular. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb shHDAC2 o shcontrol. Es van seleccionar amb puromicina i al cap d'uns vint dies, les cèl·lules es van comprovar per WB. En aquest cas, l'eficiència del shHDAC2 no és molt bona. La figura 1 ens mostra que tant el *knockdown* com el control es comporten igual. Per tant, la manca de la HDAC2, en principi, no té cap efecte sobre el cicle.

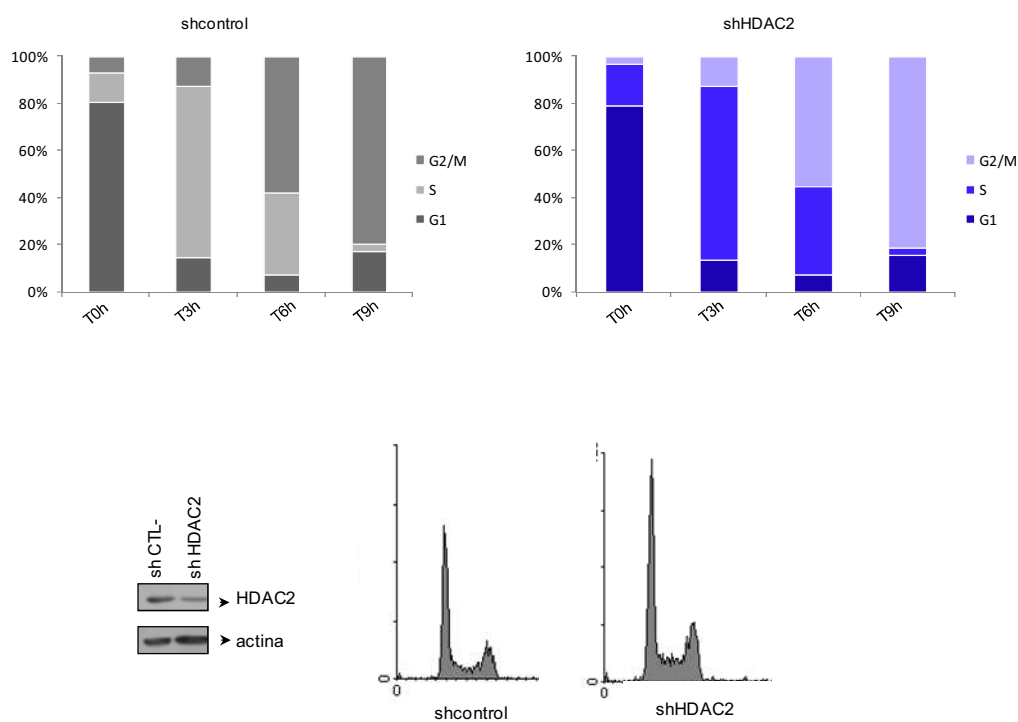


Figura 1 | **HDAC2<sup>-/-</sup> no causa un efecte sobre el cicle.** Cèl·lules HeLa *knockdown* estables de la HDAC2 o control van ser sincronitzades amb un doble bloqueig de timidina. Llavors van ser rentades i posades a l'incubador amb medir fresc. Les cèl·lules van ser recollides a les hores que mostra la gràfica, fixades (veure materials i mètodes) i preparades per ser analitzades per FACs. Una part de la mostra va ser analitzada per WB per comprovar l'eficiència del shRNA de la HDAC2. L'actina va ser utilitzada com control de càrrega.

---

A la figura 2 el que podem observar són els nivells de les diferents proteïnes mostrades en cèl·lules *knockdown* de HDAC2 *versus* el control.

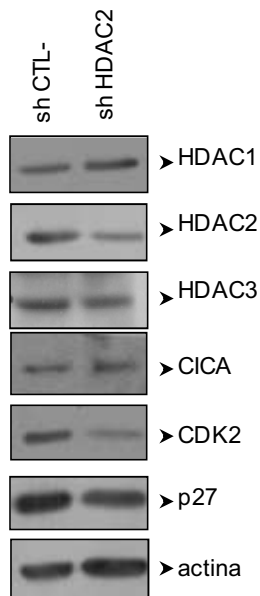


Figura 2 | **Nivells de diferents proteïnes a *knockdown* estables de la HDAC2 i control.** Mostres de cèl·lules HDAC2<sup>-/-</sup> *vs* les cèl·lules control van ser analitzades per WB amb anticossos dirigits contra diferents proteïnes.

---

## 1.2 INCREMENT DE L'ACTIVITAT DE LA CDK2 EN LES CÈL·LULES *KNOCKDOWN* DE LA HDAC2

La CDK2 és una altra proteïna del cicle cel·lular que s'acetila i quan està acetilada la seva activitat quinasa queda inhibida (Mateo et al. 2009(a)). Vam pensar que potser la CDK2 era deacetilada per HDAC2. En aquest cas, doncs, si no hi hagués HDAC2, la CDK2 estaria molt acetilada i per tant, no seria gaire activa. Per aquesta raó vam decidir

realitzar una assaig quinasa utilitzant la CDK2 immunoprecipitada dels *knockdown* de la HDAC2<sup>-/-</sup>, HDAC1<sup>-/-</sup> i control, i utilitzant la histona H<sub>1</sub> com substrat. Nosaltres esperàvem que l'activitat fos molt baixa, segons els estudis anteriors. La figura 3 ens mostra que, malgrat immunoprecipitar molt poca CDK2 dels *knockdown* de la HDAC 2<sup>-/-</sup>, aquesta és molt activa fosforilant la H<sub>1</sub>.

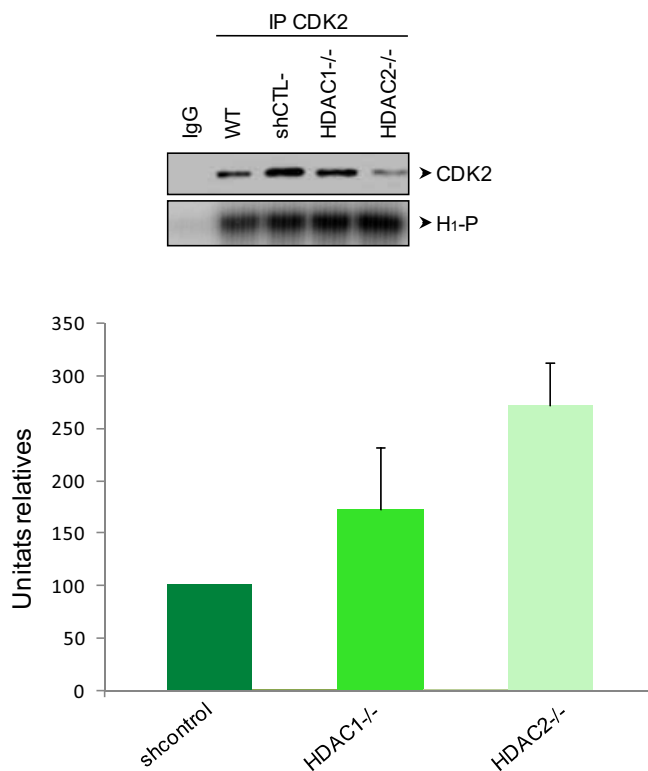


Figura 3 | **Activitat quinasa de la CDK2 immunoprecipitada del *knockdown* de la HDAC1, HDAC2 i control.** La CDK2 endògena dels *knockdown* estables de la HDAC1<sup>-/-</sup>, de la HDAC2<sup>-/-</sup> i del shCTL- va ser immunoprecipitada amb anticossos anti-CDK2 i IgG com control, seguit d'un assaig quinasa amb ATP marcat radiactivament amb <sup>32</sup>P. La fosforilació de la histona H<sub>1</sub> va ser detectada per PhosphoImager i es mostra al panell inferior. Paral·lelament, una part de les IPs va ser analitzada per WB amb anticossos anti CDK2 per a conèixer la quantitat de CDK2 immunoprecipitada (panell superior). A la part inferior de la figura es mostra una gràfica de la normalització de la fosforilació de la histona H<sub>1</sub> en relació a la quantitat de CDK2 immunoprecipitada. Els resultats mostrats provenen de la normalització de 3 experiments independents ±SD. A l'experiment també es va incloure un assaig quinasa d'una CDK2 immunoprecipitada d'unes HeLa WT com un control positiu de l'assaig.



### 1.3 p27 PODRIA SER UNA DIANA DE LA HDAC2?

Una possible explicació de que la CDK2 fos tan activa seria que no hi hagués p27, un conegut inhibidor de CDKs.

Llavors quina relació hi podia haver entre la HDAC2 i la p27? Per una banda sabem que la p27 és ubiquitinitzada per la *skp2*, una ubiquitina ligasa que actua durant la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular. Treballs anteriors descriuen que la HDAC1, amb funció repressora, s'uneix al promotor de la *skp2* durant la fase G<sub>0</sub>. De tal forma que la *skp2* no s'expressa i que per tant, els nivells de la p27 són elevats (Schneider et al. 2007). També està descrit que la HDAC3, amb funció activadora, s'uneix al promotor de la *skp2* durant la fase G<sub>1</sub> tardana. D'aquesta manera la *skp2* s'expressa moltíssim i degrada la p27. Amb aquests dos resultats, ens van fer pensar que potser HDAC2 s'unia al promotor de la *skp2* a la fase G<sub>1</sub> temprana amb una funció repressora, i per tant en aquests moments la p27 encara no era degradada. Per comprovar aquesta idea vam analitzar els nivells de la *skp2* en els *knockdown* de la HDAC2. Però tal com es veu a la figura 4, els nivells de la *skp2* no estan alterats.

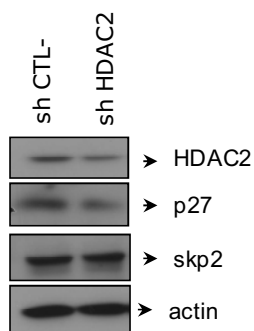


Figura 4 | Nivells de la *skp2* en HDAC2<sup>-/-</sup> versus control. Mostres de lisats de cèl·lules dels *knockdown* d'HDAC2 o control van ser tractades i analitzades per WB amb anticossos anti *skp2* i actina.

Per una altra banda, uns companys de laboratori han descrit que la p27 també s'acetila i com a conseqüència la proteïna es degrada (Pérez-Luna et al. 2012). Així, doncs també podríem pensar que potser la HDAC2 és la deacetilasa que podria mantenir la proteïna estable.

La primera aproximació que hem fet ha estat buscar si la p27 i la HDAC2 interaccionen de forma directa. Per això, vam fer columnes de p27GST, i les vam incubar amb proteïna HDAC2 purificada. Vam provar dues elucions diferents, per descartar diferents tipus d'interaccions. Tal com es veu a la imatge 5, la p27 no interacciona de forma directa amb la HDAC2.

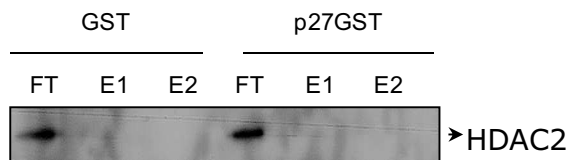


Figura 5 | **p27 i HDAC2 no interaccionen directament.** Es va obtenir p27 purificada i es va acoblar a boles de CNBr-sefarosa. Es van incubar les boles amb HDAC2 purificada. Es va fer un primer eluït amb 3MKCl i un segon eluït amb tampó acetat pH4. Les mostres van ser resoltes en un gel SDS-acrilamida i van ser analitzades per WB amb anti-HDAC2.

---



## **DISCUSSIÓ**

Les idees no duren gaire. S'ha de fer alguna cosa amb elles.

*Santiago Ramón y Cajal*

La ciclina A és una proteïna important per a la regulació del cicle cel·lular. La seva funció principal és la d'activar les quinases CDK2 i CDK1. Aquestes quinases regulen específicament les fases S, G<sub>2</sub> i M, és a dir l'inici i la progressió de la síntesi del DNA així com els sistemes de vigilància durant la fase S (Saha et al. 1998; Petersen et al. 1999; Coverley et al. 2002) i la transició G<sub>2</sub>/M, com també la progressió fins a la profase (Pagano et al. 1992). Inclús recentment, s'han descrit funcions independents de CDK com el control de la invasió cel·lular a través de la via de senyalització de RhoA (Arsic et al. 2012).

La degradació de la ciclina A comença al principi de la prometafase i és completada a la metafase (den Elzen & Pines, 2001; Geley et al. 2001). Aquesta degradació és necessària per a la posterior degradació de la ciclina B i la transició de la metafase a l'anafase de la mitosi. Durant molts anys, la modificació post-traducciona que senyalitzava la ciclina A per a la seva degradació durant la mitosi ha estat desconeguda. Recentment, estudis en el nostre laboratori, van descriure el mecanisme de la seva degradació. Específicament, l'acetilació de la ciclina A per l'acetilasa P/CAF a quatre residus de lisina era el pas previ per a la seva ubiquitinització i posterior degradació (Mateo et al. 2009(b)). Tal com hem mencionat, l'equilibri dinàmic de l'acetilació *in vivo* és regulat per les accions oposades de les acetiltransferases i les deacetilases. En aquest treball, hem aconseguit demostrar quina és la deacetilasa responsable de la deacetilació de la ciclina A durant el cicle cel·lular.

## 1. LES DEACETILASES HDAC1 I HDAC2

HDAC1 i HDAC2 són dues proteïnes altament relacionades, que són el resultat de la duplicació d'un gen (de Ruijter et al. 2003). Presenten un 85% de similitud en la seqüència. El domini catalític i el de dimerització (1-325 aminoàcids) són un 92% idèntics, mentre que l'extrem C-terminal presenta un 72% de similitud (figura 1). Encara que l'extrem C-terminal no presenti activitat catalítica *per se*, la seva deleció redueix l'activitat enzimàtica d'aquestes deacetilases (Hassig et al. 1997). Per tant, aquest domini juga un paper important en la regulació de les seves funcions. La HDAC1 i la HDAC2 poden formar homo i heterodímers.

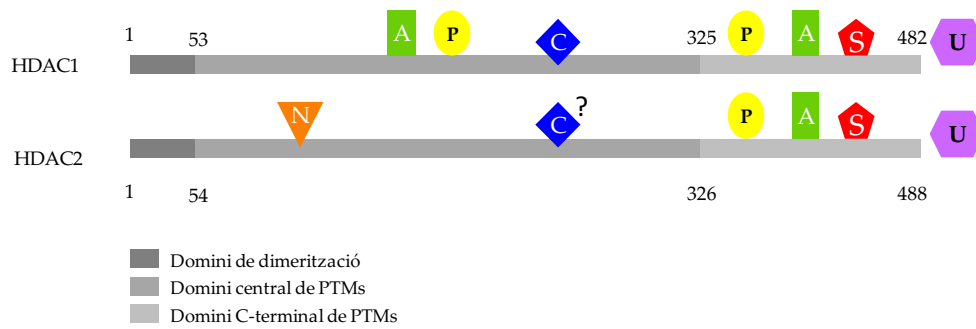


Figura 1 | **Estructura de la HDAC1 i de la HDAC2.** Domini de dimerització (1-52), domini deacetilasa (53-325), P: fosforilació, A: acetilació, S: sumoilació, U: ubiquitinització; N: nitrosilació; C: carbonilació. No s'indiquen el número de residus on tenen lloc les modificacions. El domini deacetilasa de la HDAC1 comprèn els aa 9-321 i el domini deacetilasa de la HDAC2, 9-322. (Adaptat de (Segré & Chiocca 2011)).

Tal com hem explicat en apartats anteriors, les HDACs formen part de complexos proteics. Específicament, la HDAC1 i la HDAC2, juntament amb les proteïnes d'unió a histones RbAP46 i RbAP48, formen part del centre catalític de molts complexos multiproteics que regulen la transcripció (Alland et al. 2002), entre els quals destaquem: els complexos Sin3a i NuRD que són moduladors de la transcripció d'ampli espectre d'acció (Hassig et al. 1997; Feng, et al. 2003). A més, existeix el complex REST/CoREST que realitza funcions més específiques, com per exemple, reclutant HDAC1 i HDAC2, i suprimint, llavors, la transcripció de gens neurals a teixits no neuronals (Bruce et al. 2004). Finalment, s'han caracteritzat dos complexos més que contenen HDAC1 i HDAC2: el complex SHIP i el complex NODE. SHIP1 és una proteïna implicada en la modificació de la cromatina durant l'espermatogènesi, i el complex NODE és específic de les cèl·lules embrionàries (Liang et al. 2008; You A, 2001).

La HDAC1 i la HDAC2 no només estan relacionades a nivell estructural, sinó que comparteixen molts substrats en els complexos multiproteics i a més, presenten funcions redundants en molts processos cel·lulars. Per exemple, la diferenciació dels precursors neuronals a neurones requereix HDAC1 o HDAC2, suggerint per tant, efectes

compensatoris (Montgomery et al. 2009). Consistent amb això, la depleció amb RNA d'interferència de la HDAC1 o HDAC2 a línies cel·lulars canceroses causa una regulació a l'alça de la HDAC2 o HDAC1, respectivament (Senese et al. 2007). La redundància de la HDAC1 o HDAC2 també s'ha observat al sistema hematopoètic. Els nivells i les activitats de la HDAC1 i HDAC2 són crítiques per a la diferenciació megacariocítica i eritrocítica, i la seva inactivació causa una severa trombocitopènia deguda a l'apoptosi dels megacariòcits (Wilting et al. 2010).

Existeixen altres situacions en les que la HDAC1 i HDAC2 no presenten funcions compensatòries. Per exemple, el *knockout* de la HDAC1 mor a l'estadi E9.5 (Lagger et al. 2002), mentre que el *knockout* de la HDAC2 sobreviu fins el període perinatal (Montgomery et al. 2007). Encara que aquest resultat és dubtós, ja que un estudi paral·lel va demostrar que els ratolins amb la mutació *null* de la HDAC2 eren viables (Trivedi et al. 2007). Possiblement, l'explicació d'aquest conflicte pugui ser el diferent *background* genètic. S'ha comprovat que la deleció condicional de la HDAC1 o HDAC2 és tolerada a diferents òrgans com el cor o el cervell, sempre i quan un dels dos al·lels es mantingui (Montgomery et al. 2007). Mentre que la deleció concomitant dels dos provoca mitosi catastròfica i mort cel·lular (Haberland et al. 2009). A les cèl·lules HeLa, per exemple, l'RNAi de la HDAC2 provoca un increment de l'expressió de p21 (Huang B.H. et al. 2005), mentre que a les cèl·lules U2OS, p21 és regulat a l'alça després de la disminució de la HDAC1 (Senese et al. 2007). Finalment, la HDAC1 però no la HDAC2, controla la diferenciació de les cèl·lules embrionàries. S'ha vist que la deleció de la HDAC1 causa una disminució de l'activitat dels complexos Sin3, NuRD i CoREST juntament amb la disminució dels nivells d'acetilació de la K56 a la histona H3. A més, els embrions derivats de cèl·lules embrionàries en que s'ha disminuït la HDAC1, però no la HDAC2, presenten patrons alterats de marcadors neuronals i de cardiomiòcits (Dovey et al. 2010).

El perquè dues proteïnes amb tan elevada similitud poden presentar funcions, a vegades parcialment redundants i a vegades específiques, podria ser perquè són regulades de forma diferent (revisat a (Segré & Chiocca, 2011)). Existeixen dues àrees moduls de modificacions post-traduccionals: un domini central de modificació tirosina-cisteïna i un domini C-terminal de modificació serina-lisina (figura 1). La majoria de les modificacions descrites en el domini central de les dues HDACs són nitrosilacions i carbonilacions a



conseqüència d'estressos inflamatoris o oxidatius. Es podria especular que els dominis centrals de les deacetilases actuen com plataformes per a la integració de senyals en resposta a estímuls d'estrès (fum del tabac, LPS o inflamació induïda per RCS). Per una altra banda, un espectre més ampli de modificacions post-traduccionals tenen lloc al domini C-terminal en resposta a moltes vies de senyalització (hipòxia, estimulació hormonal, senyalització extracel·lular). Aquesta organització modular subratllaria el potencial del codi post-traduccional per a la modulació de les funcions de la HDAC1 i HDAC2 a molts processos cel·lulars segons diferents estímuls.

## 1.1 RELACIÓ FUNCIONAL DE LA CICLINA A AMB LA HDAC1

### 1.1.1 La ciclina A i la HDAC1 colocalitzen

Hem vist que la ciclina A i la HDAC1 interaccionen *in vivo*, i que colocalitzen majoritàriament al nucli, malgrat que ambdues proteïnes poden realitzar funcions al citoplasma (Meraldi et al. 1999; Bakin & Jung 2008; Kim & Casaccia 2010). A més, per experiments de *pull down* hem observat que la interacció és directa. La regió implicada en aquesta interacció no la coneixem exactament. No obstant, en els nostres experiments de interacció, hem observat que quan utilitzem els fragments ciclina A 1-171 o ciclina A 171-432, la interacció amb la HDAC1 no es produeix. Aquests resultats ens suggereixen que un domini de la ciclina A, localitzat al voltant de l'aminoàcid 171 pot estar implicat en aquesta interacció. Així doncs, s'haurien de dissenyar altres fragments de la ciclina A, per tal de identificar definitivament el domini de interacció amb la HDAC1.

Per estudiar el paper de la HDAC1 sobre la ciclina A vam utilitzar shRNA contra la HDAC1. Quan disminuïem els nivells de la HDAC1, però, no observàvem alteració en els nivells de la ciclina A, indicant que la HDAC1 no era la responsable de deacetilar la ciclina A. Així doncs, la HDAC1 realitzava una altra funció en aquest complex. Una possibilitat podria ser que la HDAC1 deacetilés la CDK2. Recentment, s'ha descrit que l'acetilasa P/CAF és la responsable d'acetilar la CDK2 a la lisina 33, localitzada al seu

centre catalític, i inhibir la seva activitat (Mateo et al. 2009(a)). Es podria hipotetitzar, doncs, la possible funció de la HDAC1 com a modificadora de l'acetilació de la CDK2.

Per una altra banda, podríem pensar en una relació entre la HDAC1 i la P/CAF, ja que estan descrits la formació de nous complexos HATs-HDACs (Yamagoe et al. 2003). L'existència d'aquests complexos és compatible amb la idea que hi ha d'haver un mecanisme que estableixi i mantingui l'equilibri entre les activitats de les HATs i les HDACs. Demostren que HDAC1 i HDAC2 interaccionen amb la P/CAF de forma directa *in vitro* i *in vivo*. A més, també s'ha demostrat que la HDAC1 deacetila a la P/CAF, en menor grau comparat amb la HDAC3, i que aquesta deacetilació causa una exportació del nucli cap al citoplasma de la proteïna (Blanco-García et al. 2009).

### **1.1.2 La ciclina A i la HDAC1 interaccionen a les fases G<sub>1</sub> i G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular**

Malgrat descartar el paper de la HDAC1 en la deacetilació de la ciclina A, vam decidir continuar treballant amb la HDAC1. Els estudis de la interacció entre la HDAC1 i la ciclina A al llarg del cicle cel·lular mostren que la màxima interacció entre les dues proteïnes es dona a la fase G<sub>1</sub>/S i per experiments de deacetilació *in vitro* observem que la HDAC1 presenta la seva màxima activitat a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular. Aquests dos resultats ens indiquen que la HDAC1 podria tenir un paper fonamental durant la transició G<sub>1</sub>/S. A més, la obtenció de *knockdown* estables de HDAC1 i el seu anàlisi per FACs, ens va mostrar un retard en la progressió de la fase G<sub>1</sub>, confirmant experiments anteriors que descrivien que l'absència de HDAC1 causava una aturada a G<sub>1</sub> i la conseqüent pèrdua de cèl·lules mitòtiques, inhibició del creixement cel·lular i un increment de cèl·lules apoptòtiques (Senese et al. 2007).

La majoria dels estudis fets amb la HDAC1 i HDAC2 durant el cicle cel·lular demostren que aquesta aturada del cicle cel·lular a la fase G<sub>1</sub> ocorre parcialment per l'activació transcripcional de reguladors del cicle com p21, p27 o p57. Ja que les HDACs no presenten un domini d'unió al DNA, la qüestió és com les HDACs són reclutades als promotors. Recentment, el nostre laboratori ha descrit una nova funció per a p27 com

repressor transcripcional a través de la interacció amb p130 i E2F4 en els promotors dels gens diana de p27 (Pippa et al. 2011). Demostren que p27 interacciona amb p130 i E2F4 de forma directa i que després, és p27 la que recluta HDAC1 i mSin3A als promotors. En aquest estudi, s'ha demostrat una de les maneres de com les HDACs poden accedir als promotors de gens.

Una de les funcions que realitza la ciclina A durant la fase S implica l'inici de la replicació, activació de complexos preexistents de replicació i/o prevenció de la re-replicació (Coverley et al. 2002). La ciclina A s'ha trobat associada als focus de replicació (Cardoso et al. 1993), on hi ha molts enzims implicats en la replicació del DNA, com DNA pol  $\alpha$  i  $\epsilon$ , RPA, PCNA i DNA ligasa 1. En aquests focus, també hi ha altres proteïnes implicades en el metabolisme del DNA i el control del cicle cel·lular, per exemple s'ha trobat que la HDAC2 colocalitza a les factories de replicació de la fase S tardana, el que funcionalment lligaria amb l'establiment de l'estat hipoacetilat de la heterocromatina (Rountree et al. 2000). Per tant, una possible funció per explicar l'associació de la HDAC1 amb la ciclina A seria que pogués realitzar aquest paper de deacetilació sobre les histones del DNA acabat de sintetitzar.

## 1.2 PAPER DE LA HDAC2 DURANT EL CICLE CEL·LULAR

### 1.2.1 La HDAC2 interacciona *in vivo* amb la ciclina A

Els estudis preliminars que hem fet treballant amb la HDAC2 demostren que la proteïna també interacciona *in vivo* amb la ciclina A, i que ambdues proteïnes endògenes colocalitzen al nucli de cèl·lules HeLa. Però, a diferència de la HDAC1, la HDAC2 no interacciona de forma directa, sinó que podria ser que la interacció amb la ciclina A es donés a través de la regió de dimerització que presenten tant la HDAC1 com la HDAC2.

### 1.2.2 La HDAC2 altera l'activitat de la CDK2

En aquest treball, hem estudiat la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules amb nivells baixos de HDAC2 i no vam observar cap modificació. A més, els nivells de les proteïnes HDAC1, HDAC3 i ciclina A no estaven alterades, en canvi, si que observàvem una disminució en els nivells de CDK2 i p27. Això diferencia les funcions que realitzen HDAC1 i HDAC2 en aquest tipus cel·lular. En estudis previs fets al nostre grup, s'ha descrit l'acetilació de les proteïnes CDK2 i p27. Així que, la nostra primera opció va ser que potser la HDAC2 era la responsable de deacetilar alguna d'elles. Tal com s'ha explicat anteriorment, l'acetilació de la CDK2 per P/CAF a la lisina K33, situada al centre catalític de la proteïna, i lloc conservat a totes les CDKs, causa la inactivitat de l'enzim (Mateo et al. 2009(a)). Per això vam decidir fer assajos quinasa amb la CDK2 endògena immunoprecipitada dels *knockdown* de HDAC2<sup>-/-</sup>. Si la HDAC2 fos la responsable de deacetilar la CDK, en les nostres cèl·lules HDAC2<sup>-/-</sup>, la CDK2 presentaria molt poca activitat. Però en lloc de trobar una baixa activitat, trobàvem que, primer, hi havia nivells molts baixos de la proteïna, i que, malgrat tot, aquesta poca proteïna era molt activa. Això ens sobtava molt, perquè el cicle cel·lular no estava afectat. L'efecte de la HDAC2 sobre la CDK2 és clar, però s'ha d'esbrinar quin és el mecanisme d'acció. Podríem pensar que la HDAC2 afecta l'estabilitat de la proteïna, i no la seva activitat. Està considerat que els nivells de les CDKs durant el cicle cel·lular són relativament constants, però potser això no hauria de ser tan rotund. Estudis fets al nostre laboratori mostren que hi ha certes fluctuacions quant als nivells de la CDK2 a la fase G<sub>1</sub>. O bé podria ser, que la HDAC2 actua a través d'una altra proteïna afectant la CDK2, i no necessàriament de forma directa. També es podria tractar d'una afectació de la seva expressió. Recentment, s'ha demostrat que la inhibició de la HDAC2 a cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular provoca una reducció en el creixement del tumor i a les cèl·lules Hep3B provoca una reducció en la síntesi *de novo* de DNA. Concretament, es genera una aturada a la transició G<sub>1</sub>/S, i això és degut a què la inhibició de la HDAC2 causa un increment en l'expressió de p16 i p21 i una disminució de CDK4, CDK2 i ciclina D1; totes elles proteïnes implicades en la transició G<sub>1</sub>/S (Noh et al. 2011). A més, quan varen analitzar l'estat de la maquinària implicada en la transcripció dels gens de la fase S, van observar una disminució de la fosforilació de p130, una proteïna membre de la família del retinoblastoma (pRB). Per

tant, la inhibició de la HDAC2 induïx una disminució de l'activitat dels complexos CDKs/ciclins a través de l'increment dels nivells de certs inhibidors o de la disminució de les ciclins/CDKs. Això, provocaria una disminució de la fosforilació de les proteïnes de la família de pRB i en conseqüència, la disminució de l'expressió dels gens de fase S. Tenint en compte aquest treball, seria interessant estudiar la maquinària proteica implicada en la fase G<sub>1</sub>, ja que malgrat que els nostres *knockdown* HDAC2<sup>-/-</sup> presenten una disminució de CDK2, aquesta és prou activa per fer que el cicle cel·lular no presenti alteracions.

Quant a la p27, el treball de (Pérez-Luna et al. 2012), indica que l'acetilació de p27 seria un pas previ per a la seva degradació als inicis de la fase G<sub>1</sub>. Si a més tenim en compte que recentment s'ha descrit p27 com repressor transcripcional d'una sèrie de gens implicats en cicle cel·lular, adhesió, diferenciació o replicació del DNA (Pippa et al. 2011), seria interessant estudiar la possible relació de la HDAC2 amb la p27.

## 2. LA DEACETILASA HDAC3

La HDAC3 és una proteïna de 428 aminoàcids que presenta una seqüència d'exportació nuclear (NES) als aminoàcids 29-41, una NLS a la regió C-terminal (313-428aa) i una regió important per a l'oligomerització i per a la viabilitat cel·lular (1-122aa). El domini deacetilasa presenta similitud amb la resta dels membres de la família, mentre que la regió C-terminal, la qual presenta més divergències respecte als altres membres de la classe I, és necessària tant per a l'activitat deacetilasa com per a la repressió transcripcional. La HDAC3 és capaç de formar oligòmers amb altres HDACs tant *in vivo* com *in vitro* (Yang W et al. 2002). La HDAC3 endògena majoritàriament s'associa amb ella mateixa, però una petita fracció interacciona amb la HDAC4. Està descrit que la HDAC3 sembla responsable de l'activitat deacetilasa associada amb la HDAC4 i la HDAC7 (Fischle et al. 2002).

Tal com ja s'ha explicat anteriorment, la formació de complexos amb els corepressors N-CoR o SMRT, activa la HDAC3. Aquests dos complexos presenten funcions i reclutament de receptors nuclears independents (Jepsen et al. 2000; Jepsen et al. 2008). A més, la

formació d'un complex no interfereix en la formació de l'altre. Recentment, inclús, es descriu l'existència d'un *pool* de HDAC3 lliure, que no forma complexes, i que és intrínsecament inestable (Guo et al. 2012). Es demostra que la depleció d'un corepressor accelera la degradació de la HDAC3 lliure, evitant l'increment en la formació d'un complex amb l'altre corepressor. Estudis previs havien mostrat que tant la regió N-terminal com la C-terminal es necessitaven per a la interacció de la HDAC3 amb SMRT (Guenther et al. 2001). En un altre treball, troben que la regió C-terminal no és imprescindible per a la unió a SMRT, però sí que juga un paper clau en els passos següents durant la formació del complex estable i actiu (Guo et al. 2012).

La HDAC3 juga un paper en la progressió del cicle cel·lular i en resposta a dany al DNA. La inactivació condicional de la HDAC3 a MEFs condueix a un retard en la progressió del cicle cel·lular durant la fase S acompanyat d'un increment en el dany al DNA i apoptosi. A més, provoca una alteració en la transcripció de molts gens implicats en el metabolisme, cicle cel·lular, apoptosi, desenvolupament i transducció de senyals (Bhaskara et al. 2008). També juga un paper en el *checkpoint* de fus mitòtic i en la cohesió de les cromàtides germanes (Eot-Houllier et al. 2008). El dany al DNA observat a MEFs interfàsiques correlaciona amb l'alteració de la reparació dels trencaments de doble cadena. És interessant observar que les MEFs HDAC3<sup>-/-</sup> quiescents estan protegides enfront al dany al DNA. Aquests resultats podrien explicar el perquè els HDAC3 influencien preferentment les cèl·lules proliferants respecte les quiescents o primàries.

Els *knockout* de HDAC3 moren abans d'E9.5 (Montgomery et al. 2008). També s'ha observat que la pèrdua específica de la HDAC3 en el fetge genera una biosíntesi lipídica i del colesterol aberrant conduint a una acumulació de lípids i a una disminució en l'acumulació de glicogen (Knutson et al. 2008). La pèrdua de la HDAC3 als cardiomiòcits és letal en els tres o quatre mesos després de néixer. S'observa una hipertròfia massiva i la desrepressió de gens que controlen la captació i el metabolisme d'àcids grassos. Per altra banda, la sobreexpressió de la HDAC3 causa defectes cardíacs i hiperplàsia dels cardiomiòcits, portant a un engruiximent del miocardi (Montgomery et al. 2008).

Els ratolins deficientes en HDAC3 són més petits i presenten una vida mitja més curta comparats amb ratolins WT. La manca de HDAC3 provoca defectes severes en la formació

dels ossos i una adipogènesi incrementada en la formació del moll de l'os (Razidlo et al. 2010). També causa una inhibició de la proliferació de les cèl·lules embrionàries neuronals, juntament amb un increment dels nivells de p21 i de pten (*phosphatase and tensin homologue*) (Sun G et al. 2007). De forma semblant a la HDAC2, la inactivació de la HDAC3 a l'hipocampus dorsal dur a potenciar la memòria de llarg termini i una elevada expressió de Nr4a2 (*nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2*), gen associat amb la formació de la memòria de llarg termini (Mcquown et al. 2011). Finalment, l'eliminació de la HDAC3 induïx un bloqueig de la diferenciació del múscul llis i la regulació a la baixa de *Notch ligand Jagged1* (Singh, et al. 2011).

## 2.1 RELACIÓ FUNCIONAL DE LA HDAC3 AMB LA CICLINA A

### 2.1.1 La HDAC3 deacetila la ciclina A

En aquest treball hem descrit que la HDAC1, HDAC2 i HDAC3 interaccionen amb la ciclina A, però només HDAC3 és capaç de deacetilar-la.

Hem demostrat que la HDAC3 i la ciclina A colocalitzen al nucli. A més, interaccionen de forma directa i la regió de interacció compren els aminoàcids 1-171. Aquesta regió N-terminal està descrita com la regió important per a la seva degradació (Fung et al. 2005) i és la que conté les 4 lisines que s'aceten com a pas inicial per a la ubiquitinització i posterior degradació a la fase M (Mateo et al. 2009(b)).

Hem descrit que la sobreexpressió de la HDAC3 disminueix l'estat d'acetilació de la ciclina A, de la mateixa manera que la disminució dels nivells de la HDAC3, l'incrementa. Aquests resultats es veuen confirmats per la deacetilació *in vitro* de la ciclina A per part de la HDAC3.

### 2.1.2 La HDAC3 afecta la vida mitja de la ciclina A

Prèviament, vam descriure que les cèl·lules tractades amb inhibidors generals de deacetilases com TSA o butirat sòdic, disminueixen la vida mitja de la ciclina A (Mateo et al. 2009(b)). En aquest treball, hem estudiat la vida mitja de la ciclina A quan es disminueixen els nivells de la HDAC3. Els resultats ens van mostrar que la vida mitja de la ciclina A disminuïa dràsticament quan els nivells de la HDAC3 eren reduïts. Això ens confirmava que la manca de la HDAC3 alterava el balanç d'acetilació/deacetilació de la ciclina A, modificant la seva estabilitat i per tant, els seus nivells.

Un punt important ha estat el fet que la mancança de HDAC3 no afecta els mutants no acetilables de la ciclina A, ja sigui el mutant ciclina A 4R, el qual té mutades a arginines les quatre lisines que són susceptibles d'acetilar-se, o bé el mutant ciclina A 171-432, al qual li falta la regió N-terminal que és imprescindible per a la seva degradació, confirmant que l'acetilació de la ciclina A és necessària per a la seva ubiquitinització i posterior degradació.

Sabem que la ciclina A es degrada a la prometafase (den Elzen & Pines, 2001; Geley et al. 2001). Per tal de confirmar la necessitat de l'acetilació per a la degradació de la proteïna, vam comparar els nivells dels diferents mutants de la ciclina A a cèl·lules asincròniques i a cèl·lules en mitosi. Vam observar la correcta degradació de la ciclina A WT, mentre que la reducció dels nivells de la ciclina A 4R era significativament menor. Aquests resultats confirmen els assajos d'ubiquitinització *in vivo* que es van fer amb la ciclina A WT i el mutant ciclina A 4R (Mateo et al. 2009(b)), en els quals observàvem que la ciclina A 4R era capaç d'ubiquitinitzar-se, encara que de forma menys eficient que la ciclina A WT. Aquest fet es podria explicar perquè està descrit que la lisina 37 de la ciclina A és un residu susceptible d'ubiquitinitzar-se (Fung et al. 2005). El nostre mutant ciclina A 4R, el qual no té alterat el residu 37, es podria ubiquitinitzar, al menys parcialment. Això si, la regió N-terminal (1-171) és imprescindible per a la seva degradació, ja que aquest mutant no es degrada en absolut a la mitosi.



### 2.1.3 La HDAC3 durant el cicle cel·lular

L'estudi de la unió al llarg del cicle cel·lular ens mostra que la HDAC3 i la ciclina A presenten una màxima interacció a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular, de la mateixa manera que la màxima interacció entre P/CAF i ciclina A té lloc a les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M del cicle cel·lular (Mateo et al. 2009(b)). També sabem per estudis previs fets amb "Biacore" que la P/CAF i la ciclina A interaccionen de forma directa, malgrat que no sabem la regió de interacció.

Els assajos de deacetilació de la HDAC3 ens indiquen que la seva activitat no presenta variacions al llarg de les fases G<sub>1</sub>/S i G<sub>2</sub>/M, així doncs podríem pensar que és la P/CAF la que s'activa en els moments adients. El balanç d'activació d'aquests dos enzims, P/CAF i HDAC3, determina l'estat d'acetilació de la ciclina A, i per tant la seva degradació o bé la seva estabilitat. Se sap que l'autoacetilació de la P/CAF porta a un increment de l'activitat acetilasa *in vitro* (Santos-Rosa et al. 2003) i la seva deacetilació per la HDAC3 causa la seva exportació del nucli cap al citoplasma (Blanco-García et al. 2009). A més, la P/CAF es degrada a la fase M (Mateo et al. 2009(b)). En conjunt, podríem pensar que, la HDAC3, a l'inici de la fase M, deacetilés la P/CAF causant la seva exportació al citoplasma i la seva degradació. Experiments fets al laboratori ens mostren que quan sobreexpressem la HDAC3, els nivells de la P/CAF disminueixen molt, confirmant la relació entre la HDAC3 i la P/CAF.

### 2.1.4 La regulació de la HDAC3

Hem vist que la HDAC3 es degrada a la fase M i que la seva degradació es via proteasoma. Fins ara no està descrit el mecanisme pel qual la HDAC3 es degrada així que vam intentar trobar-lo. La ciclina A interacciona entre d'altres proteïnes amb HDACs, les quals presenten activitat deacetilasa, i amb CDK, la qual presenta activitat quinasa. Així doncs, vam pensar en dos possibles mecanismes de regulació de l'estabilitat de la HDAC3: per acció de les HDACs, directa o indirectament; o bé per fosforilació.

La utilització d'un inhibidor general de les HDACs com el TSA causa un cert increment dels nivells de la HDAC3. No sabem si l'acció d'alguna HDAC és directa o indirecta. Si

l'acció fos directa, podríem pensar que l'acetilació de la HDAC3 estabilitza la proteïna, ja que si sobreexpressem la HDAC4, deacetilasa que interacciona també amb la HDAC3 i amb la ciclina A i que forma part de les HDACs de classe II, els nivells de la HDAC3 disminueixen. Aquests resultats s'haurien de comprovar amb assajos de deacetilació *in vitro*. Si fos de forma indirecta, podria ser a través de l'acció d'una segona proteïna o bé que actués a nivell de la transcripció.

El tractament de les cèl·lules amb roscovitina, un inhibidor específic de CDKs, causa una disminució de la HDAC3. Per tant, això ens indica que la fosforilació de la HDAC3 fa que la proteïna sigui estable. El complex quinasa que controla la fase S és CDK2/ciclina A, per això vam transfectar la CDK2 juntament amb la ciclina A. Vam observar que els nivells de la HDAC3 incrementaven, indicant-nos que la fosforilació de la HDAC3 per part del complex CDK2/ciclina A l'estabilitza. El lloc consensu de fosforilació de la CDK2 a la HDAC3 es troba a la serina 74, així doncs hauríem de construir el mutant de la HDAC3 i comprovar l'efecte de la CDK2 sobre el mutant. Per tant, amb tots aquests resultats podríem establir un primer model de regulació de la HDAC3 (figura 2).

Les diferents vies de senyalització que ocorren als diferents tipus cel·lulars determinen certes modificacions post-traduccionals que afecten les proteïnes de forma molt diversa. Això ens ho confirma el fet que a diferència del nostre treball en què la fosforilació estabilitza la HDAC3, el tractament de cèl·lules de càncer de colon amb sulforane, un agent quimioprotector, provoca la fosforilació de la HDAC3 i SMRT per CK2, la qual fa que el complex es dissociï, que s'uneixin a les proteïnes 14-3-3 o Pin1 i que s'exportin al citoplasma (Rajendran et al. 2011). Pin-1 és una proteïna que està implicada en la degradació de SMRT (Stanya et al. 2008). Al citoplasma, doncs, la unió de la HDAC3 a 14-3-3 competeix amb la via de degradació que implica la unió a Pin-1. A part de l'alteració de la localització per fosforilació, s'ha descrit que la HDAC3 es fosforila per CK2 a la serina 424 i que la fosforilació causa una disminució de la seva activitat (Zhang X et al. 2005). A més, també s'ha trobat la PP4 i PP2A que poden formar part del complex (Togi et al. 2009; Zhang X et al. 2005). Això confirma que en un mateix complex es troben ambdós enzims amb activitats oposades responsables de la modificació de la HDAC3.

El nostre model de regulació de la HDAC3 podria coincidir amb estudis recents, que descriuen l'existència d'un *pool* lliure de HDAC3 que és intrínsecament inestable (Guo et al. 2012). Sabem que la formació del complex que forma la HDAC3 amb els corepressors NCoR/SMRT estabilitza la HDAC3, però nosaltres afegim que l'acció de les HDACs i la fosforilació a certs residus també ajuden a estabilitzar la proteïna.

Els objectius següents serien determinar, quins són els enzims responsables de les modificacions, a quins residus es produeixen aquestes modificacions i en quin moment tenen lloc. A més, es podria estudiar l'efecte de les modificacions sobre la localització cel·lular de la HDAC3 i sobre la formació del complex, del qual forma part.

### 3. MODEL DE REGULACIÓ DE LA CICLINA A

El balanç acetilació/deacetilació és molt important en la regulació de la transcripció gènica. A mesura que es coneixen nous substrats no histones tant de les HATs com de les HDACs, veiem la importància del control de tots aquests substrats que formen part de molts processos cel·lulars com el cicle cel·lular, la diferenciació i el desenvolupament.

L'activitat de la ciclina A s'ha vist que es troba desregulada a molts càncers de mama, de colon, de pulmó i de pròstata (Yam et al. 2002). A cèl·lules de mamífer, nivells alts de la ciclina A causen un retard en l'inici de la metafase i l'anafase, és a dir, un retard en l'alineament dels cromosomes i en la segregació de les cromàtides germanes (den Elzen & Pines, 2001; Geley et al. 2001). Per contra, cèl·lules on s'han disminuït els nivells de 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 & Jaklevic 2001). Per tant, la regulació de la ciclina A durant el cicle cel·lular és molt important pel correcte funcionament del mateix.

Finalment, doncs, els estudis previs del nostre laboratori treballant amb la ciclina A i la P/CAF i els estudis d'aquesta tesi ens permeten establir un model de regulació de la ciclina A:

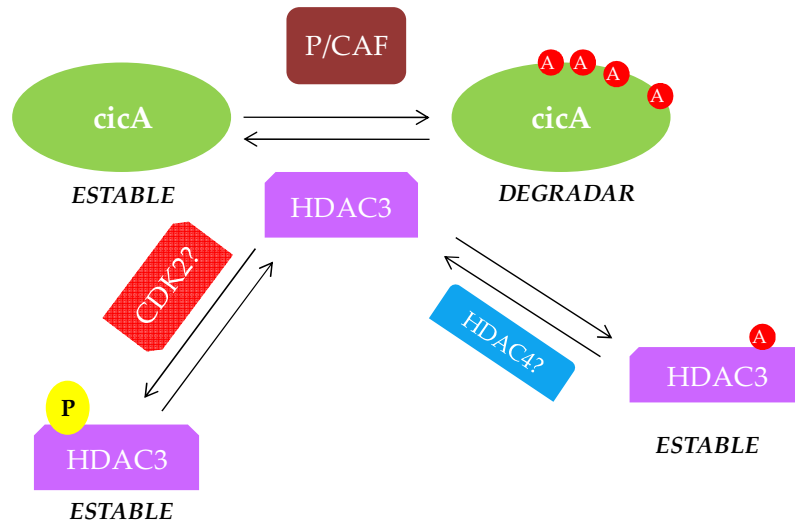


Figura 2 | **Model de regulació de la ciclina A i de la HDAC3.** La P/CAF acetila la ciclina A a quatre residus de lisina i això és un senyal que porta a la ubiquitinització de la proteïna i posterior degradació. Per contra, la HDAC3 és la deacetilasa que deacetila la ciclina A i l'estabilitza. A més, hem demostrat que la HDAC3 a la vegada també es regula. Dos mecanismes la modifiquen, la fosforilació (per CDK1 o CDK2) i l'acció de les HDACs, ja sigui directa o bé indirecta. A: acetilació; P: fosforilació.

#### 4. COMPLEX CDK2/CICLINA A A LES FASES S i G<sub>2</sub>/M

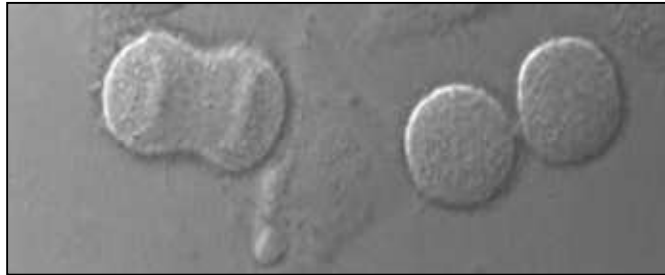
El cicle cel·lular és controlat per una sèrie de complexos CDKs/ciclins, que varien segons la fase del cicle cel·lular en què es troben les cèl·lules. Les CDKs són serina/treonina quinases, l'activitat de les quals és controlada en part per la unió a subunitats reguladores, les ciclins. La ciclina A es comença a sintetitzar a l'inici de la fase S i es degrada a la prometafase. L'estabilitat de la ciclina A és regulada pel balanç entre la seva l'acetilació, per P/CAF, i la seva deacetilació, per HDAC3. Durant tot aquest període s'uneix, primer a la CDK2 durant la fase S i G<sub>2</sub> i després a la CDK1, fins a la prometafase.

La regulació del complex CDK2/ciclina A per P/CAF ha estat estudiat al nostre laboratori (Mateo et al. 2009 (a) i (b)). Sabem que la P/CAF actua sobre el complex de dues formes

diferents. Primer, la P/CAF altera el complex CDK2/ciclina A per un mecanisme desconegut, possiblement alterant la seva conformació, i segon, acetila la ciclina A i la CDK2. Sabem que un mutant CDK2 K33Q (mutant considerat pseudoacetilat i per tant, no funcional), perd la interacció amb la ciclina A. És a dir, durant la fase S, el complex CDK2/ciclina A fa les seves funcions, però arriba un moment en què la P/CAF altera el complex inhibint-lo de les dues maneres abans mencionades. En aquest moment, que podria ser durant la fase G<sub>2</sub>, la ciclina A s'ha separat de la CDK2 i s'uneix a la CDK1. Recordem que per iniciar la mitosi la CDK1 ha d'estar unida a la ciclina A i que fins la prometafase no s'ha de degradar la ciclina A, així que ha de mantenir baixos els nivells d'acetilació i això vol dir que la HDAC3 ha de continuar estable. Segons aquesta hipòtesi, els nivells de fosforilació de la HDAC3 haurien de ser elevats i això ens faria pensar en què, ja no la CDK2 (la qual ja no forma part del complex que funciona en aquesta fase), sinó que també la CDK1 seria responsable de la fosforilació de la HDAC3. Això faria que la ciclina A es mantingués encara estable fins la prometafase, moment en què es degradaria.

A més, la unió de la ciclina A amb la P/CAF s'hauria de mantenir fins la degradació de la ciclina A, la qual es dona quan la ciclina A està unida a la CDK1. Per experiments d'acetilació *in vitro* sabem que la CDK1 també és substrat de la P/CAF, per tant quina conseqüència funcional podria tenir aquesta acetilació? Podria ser que estabilitzés la proteïna? S'haurien de realitzar més experiments per determinar el paper de la P/CAF respecte la CDK1.

## **CONCLUSIONS**



**Cèl·lules HeLa en divisió.** A l'esquerra es poden observar els cromosomes, i a la dreta, les dues cèl·lules just acabades de dividir.

Imatge DIC 525nM LED

Viki Allan, Peter March and Rachel Southern, Faculty of Life Science, University of Manchester

## Conclusions

1. HDAC1 i ciclina A colocalitzen al nucli, i interaccionen de forma directa.
2. HDAC1 i ciclina A interaccionen sobretot a les fases G<sub>1</sub> i G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular.
3. HDAC2 colocalitza amb la ciclina A, però no interacciona de forma directa.
4. HDAC3 colocalitza al nucli amb la ciclina A, i interacciona de forma directa a través de la regió que compren els aminoàcids 1-171.
5. La HDAC3 deacetila la ciclina A *in vitro*.
6. La manca de HDAC3 afecta la vida mitja de la ciclina A, disminuint-la de forma considerable.
7. Els mutants ciclina A 4R i ciclina A 171-432, mutants no acetilables, no es veuen afectats per la deleció de HDAC3.
8. A la mitosi, el mutant ciclina A 4R es degrada amb menys eficiència que la ciclina A WT suggerint que malgrat no patir la prèvia acetilació, es pot ubiquitinitzar.
9. La HDAC3 es degrada a la mitosi.
10. Un inhibidor general de les deacetilases, el TSA, estabilitza la proteïna.
11. En canvi, la roscovitina, un inhibidor específic CDKs, indueix la degradació de la HDAC3.



## *Conclusions*

## **ANNEX II**





ORIGINAL ARTICLE

## Degradation of cyclin A is regulated by acetylation

F Mateo<sup>1</sup>, M Vidal-Laliena<sup>1</sup>, N Canela<sup>1</sup>, L Busino<sup>2</sup>, MA Martinez-Balbas<sup>3</sup>, M Pagano<sup>2,4</sup>, N Agell<sup>1</sup> and O Bachs<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medicine, Department of Cell Biology and Pathology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Pathology, NYU Cancer Institute, Smilow Research Center, New York University School of Medicine, New York, NY, USA; <sup>3</sup>Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain and <sup>4</sup>Howard Hughes Medical Institute, New York University School of Medicine, New York, NY, USA

**Cyclin A accumulates at the onset of S phase, remains high during G<sub>2</sub> and early mitosis and is degraded at prometaphase. Here, we report that the acetyltransferase P/CAF directly interacts with cyclin A that as a consequence becomes acetylated at lysines 54, 68, 95 and 112. Maximal acetylation occurs simultaneously to ubiquitylation at mitosis, indicating importance of acetylation on cyclin A stability. This was further confirmed by the observation that the pseudoacetylated cyclin A mutant can be ubiquitylated whereas the nonacetyltable mutant cannot. The nonacetyltable mutant is more stable than cyclin A WT (cycA WT) and arrests cell cycle at mitosis. Moreover, in cells treated with histone deacetylase inhibitors cyclin A acetylation increases and its stability decreases, thus supporting the function of acetylation on cyclin A degradation. Although the nonacetyltable mutant cannot be ubiquitylated, it interacts with the proteins needed for its degradation (cdks, Cks, Cdc20, Cdh1 and APC/C). In fact, its association with cdks is increased and its complexes with these kinases display higher activity than control cycA WT–cdk complexes. All these results indicate that cyclin A acetylation at specific lysines is crucial for cyclin A stability and also has a function in the regulation of cycA-cdk activity.**

*Oncogene* (2009) 28, 2654–2666; doi:10.1038/onc.2009.127; published online 1 June 2009

**Keywords:** acetylation; cyclin A; degradation; P/CAF; ubiquitylation

### Introduction

Cell-cycle progression is governed by the family of cyclin-dependent kinases (cdks) (Morgan, 1997). Their activities are regulated by binding to regulatory subunits called cyclins, phosphorylation and binding to inhibitory proteins (Sherr and Roberts, 1999). During cell cycle, specific pairs of cyclin-cdks are formed and

activated. cdk1 together with cyclins A and B governs G<sub>2</sub>/M transition. G<sub>1</sub> progression is under the control of cyclin D-cdk4/6. Cyclin E-cdk2 triggers DNA synthesis and cyclin A-cdk2 drives S-phase progression (Malumbres and Barbacid, 2005). Whereas the levels of most cdks are relatively constant during cell cycle those of cyclins fluctuate, and in that way, they bind to and activate specific cdks.

Cyclin A levels are low during G<sub>1</sub> but they increase at the onset of S phase, when it contributes to the stimulation of DNA synthesis (Resnitzky *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1995). The amount of cyclin A remains high after S phase and in early mitosis when, by associating with cdk1, it drives the initiation of chromosome condensation and possibly nuclear envelope breakdown (Pagano and Draetta, 1991; Furuno *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2007). It is destroyed during prometaphase by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) by proteasome (den Elzen and Pines, 2001). Cyclin B levels rise during G<sub>2</sub> and then it binds to cdk1. This complex promotes the completion of chromosome condensation and spindle assembly, thus driving cell-cycle progression until metaphase. Cyclin B is degraded during metaphase, significantly later than cyclin A (Hagting *et al.*, 2002). Because each cyclin is responsible for the phosphorylation of a specific subset of cdk substrates, it is expected that after their degradation their specific substrates would be dephosphorylated. Thus, the ordered destruction of the different cyclins helps to order the sequence of events in late mitosis (Bloom and Cross, 2007). In fact, on time degradation of cyclins A and B is a key event for mitosis progression and nondegradable mutants of cyclin A cause cell arrest in metaphase, whereas those of cyclin B block cells during anaphase (Parry and O'Farrell, 2001; Sullivan and Morgan, 2007).

The signals that trigger cyclin A degradation at prometaphase are still a matter of controversy. Degradation is induced by APC/C bound to the targeting subunit Cdc20 (APC/C<sup>Cdc20</sup>) that is activated by phosphorylation by cyclin B-cdk1. Cyclin A degradation is spindle-checkpoint independent and thus, it starts as soon as APC/C<sup>Cdc20</sup> is activated (Geley *et al.*, 2001; den Elzen and Pines, 2001). In contrast, cyclin B1 degradation by APC/C<sup>Cdc20</sup> is sensitive to the spindle-assembly checkpoint. Therefore, at prometaphase

Correspondence: Professor O Bachs, Department of Cell Biology and Pathology, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: obachs@ub.edu

Received 25 November 2008; revised 11 March 2009; accepted 22 April 2009; published online 1 June 2009

unattached sister chromatids generate signals that allow inhibitory components of the spindle-assembly checkpoint, such as Mad2, to bind to Cdc20 and block its ability to interact with cyclin B1 (Fang *et al.*, 1998; Sudakin *et al.*, 2001). Moreover, a recent report indicates that to maintain the cell-cycle arrest induced by the spindle-assembly checkpoint, Cdc20 must be ubiquitinated and degraded (Nilsson *et al.*, 2008). Only when all chromatids are attached to the mitotic spindle at metaphase, the spindle-assembly checkpoint becomes inactivated and then cyclin B1 can be degraded. This different behavior of cyclin A and cyclin B degradation by the same APC/C complex indicates that distinct signals participate in targeting these cyclins for ubiquitylation and the subsequent degradation during mitosis (Geley *et al.*, 2001).

The association of cyclin A to its cdk partner is needed for its degradation, suggesting that Cdc20 binds to cyclin A through an extended motif that includes not only its N terminus but also its cdk partner (Wolthuis *et al.*, 2008). It has recently been reported that the cyclin A-cdk complex must bind a Cks protein to be degraded in prometaphase and it has been proposed that the cyclin A-cdk-Cks complex is recruited to the phosphorylated APC by its Cks protein. Then, its attached Cdc20 protein causes cyclin A to be degraded regardless of whether the spindle checkpoint is active or not (Wolthuis *et al.*, 2008).

In general, cyclins have a 'destruction box' that is a sequence recognized by the ubiquitylation machinery to degrade these proteins (Glotzer *et al.*, 1991). Cyclin A also has an extended 'destruction box' that includes aa 47–72 (Klotzbucher *et al.*, 1996). However, to totally avoid cyclin A ubiquitylation and degradation the first 171 aa of cyclin A must be eliminated, revealing that in addition to the extended 'destruction box' more sequences from the N terminus are needed for cyclin A degradation (Fung *et al.*, 2005).

Here we report that cyclin A can be acetylated *in vivo* and *in vitro* by the acetyltransferase P/CAF (p300/CBP-associated factor) at four specific lysine residues located in its N terminus. When these residues are substituted by arginines, cyclin A is less ubiquitylated, is much more stable and causes cell-cycle arrest at G<sub>2</sub>/M. Therefore, our results indicate that acetylation is a critical signal in the regulation of cyclin A degradation.

## Results

The putative *in vivo* acetylation of cyclin A was analysed in HCT116 cells transfected with HA-cyclin A. By immunoprecipitation (IP) with anti-HA antibodies followed by western blotting (WB) with anti-acetylated lysines (acetylK), we observed that cyclin A was acetylated in the cells (Figure 1a, left panel). *In vivo* labeling of ectopic HA-cyclin A was also observed in cells incubated with [<sup>3</sup>H]Na acetate. After labeling, cells were subjected to IP with anti-HA and acetylated cyclin A was visualized by autoradiography (Supplementary

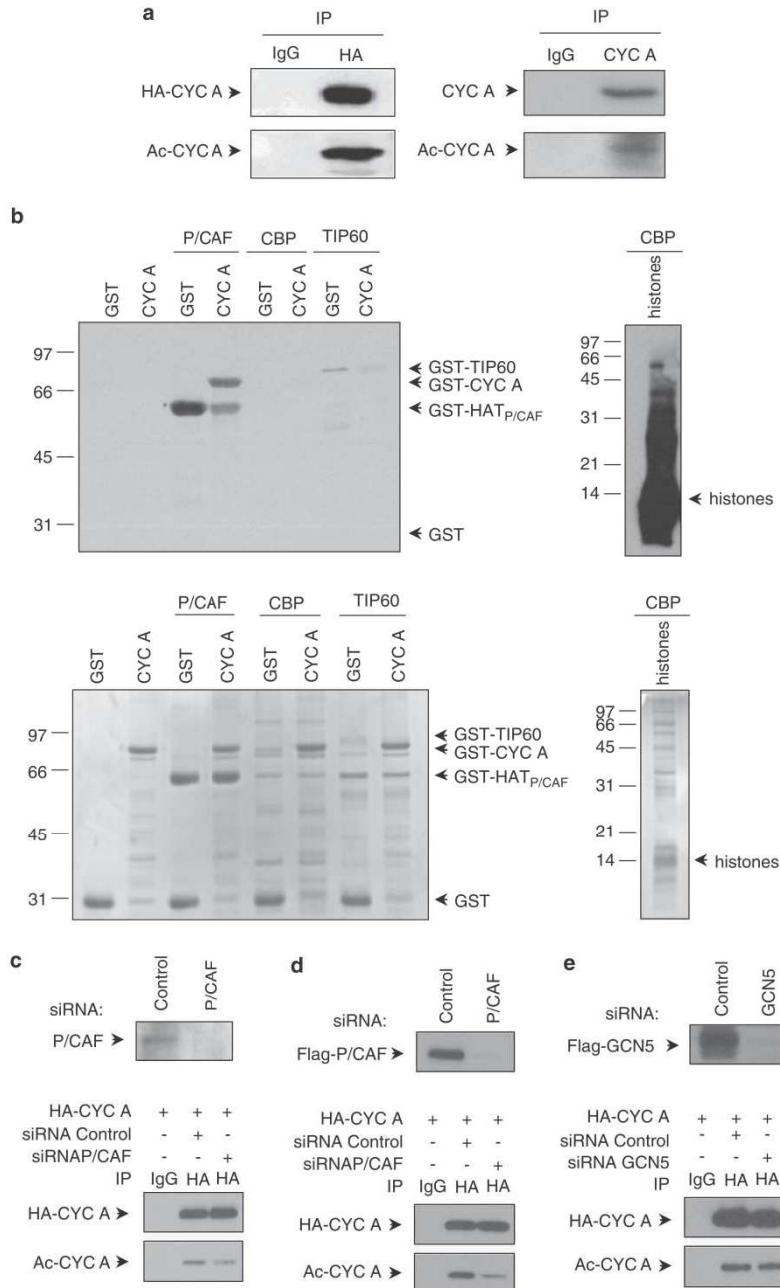
Figure S1). By IP with anti-cyclin A followed by WB with anti-acetylK we observed that endogenous cyclin A was also acetylated (Figure 1a, right panel). We subsequently aimed to identify the acetyltransferases that could be responsible for this acetylation. Thus, *in vitro* assays, using glutathione S-transferase (GST)-cyclin A as a substrate and different acetyltransferases as enzymes, were performed. As shown in Figure 1b, cyclin A was acetylated by P/CAF but not by CBP or TIP60. To further determine whether P/CAF was also involved in the *in vivo* acetylation of cyclin A, we analysed the effect of the depletion of endogenous or ectopic P/CAF on cyclin A acetylation. As shown in Figure 1c depletion of endogenous P/CAF (by a specific siRNA) significantly decreased cyclin A acetylation. Similarly, depletion of ectopic P/CAF in cells transfected with Flag-P/CAF resulted in a significant reduction of cyclin A acetylation (Figure 1d). Finally, decreasing the levels of ectopic GCN5 (an acetylase homologous to P/CAF) only produced a small diminution of cyclin A acetylation (Figure 1e). These results indicate a key function of P/CAF in the *in vivo* acetylation of cyclin A.

The putative *in vivo* interaction between cyclin A and P/CAF was first analysed by fluorescence microscopy in cyan fluorescent protein (CFP)-cyclin A-transfected and yellow fluorescent protein (YFP)-P/CAF-transfected cells. Results showed that both proteins colocalized in the nucleus (Figure 2a). The interaction between both proteins was further determined by IP experiments with anti-HA in cells co-transfected with YFP-P/CAF and HA-cyclin A. Subsequent WB analysis demonstrated the co-IP of cyclin A, P/CAF and cdk2 (Figure 2b). Finally, surface plasmon resonance analyses demonstrated the direct association between cyclin A and P/CAF (Figure 2c). We were also interested in determining the interaction between cyclin A and P/CAF during the cell cycle. For that purpose we first analysed the levels of cyclin A and P/CAF in cells synchronized at different phases of the cell cycle. We observed that the levels of P/CAF were high during S phase and G<sub>2</sub>/M, decreased at metaphase and remained low during G<sub>1</sub>. This behavior was similar to that observed for cyclin A (Figure 2d, left panel). Cdk2 was detected over all the cell cycle although the levels slightly varied depending on the cell-cycle phase. The interaction between cyclin A and P/CAF was analysed by IP experiments followed by WB. Results indicated that cyclin A and P/CAF mostly interacted during S phase and G<sub>2</sub>/M, when both proteins were most abundant. At these specific points of the cell cycle, cyclin A also interacted with cdk2. Interestingly, maximal acetylation of cyclin A was observed during G<sub>2</sub>/M although the protein was also acetylated during S phase (Figure 2d, right panel).

Among other regulatory functions, acetylation of lysine residues might affect protein stability in different ways. Thus, we decided to investigate whether acetylation could participate in the regulation of cyclin A stability. Cyclin A degradation largely depends on its N-terminal region and the lysine residues involved in cyclin A ubiquitylation and degradation are located in

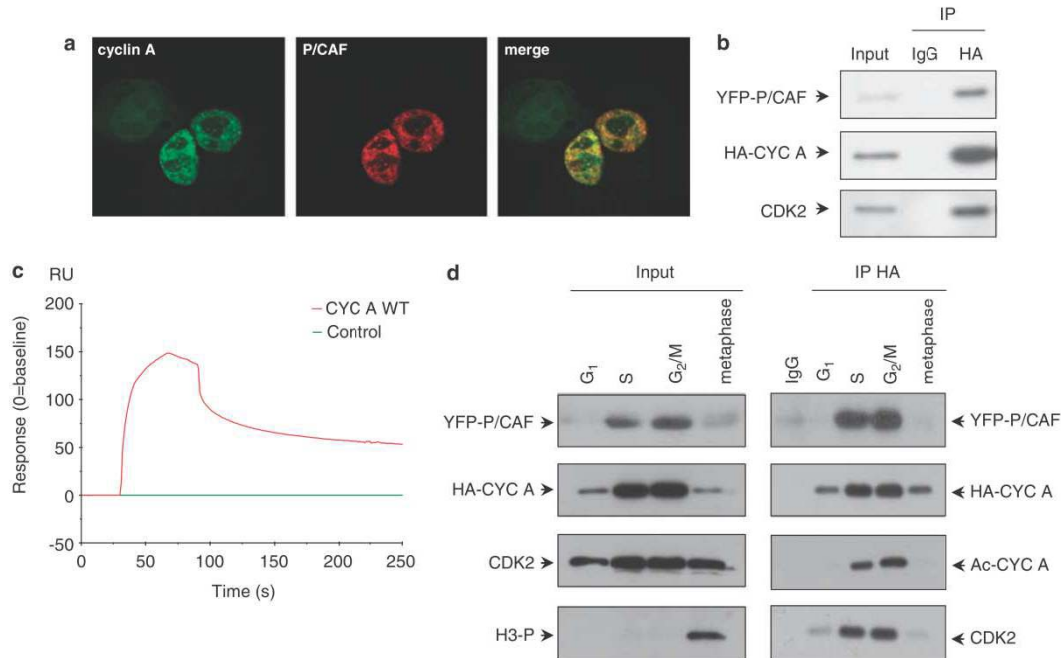
the first 171 aa of its sequence (Figure 3a) (Geley *et al.*, 2001; den Elzen and Pines, 2001). To study whether the acetylation sites were located in this cyclin A region that contains 12 lysines, we performed *in vitro* spot mapping

assays. Thus, 13 peptides (each one containing one or two consecutive lysines) belonging to this N-terminal region of cyclin A were synthesized and spotted on a membrane that was subjected to acetylation assays with



P/CAF (Supplementary Figure S2). An acetyltable peptide from histone H3 was used as a control. Results indicated that peptides containing K54, K68, K95 and K112 were acetylated (Figure 3b). To analyse whether these lysines were the major acetylation sites in the full-length protein, we generated a cyclin A mutant in which lysines 54, 68, 95 and 112 were substituted by arginines

(cycA 4R). This mutant was used for *in vitro* acetylation assays with P/CAF. Results indicated that differently from cyclin A WT (cycA WT) that was clearly acetylated by P/CAF, cycA 4R was not (Figure 3c). Finally, to further determine whether these four lysines were the major *in vivo* acetylation sites, we transfected cells with Flag-cycA WT or Flag-cycA 4R, subsequently



**Figure 2** Cyclin A interacts with P/CAF (p300/CBP-associated factor) and is acetylated at S and G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle. (a) COS cells were transfected with cyan fluorescent protein (CFP)-cyclin A and yellow fluorescent protein (YFP)-P/CAF and colocalization of both proteins was studied by fluorescence microscopy. (b) HeLa cells were transfected with HA-cyclin A and YFP-P/CAF. Cell extracts were subjected to immunoprecipitation (IP) using HA or IgG as a control followed by western blotting (WB) with antibodies against HA, P/CAF and cdk2. A sample of cell lysate (input) was used as a control. (c) The putative direct interaction between P/CAF and cyclin A was studied by surface plasmon resonance as described in Materials and methods section. P/CAF was fixed on the matrix and cyclin A was left to circulate on the chip. The interaction was represented in the sensorgram. (d) HeLa cells were transfected with HA-cyclin A and YFP-P/CAF and synchronized as described in Materials and methods section. Then, the levels of P/CAF, cyclin A and cdk2 were determined by WB (left panel). To confirm the time of mitosis, a WB with anti-H3P was performed (bottom, left panel). Cell extracts were subjected to IP with anti-HA and the amount of P/CAF, cyclin A, acetylated cyclin A and cdk2 was analysed by WB (right panel).

**Figure 1** Cyclin A is acetylated by P/CAF (p300/CBP-associated factor) *in vivo* and *in vitro*. (a) HCT116 cells transfected with HA-cyclin A were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-HA or IgG as a control, followed by western blotting (WB) with anti-HA or anti-acetylK (left panel). To analyse the acetylation of the endogenous protein, HCT116 cells were synchronized in G<sub>2</sub>/M (when levels of cyclin A are highest) and endogenous cyclin A was immunoprecipitated from cell extracts using anti-cyclin A or IgG as a control, followed by WB with anti-cyclin A or anti-acetylK (right panel). (b) Purified glutathione S-transferase (GST)-cyclin A was subjected to *in vitro* acetylation assays using the catalytic domain of P/CAF (GST-HAT<sub>P/CAF</sub>), GST-CBP or GST-TIP60 in the presence of [<sup>14</sup>C]acetylCoA. Purified GST was used as a negative control substrate. In the assays with P/CAF or TIP60, their auto-acetylation was used as a positive control, whereas in the case of CBP, histones were used as a positive control substrate. Acetylated proteins were visualized by autoradiography (top panel). A loading control gel was stained with Coomassie blue (bottom panel). (c) HCT116 cells were transfected with HA-cyclin A and control or P/CAF siRNA. Extracts were prepared and expression of endogenous P/CAF was analysed by WB (top panel). Part of the extracts was subjected to IP against HA or IgG as a control, followed by WB with anti-HA or anti-acetylK (bottom panel). (d) The same as in (c), but coexpressing HA-cyclin A and Flag-P/CAF together with control or P/CAF siRNA. (e) HCT116 cells were transfected with HA-cyclin A, Flag-GCN5 and control or GCN5 siRNA. Expression of GCN5 was analysed by WB (top panel) and IP was performed with the cell extracts using antibodies against HA or IgG as a control, followed by WB with anti-HA or anti-acetylK (bottom panel).

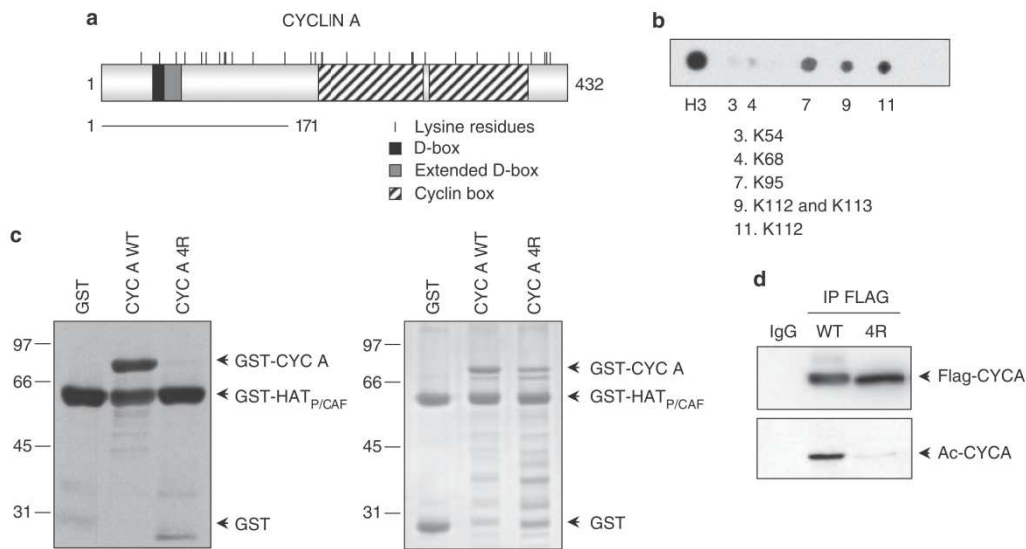
they were subjected to IP with anti-Flag and then cyclin A acetylation was determined by WB. Results revealed that cycA WT was acetylated whereas the mutant cycA 4R was not, indicating that these four lysines are the major *in vivo* acetylation sites (Figure 3d).

To further study the function of acetylation on cyclin A stability, we determined the half-life of cycA WT and cycA 4R in transfected cells. Figure 4a shows that the half-life of cycA WT is of around 6h whereas that of cycA 4R is much longer. These results suggested that acetylation participates in the degradation of cyclin A. To further confirm this possibility, we aimed to determine the stability of cyclin A under experimental conditions that increase cyclin A acetylation. For this purpose, cells were treated with histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate (NaB) or trichostatin A (TSA) (Abramova *et al.*, 2006; Baek *et al.*, 2006). After these treatments, the acetylation levels of histones (that were used as a control) and those of cyclin A were clearly increased (Figure 4b). It can also be observed that treated cells show reduced levels of cyclin A. Interestingly, the half-life of cyclin A in NaB- or TSA-treated cells was strongly reduced (2h) respect to that observed in nontreated cells (6 h) (Figure 4c).

Next we analysed the acetylation and ubiquitylation of cyclin A during cell cycle. Thus, Flag-cycA WT-transfected cells were synchronized by a double-thymidine block, treated with the proteasome inhibitor ALLN and subjected to IP with anti-Flag at different times

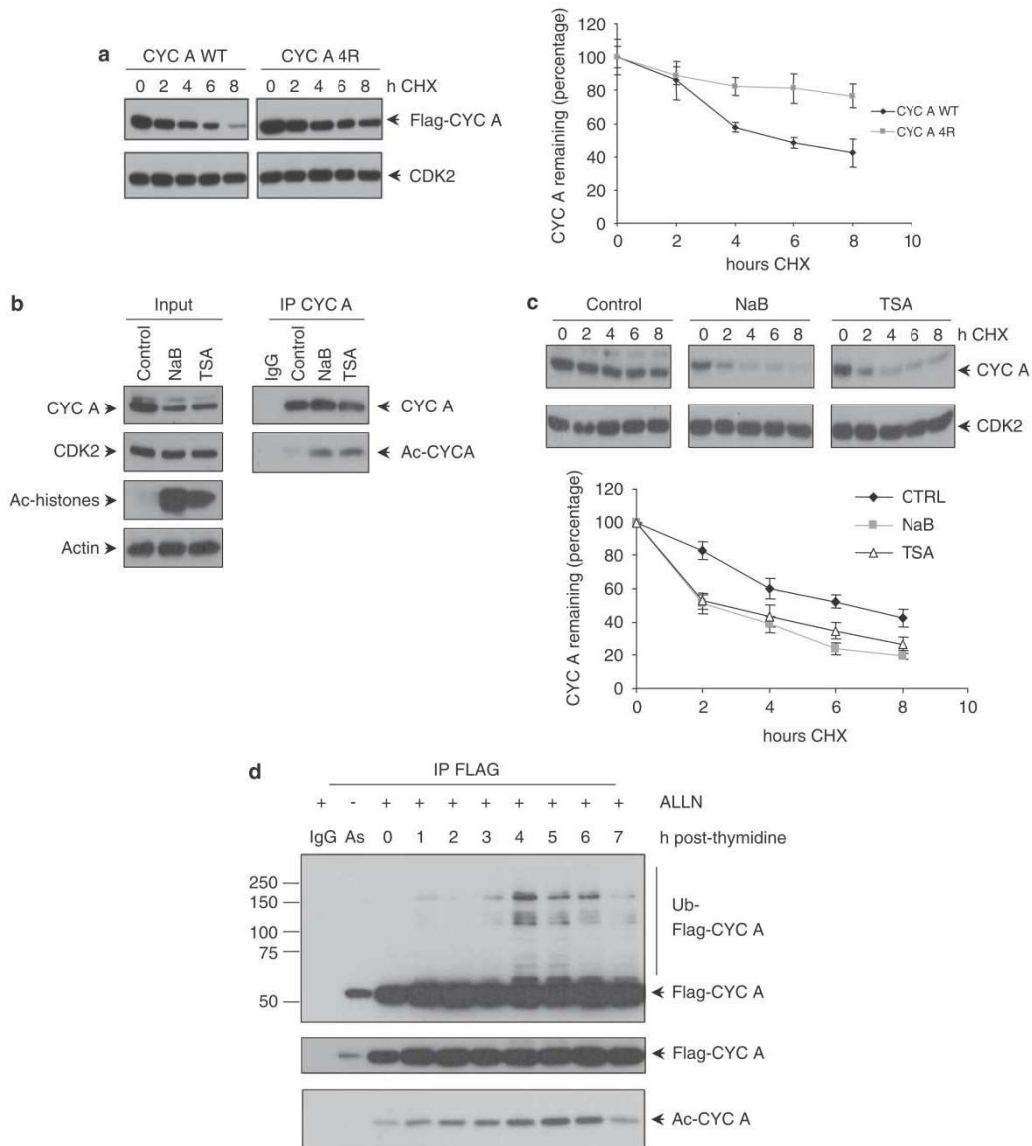
after the release of the blockade. When WB with anti-acetylK was performed, a peak of cyclin A acetylation was observed at 4–6h after the release (Figure 4d, bottom panel). Interestingly, during the same period of time a peak of cyclin A ubiquitylation was also observed (Figure 4d, upper panel). The simultaneous acetylation and ubiquitylation of cyclin A also supports that acetylation is involved in cyclin A ubiquitylation and degradation. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis revealed that under our experimental conditions at 4–6h after the release of the double-thymidine block cells are in mitosis (Supplementary Figure S3).

As it has been reported that nondegradable forms of cyclin A (lacking a part of the N terminus) cause arrest of cells in metaphase (Geley *et al.*, 2001; Fung *et al.*, 2005), we aimed to study the effect of the overexpression of the nonacetylatable and more stable cycA 4R mutant on cell-cycle progression. FACS analysis revealed a substantial block in G<sub>2</sub>/M in cells transfected with the cycA 4R mutant, whereas only a slight effect was observed in cells transfected with cycA WT (Figure 5a). To further analyse whether cycA 4R arrested cells in mitosis, cycA WT- or 4R-transfected cells were analysed by immunocytochemistry using anti-phosphorylated histone H3. Figure 5b shows that the number of mitosis was increased in cycA 4R-transfected cells and quantification analysis revealed a significant increase in the percentage of metaphases in these cells (Table 1).

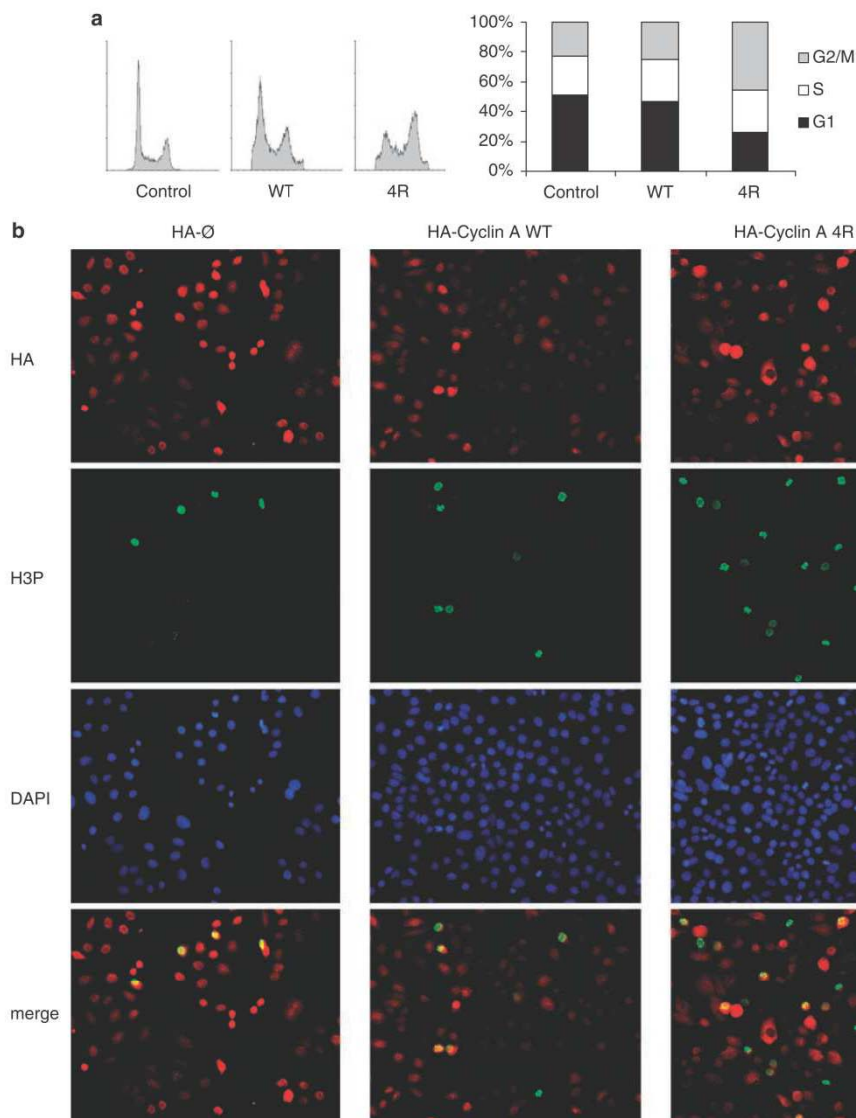


**Figure 3** Cyclin A is acetylated at lysines 54, 68, 95 and 112. **(a)** Schematic representation of cyclin A lysine residues and domains. **(b)** Thirteen peptides containing one or two consecutive lysines from the cyclin A fragment including aa 1–171 were spotted on a membrane (see also Supplementary Figure S2). As a positive control, a peptide from histone H3 was added. The membrane was subjected to *in vitro* acetylation assays with P/CAF (p300/CBP-associated factor) and [<sup>14</sup>C]acetylCoA. Acetylation was visualized by autoradiography. **(c)** Purified glutathione S-transferase (GST)-cycA WT and GST-cycA 4R were subjected to *in vitro* acetylation assays with P/CAF. Acetylation was visualized by autoradiography (left panel). A loading control gel was stained with Coomassie blue (right panel). **(d)** HeLa cells were transfected with Flag-cycA WT or Flag-cycA 4R. Cell extracts were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Flag followed by western blotting (WB) with anti-Flag and anti-acetylK.





**Figure 4** Acetylation affects cyclin A stability. **(a)** HeLa cells were transfected with Flag-cycA WT or Flag-cycA 4R, treated with cycloheximide (CHX), collected at different times of treatment and cyclin A levels analysed by WB. Cdk2 levels were used as a loading control. The amount of Flag-cyclin A was quantitated and represented in the graph. Results are the mean  $\pm$  s.e. of eight independent experiments. **(b)** HCT116 cells were treated with histone deacetylase inhibitors sodium butyrate (NaB, 4 mM) or trichostatin A (TSA, 500 nM) for 16 h. Then extracts were prepared and levels of cyclin A, cdk2, acetylated histones and actin were determined by western blotting (WB; left panel). Part of the extracts was used to perform immunoprecipitation (IP) with anti-cyclin A or IgG as a control followed by WB with anti-cyclin A and anti-acetylK (right panel). **(c)** HCT116 cells were treated with 4 mM of NaB or 500 nM TSA for 16 h. Then CHX was added to the cells and samples were collected at different times of CHX treatment. Levels of endogenous cyclin A were analysed by WB and cdk2 was used as a loading control. The amount of cyclin A was quantitated and represented in a graph. Results are the mean  $\pm$  s.e. of six independent experiments. **(d)** Flag-cyclin A-transfected cells were treated with the proteasome inhibitor ALLN, collected at different times after the release of a double-thymidine block and subjected to IP with anti-Flag. Cyclin A ubiquitylation was determined by WB with anti-Flag (top panel) and cyclin A acetylation with anti-acetylK (bottom panel). A shorter exposure of WB with anti-Flag is shown in the middle panel.



**Figure 5** Cyclin A 4R blocks cell-cycle progression at G<sub>2</sub>/M. **(a)** HeLa cells were mock-transfected as a control or transfected with cyan fluorescent protein (CFP)-cycA WT or CFP-cycA 4R. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of the population of transfected cells was performed and represented in a graph. Control of expression of CFP-cycA WT and CFP-cycA 4R is shown in Supplementary Figure S5. **(b)** HeLa cells were transfected with pEFHA empty vector or HA-cycA WT or HA-cycA 4R. 24 h after transfection, cells were fixed and immunofluorescence against HA and phosphorylated histone H3 was performed.

**Table 1** Analysis of percentage of mitosis

	n	% mitotic cells (mean ± s.d.)	% metaphase cells (mean ± s.d.)	% metaphase/mitosis (mean ± s.d.)
HA-∅	4027	1.72 ± 0.45	0.37 ± 0.04	22.68 ± 3.63
HA-Cyclin A WT	3066	1.65 ± 0.25	0.59 ± 0.11	35.05 ± 1.75
HA-Cyclin A 4R	3604	4.68 ± 0.32	3.36 ± 0.24	71.92 ± 0.58

Abbreviations: n, number of counted cells; s.d., standard deviation.

We further explored the possibility that the increased stability of cycA 4R could be due to defects in its ubiquitylation. Thus, *in vivo* ubiquitylation assays were performed. Cells were transfected with HA-ubiquitin plus Flag-cycA WT or Flag-cycA 4R, then subjected to IP with anti-Flag and finally the ubiquitylation levels were analysed by WB with anti-Flag and anti-HA. Results indicated that cycA WT was clearly ubiquitylated whereas ubiquitylation of cycA 4R was strongly reduced (Figure 6a). To study the function of acetylation in cyclin A ubiquitylation, we analysed the *in vivo* ubiquitylation of Flag-cycA 4Q, a mutant in which lysines 54, 68, 95 and 112 of cyclin A were substituted by glutamines. This form is considered to be a pseudoacetylated mutant because of the structure similarity between glutamine (Q) and the acetylated-lysine residue (Hecht *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2002). Results indicated that differently from cycA 4R, the mutant cycA 4Q was ubiquitylated similarly to cycA WT (Figure 6a). Interestingly, the half-life of cycA 4Q is shorter than that of cycA 4R but not as short as that of cycA WT, indicating that cycA 4Q can be degraded although not so efficiently as cycA WT (Supplementary Figure S4). Therefore, these results indicate that K54, K68, K95 and K112 are acetylation sites needed for cyclin A ubiquitylation.

We subsequently aimed to analyse the mechanisms underlying the differential ubiquitylation of cyclin A mutants. It is known that to be degraded cyclin A has to form a cyclin A-cdk-Cks complex that is recruited to the phosphorylated APC/C by its Cks protein. Cdc20 attached to this complex causes cyclin A to be degraded (Wolthuis *et al.*, 2008). Thus, we analysed the interactions of Flag-cycA WT, Flag-cycA 4R and Flag-cycA 4Q with Cdc20, Cdh1, APC3, Cks1/2, cdk1 and cdk2 in asynchronously growing cells. Results showed that the three forms of cyclin A interacted with Cdc20 and APC3 in a similar manner. However, cycA 4R and cycA 4Q showed an increased interaction with cdk1, cdk2, Cks and Cdh1 (Figure 6b). The specific interactions of the three cyclin A forms with Cdc20 and Cdh1 were further confirmed by IP experiments in cells transfected with Flag-Cdc20 or HA-Cdh1 plus each one of cyclin A forms (Figure 6c). Experiments carried out in cells synchronized in S phase or G<sub>2</sub>/M revealed that the interactions of the different cycA forms with all these proteins at these specific points are similar to those observed in asynchronously growing cells (data not shown).

Finally, we studied the direct interaction of cycA WT, cycA 4R and cycA 4Q with Cdc20, Cdh1, cdk2 and Cks1/2 by pull down using purified proteins. As shown in Figure 6d none of these cyclin A forms directly interacted with Cks 1/2 and the interaction with Cdc20, Cdh1 and cdk2 was similar in all the three cyclin A forms. These results indicate that the *in vivo* increased association of both cycA mutants with Cdh1 and cdk2 is not produced by a higher affinity for these proteins but by an unknown mechanism related to the *in vivo* complexes.

The increased *in vivo* interaction of cycA 4R and cycA 4Q with cdk1 and cdk2 is of particular interest because it might affect their kinase activity. To analyse this

possibility, we subjected cells transfected with Flag-cycA WT or Flag-cycA 4R to IP with anti-Flag and the associated cdk activity was determined in the immunoprecipitates. We observed that cycA 4R-cdk complexes display higher kinase activity than that of cycA WT-cdk complexes (Figure 7a). When cells were subjected to IP with anti-cdk2 we also observed an increased association of cycA 4R with cdk2 respect to that shown by cycA WT, and also a higher kinase activity in the cycA 4R-cdk2 complexes (Figure 7b). Similar results were observed with the cycA 4Q mutant (data not shown). So, in addition to the function in cyclin A stability, lysines 54, 68, 95 and 112 also have a function in the regulation of cyclin A interaction with cdk and its associated kinase activity.

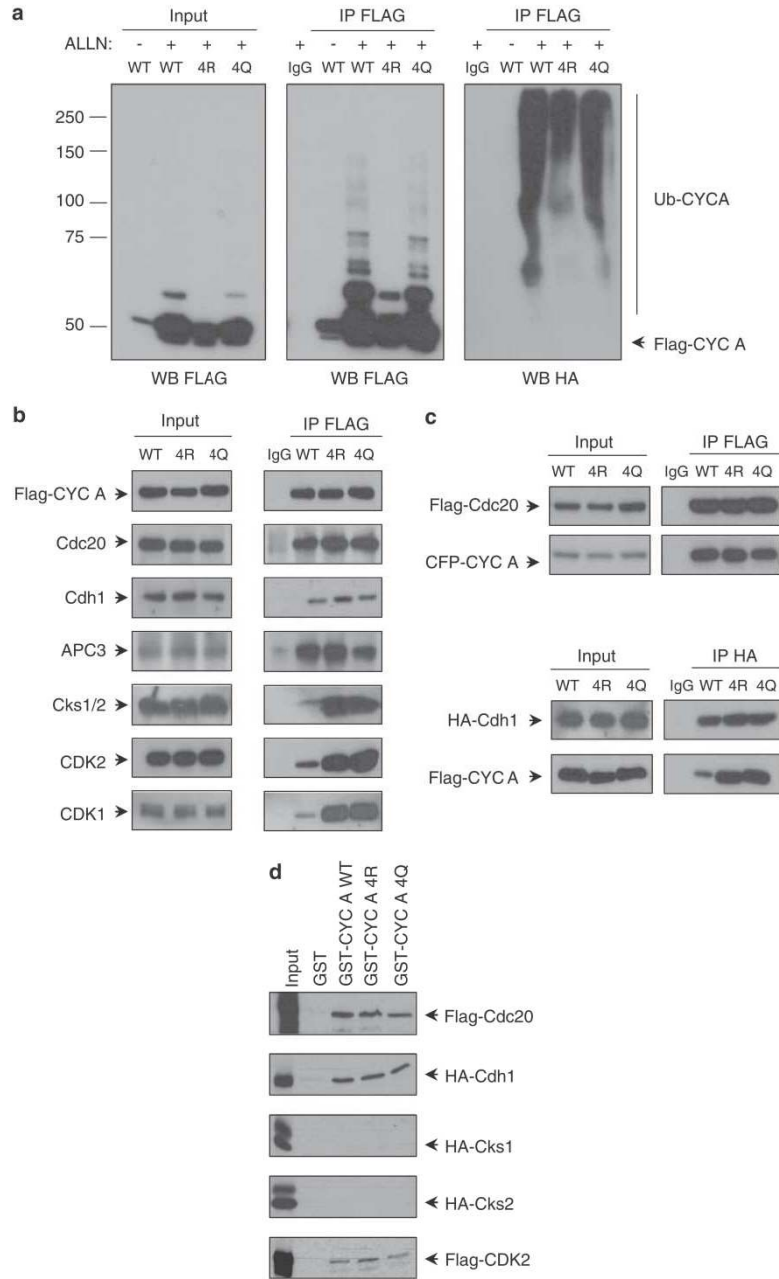
## Discussion

The different timing of cyclin A and cyclin B degradation at mitosis and the diverse sensitivity of these cyclins to the spindle-assembly checkpoint indicates that specific mechanisms target each one of these cyclins for degradation (van Leuken *et al.*, 2008). We report here that cyclin A acetylation by the acetyltransferase P/CAF participates in the signaling pathway that targets cyclin A for degradation at early mitosis. Acetylation is a posttranslational modification occurring at the Nε-amino group of lysines that might regulate protein functions in many different ways as for instance, protein-protein and protein-DNA interactions and protein stability. Lately, a number of reports have revealed that lysine acetylation might act as a direct signal enhancing protein degradation for proteins such as E2F1 (Galbiati *et al.*, 2005), HIF-1α (Jeong *et al.*, 2002), SV40T antigen (Shimazu *et al.*, 2006) and pRB (Leduc *et al.*, 2006). Moreover, the interplay between lysine acetylation and ubiquitylation has been reinforced by the evidence that at least four acetyltransferases (p300, CBP, P/CAF and TAF1) possess intrinsic ubiquitin activating/conjugating or ligase activities (Sadoul *et al.*, 2008).

We report here that P/CAF acetylates cyclin A at lysines K54, K68, K95 and K112 and that these lysines are the major acetylation sites both *in vivo* and *in vitro*. These specific residues are located in the N-terminal domain of cyclin A that has been involved in the stability of the protein (Wolthuis *et al.*, 2008). In fact, two of these lysines, K54 and K68, were already described as important residues for the ubiquitylation and degradation of cyclin A. Specifically, the authors reported that substitution of K37, K54 and K68 by arginines generates a more stable cyclin A but this mutant was still ubiquitylated (Fung *et al.*, 2005). As our observations indicate that lysines K54, K68, K95 and K112 are critical residues for acetylation, this means that at least K54 and K68 can be both acetylated and ubiquitylated. Thus, it is likely that when these lysines are acetylated, alternative ubiquitylation sites could be used. It has also been reported that in *Drosophila* the

substitution of eight lysines in the N-terminal domain of cyclin A by arginines generates an unusual enrichment of overcondensed metaphase chromosomes in injected embryos, similar to what has been observed with stable cyclin A (Ramachandran *et al.*, 2007). These data are

compatible with our results indicating that these lysines are critical for cyclin A stability. Thus, our results suggest that likely cyclin A acetylation at these specific lysines signals this protein for the subsequent ubiquitylation and degradation.



According to our observations, P/CAF is the principal histone acetyltransferase involved in cyclin A acetylation. In addition to acetylating histones, P/CAF also participates in the reversible acetylation of various transcriptional regulators such as the general transcription factors TF<sub>II</sub>E $\beta$  and TF<sub>II</sub>F (Imhof *et al.*, 1997) and the sequence-specific transcription factors E2F1 (Martinez-Balbas *et al.*, 2000), c-myc (Patel *et al.*, 2004), myo D (Patel *et al.*, 2004) and p53 (Gu and Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998). It has been implicated in many important cellular processes such as transcription, differentiation, proliferation and apoptosis (Schiltz and Nakatani, 2000). In the cell P/CAF is a subunit of multiprotein complexes that possess global histone acetylation activity and locus-specific coactivator functions together with acetyl transferase activity on non-histone substrates (Nagy and Tora, 2007). Recently, it has been described that in addition to acetylate p53, the intrinsic ubiquitylation activity of P/CAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2, indicating an important function of this acetylase in the DNA damage checkpoint (Linares *et al.*, 2007).

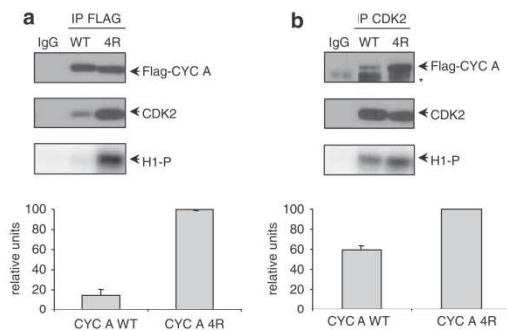
Interestingly, the levels of P/CAF oscillate during cell cycle similarly to those of cyclin A. They are low at G<sub>1</sub>, increase during S phase and remain high during G<sub>2</sub> and early mitosis to finally decrease before metaphase. As

the decrease of cyclin A is produced by degradation by the APC/C<sup>Cdc20</sup> complex, the similar behavior of P/CAF suggests that it could also be an APC/C<sup>Cdc20</sup> substrate. However, this is something that needs to be investigated.

Cyclin A associates with P/CAF during S phase and this interaction is maintained until early mitosis, then before metaphase this complex is disrupted. Concomitant to its association with P/CAF, cyclin A becomes acetylated. A more detailed time-course analysis indicates that cyclin A acetylation increases at early mitosis simultaneously to cyclin A ubiquitylation. All these data support that acetylation by P/CAF targets cyclin A for its ubiquitylation.

To be degraded cyclin A has to be bound to a cdk subunit that in turn has to be associated with a Cks protein. This cyclin A-cdk-Cks complex is then recruited to the phosphorylated APC/C by its Cks subunit. The Cdc20 attached to cyclin A causes cyclin A to be degraded regardless of the spindle checkpoint being active or not (Wolthuis *et al.*, 2008). Thus, a possibility was that cyclin A acetylation at these specific lysines might be required for the interaction with some of these proteins of the ubiquitylation machinery. However, the analysis of the interactions of cycA 4R and cycA 4Q with the proteins of the APC/C<sup>Cdc20</sup> ubiquitylation complex ruled out this possibility because these mutants retain the ability to interact with all the proteins of the complex. Thus, the lack of ubiquitylation of cycA 4R is not due to a reduced ability to form ubiquitylation complexes. A possible interpretation of these results is that acetylation of lysines 54, 68, 95 and 112 is needed for the correct incorporation of ubiquitin molecules on specific sites of cyclin A.

An unexpected result was the observation that the levels of cdk1, cdk2 and Cks associated with cycA 4R and cycA 4Q are much higher than those bound to cycA WT. These results could be interpreted in the sense that both cycA mutants display a much higher affinity for these proteins than cycA WT. However, this possibility was ruled out by results showing that the direct interaction between the cycA mutants and these proteins was similar to that shown by cycA WT. Thus, the *in vivo* increased interaction between cyclin A mutants and cdk2 is due to still unknown mechanisms. The increased interaction of cycA 4R and cycA 4Q with cdk2 is accompanied by a higher activity of these complexes. The fact that cycA 4Q can be ubiquitylated whereas cycA 4R cannot indicates that the elevated kinase activity of these complexes does not have a function in cyclin A ubiquitylation.



**Figure 7** Increased interaction of cycA 4R with cdk2 correlates with an increase in cyclin A-associated kinase activity. 293T cells were transfected with Flag-cycA WT or Flag-cycA 4R, lysed and immunoprecipitated with anti-Flag (a) or anti-cdk2 (b). Kinase assays of the immunoprecipitates were performed and phosphorylation of histone H1 was detected by PhosphorImager. Kinase activity was normalized to the amount of immunoprecipitated cdk2 and represented in the graphs. Results shown are the mean  $\pm$  s.e. of three independent experiments.



**Figure 6** Cyclin A WT, 4R and 4Q present differential ubiquitylation and interaction with components of the ubiquitylation machinery and cdk1 and cdk2. (a) HeLa cells were transfected with HA-ubiquitin plus Flag-cycA WT, Flag-cycA 4R or Flag-cycA 4Q and treated with the proteasome inhibitor ALLN. Then, they were lysed and subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Flag or IgG as a control. The levels of ubiquitylated cyclin A were determined by western blotting (WB) with anti-Flag and anti-HA. (b) 293T cells were transfected with Flag-cycA WT, 4R or 4Q, lysed and immunoprecipitated with anti-Flag. The presence of Flag-cyclin A, APC3, Cdh1, Cdc20, Cks1/2, cdk1 and cdk2 in the immunoprecipitates was determined by WB. (c) As described in panel b, but co-transfecting Flag-Cdc20 with CFP-cycA WT, 4R or 4Q, or co-transfecting HA-Cdh1 with Flag-cycA WT, 4R or 4Q. (d) Pull-down experiments using purified recombinant glutathione S-transferase (GST)-cycA WT, 4R and 4Q or GST as a control bound to glutathione Sepharose beads and *in vitro* translated, radiolabeled, Cdc20, Cdh1, cdk2, Cks1 and Cks2. Interacting proteins were visualized by autoradiography.

As a summary, results presented here reveal that acetylation at specific lysines is a new mechanism that targets cyclin A for degradation at early mitosis. In addition to that, our results also revealed an unexpected new mechanism for the regulation of cdk activity that depends on the integrity of four specific lysines of cyclin A.

## Materials and methods

### Plasmids

cDNA of wild-type cyclin A was cloned into pGEX6P1, pEFHA, pcDNA3-Flag and pECFP-C1 vectors. *cycA* 4R and *cycA* 4Q mutants were generated by site-directed mutagenesis. pCX-Flag-P/CAF, pGEX2TKP-HAT<sub>P/CAF</sub> (352–658), pGEX4T2-P/CAF (full length), pGEX2T-CBP and pGEX2T-TIP60 were a kind gift from MA Martinez-Balbás. pcDNA3.1-HA-Cdh1 and Flag-Cdc20 were a kind gift from M Pagano. pcDNA3-HA-Cks 1 and 2 were a kind gift from R Wolthuis. P/CAF shRNA and control shRNA were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

### Antibodies and reagents

Antibodies against cyclin A (H-432), cyclin A (BF-683)-AC (agarose conjugated), cdk2 (M-2), Cdc20 (H175) and Cks1/2 (FL-79) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Cdh1 (34-2000) was purchased from Zymed (South San Francisco, CA, USA). Anti-acetylated lysines (9441) and anti-phospho-histone H3 (Ser28) (9713) were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Antibodies against Flag (F7425), HA (H6908) and P/CAF (P7493) were purchased from Sigma, and APC3/Cdc27 (ab10538) from Abcam (Cambridge, UK). Anti-HA 12C5A for immunofluorescence was purchased from Roche (Basel, Switzerland). For IP we used monoclonal anti-HA agarose and monoclonal anti-Flag M2 affinity gel from Sigma. [<sup>14</sup>C]acetylCoA was purchased from PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Thymidine, nocodazole, cycloheximide, sodium butyrate and TSA were from Sigma. ALLN was from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). For transfection assays we used Lipofectamine 2000 from Invitrogen (Paisley, UK).

### Protein purification and in vitro acetylation

Protein expression and purification was performed as described (Canela *et al.*, 2006). Acetylase assays were performed as described (Martinez-Balbas *et al.*, 2000). For cyclin A acetylation assays, 1–10 μl of the different acetylases (5000–10000 c.p.m. activity on histones) were incubated with 6 μM of purified GST or GST-cyclin A and 0.02 μCi [<sup>14</sup>C]acetylCoA. For the spot-mapping experiment, the membrane was incubated in 3 ml of HAT buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol, 0.1% Nonidet P-40 (NP-40)) in the presence of GST-HAT<sub>P/CAF</sub> and [<sup>14</sup>C]acetylCoA, for 30 min at 30 °C. Then the membrane was washed, dried and subjected to autoradiography.

### Immunoprecipitation

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 μg/μl aprotinin, 10 μg/μl leupeptin) for 30 min on ice. Lysates (0.2–2 mg of protein) were incubated with Flag or HA or cyclin A agarose beads for 2 h at 4 °C. After three washes

with RIPA buffer, Laemmli buffer was added to the samples and they were electrophoresed.

### Surface plasmon resonance experiments

The surface plasmon resonance analysis was performed at room temperature using a Biacore T100 (Biacore International AB, GE Healthcare, New Jersey, NJ, USA). P/CAF purified protein was immobilized on a carboxymethylated dextran sensor chip (CM5) using the amine coupling method as described by the manufacturer. A blank immobilization was performed using the same method and was used as the reference surface. Purified full-length cyclin A was diluted in HBS-EP buffer (Biacore International AB) and was injected over the flow cells at a flow rate of 30 μl/min for 60 s. Following a dissociation time of 120 s, final regeneration of the surface was performed with a short pulse of 0.05% (w/v) SDS. The interaction between P/CAF and cyclin A was detected and presented as a sensorgram by plotting resonance units against time. Cells were fixed with 70% cold ethanol for 2 h at 4 °C, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and finally incubated with 50 μg/ml of propidium iodide (Sigma) and 200 μg/ml RNase for 30 min at room temperature. Analysis of DNA content was carried out in a BD Biosciences FACS Canto II (BD Biosciences, Erembodegen, Belgium). Data were analysed with WinMDI 2.9 software (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

### Immunofluorescence

To detect HA-cyclin A and H3P by immunocytochemistry, cells were grown in coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 15 min at room temperature, washed in PBS and blocked with 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 h. Then, coverslips were incubated with anti-HA (Roche; 12C5A, mouse monoclonal, 1:200 dilution) and anti-H3P (Cell Signaling; 9713, rabbit polyclonal, 1:200 dilution) for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere. They were then washed in PBS and incubated for 45 min at 37 °C with Alexa-Fluor 594 (Invitrogen, A11005, goat anti-mouse, dilution 1:500) and Alexa-Fluor 488 (Invitrogen, Molecular Probes; A11008, goat anti-rabbit, dilution 1:250). After that coverslips were washed, mounted on glass slides with Mowiol (Calbiochem) and analysed by fluorescence microscopy.

### In vivo ubiquitylation assays

Cells were transfected with indicated plasmids. At 24 h after transfection, cells were replated and treated with 100 μM ALLN for 16 h. Then, cells were harvested and subjected to IP as described (Fung *et al.*, 2005).

### In vitro protein-binding assay

The GST and GST-cycA WT, 4R and 4Q were expressed in *Escherichia coli*. These fusion proteins were bound to glutathione Sepharose beads (Glutathione Sepharose 4B; GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) and washed with NETN (20 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8), 0.5% NP-40, 100 mM NaCl). Beads were then incubated for 1 h at room temperature with <sup>35</sup>S-labeled Flag-CDK2, Flag-Cdc20, HA-Cdh1, HA-Cks1 or HA-Cks2 proteins, *in vitro* transcribed and translated using the Promega TnT kit (Promega, Madison, WI, USA). Beads were extensively washed with NETN 150 mM NaCl, and the bound material was analysed by SDS-polyacrylamide gel followed by autoradiography.

### Immunoprecipitation and kinase assays

After three washes in IP buffer and two in kinase buffer (50 mM HEPES (pH 7.4), 2.5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) immunoprecipitates were resuspended in a final volume of

30  $\mu$ l of kinase buffer containing 15  $\mu$ M ATP, 10  $\mu$ Ci of [<sup>32</sup>P]ATP, 2 mM dithiothreitol and 2  $\mu$ g of histone H1 for 30 min at 30 °C. Reactions were stopped by the addition of Laemmli buffer. Samples were then electrophoresed on 12% SDS-PAGE and then stained with Coomassie blue and dried. The radioactivity associated to the gels was detected with a PhosphorImager (BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Abramova MV, Pospelova TV, Nikulenkov FP, Hollander CM, Fornace Jr AJ, Pospelov VA. (2006). G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* **281**: 21040–21051.
- Baek SY, Kim SR, Bae MK, Hwang JW, Kim JS, Choi YH *et al*. (2006). Trichostatin A increases the thermosensitivity of human glioblastoma A172 cells. *Neurosci Lett* **396**: 230–234.
- Bloom J, Cross FR. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 149–160.
- Canela N, Orzaez M, Fucho R, Mateo F, Gutierrez R, Pineda-Lucena A *et al*. (2006). Identification of an hexapeptide that binds to a surface pocket in cyclin A and inhibits the catalytic activity of the complex cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J Biol Chem* **281**: 35942–35953.
- den Elzen N, Pines J. (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* **153**: 121–136.
- Donzelli M, Squatrito M, Ganoth D, Hershko A, Pagano M, Draetta GF. (2002). Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J* **21**: 4875–4884.
- Fang G, Yu H, Kirschner MW. (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* **2**: 163–171.
- Fung TK, Yam CH, Poon RY. (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, 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 MI, Giacca M. (2005). Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle* **4**: 930–939.
- Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters JM, 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.
- Glutzer M, Murray AW, Kirschner MW. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132–138.
- Gong D, Pomerening JR, Myers JW, Gustavsson C, Jones JT, Hahn AT *et al*. (2007). Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol* **17**: 85–91.
- Gu W, Roeder RG. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595–606.
- Hagting A, den Elzen N, Vodermaier HC, Waizenegger IC, Peters JM, Pines J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* **157**: 1125–1137.
- Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, 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.
- Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* **7**: 689–692.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH *et al*. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* **111**: 709–720.
- Klotzbucher A, Stewart E, Harrison D, Hunt T. (1996). The 'destruction box' of cyclin A allows B-type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed. *EMBO J* **15**: 3053–3064.
- Leduc C, Claverie P, Eymin B, Col E, Khochbin S, Brambilla E *et al*. (2006). p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* **25**: 4147–4154.
- Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* **277**: 50607–50611.
- Linares LK, Kiernan R, Triboulet R, Chable-Bessia C, Latreille D, Cuvier O *et al*. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol* **9**: 331–338.
- Malumbres M, Barbacid M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**: 630–641.
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* **19**: 662–671.
- Morgan DO. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261–291.
- Nagy Z, Tora L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**: 5341–5357.
- Nilsson J, Yekezare M, Minshull J, Pines J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol* **10**: 1411–1420.
- Pagano M, Draetta G. (1991). Cyclin A, cell cycle control and oncogenesis. *Prog Growth Factor Res* **3**: 267–277.
- Parry DH, O'Farrell PH. (2001). The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr Biol* **11**: 671–683.
- Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ *et al*. (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* **24**: 10826–10834.
- Ramachandran V, Matzkies M, Dienemann A, Sprenger F. (2007). Cyclin A degradation employs preferentially used lysines and a cyclin box function other than Cdk1 binding. *Cell Cycle* **6**: 171–181.
- Resnitzky D, Hengst L, Reed SI. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* **15**: 4347–4352.
- Rosenberg AR, Zindy F, Le Deist F, Mouly H, Metezeau P, Brecht C *et al*. (1995). Overexpression of human cyclin A advances entry into S phase. *Oncogene* **10**: 1501–1509.
- Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin S. (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* **90**: 306–312.

- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Busin M, Vassilev A *et al.* (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**: 2831–2841.
- Schiltz RL, Nakatani Y. (2000). The PCAF acetylase complex as a potential tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* **1470**: M37–M53.
- Sherr CJ, Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501–1512.
- Shimazu T, Komatsu Y, Nakayama KI, Fukazawa H, Horinouchi S, Yoshida M. (2006). Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene* **25**: 7391–7400.
- Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* **154**: 925–936.
- Sullivan M, Morgan DO. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 894–903.
- van Leuken R, Clijsters L, Wolthuis R. (2008). To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta* **1786**: 49–59.
- Wolthuis R, Clay-Farrace L, van Zon W, Yekezare M, Koop L, Ogink J *et al.* (2008). Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Mol Cell* **30**: 290–302.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)





# The transcriptional co-activator PCAF regulates cdk2 activity

Francesca Mateo<sup>1,2</sup>, Miriam Vidal-Laliena<sup>1,2</sup>, Núria Canela<sup>1,2</sup>, Annalisa Zecchin<sup>3</sup>, Marian Martínez-Balbás<sup>5,6</sup>, Neus Agell<sup>1,2</sup>, Mauro Giacca<sup>3,4</sup>, María Jesús Pujol<sup>1,2</sup> and Oriol Bachs<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, <sup>2</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, <sup>3</sup>Molecular Medicine Laboratory, International Centre for Engineering and Biotechnology (ICGEB), <sup>4</sup>Department of Biomedicine, Faculty of Medicine, University of Trieste, Italy, <sup>5</sup>Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and <sup>6</sup>Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

Received March 31, 2009; Revised and Accepted September 3, 2009

## ABSTRACT

**Cyclin dependent kinases (cdks) regulate cell cycle progression and transcription. We report here that the transcriptional co-activator PCAF directly interacts with cdk2. This interaction is mainly produced during S and G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle. As a consequence of this association, PCAF inhibits the activity of cyclin/cdk2 complexes. This effect is specific for cdk2 because PCAF does not inhibit either cyclin D3/cdk6 or cyclin B/cdk1 activities. The inhibition is neither competitive with ATP, nor with the substrate histone H1 suggesting that somehow PCAF disturbs cyclin/cdk2 complexes. We also demonstrate that overexpression of PCAF in the cells inhibits cdk2 activity and arrests cell cycle progression at S and G<sub>2</sub>/M. This blockade is dependent on cdk2 because it is rescued by the simultaneous overexpression of this kinase. Moreover, we also observed that PCAF acetylates cdk2 at lysine 33. As this lysine is essential for the interaction with ATP, acetylation of this residue inhibits cdk2 activity. Thus, we report here that PCAF inhibits cyclin/cdk2 activity by two different mechanisms: (i) by somehow affecting cyclin/cdk2 interaction and (ii) by acetylating K33 at the catalytic pocket of cdk2. These findings identify a previously unknown mechanism that regulates cdk2 activity.**

## INTRODUCTION

Cyclin dependent kinases (cdks) are key enzymes for the regulation of cell cycle progression and transcription (1).

Their activities are firstly regulated by their binding to regulatory subunits called cyclins (2). A specific subset of cyclin/cdk complexes participates in the control of cell cycle progression by being activated at different stages of the cell cycle, thus driving the cells through its different phases. It is now clear that cdk1 bound to cyclins A and B governs G<sub>2</sub>/M transition (3). G<sub>1</sub> progression is primarily under the control of cyclin D/cdk4/6 (4). Finally, cyclins E and A paired to cdk2 are required for G<sub>1</sub>/S transition and progression through S phase (1,5).

Cyclin/cdk complexes are additionally regulated by a number of mechanisms including phosphorylation and binding to inhibitory proteins. Thus, in addition to cyclin binding most cdks require phosphorylation at a conserved residue (Thr 160 in human cdk2) to achieve full kinase activity. The enzyme responsible for this phosphorylation is CAK, that consists in the cdk7/cyclin H/Mat 1 trimer (6). Major cdks can also be inhibited by phosphorylation at a conserved tyrosine (Tyr 15) and at its adjacent threonine (Thr 14). These phosphorylations are carried out by Wee1 and Myt1 in vertebrate cells and can be removed by the phosphatase cdc25 (7). Finally, cdk activity is also regulated by binding to members of two families of inhibitors (CKIs): the Ink4 family (p16<sup>ink4a</sup>, p15<sup>ink4b</sup>, p18<sup>ink4c</sup> and p19<sup>ink4d</sup>) and the Cip/Kip family (p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> and p57<sup>Kip2</sup>) (8). The members of the Ink4 family only interact with cdk4 and cdk6 inhibiting their activities. In contrast, the Cip/Kip members bind to all known cyclin/cdk complexes. These proteins are potent inhibitors of cyclin/cdk2, but they also inhibit the other cyclin/cdk complexes, although in a less extension.

Apart from participating in cell cycle regulation cyclinA/cdk2 also plays a role in the control of the transcriptional activity of steroid receptors (9). For instance, both the estrogen receptor (ER) and the progesterone receptor (PR) are activated by cyclin

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 93 403 52 86, Fax: +34 93 402 19 07; Email: obachs@ub.edu

© The Author(s) 2009. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A/cdk2. In the first case, this complex directly phosphorylates ER, thus potentiating its transcriptional activity (10). In the second case, cyclin A/cdk2 phosphorylates the co-activator SRC-1, fact that enhances its affinity for PR and thus increases gene expression (11). Thus, in the promoters regulated by these receptors cyclin A/cdk2 participates in multi-protein complexes that also contain transcription factors, co-repressors and co-activators including acetyltransferases.

During the last decade a growing number of evidences indicate that acetylation, a post-translational modification occurring at the N $\epsilon$ -amino-group of lysines, might regulate protein functions in many different ways as, for instance, protein-protein interaction, protein association to DNA and protein stability (12). Recently, it has been shown that cdk9, a member of the cdk family involved in transcriptional regulation, is acetylated by Gcn5 and PCAF at lysines 44 and 48 that are located at the catalytic pocket of the enzyme (13). In particular, K48 is essentially involved in orienting the ATP phosphate residues within the catalytic pocket and thus, acetylation of this lysine residue inactivates the enzyme (13,14). Therefore, acetylation of cdk9 at these specific lysines is a new mechanism involved in transcriptional regulation. Lysine K48 is conserved in all the members of the cdk family and this fact suggests that other cdks may be susceptible to be acetylated at this site. For this reason, we aimed to explore whether acetylases might participate in the regulation of cdk2 activity. Recently, we observed that the acetyltransferase PCAF can acetylate cyclin A at specific lysines, leading to its degradation (15). PCAF is homologous to GCN5 and in vertebrate cells both proteins are subunits of the SAGA-type multiprotein complexes. These complexes are co-activators that stimulate transcription in part via acetylation and modification of nucleosomes, in cooperation with nucleosome remodeling enzymes and by physically recruiting the mediator complex (16,17).

We report here that PCAF directly binds to cdk2, acetylates K33 and as a consequence inhibits its kinase activity. Moreover, our results also revealed that merely the interaction of PCAF with cyclin/cdk2 complexes, in the absence of acetylation, inhibits cdk2 activity. This effect is specific because PCAF does not inhibit the activities of either cyclin B/cdk1 or cyclin D3/cdk6 complexes. Therefore, PCAF can regulate cdk2 activity by two different mechanisms: acetylation of K33 of cdk2 and disturbing cyclin/cdk2 complexes independently of acetylation.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmids

cDNA of wild-type cdk2 was cloned into pGEX2T and pECFP-C1 vectors. pUHDP1-Flag-cdk2 WT and K33R and pGEX2T-cdk2 K33R were a generous gift from R. Poon (Hong Kong). pECFP-C1-cdk2 K33R, pUHDP1-Flag-cdk2 K33Q and pGEX2T-cdk2 K33Q were generated by site-directed mutagenesis. All the vectors harboring different acetylases or their fragments used in

this work were provided by MA. Martínez-Balbás and M. Giacca.

### Antibodies and reagents

Antibodies against cyclin A (H-432), PCAF (E-8), cdk2 (M-2) and cdk2 (D-12) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-phospho-histone H3 (Ser 28) (#9713) and anti-acetylated lysines (#9441) were from Cell Signaling. Anti-acetylated cdk9 was from M. Giacca's laboratory. Antibodies against SPT3 were a kind gift from E. Martinez (California). Antibodies against FLAG (F7425) and PCAF (P7493) were obtained from Sigma. For immunoprecipitation, we used monoclonal anti-FLAG M2 affinity gel from Sigma. For pull-down experiments, we conjugated purified proteins to CNBr-sepharose beads (Pharmacia). Thymidine and Nocodazole used in cell synchronization were from Sigma. [<sup>32</sup>P]ATP used in kinase assays was purchased from Amersham and [<sup>14</sup>C]acetylCoA used in the *in vitro* acetylation experiments was from Perkin Elmer.

### Cell culture, transfection and synchronization

Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Transfection experiments were performed using Lipofectamine 2000 from Invitrogen. Transfected synchronized cells were obtained as described (18).

### Immunocytochemistry and fluorescence microscopy

For intracellular localization analysis of PCAF and cdk2, cells were grown on coverslips and fixed in 4% paraformaldehyde-phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature. Coverslips were then washed three times (5 min each) in PBS, permeabilized and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) + 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature, and then incubated for 1 h at 37°C in a humidified atmosphere with a monoclonal anti-PCAF antibody (E-8, Santa Cruz Biotechnology) at a 1:100 dilution and a polyclonal cdk2 antibody (M2, Santa Cruz Biotechnology), at a 1:200 dilution. Coverslips were then washed three times (5 min each) in PBS and incubated for 45 min at 37°C with an Alexa 594 anti-mouse antibody and an Alexa 488-conjugated anti-rabbit antibody (dilution 1:500 in both cases; Jackson). Coverslips were washed, mounted on glass slides with Mowiol (Calbiochem) and analyzed by fluorescence microscopy. For intracellular localization analysis of CFP and YFP fusion proteins, transfected cells were grown on coverslips and fixed as described above, then washed 3 times in PBS and mounted.

### Protein purification, pull-down and immunoprecipitation

Protein expression and purification was performed as described (19). For pull-down experiments, cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 μg/μl aprotinin, 10 μg/μl leupeptin) for

30 min on ice. Lysates (0.2–2 mg of protein) were incubated with CNBr-sepharose beads conjugated with purified GST, GST-HAT(PCAF) or GST-PCAF (full length) in the case of pull-down, or with anti-FLAG M2 affinity gel in the case of immunoprecipitation, for 2 h at 4°C. After three washes with RIPA buffer, Laemmli buffer was added to the samples and they were subsequently electrophoresed.

#### Surface plasmon resonance experiments

The Surface plasmon resonance (SPR) analysis is a method that permits to analyze the direct interaction between two proteins. SPR detects binding interactions by monitoring the reflection of a beam of light off the interface between an aqueous solution of potential binding molecules and a biosensor surface carrying an immobilized bait protein. The analysis of the interaction between PCAF and cdk2 was performed at room temperature using a Biacore T100 (Biacore International AB). Purified recombinant proteins GST-PCAF and GST-*cdk2* were cleaved with Thrombin protease (Sigma) to remove GST. Then, PCAF was immobilized on a carboxymethylated dextran sensor chip (CM5) using the amine coupling method as described by the manufacturer. A blank immobilization was performed using the same method and was used as the reference surface. Purified full-length *cdk2* was diluted in HBS-EP buffer (Biacore International AB) and was injected over the flow cells at a flow rate of 30  $\mu$ l/min for 60 s. Following a dissociation time of 120 s, final regeneration of the surface was performed with a short pulse of 0.05% (w/v) SDS. The interaction between PCAF and *cdk2* was detected and presented as a sensorgram by plotting resonance units against time.

#### Kinase assays

Purified active cyclin A/*cdk2*, cyclin E/*cdk2*, cyclin B/*cdk1* and cyclin D3/*cdk6* were purchased from Upstate Biotechnology. Purified recombinant proteins were resuspended in a final volume of 30  $\mu$ l of kinase buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 2.5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) containing 12.5  $\mu$ M ATP, 1  $\mu$ Ci of [<sup>32</sup>P]ATP, 2 mM dithiothreitol and 2  $\mu$ g of histone H1. Then, they were incubated for 30 min at 30°C. Samples (25  $\mu$ l) were spotted on the center of a 2 cm  $\times$  2 cm P81 paper square. After three washes with 1% phosphoric acid, papers were left to dry, then transferred to vials with 10 ml scintillation cocktail and activity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409). In some experiments, reactions were stopped by adding Laemmli buffer and samples were electrophoresed in 12% SDS-polyacrylamide gels and then stained with Coomassie Blue and dried. The radioactivity associated to the gels was detected with a PhosphorImager. Experiments involving immunoprecipitation followed by *cdk* activity assays were performed as described in (19).

#### Cell proliferation assays

Cells were transfected with Flag-PCAF or empty vector then counted and seeded in 6 well-plates. Measurements of

the number of cells were performed at different times after transfection and represented in a graph. Cell proliferation was also measured using inducible cell lines expressing C-terminus-PCAF $\Delta$ HAT (Cterm $\Delta$ HAT, 352–832,  $\Delta$ 527–547). This cell line was provided by M. Ventura (Barcelona)

#### Flow cytometry analysis

Cells were fixed with 70% cold ethanol for 2 h at 4°C, washed with PBS, and finally incubated with 2  $\mu$ M TOPRO-3 (Invitrogen) and 200  $\mu$ g/ml RNase for 30 min at room temperature. Analysis of DNA content was carried out in a BD Biosciences FACS Canto II. Data was analysed with WinMDI 2.9 software.

#### In vitro acetylation

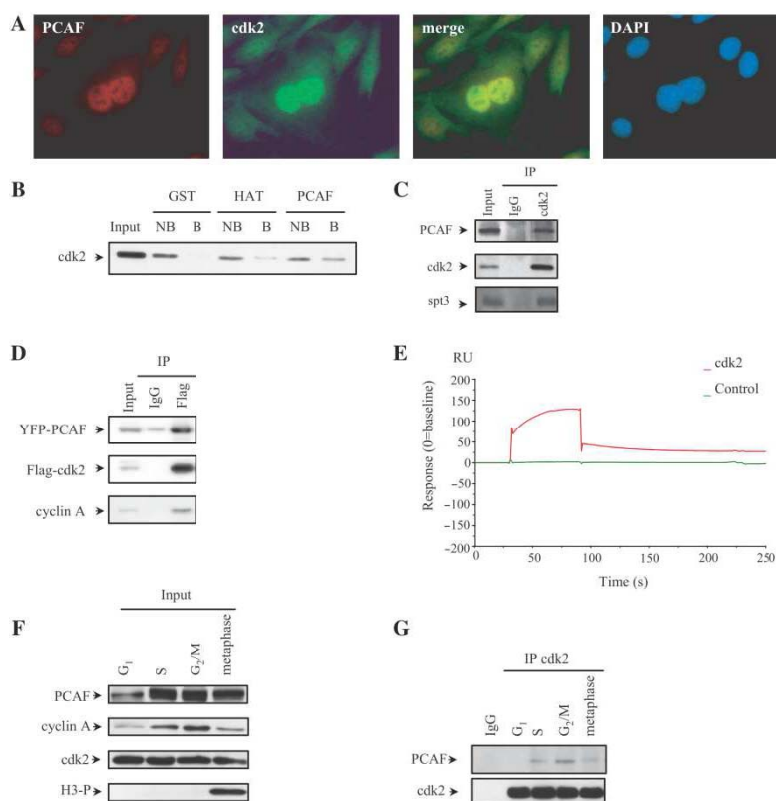
Acetylase assays were performed as described (20). For *cdk2* acetylation assays, 1–10  $\mu$ l of the different acetylases (5000–10 000 c.p.m. activity on histones) were incubated with 6  $\mu$ M of purified GST or GST-*cdk2* and 0.02  $\mu$ Ci [<sup>14</sup>C]acetylCoA for 30 min at 30°C. Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer. Then, samples were electrophoresed and transferred onto a nitrocellulose membrane. After that, the membrane was subjected to autoradiography. For the spot-mapping experiment, the membrane containing the spotted peptides was incubated in 3 ml of HAT buffer (50 mM Tris–HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycerol, 0.1% NP-40) in the presence of GST-HAT(PCAF) and [<sup>14</sup>C]acetylCoA, for 30 min at 30°C. Then the membrane was washed, dried and subjected to autoradiography.

## RESULTS

### Cdk2 interacts with the acetyltransferase PCAF

With the aim to analyze the putative interaction between *cdk2* and the acetylase PCAF, we first studied the intracellular distribution of both proteins in C2C12 cells by immunofluorescence using specific antibodies against PCAF and *cdk2*. Figure 1A shows that both proteins co-localized in the nucleus. Supplementary Figure S1A and B show single staining for PCAF or *cdk2*. Nuclear co-localization of both proteins was also observed by fluorescence confocal microscopy of cells transfected with YFP-PCAF and CFP-*cdk2* (Supplementary Figure S1C). Pull-down experiments using the full length GST-PCAF or the catalytic domain of PCAF (HAT domain) revealed that *cdk2* binds to both of them (Figure 1B). In contrast, no binding of *cdk2* to the control GST-beads was observed.

To analyze the *in vivo* interaction between endogenous *cdk2* and PCAF, cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-*cdk2* and the immunoprecipitates were analyzed by western blot (WB). Results showed that PCAF associates with *cdk2* in the cells (Figure 1C). Interestingly, these complexes contain SPT3, a protein subunit of the GCN5/PCAF multiprotein complexes (21). A similar interaction was observed with ectopic YFP-PCAF and Flag-*cdk2* proteins (Figure 1D). These



**Figure 1.** Cdk2 interacts with the acetyltransferase PCAF. (A) C2C12 cells were fixed and stained with antibodies against PCAF and cdk2 and colocalization of both proteins was studied by fluorescence microscopy. (B) CNBr-sepharose beads coupled to GST, GST-HAT (PCAF) or GST-PCAF (full length) were incubated with HCT-116 cell extracts and pull-down experiments were performed. The presence of cdk2 in the precipitates was analysed by WB. NB, not bound; B, bound. (C) C2C12 cell extracts were subjected to IP with IgG as a control and anti-ckd2 in order to immunoprecipitate the endogenous protein. Then, WB was performed to detect endogenous cdk2, PCAF and SPT-3. A sample of cell lysate (input) is shown in the first lane. (D) HeLa cells were transfected with YFP-PCAF and Flag-ckd2. Cell extracts were subjected to IP using anti-Flag or IgG as a control followed by WB with antibodies against Flag, PCAF or cyclin A. A sample of cell lysate (input) was used as a control. (E) The putative direct interaction between PCAF and cdk2 was studied by Surface Plasmon Resonance as described in 'Materials and Methods' section. PCAF was fixed on the matrix and cdk2 was left to circulate on the chip. The interaction was represented in the sensorgram. (F) C2C12 cells were synchronized by a double-thymidine block or nocodazole as described in 'Materials and Methods' section. Then, the levels of endogenous PCAF, cyclin A and cdk2 were determined by WB. To confirm the time of mitosis a WB with antibodies against phosphorylated histone H3 was performed. (G) Cell extracts from synchronized cells described in (F) were subjected to IP with anti-ckd2 or IgG as a control and the amount of PCAF and cdk2 was analyzed by WB.

complexes also contain cyclin A (Figure 1D). To further investigate the putative direct interaction between cdk2 and PCAF, Surface Plasmon Resonance analyses were performed. As observed in Figure 1E results indicate that cdk2 directly interacts with the acetylase.

The interaction between cdk2 and PCAF during cell cycle was subsequently determined. Thus, cells were synchronized at different phases of the cell cycle by a double thymidine block or by a nocodazole treatment as described in the methods section. To check whether synchronization was correct we analyzed the levels of cyclin A, and phosphorylated histone H3 in the cell extracts. It is known that cyclin A levels are high at S and G<sub>2</sub>/M, whereas they remain low at G<sub>1</sub> and mitosis and that

phosphorylated histone H3 is considered to be a mitotic marker. As shown in Figure 1F the levels of cyclin A and those of phosphorylated H3 behaved as expected. We also observed that cdk2 remained constant along cell cycle, whereas the levels of PCAF were high at S and G<sub>2</sub>/M, slightly lower at metaphase and much lower at G<sub>1</sub> (Figure 1F). The interaction between cdk2 and PCAF at these different stages of the cell cycle was determined by IP with anti-ckd2 followed by WB with anti-PCAF. Results indicate that cdk2 was preferentially associated with PCAF during G<sub>2</sub>/M, whereas the association decreased at S phase and metaphase and was almost undetectable at G<sub>1</sub> (Figure 1G). Similar results were observed when the interaction between overexpressed proteins was analyzed.

However, in this case the association of PCAF with cdk2 at S phase is much higher than that observed in the case of the endogenous proteins (Supplementary Figure S1D).

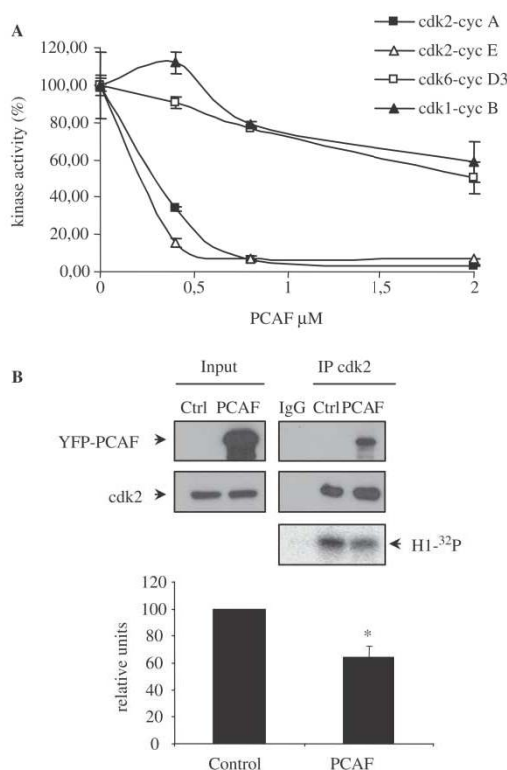
#### PCAF inhibits cyclin A/cdk2 activity

Because of the direct interaction between PCAF and cdk2, we aimed to study whether PCAF might affect cyclin/cdk2 activity. Thus, *in vitro* cyclin A/cdk2 and cyclin E/cdk2 kinase assays were performed in the presence of different PCAF concentrations. Results showed that PCAF inhibits the activity of both complexes with an IC<sub>50</sub> of around 300 nM (Figure 2A). This effect is specific, because PCAF only slightly affected the activities of other cyclin/cdk complexes as cyclin D3/cdk6 or cyclin B/cdk1 determined in similar *in vitro* experiments (Figure 2A). As a control, we determined the effect of GST on the activity of these different cyclin/cdk complexes and as shown in supplementary Figure S2, GST did not modify the activity of any of them. Therefore, these results indicate that PCAF specifically inhibits with high affinity the *in vitro* activity of cyclin/cdk2 complexes. We also observed that PCAF is able to inhibit cyclin/cdk2 complexes *in vivo*. As shown in Figure 2B cdk2-associated kinase activity was significantly decreased in cells transfected with YFP-PCAF.

To further identify the domain of PCAF involved in the inhibition of cyclin/cdk2 activity we first generated two different PCAF fragments: the N-terminus (aa 20–654) and the C-terminus (aa 352–832) (Figure 3A). Then, their effect on cyclin A/cdk2 activity was determined. Results indicate that the C-terminus fragment but not the N-terminus was able to significantly inhibit the kinase activity (Figure 3B). An inactive C-terminus fragment of PCAF that lacks a 20 amino acids region (aa 527–547) inside of its catalytic domain (Ct $\Delta$ HAT) (22) also inhibited cyclin A/cdk2 activity as efficiently as Ctwt PCAF did (Figure 3B). These results indicate that the inhibitory effect of PCAF on cyclin A/cdk2 is independent of its acetylase activity.

We further analyzed four different domains belonging to the PCAF C-terminus fragment for their ability to inhibit cyclin A/cdk2 kinase activity. These domains were: HAT (aa 352–658), ADA fragment (aa 581–695, involved in the interaction with ADA2 cofactor), bromodomain (aa 782–832, involved in the interaction with acetylated lysines), and ADA-bromodomain (aa 658–832) (Figure 3A). As it can be observed in Figure 3C none of these fragments significantly inhibited the kinase activity of cyclin A/cdk2. Figure 3D shows a typical experiment of the effect of the different PCAF constructs on cyclin A/cdk2 activity. Altogether, these results indicate that an intact C-terminus region is needed to efficiently inhibit cyclin A/cdk2 activity and that the acetylase activity of PCAF is not required for the inhibition.

In order to analyze the mechanism of the inhibition of cdk2 activity by PCAF we performed kinetic analysis of cyclin A/cdk2 activity in the presence of increasing amounts of ATP or substrate (histone H1). Results indicate that the inhibition of cyclin A/cdk2 by PCAF

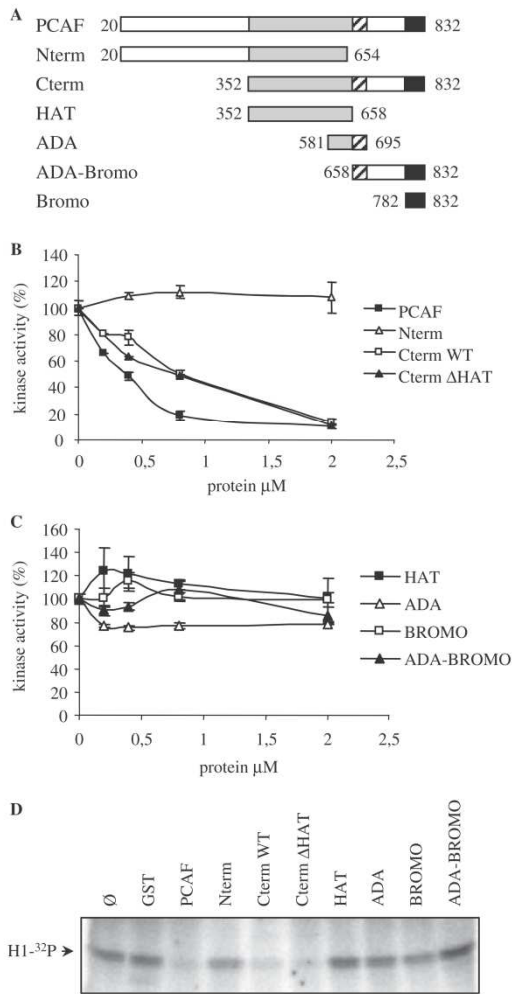


**Figure 2.** PCAF inhibits cyclin/cdk2 complexes *in vivo* and *in vitro*. (A) Purified active cyclin A/cdk2, cyclin E/cdk2, cyclin B/cdk1 and cyclin D3/cdk6 complexes were incubated with increasing concentrations of purified recombinant PCAF and kinase assays were performed. (B) HeLa cells were transfected with YFP-PCAF or empty vector as a control. Cell extracts were subjected to IP with anti-cdk2. Kinase assays of the immunoprecipitated endogenous cdk2 were performed and phosphorylation of histone H1 was detected by PhosphorImager. Kinase activity was normalized to the amount of immunoprecipitated cdk2 and represented in the graph. Results shown are the mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments. \**P*-value  $<0.05$ .

follows a non-competitive kinetics in both cases, with ATP (Figure 4A) or with the substrate (Figure 4B). Kinetic analyses of cdk2 activity in the presence of PCAF and growing amounts of cyclin A were also performed. We observed that again, inhibition by PCAF follows a non-competitive kinetics with cyclin A (Figure 4C) meaning that likely PCAF does not separate the components of cyclin A/cdk2 complex, but rather disturbs the complex in some way thereby inducing the inhibition of its kinase activity.

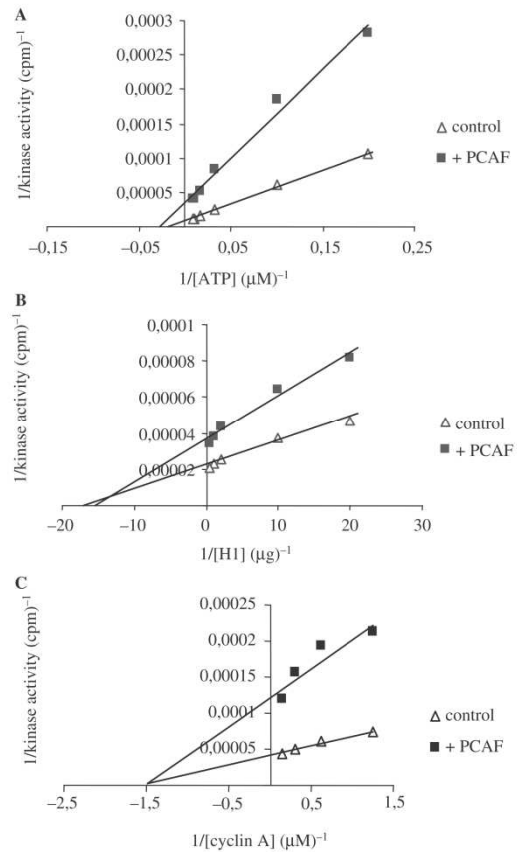
#### PCAF overexpression blocks cell cycle progression

As PCAF inhibits cyclin A/cdk2 activity, that is necessary for cell cycle progression, we aimed to study the effect of PCAF overexpression on cell proliferation. Thus, we first transfected NIH3T3 cells with Flag-PCAF or with an



**Figure 3.** The C terminus of PCAF is responsible for the inhibition of cyclin A/cdk2 activity *in vitro*. (A) Schematic representation of the domains of PCAF used in the experiments. (B) Purified recombinant cyclin A/cdk2 complexes (400 nM) were incubated with increasing concentrations of Nterm, Cterm, Nterm ΔHAT and full-length PCAF and kinase assays were performed. (C) The same as in (B), but using different recombinant fragments of PCAF: HAT, ADA, Bromo and ADA-Bromo. (D) A typical kinase assay using purified recombinant cyclin A/cdk2 complex (400 nM) as a kinase and histone H1 (2 μg) as a substrate. Different reactions were performed by adding GST or different purified fragments of PCAF at a concentration of 800 nM. After incubation, reactions were stopped and samples were electrophoresed. Phosphorylation of histone H1 was detected by autoradiography using a PhosphorImager.

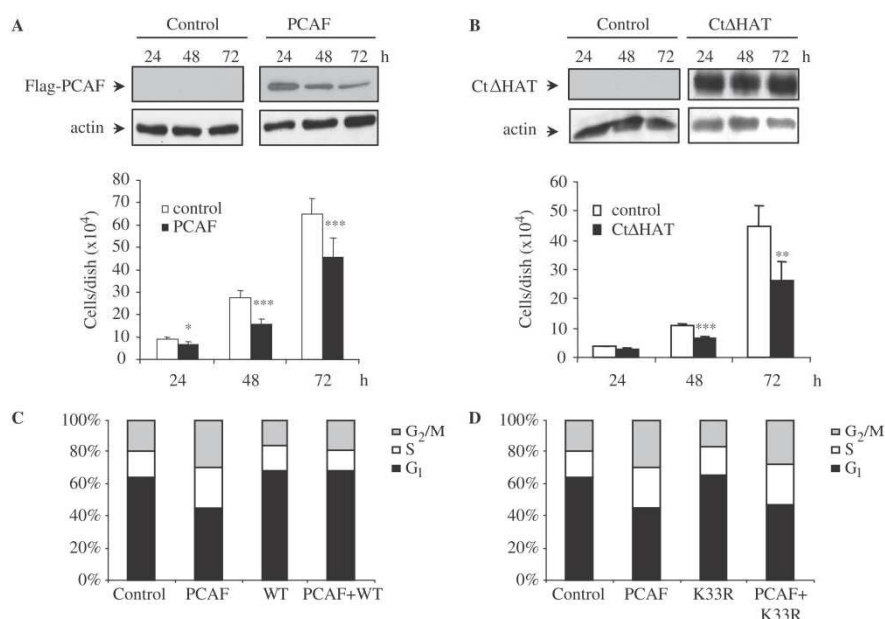
empty vector and the number of cells in the cultures were counted at different times after transfection. As showed in Figure 5A the cell number is significantly lower in PCAF overexpressing cells than in control cells. Similar results were obtained when using a NIH3T3 stable cell line



**Figure 4.** PCAF inhibition is not competitive with ATP nor with substrate histone H1 or cyclin A. Data from kinetic assays (see 'Materials and Methods' section) were analysed by double reciprocal plots. (A) Inhibition of cyclin A/cdk2 activity by PCAF at different ATP concentrations. The assay consisted in the incubation of 2 μg of substrate histone H1 with 400 nM cyclin A/cdk2 in the presence (square) or absence (triangle) of 800 nM PCAF. (B) Inhibition of cyclin A/cdk2 activity by PCAF at different histone H1 concentrations. The assay consisted in the incubation of 12.5 μM ATP with 400 nM cyclin A/cdk2 in the presence (square) or absence (triangle) of 800 nM PCAF. (C) Inhibition of cdk2 activity by PCAF at different cyclin A concentrations. The assay consisted in the incubation of 400 nM cdk2 (control) or 400 nM cdk2 plus 800 nM PCAF (+PCAF) with increasing concentrations of cyclin A in the presence of 12.5 μM ATP and 2 μg of substrate histone H1.

expressing CtΔHAT-PCAF in the absence of tetracycline (Tet-off system). Also in this case, a block of cell proliferation was observed (Figure 5B).

To better determine, at which cell cycle stage PCAF blocks cell proliferation FACS analysis were carried out in YFP-PCAF transfected cells. Supplementary Figure S3A shows the expression of YFP-PCAF in these transfected cells. Results indicate that in cells overexpressing PCAF a block in S and G<sub>2</sub>/M was produced (Figure 5C). This blockade is mediated by



**Figure 5.** PCAF impairs cell proliferation by causing S and G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. (A) NIH3T3 cells were transfected with empty vector or Flag-PCAF, then counted, and equal amounts were seeded in triplicates in 6-well-plates. Cell proliferation was measured by counting the number of cells present in each well 24, 48 and 72 h after transfection. Results shown are the mean of three independent experiments ± SE. \**P*-value <0.05; \*\**P*-value <0.01; \*\*\**P*-value <0.001. A WB showing the levels of transfected PCAF is shown in the top panel, and a WB with anti-actin was performed as a loading control (bottom panel). (B) Similar experiments as in (A) were performed using a NIH3T3 clone expressing CtΔHAT-PCAF under a Tet-off system generated as described in the 'Materials and Methods' section. Equal amounts of cells were seeded in triplicates in 6 well plates. Cell proliferation was measured by counting the number of cells present in each well 24, 48 and 72 h after seeding. CtΔHAT expressing cells were cultured in the absence of tetracyclin. As a control, the same clone was cultured in medium supplemented with tetracyclin. Results shown are the mean of three independent experiments ± SE. \**P*-value <0.05; \*\**P*-value <0.01; \*\*\**P*-value <0.001. A WB showing the levels of CtΔHAT-PCAF is shown in the top panel, and a WB with anti-actin was performed as a loading control (bottom panel). (C) HCT-116 cells were transfected with YFP-PCAF, CFP-cdk2WT or both. At 48 h after transfection they were fixed, DNA was stained with TOPRO-3 and transfected cells were analysed by FACS. The percentage of cells in each phase of the cell cycle is represented in the graph. (D) The same as in (C), but in this case cells were transfected with YFP-PCAF, CFP-cdk2 K33R, or both.

cdk2 because it is reversed by the simultaneous overexpression of this kinase (Figure 5C). Interestingly, the overexpression of the kinase dead mutant cdk2K33R did not reverse this cell cycle block (Figure 5D and supplementary Figure S3B), indicating that cdk2 activity is essential to overcome the cell cycle arrest induced by PCAF. FACS images of these studies are shown in supplementary Figure S3C.

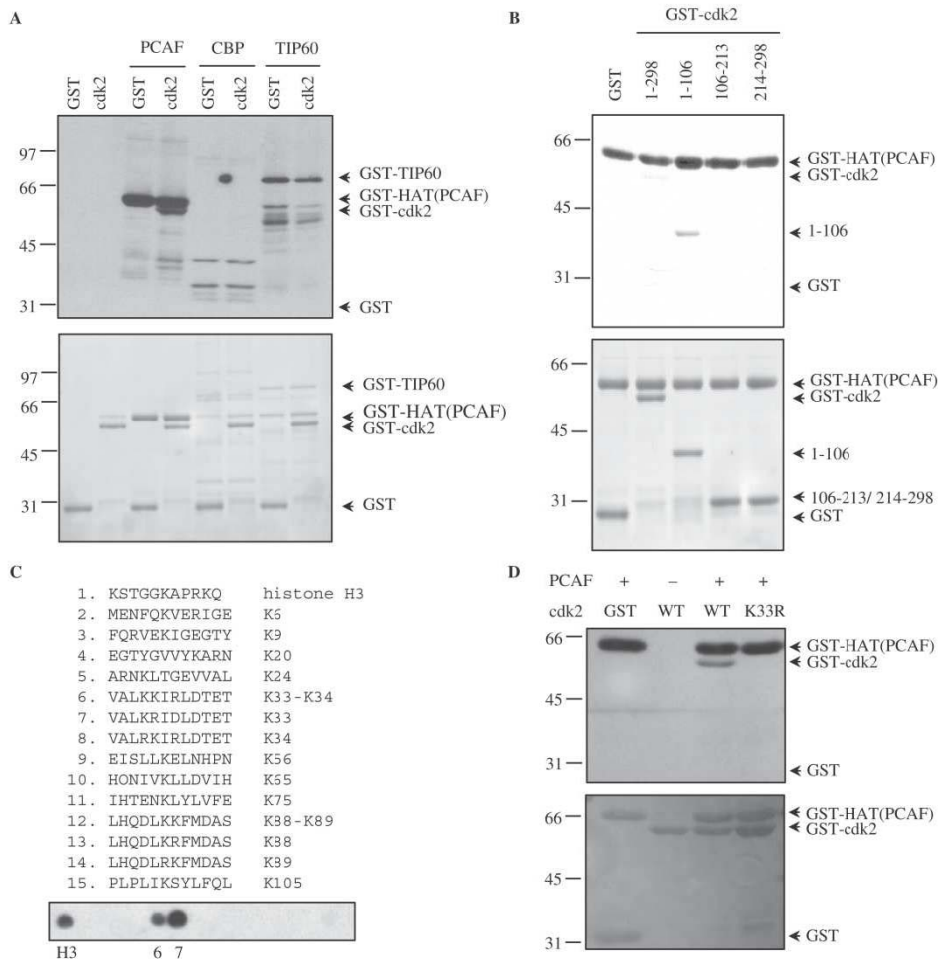
#### PCAF acetylates cdk2

The association of cdk2 with the catalytic domain of PCAF suggested that cdk2 might be a substrate of the acetylase. Thus, an *in vitro* acetyltransferase assay using purified recombinant GST-cdk2 as a substrate and purified GST-HAT as enzyme was performed. Results revealed that cdk2 was acetylated by PCAF. In contrast, other acetyltransferases as CBP or Tip60 were unable to acetylate this kinase (Figure 6A and Supplementary Figure S4A). To identify the acetylation sites of cdk2 we first performed *in vitro* acetylation assays using three GST-cdk2 fragments (including aa 1–106, 106–213 and 214–298) as substrates and GST-HAT as acetylase.

These fragments show different electrophoretic mobility in SDS-acrylamide gels, as shown in Figure 6B, bottom panel. Results indicated that only the cdk2 fragment including aa 1–106 was acetylated *in vitro* by PCAF (Figure 6B, upper panel).

This cdk2 fragment contains 12 lysine residues at positions K6, K9, K20, K24, K33, K34, K56, K65, K75, K88, K89 and K105. To identify the lysine/es that might be acetylated by PCAF, *in vitro* 'spot mapping' experiments were performed. Thus, 14 peptides, each one containing one or two of the lysines present in this fragment, were synthesized and spotted on a nitrocellulose membrane (Figure 6C, upper panel). A peptide from histone H3 was used as a positive control (peptide 1). Then, this membrane was subjected to an *in vitro* acetylation assay using GST-HAT as acetylase. Results indicated that the control peptide and peptides containing K33 (spots 6 and 7) were clearly acetylated by PCAF (Figure 6C, bottom panel). To analyze whether K33 was the acetylation site in the full length cdk2 protein, a mutational analysis was performed. Thus, a cdk2 protein harboring the K33R substitution was used for an *in vitro*



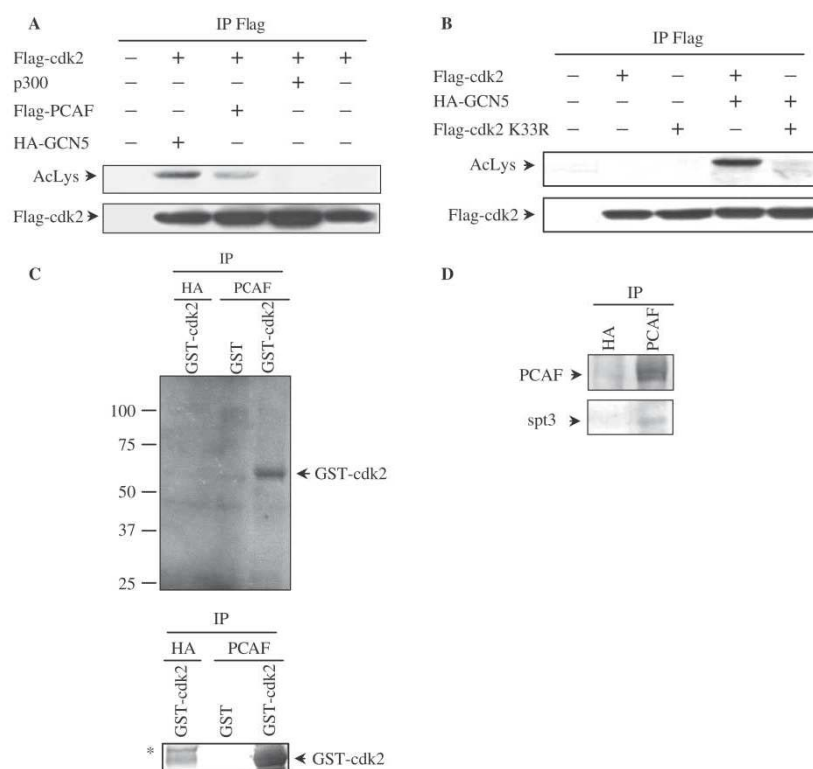


**Figure 6.** Cdk2 is a substrate acetylated by PCAF *in vitro*. (A) Purified GST-cdk2 was subjected to *in vitro* acetylation assays using the catalytic domain of PCAF [GST-HAT(PCAF)], GST-CBP or GST-Tip60 in the presence of [<sup>14</sup>C]acetylCoA. Purified GST was used as a negative control substrate. In the assays with PCAF or Tip60 their autoacetylation was used as a positive control, whereas in the case of CBP, histones were used as a positive control substrate (see Supplementary Data Figure S4A). Acetylated proteins were visualized by autoradiography (top panel). A loading control gel was stained with coomassie blue (bottom panel). (B) Purified recombinant cdk2 fragments were subjected to *in vitro* acetylation assays as in (A) using GST-HAT (PCAF) as acetylase. Acetylated proteins were visualized by autoradiography (top panel). A loading control gel was stained with coomassie blue (bottom panel). (C) Fourteen peptides including one or two consecutive lysines from the cdk2 fragment including aa 1–106, were spotted on a membrane. As a positive control a peptide from histone H3 was added. The membrane was subjected to *in vitro* acetylation assays with GST-HAT(PCAF) and [<sup>14</sup>C]acetylCoA. Acetylation was visualized by autoradiography. (D) Purified GST-cdk2 WT and GST-cdk2 K33R were subjected to *in vitro* acetylation assays with GST-HAT(PCAF). Acetylation was visualized by autoradiography (top panel). A loading control gel was stained with red ponceau (bottom panel).

acetylation assay. Results revealed that the cdk2 K33R mutant was not acetylated by PCAF (Figure 6D). These results indicate that K33 of cdk2 is a specific acetylation site for PCAF.

We further aimed to study the *in vivo* acetylation of cdk2. Thus, cells were transfected with Flag cdk2 alone or together with Flag PCAF, then cell extracts were subjected to IP with anti-Flag and the immunoprecipitates

analyzed for the acetylation of cdk2 by WB with anti-acetyl K. Results revealed that in cells non-transfected with the acetylase cdk2 acetylation is not observed. In contrast, in PCAF-transfected cells cdk2 acetylation is clearly seen (Figure 7A). Similar experiments carried out after transfection of cells with GCN5, an acetylase homologous to PCAF, revealed that this acetylase is also able to acetylate cdk2 (Figure 7A). Experiments performed with



**Figure 7.** Cdk2 is acetylated by PCAF and GCN5 *in vivo*. (A) Cells were transfected with Flag-cdk2 alone or together with three different acetylases (p300, PCAF or GCN5). Cell extracts were subjected to IP with anti-Flag and WBs were performed with anti-Flag and anti-Acetyl-K. (B) Cells were transfected with Flag-cdk2 or Flag-cdk2K33R alone or together with HA-GCN5. Then, cell extracts were subjected to IP with anti-Flag followed by WB with anti-Flag and anti-Acetyl-K. (C) C2C12 cell extracts were subjected to IP with anti-PCAF. The obtained immunoprecipitates were used as a source of active PCAF and were used for *in vitro* cdk2 acetylation experiments. Autoradiography indicates cdk2 acetylation (top panel). A WB anti-cdk2 of the membrane used for autoradiography is shown on the bottom panel. Asterisks indicates non-specific bands. (D) The immunoprecipitates obtained in (C) were checked for the content of PCAF and SPT3 by WB.

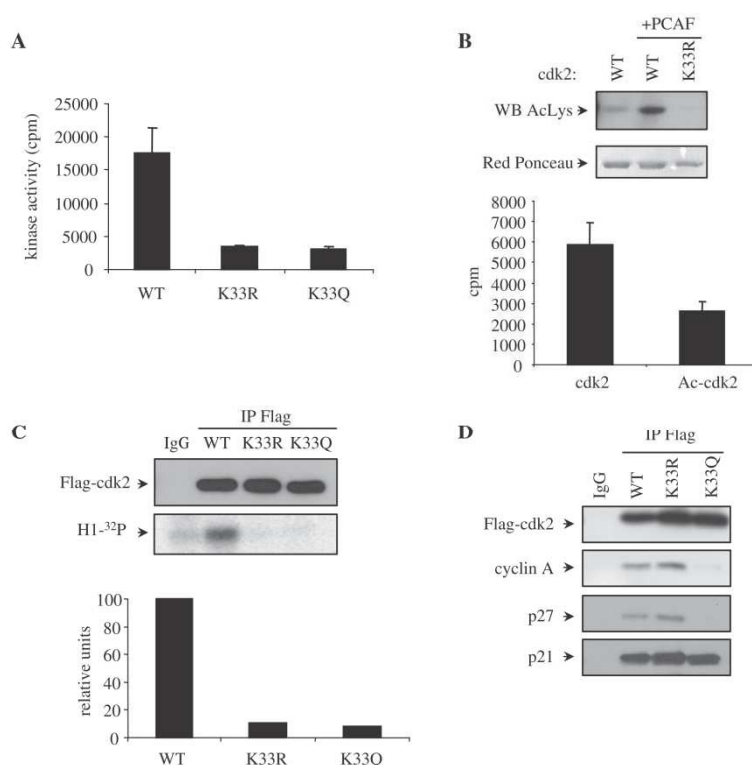
the mutant cdk2 K33R, revealed that lysine 33 is also the *in vivo* acetylation site of cdk2, because it was not acetylated (Figure 7B). Finally, we aimed to determine whether PCAF immunoprecipitated from cell extracts was able to acetylate purified cdk2. Results indicated that cdk2 is acetylated by immunoprecipitated PCAF (Figure 7C). Interestingly, the immunoprecipitated PCAF forms part of specific multiprotein complexes that, as shown in Figure 7D, contain the protein spt3.

#### Acetylation of cdk2 inhibits its kinase activity

Lysine 33 is located in the catalytic pocket of cdk2 and it is involved in the binding of ATP. This lysine residue is conserved in all the members of the cdk family (Supplementary Figure S4B). It is well known that this lysine is essential for the kinase activity of cdk2 and the mutated form cdk2 K33R is fully inactive (23). To confirm that acetylation at this specific lysine of cdk2 inactivates the kinase we generated purified recombinant cdk2,

in which K33 was substituted by glutamine (K33Q mutant) in order to mimic acetylation of this residue (24,25). Thus, the activities of cdk2 K33Q and cdk2 K33R associated with cyclin A were determined *in vitro*. Results indicate that whereas cyclin A/cdk2 WT was active, the cyclin A complexes with the non-acetylatable mutant cdk2 K33R or the pseudoacetylated mutant cdk2 K33Q were inactive (Figure 8A).

To further confirm that acetylation at lysine 33 of cdk2 inactivates its kinase activity we generated acetylated GST-cdk2 in bacteria. To this aim, bacteria were transformed with GST-cdk2WT alone, GST-cdk2WT plus PCAF or with the mutant GST-cdk2 K33R plus PCAF. Then, these different cdk2s were purified and subsequently analyzed for their acetylation status by WB using an anti-acetyl-K antibody. We observed that GST-cdk2WT in the absence of PCAF was only slightly acetylated, GST-cdk2WT in the presence of PCAF was highly acetylated and GST-cdk2 K33R even in the presence of PCAF was not acetylated at all (Figure 8B, upper panel). In such a



**Figure 8.** Acetylation of cdk2 impairs its kinase activity both *in vivo* and *in vitro*. (A) *In vitro* kinase assays were performed using 400 nM of purified recombinant GST-cdk2WT, K33R or K33Q together with 400 nM of cyclin A. Kinase activity  $\pm$  SE was represented in the graph. (B) GST-cdk2 WT and K33R were expressed in bacteria co-expressing 6His-PCAF. After purification of GST-cdk2 WT and K33R, they were analysed by WB with anti-Acetyl-K (top panel). Red Ponceau staining of the proteins is shown in the bottom panel as a loading control. GST-cdk2 WT purified in the absence or presence (Ac-cdk2) of PCAF were tested for *in vitro* kinase activity. 400 nM of the proteins were incubated with 400 nM of purified GST-cyclin A in the presence of histone H1 as a substrate and [ $^{32}$ P]ATP as a cofactor. Kinase activity  $\pm$  SE was represented in the graph. (C) HeLa cells were transfected with Flag-cdk2 WT, K33R or K33Q. Cell extracts were subjected to IP with anti-Flag or IgG as a control. A WB performed with anti-Flag is shown in the top panel. Kinase assays were also performed with the immunoprecipitates and their kinase activity was quantitated with a PhosphorImager (bottom panel). Normalization of cdk activity with respect to the amount of immunoprecipitated cdk2 is shown in the graph. (D) 293-T cells were transfected with Flag-cdk2WT, K33R or K33Q. Cell extracts were subjected to IP with anti-Flag or IgG as a control. A WB performed with anti-Flag is shown in the upper panel. Interaction of the different cdk2 forms with cyclin A, p21 and p27 was analyzed by WB.

way, we obtained cdk2 with different levels of acetylation at K33. These purified cdk2 fractions did not contain PCAF as checked by WB (data not shown). These fractions were subsequently used for the determination of their activity, when associated to cyclin A. Results clearly indicated that the activity of acetylated cdk2 was much lower than non-acetylated cdk2 (Figure 8B, bottom panel). Finally, we also analyzed the *in vivo* activity of the cdk2 mutants K33R and K33Q. Cells were transfected with Flag-cdk2 WT, Flag- performed. The kinase activity of the immunoprecipitates was analyzed and results showed that in contrast to cdk2 WT, the cdk2 mutants K33R and K33Q were inactive *in vivo* (Figure 8C).

To analyze the functional relevance of cdk2 acetylation, we analyzed whether in addition to its inactivation, cdk2 acetylation could affect its interaction with other cell cycle regulatory proteins. To this aim, cells transfected with

cdk2WT, cdk2K33R or cdk2K33Q were subsequently subjected to IP and then analyzed for its interaction with different cyclins and CKIs. Interestingly, it was observed that the pseudoacetylated mutant cdk2 K33Q lost its interaction with cyclin A and p27 but not with p21 (Figure 8D). These results indicate that cdk2 acetylation also modulates its interaction with some other cell cycle regulatory proteins.

## DISCUSSION

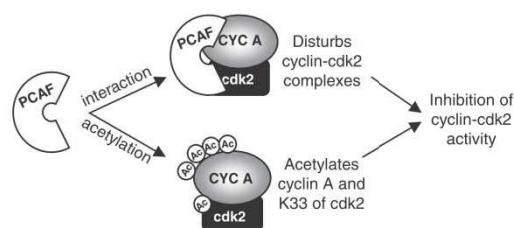
Cdks are serine/threonine kinases that play a key role in the regulation of cell cycle progression and transcription. Those members of the family that participate in the regulation of the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle act as integrators of the extracellular mitogenic stimuli, that include growth factors, interaction with the extracellular matrix and

cell–cell interactions (26,27). These external factors, when associate with specific plasma membrane receptors trigger different signaling pathways that converge in the regulation of the activity of the  $G_1$ -operating cdk. In addition to that, cdk. also integrate the signaling emanated from cell cycle checkpoints (28). Therefore, these kinases have multiple regulatory mechanisms that allow them to coordinate these different pathways and qualify cdk. for doing this complex integrative activity. As mentioned above, the now classical general mechanisms that regulate cdk activity include the interaction with cyclins, that stimulates cdk activity, and with CKIs that, on the contrary, inhibit cdk activity. Phosphorylation also regulates positively and negatively the activity of cdk. However, more recently, new mechanisms that specifically regulate the activity of some cdk. are emerging. For example, it should be mentioned that the oncogene and chromatin remodeling protein SET specifically inhibits cyclin B/cdk1 activity by associating to this complex (29). Other examples are that acetylation of K48 of cdk9 by PCAF and Gcn5 inactivates this enzyme (13) and that acetylation of cyclin A at specific lysines promotes its degradation (15).

We report here that the acetyltransferase PCAF inhibits cyclin/cdk2 activity by two different mechanisms: (i) by interacting with cyclin/cdk2 complexes in experimental conditions that do not allow protein acetylation (absence of the acetyl donor Acetyl-CoA) and (ii) by acetylating K33 of the cdk2 sequence, similarly to that observed for cdk9.

PCAF is a histone acetyltransferase homologous to Gcn5, both belonging to the GNAT family (Gcn5 related N-acetyltransferases), which are important for transcriptional initiation (30). PCAF participates in the reversible acetylation of various transcriptional regulators as the general transcription factors  $TF_{II}E\beta$  and  $TF_{II}F$  (31) and the sequence-specific transcription factors E2F1 (20), c-myc (32), myo D (33) and p53 (34,35) among others (36). In the cell, PCAF is a subunit of multiprotein complexes that possess global histone acetylation activity and locus-specific co-activator functions together with acetyltransferase activity on non-histone substrates (21,37). Interestingly, PCAF possesses a domain with E3 ubiquitin ligase activity in its N-terminal region (38).

We have recently observed that PCAF directly interacts with and acetylates cyclin A (15). This acetylation is produced at early mitosis and stimulates cyclin A degradation at prometaphase with the consequent inactivation of cyclin A/cdk2 complexes. These results together with those reported here indicate that the mechanism involved in the inhibition of cyclin A/cdk2 activity by PCAF is quite complex and include at least three different actions: alteration of cyclin A/cdk2 association, acetylation of cdk2 and acetylation of cyclin A (Figure 9). Likely, these three actions of PCAF on cyclin A/cdk2 proceed in a specific sequence in order to block the activity of this complex during a given period of time. We propose that after binding of PCAF to cyclin A/cdk2 the activity of this complex is inhibited simply by the affectation of the interaction between both subunits. Then, cdk2 could be acetylated on K33 at the catalytic pocket, a fact that



**Figure 9.** An outline representing the two different mechanisms, by which PCAF inhibits the activity of cyclin A/cdk2 complexes is shown.

would additionally inactivate the enzyme but also, and probably most important, would provoke its separation from cyclin A. This is suggested by the data reported here revealing that the pseudoacetylated cdk2K33Q mutant does not interact with cyclin A. Subsequently, acetylated cdk2 would remain inactive and also protected from the putative activation by other type of cyclins.

Kinetic analyses of cyclin A/cdk2 activity in the presence or absence of PCAF reveal that it does not compete either with ATP or with the substrate. As PCAF directly interacts with both cyclin A and cdk2 it is likely that this double interaction disturbs somehow cyclin A/cdk2 association, thus reducing its enzymatic efficiency. This is supported by the evidence that, to effectively inhibit the activity of cyclin A/cdk2 complexes, the integrity of a long fragment of PCAF is needed (C-terminus including aa 352–382). Specific domains within this C-terminus fragment of PCAF, as HAT, ADA and Bromodomain, when tested alone, do not inhibit the activity of the complex. Likely, this long C-terminus fragment should contain specific domains responsible for the specific interaction with cyclin A and cdk2. However, the identity of these putative interacting domains still remains unknown.

Overexpression of PCAF blocks cell cycle progression at S and  $G_2/M$  as observed by FACS analysis. This is consistent with the evidence that at these stages of the cell cycle the interaction of PCAF with cdk2 and also with cyclin A (15) is high. Interestingly, this cell cycle blockade is reversed, when cells are simultaneously co-transfected with PCAF and cdk2. These results indicate that overexpression of PCAF is affecting the cellular availability of cdk2 and that by increasing the amount of cdk2 in the cells, the cell cycle arrest is overcome. We still do not know the role of PCAF on the regulation of S phase but a recent report indicates that GCN5 modulates S phase by regulating cdc6 phosphorylation by cyclin A/cdk2 complexes (39). In this article authors describe that overexpression of GCN5 generates a block in S phase similarly to that we observed in cells transfected with PCAF. Because these two acetylases are highly homologous it can be postulated that PCAF can also play a role in regulating DNA synthesis. The putative role of PCAF on  $G_2/M$  could be related to the inactivation of cyclin A/cdk2 complexes at the  $G_2$  phase. However, to demonstrate this hypothesis it is necessary to determine the endogenous acetylation of

cdk2 along the cell cycle. Unfortunately, detection of endogenous acetylated cdk2 *in vivo* has been widely elusive until now.

PCAF acetylation of K33 of cdk2 is a similar event to that occurring in cdk9. It has been previously reported that this kinase can also be acetylated by PCAF and Gcn5 at K48, which is the equivalent to K33 in cdk2 (13). As cdk9 is involved in transcription (40), authors demonstrated that acetylation of this kinase specifically inhibits cdk9 dependent transcriptional activity. As this lysine is located in the catalytic pocket of all cdks but also of many other kinases, one can speculate that acetylation of this specific residue could be a more general mechanism of the regulation of kinase activity.

PCAF also plays an important role in the DNA damage checkpoint response by acetylating p53 and E2F1. After DNA damage, PCAF acetylates and stabilizes E2F1 and as a consequence complexes containing both proteins are formed. These complexes re-localize from cell cycle progression-genes to the promoters of pro-apoptotic genes (41). Moreover, PCAF acetylates p53 at lysine 320 and induces the expression of selected p53 target genes as PIG3 and NOXA under DNA damage conditions (42,43). Results reported here allow us to speculate about the possibility that PCAF could also participate in the DNA damage response by inhibiting cyclin/cdk2 complexes in order to arrest cell cycle progression. Thus, PCAF activation after DNA damage would induce the acetylation of both cyclin A and cdk2 leading to the inhibition of cdk2 activity and cell cycle arrest.

As cyclin A/cdk2 complexes are involved in the regulation of steroid hormone mediated transcription, it appears that the inhibition of these complexes by PCAF could affect the activity of SR-mediated gene expression. However, this possibility still remains to be explored.

As a summary, our results reveal a new mechanism for the regulation of cell cycle progression by PCAF. This acetylase controls cdk2 activity by a mechanism that includes the direct binding to cyclin/cdk2 complexes that might compromise the interaction between both proteins and by acetylating an essential lysine located in the catalytic pocket of the kinase.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## FUNDING

Grants SAF2006-05212 and SAF2007-60491 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and Rticc RD06/0020/0010 from the Instituto de Salud Carlos III. Funding for open access charge: Grant from the Spanish Government.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Morgan,D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 261–291.
- Sherr,C.J. (1994) Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem. Cells*, **12**(Suppl. 1), 47–55.
- Nigg,E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 21–32.
- Sherr,C.J., Kato,J., Quelle,D.E., Matsuoka,M. and Roussel,M.F. (1994) D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **59**, 11–19.
- Malumbres,M. and Barbacid,M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, **30**, 630–641.
- Nigg,E.A. (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 312–317.
- Coleman,T.R. and Dunphy,W.G. (1994) Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 877–882.
- Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, **13**, 1501–1512.
- Weigel,N.L. and Moore,N.L. (2007) Cyclins, cyclin dependent kinases, and regulation of steroid receptor action. *Mol. Cell Endocrinol.*, **265–266**, 157–161.
- 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.
- 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.
- Spange,S., Wagner,T., Heinzel,T. and Kramer,O.H. (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 185–198.
- 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.
- 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.
- Mateo,F., Vidal-Laliena,M., Canela,N., Busino,L., Martinez-Balbas,M.A., Pagano,M., Agell,N. and Bachs,O. (2009) Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene*, **28**, 2654–2666.
- Mizuguchi,G., Vassilev,A., Tsukiyama,T., Nakatani,Y. and Wu,C. (2001) ATP-dependent nucleosome remodeling and histone hyperacetylation synergistically facilitate transcription of chromatin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14773–14783.
- Liu,X., Vorontchikhina,M., Wang,Y.L., Faiola,F. and Martinez,E. (2008) STAGA recruits Mediator to the MYC oncoprotein to stimulate transcription and cell proliferation. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 108–121.
- Donzelli,M., Squatrito,M., Ganoh,D., Hershko,A., Pagano,M. and Draetta,G.F. (2002) Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J.*, **21**, 4875–4884.
- Canela,N., Orzaez,M., Fucho,R., Mateo,F., Gutierrez,R., Pineda-Lucena,A., Bachs,O. and Perez-Paya,E. (2006) Identification of a Hexapeptide That Binds to a Surface Pocket in Cyclin A and Inhibits the Catalytic Activity of the Complex Cyclin-dependent Kinase 2-Cyclin A. *J. Biol. Chem.*, **281**, 35942–35953.
- 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.
- Nagy,Z. and Tora,L. (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, **26**, 5341–5357.
- Santos-Rosa,H., Valls,E., Kouzarides,T. and Martinez-Balbas,M. (2003) Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4285–4292.
- 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.
- 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.
25. 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.
  26. Walker, J.L. and Assoian, R.K. (2005) Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 383–393.
  27. Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W. and Ogita, H. (2008) Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 603–615.
  28. Lobrich, M. and Jeggo, P.A. (2007) The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 861–869.
  29. 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.
  30. Vetting, M.W., Carvalho, L.P. S.d., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L. and Blanchard, J.S. (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 212–226.
  31. 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.
  32. Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S. *et al.* (2004) The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10826–10834.
  33. 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. *et al.* (1997) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell*, **1**, 35–45.
  34. 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.
  35. Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.*, **12**, 2831–2841.
  36. Schiltz, R.L. and Nakatani, Y. (2000) The PCAF acetylase complex as a potential tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1470**, M37–M53.
  37. Li, X., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 3763–3773.
  38. 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.
  39. Paolinelli, R., Mendoza-Maldonado, R., Cereseto, A. and Giacca, M. (2009) Acetylation by GCN5 regulates CDC6 phosphorylation in the S phase of the cell cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 412–420.
  40. Peterlin, B.M. and Price, D.H. (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol. Cell*, **23**, 297–305.
  41. 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.
  42. 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.
  43. Terui, T., Murakami, K., Takimoto, R., Takahashi, M., Takada, K., Murakami, T., Minami, S., Matsunaga, T., Takayama, T., Kato, J. *et al.* (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.



# **MATERIALS I MÈTODES**



Compartir és viure

## 1. CULTIUS CEL·LULARS

### 1.1 MODELS CEL·LULARS

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

**C2C12:** línia immortalitzada de mioblasts de ratolí

**HCT-116.** Línia tumoral procedent de càncer colorectal humà.

**HEK 293T.** Línia immortalitzada procedent de ronyó embrionari humà.

**HeLa.** Línia tumoral procedent de càncer de cèrvix humà.

**HeLa HDAC1<sup>-/-</sup>:** Knockdown de la HDAC1 estable generat a partir de HeLa.

**HeLa HDAC2<sup>-/-</sup>:** Knockdown de la HDAC2 estable generat a partir de HeLa.

**NIH3T3:** línia immortalitzada de fibroblasts de ratolí

### 1.2 MANTENIMENT DE CÈL·LULES EN CULTIU

Les diferents línies s'han mantingut en un incubador a 37°C i a una pressió parcial de CO<sub>2</sub> 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'estreptomina) i 10% de FCS.

*HeLa*, *293T*, *C2C12*: 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'estreptomina) i 10% de FCS.

*NIH3T3*; creixen 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'estreptomina) i 10% de DBS.

### 1.3 MEDIS I SUPLEMENTS

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 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 estreptomina)*. 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. Ultrafree-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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2, 0,9 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

## 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 o corning). El protocol que se segueix és el següent:

- Atemperar prèviament el PBS, la solució de tripsina-EDTA 1x i el medi de cultiu.
- Treure el medi i fer un rentat amb PBS.
- 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.
- Es neutralitza la tripsina tot afegint el mateix volum de medi al 10% de FCS.
- 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 subconfluent en creixement exponencial. El protocol de congelació és el següent:

-Es tripsinitzen les cèl·lules i posteriorment es neutralitza la tripsina amb medi suplementat.

-Es compten les cèl/ml utilitzant la càmera de Neubauer.

-La suspensió de cèl·lules es centrifuga 5 min a 2000 rpm, a temperatura ambient i es descarta el sobrenedant.

-Es ressuspenen les cèl·lules amb el medi necessari per a fer alíquotes d'entre  $1-1,5 \cdot 10^6$  cèl/ml (en el cas de MEFs  $3 \cdot 10^6$  cèl/ml), tenint en compte que a cada criotub hi posarem 800  $\mu$ l de medi i 200  $\mu$ l de DMSO 50% (10% concentració final).

-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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

-Finalment, els vials de cèl·lules es mantenen durant 2-3 dies a  $-80^{\circ}\text{C}$  i posteriorment s'emmagatzemen en  $\text{N}_2$  líquid fins que sigui requerida la seva descongelació.

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

-En primer lloc, escalfem a  $37^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ l 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 ressuspen 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 HeLa i NIH 3T3, i el sistema Polyfect (Qiagen) per a transfectar les cèl·lules HCT-116 i HeK293T. En general hem seguit les instruccions aportades pels fabricants, però en el cas de la Lipofectamina en alguns casos hem variat la relació DNA ( $\mu\text{g}$ ): lipofectamina ( $\mu\text{l}$ ) 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 la transició  $G_1/S$  o a la metafase utilitzant timidina o nocodazol.

### **Doble bloqueig amb Timidina**

Per aturar les cèl·lules a la transició  $G_1/S$  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  $G_1/S$ .

## 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

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

- Retirem el medi i fem 2 rentats amb PBS.
- 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.
- Recollir les cèl·lules en tubs mantinguts en gel.
- Centrifugar a 2500 rpm a 4°C durant 5 min, i eliminar el sobrenedant.
- Congelar els *pellets* a -80°C si no els hem d'utilitzar en aquest moment.
- Si la mostra que obtenim és per a realitzar assajos de *western blot*, podem ressuspèndre 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.

### **Reactius:**

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

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

### **Protocol:**

- 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.

-S'hi afegeix 200 µl de reactiu de Bradford.

-Es barreja i s'incuba 10 min a temperatura ambient.

-Es llegeix en un espectrofotòmetre a 595 nm.

-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 (µg/µl)	BSA (µl) (0,1 mg/ml)	Tampó de lisi (µl)	H <sub>2</sub> 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

**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:

**Reactius:**

*Solució 1:* 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,1 N NaOH.

*Solució 2:* 0,5% CuSO<sub>4</sub>.

*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.

- 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.

- S'hi afegeix 2,5 ml de solució A. Es barreja i s'incuba 10 min a temperatura ambient.

- S'hi addicionen 250 µl de solució B, es barreja i s'incuba 30 min a temperatura ambient.

- Es llegeix en un espectrofotòmetre a 750 nm.

- 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 (µg/µl)	BSA (µl) (0,1 mg/ml)	Tampó de lisi (µl)	H <sub>2</sub> 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

## 2. CULTIUS BACTERIANS

### 2.1 SOQUES I MEDIS DE CULTIU

Hem utilitzat les següents soques bacterianes: *E. coli* DH5 $\alpha$  per a l'obtenció de DNA plasmídic; i 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.

- Descongelem els bacteris competents en gel.
- S'afegeixen uns 0,5  $\mu$ g de DNA plasmídic (0,5-1  $\mu$ l), a 100  $\mu$ l de cèl·lules competents, i s'incuba en gel 30 min.
- Es sotmet a un xoc tèrmic de 45 seg a 42 $^{\circ}$ C, i seguidament es deixa 2 min en gel.
- S'afegeix 1 ml de medi ric LB sense antibiòtics, i s'incuba 1 h a 37 $^{\circ}$ C, en agitació.
- Es centrifuga 1 min a 5000 rpm i es descarten 900  $\mu$ l 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 $^{\circ}$ 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	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A WT	pGEX6P1	?	Dra. Núria Canela
Ciclina A WT	pGEX2T	?	Comú lab
Ciclina A WT	pEF-HA	BamHI-XhoI/SalI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A WT	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A WT	pEGFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/SalI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A WT	pECFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/SalI	Dra. Francesca Mateo
Fragment 4R	pUC57	SmaI-MfeI	Sintetitzat per GenScript
Ciclina A 4R	pGEXKG	BamHI-XhoI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A 4R	pEF-HA	BamHI-XhoI/SalI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A 4R	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A 4R	pECFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/SalI	Dra. Francesca Mateo
Fragment 4Q	pUC57	SmaI-MfeI	Sintetitzat per GenScript
Ciclina A 4Q	pGEXKG	BamHI-XhoI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A 4Q	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Dra. Francesca Mateo

cDNA	Vector	Dianes de clonatge	Origen
Ciclina A 4Q	pECFP-C1	BamHI/BglII-XhoI/SalI	Dra. Francesca Mateo
Ciclina A 171-432	pGEXKG	?	Dra. Núria Canela
Ciclina A 171-432	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
CDK2 WT	pGEXKG	BamHI-HindIII	Comú lab
CDK2 WT	pGEX6P1	?	Dra. Núria Canela
CDK2 WT	pUHD-P1-FLAG	?	Dr. Randy Poon
CDK2 WT	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
CDK2 WT	pECFP-C1	BamHI/BglII-HindIII	Dra. Francesca Mateo
CDK2 K33R	pGEX2T	?	Dr. Randy Poon
CDK2 K33R	pUHD-P1-FLAG	?	Dr. Randy Poon
CDK2 K33Q	pGEX2T	?	Dra. Francesca Mateo
CDK2 K33Q	pUHD-P1-FLAG	?	Dra. Francesca Mateo
CDK2 K21R	pUC57	?	Sintetitzat per GenScript
CDK2 K21R	pcDNA3-FLAG	BamHI/XhoI	Aquesta tesi
PCAF	pGEX2TKP	BamHI/BglII-XhoI	Dra. MA. Martínez-Balbás
PCAF	pcDNA3-FLAG	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
PCAF	pEYFP	?	Maria Pérez
HAT (352-658 de PCAF)	pGEX2TKP	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
GCN5	pGEX4T1	BamHI-EcoRI	Aquesta tesi
GCN5	pcDNA3-FLAG	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
HDAC1	pME1 8S-FLAG	?	Dra. MA Martínez-Balbás
HDAC1 51-482	pGEX	?	Dra. MA. Martínez

cDNA	Vector	Dianes de clonatge	Origen
HDAC2	pcDNA3-FLAG	?	Dr. Alexander Brehm
HDAC2	pGEX	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
HDAC3	pGEX	BamHI-XhoI	Aquesta tesi
HDAC3	pcDNA3-FLAG	BamHI/XhoI	Aquesta tesi
HDAC3	pYFP	?	Dr. Shuo Xong
HDAC4	pcDNA3	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
Sirt-1	pCMV-FLAG	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
shcontrol	pLKO.1-puro	?	Sigma
shRNA HDAC1	pLKO.1-puro	?	Sigma
shRNA HDAC2	pLKO.1-puro	?	Sigma
shRNA HDAC3	pSuper	?	Dra. MA. Martínez-Balbás
shRNA anti-PCAF	pLKO.1-puro	?	Sigma
shRNA anti-GCN5	pLKO.1-puro	?	Sigma
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

## 2.4 EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES A *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 retenguda 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 fa idònia 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).

**Reactius:**

*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*. Ultrafreee-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<sup>®</sup>, 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 Glutació reduït.

**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:

-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).

-Amplificar el cultiu fins al volum desitjat. Normalment de 0,5 a 1 litre.



-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).

-Per comprovar la inducció prèviament a la purificació, podem separar una fracció (15 µl) 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**

-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.

-Lisi dels bacteris en tampó NETN. Es fan diversos cicles de congelació i descongelació i es sonica en gel, 4 x 10 seg.

-Es clarifica el lisat per centrifugació durant 15 min en un rotor ss-34 a 15000 rpm, i es guarda el sobrenedant.

-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.

-Fer 3 rentats exhaustius amb tampó NETN (volum final de 10 ml).

-Afegir 2-5 ml de tampó d'elució i incubar-ho 30 min a 4°C en rotació.

-Recollir la proteïna eluïda per centrifugació (5 min a 3000 rpm).

-La proteïna purificada se sol dialitzar amb el tampó adequat per a l'assaig en el que la vulguem emprar. Es guarda aliquidada 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.

### Protocol:

-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.

-Incubar la resina amb el mateix volum d'una solució (95:5) de PBS/trombina (*stock*: 1 U/ $\mu$ l, en PBS) durant 16 h a temperatura ambient en rotació.

-Centrifugació a 3000 rpm durant 1 min i recuperem el sobrenedant.

-Per eliminar la trombina, s'incuba el sobrenedant 10 min a temperatura ambient en rotació amb 75  $\mu$ l de la resina de para-aminobenzamidina (que haurem pre-rentat amb PBS) per cada 6 U de trombina.

-Centrifugar 5 min a 3000 rpm per a recuperar el sobrenedant, on hi ha la proteïna purificada sense GST i sense trombina.

-Podem dialitzar la proteïna amb el tampó més adient per a posteriors assajos.

-Per comprovar la digestió es poden carregar 5  $\mu$ l del sobrenedant en un gel SDS-PAGE i fer una tinció amb *Coomassie blue*.

-En cas que es necessiti que la proteïna sigui estèril es pot filtrar amb un filtre de 0,22  $\mu$ m.

### 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 poliactilamida. 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 Miniprotean® (Bio-Rad).

##### **Reactius:**

*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.

**Protocol:**

-Primer es prepara el gel resolutiu (segons la taula 4). Una vegada barrejats els components, la solució resolutive s'aboca entre els vidres del muntatge.

-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.

-Quan ha polimeritzat, i abans d'aplicar el gel empaquetador, es decanta l'aigua o l'isopropanol.

-Es prepara el gel empaquetador i s'aboca a sobre del resolutiu.

-Abans que polimeritzi, es col·loca una pinta que permetrà la formació dels pous on després es carregarà la mostra. Es deixa polimeritzar.

-Una vegada ja està polimeritzat es treu la pinta i es col·loca el gel en una cubeta, on afegim el tampó electròlit.

-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).

-Finalment apliquem un camp elèctric per resoldre les mostres. Normalment 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 <sub>2</sub> O (ml)	2,6	2,2	1,6	1	-	H <sub>2</sub> 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

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:

-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.

-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<sub>i</sub> pH 7.0, 40% Glicerol, 10% SDS, 2 mg/ml DTT, 0,67 mg/ml Blau de Bromofenol.

### 3.2 TINCIÓ DE 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:

-Una vegada finalitzada l'electroforesi, s'incuba el gel amb la solució de tinció durant 10-20 min, en agitació i a temperatura ambient.

-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).

-En primer lloc, cal hidratar la membrana de nitrocel·lulosa amb aigua.

-La membrana i el gel s'incuben uns min amb tampó de transferència.

-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.

-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.

-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.

## **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 antígens. 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.

### **Reactius:**

*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.

### **Protocol:**

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:

-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.

-Es realitzen tres rentats de 10 min amb TBST.



-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.

-Es realitzen tres rentats de 10 min amb TBST.

-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.

-Es fan tres rentats de 10 min amb TBST.

-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.

-Primer s'incuba la membrana amb una barreja a parts iguals de les solucions 1 i 2 d'ECL, durant un min.

-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.

**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	Rockland	60000-401-939	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
Ciclina A	BD	611268	ICQ
Cks1/2	Santa Cruz	sc-6238 (FL-79)	WB
CUL1	Zymed	71-8700	WB
FLAG	Sigma	F7425	WB, IP
FLAG	Sigma	A2220	IP
GCN5	Santa Cruz	sc-20698(H-75)	WB
H3P (Ser 28)	Cell Signaling	9713	WB, ICQ
HA	Roche	12C5A	ICQ
HA	Sigma	H6908	WB
HA	Sigma	A2095	IP
HDAC1	Santa Cruz	sc-8410 (H-11)	WB
HDAC2	Santa Cruz	sc-55542(F-6)	WB
HDAC3	Santa Cruz	Sc-11417(H-99)	WB, ICQ
HDAC3	Cell Signaling	3949	ICQ
Histones	Chemicon	MAB052	WB
p27	Santa Cruz	sc-1641 (F-8)	WB, IP
p27	Santa Cruz	sc-528 (C-19)	WB, IP

Antigen	Casa comercial	Referència	Tècnica
p27	Transduction Lab	610242	WB
PCAF	Sigma	P7493	WB, IP
PCAF	Santa Cruz	sc-13124 (E-8)	WB, IP
Skp2	Santa Cruz	Sc-7164(H-435)	WB

## 4. ANÀLISI DE L'ACETILACIÓ/DEACETILACIÓ 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 immunoprecipitada de cèl·lules c2c12. Com a substrats utilitzem la barreja d'histones H2A, H2B, H3 i H4 (Sigma).

-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'acetilCoA<sup>3</sup>H. Afegim a la barreja de reacció tampó HAT fins arribar a un volum final de 30 µl.

-Ho incubem un mínim de 30 min a 30°C.

-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.

-Es realitzen tres rentats de 10 min amb una solució de 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9.

-Un rentat curt amb acetona, i els papers es deixen assecar a l'aire.

-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.

AcetilCoA<sup>3</sup>H. TRK924-50 Ci 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 DEACETILACIÓ D'HISTONES

Els assajos de deacetilació *in vitro* ens permeten detectar la capacitat que tenen les deacetilases per eliminar el grup acetil de residus de lisina, en el nostre cas de les histones. Com a enzim actiu, hem utilitzat les deacetilases HDAC1 i HDAC3 immunoprecipitades de les cèl·lules i com a font d'histones acetilades hem utilitzat cèl·lules HeLa tractades durant 16h amb 3µM de TSA (està descrit que el tractament amb TSA afavoreix l'acetilació de la H<sub>4</sub>, majoritàriament).

Reactius:

Tampó deacetilació: 50mMTris- HCl pH8, 10% glicerol. En el moment de fer l'assaig, afegir 1 mM PMSF, 1mM DTT i 0,1 mM EDTA

**Protocol:**

-400µg de lisat de cèl·lules HeLa transfectades amb FL-HDAC1 o FL-HDAC3 i immunoprecipitades o/n amb anti-Flag conjugat amb boles de proteïna A.

-3 rentats amb tampó de deacetilació

-Posar en contacte les boles que tenen unides la FL-HDAC1 o FL-HDAC3 amb 40µg de lisat de cèl·lules HeLa tractades amb 3µM de TSA. Afegir 30µl tampó de deacetilació.

-Incubar durant 45min a 30°C

-Centrifugar a 14000 rpm 15''

-Afegir tampó de mostra 4x i correr en un gel del 15% d poliacrilamida.

-Fer la transferència i revelar amb anti-acetil lisina.

### 4.3 DEACETILACIÓ *IN VITRO* DE PROTEÏNES NO HISTONES

Per a determinar si la HDAC3 deacetilava *in vitro* la ciclina A, vam dur a terme aquest assaig de deacetilació *in vitro*. La HDAC3 la vam obtenir de cèl·lules transfectades amb FL-HDAC3 i immunoprecipitada amb anti-flag. La ciclina A, el nostre substrat, el vam obtenir de cèl·lules HeLa transfectades amb HA-cicA i YFP/PCAF i tractades durant 16h amb un inhibidor de deacetilases generals, com el TSA per incrementar els seus nivells d'acetilació.

#### **Reactius:**

*Tampó de deacetilació:* 50mM Tris-HCl pH8, 10% glicerol. En el moment de fer l'assaig, afegir 1 mM PMSF, 1mM DTT i 0,1 mM EDTA

#### **Protocol:**

Per a la obtenció del substrat, cèl·lules HeLa van ser transfectades amb HA-CicA i YFP-P/CAF. 24h post transfecció, van ser tractades durant 16h amb 3 $\mu$ M de TSA, es va recollir el pellet cel·lular i es va lisar amb tampó RIPA (descriu a la secció 5.2). Es va immunoprecipitar la ciclina A utilitzant un anti-HA o/n a 4°C. Al dia següent es va incubar amb boles de proteïna A.

Obtenció de la deacetilasa: cèl·lules HeLa van ser transfectades amb FL-HDAC3. 24h post transfecció les cèl·lules van ser recollides i els pellets van ser lisats amb tampó de deacetilació. Les mostres van ser immunoprecipitades amb anti-Flag conjugat amb boles de sefarosa de proteïna A o/n a 4°C.

Assaig de deacetilació:

-3 rentats amb tampó de deacetilació, tant la ciclina A com la HDAC3, immunoprecipitades amb els respectius anticossos, anti-HA i anti-Flag.

-Posar en contacte les boles que tenen unida la HDAC3 i les boles que tenen unida la ciclina A i afegir un volum de 30µl de tampó de deacetilació.

-Incubar durant 45min a 30°C.

-Centrifugar a 14000 rpm 15".

-Afegir tampó de mostra 4x i correr en un gel del 10% de poliacrilamida.

-Fer la transferència i revelar amb anticòs anti-acetil lisina.

## 5. ANÀLISI DE LA INTERACCIÓ ENTRE PROTEÏNES

### 5.1 *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 de dues maneres: posant en contacte una proteïna purificada unida a *beads* de sefarosa i un extracte proteic de cèl·lules HCT-116; o bé posant en contacte una proteïna purificada unida a *beads* de sefarosa i proteïna purificada.

#### **Preparació de la columna de CNBr sefarosa-proteïna**

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

**Reactius:**

*Tampó Bicarbonat:* 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> 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:**

-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.

-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.

-Ressuspensem 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.

-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.

-Per eliminar l'excés de lligand es fa un rentat amb 10 volums de tampó bicarbonat respecte al volum de la resina emprada.

-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.

-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 assegurin que no

quedi cap lligand lliure unit iònicament a la proteïna que hem unit covalentment a la resina.

-Per conservar la columna en bones condicions la ressuspenem en PBS i 0,1% d'azida sòdica a 4°C.

### **Protocol del *pull down***

-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.

-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.

-Fem tres rentats de la fracció unida amb 1 ml de Tampó d'Unió o amb el tampó de lisi de les cèl·lules.

-Afegim Tampó de Mostra desnaturalitzant (Laemmli) tant a la fracció unida com a la no unida.

-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.



## 5.2 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 <sub>2</sub>	++	-
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.

### Reactius:

*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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 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 anàlisi dels complexos**

-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).

-Clarificar l'extracte per centrifugació a 14000 rpm, 10 min, 4°C.

-Es recupera el sobrenedant i es valora la quantitat de proteïna pel mètode de Bradford.

-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.

-S'afegeixen 15-30 µl de proteïna A-Sepharose<sup>®</sup> (Pierce) o proteïna G-Sepharose<sup>®</sup> (Sigma) i s'incuba durant 1 hora a 4°C, en agitació.

-Es centrifuga uns 10 seg a 14000 rpm a 4°C.

-Es renten les boletes de sefarosa 3 vegades amb el mateix tampó amb el que hem lissat les cèl·lules (si es tracta del tampó HAT, s'hi afegeix KCl fins a 150 mM).

-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 poliacrilamida, es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa i es realitza un *western blot* per analitzar la composició dels complexos.

### **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.

#### **Reactius:**

*Barreja de reacció:* 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 12,5 µM ATP, 2 mM DTT, Tampó quinasa 10x.

*Histona H1.* Boehringer Mannheim.

*ATP.* Sigma.

*[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP.* Amersham, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml.

#### **Protocol:**

-S'immunoprecipiten 100-250 µg de lisat amb 1-2 µg d'anticòs anti-CDK2. També incloem un control negatiu (IgG), i es segueix el procediment descrit per la immunoprecipitació i l'anàlisi de complexos.

-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").

-A continuació es retira el sobrenedant i s'afegeix el substrat (2 µg d'histona H1) a cada mostra.

-S'afegeix la barreja de reacció que haurem preparat al moment. El volum final és de 30 µl.

- S'incuba durant 30 min a 30 °C.
- La reacció s'atura afegint 10 µl de tampó de mostra 4x.
- Es procedeix a la separació electroforètica de les mostres en un gel del 12% d'acrilamida.
- 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.
- 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).

## 6. 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 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]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.

### Reactius:

*Barreja de reacció:* 2 µg Histona H<sub>1</sub>, 12,5 µM ATP, Tampó quinasa 10x, 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, 2 mM DTT (l'afegim al moment de l'assaig), H<sub>2</sub>O mQ fins a 30 µl.

*Tampó quinasa:* 25 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

**A partir d'immunoprecipitació** (vegeu apartat 5.2, "Materials i Mètodes").

## 7. DETERMINACIÓ DE LA VIDA MITJA

Per a determinar la vida mitja de la ciclina A hem tractat les cèl·lules amb 10 µg/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.

## 8. 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 Iodur de Propidi o bé TOPRO-3, seguit de l'anàlisi per **citometria de flux**. El procediment és el següent:

-Les cèl·lules es tripsinitzen, i després es neutralitza la tripsina afegint el mateix volum de medi suplementat.

-Es centrifuguen a 2000 rpm a temperatura ambient durant 5 min.

-Es descarta el sobrenedant i es fa un rentat amb PBS.

-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.

-Es centrifuguen les cèl·lules per eliminar la solució de fixació i tot seguit es fa un rentat amb PBS.

-El *pellet* es ressuspèn en una solució que conté 20 µg/ml de Iodur 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 CantoII. La interpretació dels resultats es pot fer amb diferents programes. Nosaltres hem utilitzat el WinMDi 2.9.

## 9. 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 podrem 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:

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

-Realitzar les transfeccions oportunes. 24 h post-transfecció cal treure el medi de les cèl·lules i fer dos rentats amb PBS.

-Fixació tot incubant les cèl·lules durant 15 min a temperatura ambient amb una solució al 4% de paraformaldehid en PBS.

-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.

-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-HDAC1, HDAC2, HDAC3 i ciclina A van ser utilitzats a una dilució 1/50).

-3 rentats amb PBS.

-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 1:500).

-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.

Finalment, cal rentar amb PBS i muntar els cubres sobre portaobjectes afegint uns 5 µl de medi de muntatge *Mowiol*<sup>®</sup> (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.

## 10. UBIQUITINITZACIÓ DE PROTEÏNES

### 10.1 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 impedit 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 poliubiquitiniza 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.

## **BIBLIOGRAFIA**





- Adams, P.D. et al., 1996. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol. Cell. Biol.*, 16(12), pp.6623-6633.
- Ahringer, J., 2000. NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends in genetics*, 16(8), pp.351-356.
- Alland, L. et al., 2002. Identification of Mammalian Sds3 as an Integral Component of the Sin3/Histone Deacetylase Corepressor Complex. *Mol. Cell. Biol.*, 22(8), pp.2743-2750.
- Alland, L. et al., 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*, 387, pp.49-55.
- Allfrey, G., Faulkner, R. & Mirsky, A.E., 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their possible role in the regulation of RNA synthesis. *PNAS*, 51, pp.786-794.
- Armeanu, S. et al., 2005. Natural Killer Cell-Mediated Lysis of Hepatoma Cells via Specific Induction of NKG2D Ligands by the Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Valproate. *Cancer Research*, 65(14), pp.6321-6329.
- Arsic, N. et al., 2012. A novel function for Cyclin A2: Control of cell invasion via RhoA signaling. *J. Cell Biol.*, 196(1), pp.147-162.
- Avvakumov, N. & Coté, J., 2007. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*, 26, pp.5395-5407.
- Bakin, R.E. & Jung, M.O., 2008. HDAC2 Cytoplasmic Sequestration Potentiates Keratinocyte Terminal Differentiation. *The Open Cell Development & Biology Journal*, 1, pp.1-9.
- Barrière, C. et al., 2007. Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Molecular Oncology*, 1, pp.72-83.
- Bartek, J. & Lukas, J., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3, pp.421-429.

- Bartek, J., Lukas, C. & Lukas, J., 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews*, 5, pp.792-804.
- Berns, K. et al., 2004. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, 428, pp.431-437.
- Berthet, C. et al., 2003. Cdk2 Knockout Mice Are Viable. *Current Biology*, 13, pp.1775-1785.
- Berthet, C. et al., 2006. Combined Loss of Cdk2 and Cdk4 Results in Embryonic Lethality and Rb Hypophosphorylation. *Developmental Cell*, 10, pp.563-573.
- Bhaskara, S. et al., 2008. Article Deletion of Histone Deacetylase 3 Reveals Critical Roles in S Phase Progression and DNA Damage Control. *Molecular Cell*, 30, pp.61-72.
- Bitterman, K.J. et al., 2002. Inhibition of Silencing and Accelerated Aging by Nicotinamide, a Putative Negative Regulator of Yeast Sir2 and Human SIRT1. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), pp.45099 -45107.
- Blanco-García, N. et al., 2009. Autoacetylation Regulates P/CAF Nuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 284(3), pp.1343-1352.
- Borriello, A. et al., 2007. p27Kip1 Metabolism. *Cell Cycle*, 6(9), pp.1053-1061.
- Boyault, C. et al., 2007. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & Development*, 21, pp.2172-2181.
- 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, pp. 248-254.
- Brown, N.R. et al., 1995. The crystal structure of cyclin A. *Structure*, 3, pp.1235-1247.
- Brownell, J.E. et al., 1996. Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell*, 84, pp.843-851.

- Bruce, A.W. et al., 2004. Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *PNAS*, 101(28), pp.10458-10463.
- Brush, M.H. et al., 2004. Deacetylase Inhibitors Disrupt Cellular Complexes Containing Protein Phosphatases and Deacetylases. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), pp.7685-7691.
- Cardoso, M.C., Leonhardt, H. & Nadal-Girard, 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, pp.979-992.
- Carmen, A.A., et al., 1999. Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *PNAS*, 96(22), pp.12356-61.
- Carrozza, M.J. et al., 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends in genetics*, 19(6), pp.321-329.
- Chan, H.M. & La Thangue, N.B., 2001. p300/CBP proteins:HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of Cell Science*, 114(13), pp.2363-2373.
- Chang, S. et al., 2006. Histone Deacetylase 7 Maintains Vascular Integrity by Repressing Matrix Metalloproteinase 10. *Cell*, 126, pp.321-334.
- Chen, H. et al., 1999. Regulation of Hormone-Induced Histone Hyperacetylation and Gene Activation via Acetylation of an Acetylase. *Cell*, 98, pp.675-686.
- Chen, Junjie et al., 1996. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol. Cell. Biol.*, 16(9), pp.4673-4682.
- Chipuk, J.E. & Green, D., 2006. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 13, pp.994-1002.
- Clements, A. et al., 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *The EMBO Journal*, 18(13), pp.3521-3532.

- Coisy, M. et al., 2004. Cyclin A Repression in Quiescent Cells Is Associated with Chromatin Remodeling of Its Promoter and Requires Brahma/SNF2 $\alpha$ . *Molecular Cell*, 15, pp.43-56.
- Colombo, R. et al., 2002. The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1. *EMBO reports*, 3(11), pp.1062-1068.
- Coradini, D. et al., 2004. Inhibition of Hepatocellular Carcinomas *in vitro* and Hepatic Metastases *in vivo* in Mice by the Histone Deacetylase Inhibitor Ha-But. *Clinical Cancer Research*, 10, pp.4822-48230.
- Coverley, D., Laman, H. & Laskey, R.A., 2002. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nature Cell Biology*, 4, pp.523-528.
- Craig, J.M. et al., 2003. Analysis of mammalian proteins involved in chromatin modification reveals new metaphase centromeric proteins and distinct chromosomal distribution patterns. *Human Molecular Genetics*, 12(23), pp.3109-3121.
- Crazzolara, R. et al., 2002. Histone deacetylase inhibitors potently repress CXCR4 chemokine receptor expression and function in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 119, pp. 965-969
- Dangond, F. et al., 1998. Differential Display Cloning of a Novel Human Histone Deacetylase (HDAC3) cDNA from PHA-Activated immune cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242, pp.648-652.
- David, G., Neptune, M.A. & Depinho, R.A., 2002. SUMO-1 Modification of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Modulates Its Biological Activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(26), pp.23658 -23663.
- Den Elzen, N. & Pines, J., 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol*, 153, pp.121-136
- Deng, C. et al., 1995. Mice Lacking p21CIP1/WAF1 Undergo Normal Development, but are defective in G<sub>1</sub> checkpoint control. *Cell*, 82, pp.875-884.

- Dequiedt, F. et al., 2003. HDAC7, a Thymus-Specific Class II Histone Deacetylase, Regulates Nur77 Transcription and TCR-Mediated Apoptosis. *Immunity*, 18, pp.687-698.
- Deroanne, C.F. et al., 2002. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, 21, pp.427-436.
- Desai, D. et al., 1995. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol. Cell Biol.*, 15(1), pp.345-350.
- Dhalluin, C. et al., 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain bromodomain. *Nature*, 399, pp.491-496.
- Dokmanovic, M. & Marks, P.A., 2005. Prospects: Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96, pp.293-304.
- Dompierre, J.P. et al., 2007. Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *The Journal of Neuroscience*, 27(13), pp.3571-3583.
- Dovey, O.M., Foster, C.T. & Cowley, S.M., 2010. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *PNAS*, 107(18), pp.8242-8247.
- Draviam, V.M. et al., 2007. A functional genomic screen identifies a role for TAO1 kinase in spindle-checkpoint signalling. *Nature Cell Biology*, 9(5), pp.556-564.
- Ducommun, B. et al., 1991. cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO Journal*, 10(11), pp.3311-3319.
- D'Urso, G. et al., 1990. Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34cdc2 protein kinase. *Science* 250, pp. 786-791.
- Ellis L, et al., 2009. The histone deacetylase inhibitors LAQ824 and LBH589 do not require death receptor signaling or a functional apoptosome to mediate tumor cell death or therapeutic efficacy. *Blood*, 114(2), pp.380-93.

- Eot-houllier, G. et al., 2008. Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes & Development*, 22, pp.2639-2644.
- Fang, G., Yu, H. & 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 & Development*, 12, pp.1871-1883.
- Feng, Q. & Zhang, Y. 2003. The NuRD complex: linking histone modification to nucleosome remodeling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 274, pp. 269-90.
- Fero, M.L. et al., 1996. A Syndrome of Multiorgan Hyperplasia with Features of Gigantism, Tumorigenesis, and Female Sterility in p27 Kip1-Deficient Mice. *Cell*, 85, pp.733-744.
- Fesquet, D. et al., 1993. The MO 15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin- dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thri 61 and its homologues. *EMBO Journal*, 12(8), pp.3111 -3121.
- Finkel, T., Deng, C.-Xia & Mostoslavsky, R., 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460, pp.587-591.
- Finnin, M.S. et al., 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 401, pp.188-193.
- Fischer, D.D. et al., 2002. Isolation and Characterization of a Novel Class II Histone Deacetylase, HDAC10. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8), pp.6656 -6666.
- Fischle, W. et al., 2002. Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT N-CoR. *Molecular Cell*, 9, pp.45-57.
- Fisher, Robert P and Morgan, D.O 1994. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 78, pp. 713-724
- Fisher, Robert P et al., 1995. Alternative Mechanisms of CAK Assembly Require an Assembly Factor or an Activating Kinase. *Cell*, 83, pp.47-57.

- Foster, D.A. et al., 2011. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint (s). *Genes and Cancer*, 1(11), pp.1124-1131.
- Frangioni, J.V. & Neel, B.G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem*, 210(1), pp. 179-187.
- Fung, T.K., Ma, H.T. & Poon, R.Y.C., 2007. Specialized Roles of the Two Mitotic Cyclins in Somatic Cells: Cyclin A as an Activator of M Phase-Promoting Factor. *Molecular Biology of the Cell*, 18, pp.1861-1873.
- Fung, T.K., Yam, C.H. & Poon, R.Y.C., 2005. The N-Terminal Regulatory Domain of Cyclin A Contains Redundant Ubiquitination Targeting Sequences and Acceptor Sites. *Cell Cycle*, 4(10), pp.1411-1420.
- Furuno, N., Elzen, N.D. & Pines, J., 1999. Human Cyclin A Is Required for Mitosis until Mid Prophase. *The Journal of Cell Biology*, 147(2), pp.295-306.
- Gabrielli, B.G et al., 2002. Identifying molecular targets mediating the anticancer activity of histone deacetylase inhibitors: a work in progress. *Curr Cancer Drug Targets*, 2, pp.337-353
- Gallant, P et al., 1995. Protein kinases in the control of mitosis: focus on nucleocytoplasmic trafficking. *J Cell Sci Suppl*, 19, pp. 21-28
- Geley et al. 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, pp.137-48
- Geng, Y. et al., 2007. Kinase-Independent Function of Cyclin E. *Molecular Cell*, 25, pp.127-139.
- Geng, Y. et al., 2003. Cyclin E Ablation in the Mouse. *Cell*, 114, pp.431-443.
- Giles, R.H., Peters, D.J.M. & Breuning, M.H., 1998. Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *DNA Repair*, 14(3), pp.178-183.



- Giles, R.H. et al., 1997. Construction of a 1.2-Mb Contig Surrounding, and Molecular Analysis of, the Human CREB-Binding Protein (CBP/CREBBP) Gene on Chromosome 16p13.3. *Genomics*, 42, pp.96- 114.
- Giordano, A. & Avantaggiati, M.L., 1999. p300 and CBP:Partners for Life and Death. *Journal of Cellular Physiology*, 181, pp.218 -230.
- Girard, F. et al., 1991. Cyclin A Is Required for the Onset of DNA Replication in Mammalian Fibroblasts. *Cell*, 67, pp.1169-1179.
- Girdwood, D. et al., 2003. p300 Transcriptional Repression Is Mediated by SUMO Modification. *Molecular Cell*, 11, pp.1043-1054.
- Glotzer, M., Murray, A.W. & Kirschner, M.W., 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349, pp.132-138.
- Goodman, R.H. & Smolik, S., 2000. CBP p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development*, 14, pp.1553-1577.
- Gould K.L. and Nurse P. , 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* ,342, pp.39-45
- Gozani, O. et al., 2003. The PHD Finger of the Chromatin-Associated Protein ING2 Functions as a Nuclear Phosphoinositide Receptor. *Cell*, 114, pp.99-111.
- Grant, P.A. et al., 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & Development*, 11, pp.1640-1650.
- Grant, Steven, Easley, C. & Kirkpatrick, P., 2007. Vorinostat. *Nature Reviews*, 6, pp.21-22.
- Gray, S.G. et al., 2003. Modulation of splicing events in histone deacetylase 3 by various extracellular and signal transduction pathways. *Gene Expr*, 11, pp. 13-21
- Gregoretto, I.V., Lee, Y.-mi & Goodson, H.V., 2004. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.*, 338, pp.17-31.

- Grozinger, C.M. & Schreiber, S.L., 2000. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *PNAS*, 97(4), pp.7835-7840.
- Gu, W. & Roeder, R.G., 1997. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, 90, pp.595-606.
- Guardiola, A.R. & Yao, T.-P., 2002. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Histone Deacetylase HDAC10. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(5), pp.3350-3356.
- Guenther, M.G., Barak, O. & Lazar, M.A., 2001. The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Mol. Cell. Biol.*, 21(18), pp.6091-6101.
- Guo, C. et al., 2012. Regulated Clearance Histone Deacetylase 3 protects independent formation of nuclear receptor corepressor complexes. *JBC*, pp.1-12.
- Haberland, M. et al., 2009. Genetic dissection of histone deacetylase requirement in tumor cells. *PNAS*, 106(19), pp.7751-7755.
- Haggarty, S.J. et al., 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *PNAS*, 100(8), pp.4389-4394.
- Halkidou, K. et al., 2004. Upregulation and Nuclear Recruitment of HDAC1 in Hormone Refractory Prostate Cancer. *The Prostate*, 59, pp.177-189.
- Hamamori, Y. et al., 1999. Regulation of Histone Acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH Protein Twist and Adenoviral Oncoprotein E1A. *Cell*, 96, pp.405-413.
- Hartwell, L.H. et al., 1974. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast. *Science*, 183, pp.46-51.
- Hassig, C.A. et al., 1997. Histone Deacetylase Activity Is Required for Full Transcriptional Repression by mSin3A. *Cell*, 89, pp.341-347.
- Herrera, J.E. et al., 1997. The Histone Acetyltransferase Activity of Human GCN5 and PCAF Is Stabilized by Coenzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(43), pp.27253-27258.

- Hook, S.S. et al., 2002. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *PNAS*, 99(21), pp.13425-13430.
- Huang, B.H. et al., 2005. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21 Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death and Differentiation*, 12, pp.395-404.
- Hubbert, C. et al., 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417, pp.455-458.
- Huet, X. et al., 1996. Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 16(7), pp.3789-3798.
- Hunt, T. et al., 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, pp.707-724
- Hunt, Tim, Nasmyth, K. & Novák, B., 2011. The cell cycle. *Phil. Trans. R. Soc*, 366, pp.3494-3497.
- Hübner, N.C. et al., 2010. Re-examination of siRNA specificity questions role of PICH and Tao1 in the spindle checkpoint and identifies Mad2 as a sensitive target for small RNAs. *Chromosoma*, 119, pp.149-165.
- Imhof, A. & Wolffe, A.P., 1999. Purification and Properties of the Xenopus Hat1 Acetyltransferase: Association with the 14-3-3 Proteins in the Oocyte Nucleus. *Biochemistry*, 38, pp.13085-13093.
- Iwata, A. et al., 2005. HDAC6 and Microtubules Are Required for Autophagic Degradation of Aggregated Huntingtin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp.40282-40292.
- Izumi, T., Walker, D.H. & Maller, J.L., 1992. Periodic Changes in Phosphorylation of the Xenopus cdc25 Phosphatase Regulate Its Activity. *Molecular Biology of the Cell*, 3, pp.927-939.

- Jackman, M. et al., 2002. Cyclin A- and Cyclin E-Cdk Complexes Shuttle between the Nucleus and the Cytoplasm. *Molecular Biology of the Cell*, 13, pp.1030 -1045.
- Jackman, M. et al., 2003. Active cyclin B-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*, 5, pp.143-148.
- Jeffrey, P.D. et al., 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, 376, pp.313-320.
- Jepsen, K. et al., 2008. Cooperative regulation in development by SMRT and FOXP1. *Genes & Development*, 22, pp.740-745.
- Jepsen, K. et al., 2000. Combinatorial Roles of the Nuclear Receptor Corepressor in Transcription and Development. *Cell*, 102, pp.753-763.
- Jin, Jianping et al., 2004. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes & Development*, 18, pp.2573-2580.
- Jin, L. et al., 2008. Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the Human Anaphase-Promoting Complex. *Cell*, 133, pp.653-665.
- Jin, Y. et al., 2002. MDM2 Inhibits PCAF (p300/CREB-binding Protein-associated Factor) - mediated p53 Acetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp.30838 -30843.
- Johnstone, R.W., 2002. Histone-deacetylase inhibitors:Novel drugs for the treatment of Cancer. *Nature Reviews*, 1, pp.287-299.
- Kalaszczynska, I et al., 2009. Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells. *Cell*, 138, pp.352-365
- Kao, G.D. et al., 2003. Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *The Journal of Cell Biology*, 160(7), pp.1017-1027.
- Karsenty, G., 2003. The complexities of skeletal biology. *Nature*, 423, pp.316-318.
- Kastan, M.B. & Lim, D.-sik, 2000. The Many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1(December), pp.179-186.

Kawaguchi, Y. et al., 2003. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell*, 115, pp.727-738.

Kawasaki, H. et al., 2000. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature*, 405, pp.195-200.

Kikuchi, H., Takami, Y. & Nakayama, T., 2005. GCN5: a supervisor in all-inclusive control of vertebrate cell cycle progression through transcription regulation of various cell cycle-related genes. *Gene*, 347, pp.83 - 97.

Kim, J.Y. & Casaccia, P., 2010. HDAC1 in axonal degeneration. *Cell Cycle*, 9(18), pp.3680-3684.

Kirsh, O. et al., 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO Journal*, 21(11), pp.2682-2691.

Kitawaga et al., 2011. Structural Basis of the 9-Fold Symmetry of Centrioles. *Cell*, 144, pp.364-375

Knutson, S.K. et al., 2008. Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO Journal*, 27(7), pp.1017-1028.

Kobayashi, H et al., 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, pp. 1279-94

Kozar, K. et al., 2004. Mouse Development and Cell Proliferation in the Absence of D-Cyclins. *Cell*, 118, pp.477-491.

Kraft, C. et al., 2003. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO Journal*, 22(24), pp.6598-6609.

Krude, T. et al., 1997. Cyclin/Cdk-Dependent Initiation of DNA Replication in a Human Cell-Free System. *Cell*, 88, pp.109-119.

Laemmli, U.K. et al., 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol*, 47(1), pp.69-85.

- Labib, K. & Piccoli, G.D., 2011. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway Surviving. *Phil. Trans. R. Soc*, 366, pp.3554-3561.
- Lagger, G. et al., 2002. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO Journal*, 21(11), pp.2672-2681.
- Lane, A.A. & Chabner, B.A., 2009. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 27(32), pp.5459-5468.
- Lee, H. et al., 2006. Histone Deacetylase 8 Safeguards the Human Ever-Shorter Telomeres 1B (hEST1B) Protein from Ubiquitin-Mediated Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(14), pp.5259-5269.
- Lees, E.M. & Harlow, ED, 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(2), pp.1194-1201.
- Legube, G. et al., 2004. Role of the Histone Acetyl Transferase Tip60 in the p53 Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), pp.44825-44833.
- Li, M. et al., 2008. The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. *Nature Cell Biology*, 10(9), pp.1083-1089.
- Li, M., York, J.P. & Zhang, P., 2007. Loss of Cdc20 Causes a Securin-Dependent Metaphase Arrest in Two-Cell Mouse Embryos. *Mol. Cell. Biol.*, 27(9), pp.3481-3488.
- Liang, Jiyong et al., 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G<sub>1</sub> arrest. *Nature Medicine*, 8(10), pp.1153-1160.
- Liang, Jiancong et al., 2008. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology Letters*, 10(6), pp.731-739.
- Lin, R.J. et al., 2001. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20, pp.7204-7215.

- Lin, S.-ju et al., 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & Development*, 18, pp.12-16.
- Linding, R. et al., 2007. Resource Systematic Discovery of In Vivo Phosphorylation Networks. *Cell*, 129, pp.1415-1426.
- Liu, Dong et al., 1998. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nature Genetics*, 20, pp.377-380.
- Liu, H. et al., 2009. Histone Deacetylase 11 Regulates Oligodendrocyte-Specific Gene Expression and Cell Development in OL-1 Oligodendroglia Cells. *Glia*, 57, pp.1-12.
- Liu, L.-teh et al., 2003. Histone Deacetylase Inhibitor Up-Regulates RECK to Inhibit MMP-2 Activation and Cancer Cell Invasion. *Cancer Research*, 63, pp.3069-3072.
- Lukas, C. et al., 1999. Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature*, 401, pp.815-818.
- Luo, Y. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*, 375, pp.159
- Maeda, T. et al., 2000. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 96(12), pp.3847-3856.
- Magner, W.J. et al., 2000. Activation of MHC Class I, II, and CD40 Gene Expression by Histone Deacetylase Inhibitors. *The Journal of Immunology*, 165, pp.7017-7024.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), pp.630-41.
- Malumbres, M. et al., 2004. Mammalian Cells Cycle without the D-Type Cyclin-Dependent Kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, 118, pp.493-504.
- Maridor, G. et al., 1993. Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. *Journal of Cell Science*, 106, pp.535-544.

- Martínez-Balbás, M.A. et al., 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *The EMBO Journal*, 19(4), pp.662-671.
- Massagué, J., 2004. G<sub>1</sub> cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432, pp.298-306.
- Masumi, A. et al., 1999. The Histone Acetylase PCAF Is a Phorbol-Ester-Inducible Coactivator of the IRF Family That Confers Enhanced Interferon Responsiveness. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3), pp.1810-1820.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Canela, N., Zecchin, A., et al., 2009(a). The transcriptional co-activator PCAF regulates cdk2 activity. *Nucleic Acid Research*, 37(21), pp.7072-7084.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Canela, N., Busino, L., et al., 2009(b). Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene*, 28, pp.2654-2666.
- Mathe, E. et al., 2004. The E2-C Vihar Is Required for the Correct Spatiotemporal Proteolysis of Cyclin B and itself undergoes Cyclical Degradation. *Current*, 14, pp.1723-1733.
- Maurice, T. et al., 2008. Altered Memory Capacities and Response to Stress in p300/CBP-Associated Factor (PCAF) Histone Acetylase Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology*, 33, pp.1584-1602.
- McGowan, C.H. & Russell, P., 1993. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO Journal*, 12(1), pp.75 - 85.
- Mckinsey, T.A. et al., 2000. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, 408, pp.106-111.
- Mckinsey, T.A., Zhang, C.L. & Olson, E.N., 2001. Identification of a Signal-Responsive Nuclear Export Sequence in Class II Histone Deacetylases. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), pp.6312-6321.
- Mclaughlin, F., Finn, P. & La Thangue, N.B., 2003. The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *DDT*, 8(17), pp.793-802.



- Mcquown, S.C. et al., 2011. HDAC3 Is a Critical Negative Regulator of Long-Term Memory Formation. *The Journal of Neuroscience*, 31(2), pp.764 -774.
- Medema, R.H. & Macu, L., 2011. Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, pp.1-13.
- Meraldi, P. et al., 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2–Cyclin A. *Nature Cell Biology*, 1(88-93).
- Merika, M. et al., 1998. Recruitment of CBP/p300 by the IFN $\beta$  Enhanceosome Is Required for Synergistic Activation of Transcription. *Molecular Cell*, 1, pp.277-287.
- Minucci, S. & Pelicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews*, 6, pp.38-51.
- Montembault, E. et al., 2007. PRP4 is a spindle assembly checkpoint protein required for MPS1, MAD1, and MAD2 localization to the kinetochores. *The Journal of Cell Biology*, 179(4), pp.601-609.
- Montgomery, R.L. et al., 2007. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes & Development*, 21, pp.1790-1802.
- Montgomery, R.L. et al., 2009. Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *PNAS*, 106(19), pp.7876-7881.
- Montgomery, R.L. et al., 2008. Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(11), pp.3588-3597.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374, pp.131-134
- Mueller, P.R. et al 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15 *Science*, 270, pp. 86-90 .
- Murphy, M. et al., 1997. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nature Genetics*, 15, pp.83-86.
- Musacchio, A., 2011. Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Phil. Trans. R. Soc*, 366, pp.3595-3604.

- Musacchio, A. & Salmon, E.D., 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, pp.379-393.
- Nagy, Z. & Tora, L., 2007. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, 26, pp.5341-5357.
- Nakatani, Y., 2001. Histone acetylases: versatile players. *Genes to Cells*, 6, pp.79-86.
- Nakayama, K.I. & Nakayama, K., 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, pp.369-381.
- Nigg, Erich A, 1996. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Current Opinion in Cell Biology*, 8, pp.312-317.
- Nigg, Erich A, 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, pp.21-32.
- Noh, J.H. et al., 2011. Aberrant Regulation of HDAC2 Mediates Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Deregulating Expression of G1/S Cell Cycle Proteins. *PLoS ONE*, 6(11), pp.1-13.
- Norbury, C. & Nurse, P., 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, pp.441-70.
- Nurse, P., 2000. A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond. *Cell*, 100, pp.71-78.
- Nyberg, K.A. et al., 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and Repliation checkpoints. *Annu. Rev. Genet.*, 36, pp.617-56.
- Oehme, I. et al., 2009. Histone Deacetylase 8 in Neuroblastoma Tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, 15(1), pp.91-99.
- Ogryzko, V.V. et al., 1998. Histone-like TAFs within the PCAF Histone Acetylase Complex. *Cell*, 94, pp.35-44.

- Ohtsubo, M. et al., 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol*, 15(5), pp.2612-2624.
- Oike, Y. et al., 1999. Mice Homozygous for a Truncated Form of CREB-Binding Protein Exhibit Defects in Hematopoiesis and Vasculo-angiogenesis. *Blood*, 93(9), pp.2771-2779.
- Ortega, S. et al., 2003. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature Genetics*, 35(1), pp.25-31.
- Pagano, M. et al., 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO Journal*, 11(3), pp.961 -971.
- Pandey, U.B. et al., 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature letters*, 447, pp.859-863.
- Pandolfi, P.P. 2001. Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors. *Cancer Chemoter. Pharmacol*, 48, suppl 1 S17-S18
- Pardee, A.B., 1974. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(4), pp.1286-1290.
- Parisi, T. et al., 2003. Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *The EMBO Journal*, 22(18), pp.4794-4803.
- Parry, D.H. & Farrell, P.H.O., 2001. The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Current Biology*, 11, pp.671-683.
- Pasqualucci, L. et al., 2003. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma*, 44 Suppl 3 5-S12
- Peart, M.J. et al., 2003. Novel Mechanisms of Apoptosis Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. *Cancer Research*, 63, pp.4460-4471.
- Pérez-Luna et al., 2012. PCAF regulates the stability of the transcriptional regulator and cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>KIP1</sup>. *Nucleic Acid Research*, in press

- Peters, J.-Michael, 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature*, 7, pp.644-656.
- Petersen, B.O. et al., 1999. Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. , 18(2), pp.396-410.
- Peterson, C.L., 2002. HDAC's at Work:Everyone Doing Their Part. *Molecular Cell*, 9, pp.921-922.
- Petrij, F. et al., 1995. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature*, 376, pp. 348-351
- Petroski, M.D. & Deshaies, R.J., 2005. Function and regulation of Cullin-Ring Ubiquitin ligases. *Nature Reviews*, 6, pp.9-20.
- Pflum, M.K.H. et al., 2001. Histone Deacetylase 1 Phosphorylation Promotes Enzymatic Activity and Complex Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp.47733-47741.
- Philips, A. et al., 2000. Differential Effect of Rac and Cdc42 on p38 Kinase Activity and Cell Cycle Progression of Nonadherent Primary Mouse Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp.5911-5917.
- Pili, R. et al., 2001. Combination of Phenylbutyrate and 13-cis Retinoic Acid Inhibits Prostate Tumor Growth and Angiogenesis. *Cancer Research*, 61, pp.1477-1485.
- Pines, J. & Hunter, T., 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, 346, pp.760-763
- Pines, J. & Hunter, T., 1994. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO Journal*, 13(16), pp.3772-3781.
- Pippa, R. et al., 2011. p27 Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene*, pp.1-14.
- Poizat, C. et al., 2000. Proteasome-Mediated Degradation of the Coactivator p300 Impairs Cardiac Transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 20(23), pp.8643-8654.

- Poon, R.Y.C. et al., 1993. The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *EMBO Journal*, 12(8), pp.3123-3132.
- Poux, A.N. & Marmorstein, R., 2003. Molecular Basis for Gcn5/PCAF Histone Acetyltransferase Selectivity for Histone. *Biochemistry*, 42, pp.14366-14374.
- Pugacheva, E.N. et al., 2007. HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium. *Cell*, 129, pp.1351-1363.
- Qian, D.Z. et al., 2006. Targeting Tumor Angiogenesis with Histone Deacetylase Inhibitors: the Hydroxamic Acid Derivative LBH589. *Clinical Cancer Research*, 12, pp.634-642.
- Qiu, L. et al., 2000. Histone Deacetylase Inhibitors Trigger a G2 Checkpoint in Normal Cells That Is Defective in Tumor Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11, pp.2069-2083.
- Qiu, Y. et al., 2006. HDAC1 Acetylation Is Linked to Progressive Modulation of Steroid Receptor-Induced Gene Transcription. *Molecular Cell*, 22, pp.669-679.
- Rajendran, P. et al., 2011. Histone deacetylase turnover and recovery in sulforaphane-treated colon cancer cells: competing actions of 14-3-3 and Pin1 in HDAC3 SMRT corepressor complex dissociation/reassembly. *Molecular Cancer*, 10(68), pp.1-18.
- Rane, S.G. et al., 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin- deficient diabetes and Cdk4 activation results in  $\beta$ -islet cell hyperplasia. *Nature Genetics*, 22(may), pp.44-52.
- Rape, M. & Kirschner, M.W., 2004. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature*, 432, pp.588-595.
- Rape, M., Reddy, S.K. & Kirschner, M.W., 2006. The Processivity of Multiubiquitination by the APC Determines the Order of Substrate Degradation. *Cell*, 124, pp.89-103.
- Razidlo, D.F. et al., 2010. Histone Deacetylase 3 Depletion in Osteo/Chondroprogenitor Cells Decreases Bone Density and Increases Marrow Fat. *Plo*, 5(7), pp.1-15.
- Reed, N.A. et al., 2006. Report Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology*, 16, pp.2166-2172.

- Resnitzky, D. et al., 1995. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.*, 15(8), pp.4347-4352.
- Riabowol, K, 1989. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell*, 57, pp 393
- Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D., 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, pp.81-120.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E. & Baylin, S.B., 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics*, 25, pp.269-277.
- de Ruijter, A.J.M. et al., 2003. Histone deacetylases ( HDACs ): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370, pp.737-749.
- Sabile, A. et al., 2006. Regulation of p27 Degradation and S-Phase Progression by Ro52 RING Finger Protein. *Mol. Cell. Biol.*, 26(16), pp.5994-6004.
- Saha, P. et al., 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(5), pp.2758-2767.
- Saksouk, N., Avvakumov, N. & Côté, J., 2008. Visions & Reflections (Minireview) (de) MYSTification and INGenuity of tumor suppressors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, pp.1013 - 1018.
- Santamaría, D. et al., 2007. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448, pp.811-816.
- Santos-Rosa, H. et al., 2003. Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic Acid Research*, 31(15), pp.4285-4292.
- Schwer, B. et al., 2002. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *The Journal of Cell Biology*, 158(4), pp.647-657.

- Segré, C.V. & Chiocca, S., 2011. Regulating the Regulators: The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, pp.1-15.
- Seigneurin-berny, D. et al., 2001. Identification of Components of the Murine Histone Deacetylase 6 Complex: Link between Acetylation and Ubiquitination Signaling Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 21(23), pp.8035-8044.
- Senese, S. et al., 2007. Role for Histone Deacetylase 1 in Human Tumor Cell Proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, 27(13), pp.4784-4795.
- Sherr, C.J., 1993. Mammalian G<sub>1</sub> cyclins. *Cell*, 73, pp.1059-1065
- Sherr, C.J., 1994. G<sub>1</sub> Phase Progression: Cycling on Cue. *Cell*, 79, pp.551-555.
- Sherr, C.J., 1996 Cancer cell cycles. *Science*, 274, pp.1672-1677
- Sherr, C.J. & Roberts, James M, 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub> -phase progression. *Genes & Development*, 13, pp.1501-1512.
- Sherr CJ, & Roberts JM. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Development*, 18(22), pp. 2699-711.
- Singh, N. et al., 2011. Histone deacetylase 3 regulates smooth muscle differentiation in neural crest cells and development of the cardiac outflow tract. *Circ Res.*, 109(11), pp. 1240-9.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67, pp.31-40 .
- Solomon, M.J. et al., 1990. Cyclin activation of p34cdc2. *Cell*, 63, pp. 1013-1024
- Solomon, M.J., Harper, J.W. & Shuttleworth, J., 1993. CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO Journal*, 12(8), pp.3133-3142.
- Solomon, M.J 1994. The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends Biochem Sci*, 19, pp.496-500

Song, J. et al., 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113, pp.264-268.

Song, K. et al., 2006. The Transcriptional Coactivator CAMTA2 Stimulates Cardiac Growth by Opposing Class II Histone Deacetylases. *Cell*, 125, pp.453-466.

Stanya, K.J. et al., 2008. CDK2 and Pin1 negatively regulate the transcriptional corepressor SMRT. *J. Cell Biol.*, 183(1), pp.49-61.

Statbite: FDA Oncology Drug Product Approvals in 2009. *JNCI*, p.219.

Su, T.Ti. & Jaklevic, B., 2001. DNA damage leads to a Cyclin A–dependent delay in metaphase- anaphase transition in the *Drosophila* gastrula. *Current Biology*, 11, pp.8-17.

Sun, G., Yu, R.T., et al., 2007. Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *PNAS*, 104(39), pp.15282-15287.

Sun, Y. et al., 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *PNAS*, 102(37), pp.13182-13187.

Sun, Y., Xu, Ye, et al., 2007. DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of ATM Activates ATM Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24), pp.8502-8509.

Sykes, S.M. et al., 2006. Acetylation of the p53 DNA-Binding Domain Regulates Apoptosis Induction. *Molecular Cell*, 24, pp.841-851.

Sykes, S.M. et al., 2009. Acetylation of the DNA Binding Domain Regulates Transcription-independent Apoptosis by p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(30), pp.20197-20205.

Sørensen, C.S. et al., 2001. A Conserved Cyclin-Binding Domain Determines Functional Interplay between Anaphase-Promoting Complex–Cdh1 and Cyclin A-Cdk2 during Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*, 21(11), pp.3692-3703.

Tanaka, H. et al., 2002. Cytoplasmic p21 Cip1/Waf1 regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *The Journal of Cell Biology*, 158(2), pp.321-329.



- Tang, Y. et al., 2006. Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Cell*, 24, pp.827-839.
- Tang, Z., Li, B., et al., 2001(a). APC2 Cullin Protein and APC11 RING Protein Comprise the Minimal Ubiquitin Ligase Module of the Anaphase-promoting Complex. *Molecular Biology of the Cell*, 12, pp.3839 -3851.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., et al., 2001(b). Mad2-Independent Inhibition of APC Cdc20 by the Mitotic Checkpoint Protein BubR1. *Developmental Cell*, 1, pp.227-237.
- Taunton, J. et al., 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272, pp. 408
- Taylor, W.R. & Stark, G.R., 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20, pp.1803-1815.
- Terui, T. et al., 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 Research*, 63, pp.8948-8954.
- Togi, S. et al., 2009. HDAC3 influences phosphorylation of STAT3 at serine 727 by interacting with PP2A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), pp.616-620.
- Tran, A.D.-Anh et al., 2007. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *Journal of Cell Science*, 120, pp.1469-1479.
- Trivedi, C.M. et al., 2007. Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3b activity. *Nature Medicine*, 13(3), pp.324-331.
- Tsai, S.-chang & Seto, E., 2002. Regulation of Histone Deacetylase 2 by Protein Kinase CK2. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp.31826 -31833.
- Tsang, W.Y. et al., 2007. SCAPER, a novel cyclin A-interacting protein that regulates cell cycle progression. *JCB*, 178(4), pp.621-633.

- Tsutsui, T. et al., 1999. Targeted Disruption of CDK4 Delays Cell Cycle Entry with Enhanced p27 Kip1 Activity. *Mol. Cell. Biol.*, 19(10), pp.7011-7019.
- Vashisht Gopal, Y.N., Arora, T.S. & Van Dyke, M.W., 2006. Tumor necrosis factor- $\alpha$  depletes histone deacetylase 1 protein through IKK2. *EMBO reports*, 7(3), pp.291-296.
- Vega, R.B. et al., 2004. Histone Deacetylase 4 Controls Chondrocyte Hypertrophy during Skeletogenesis. *Cell*, 119, pp.555-566.
- Villagra, A. et al., 2009. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nature Immunology*, 10(1), pp.92-101.
- Vlachos, P. et al., 2007. The cell cycle inhibitor p57 Kip2 promotes cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cell Death and Differentiation*, 14, pp.1497-1507.
- Voss, A.K. & Thomas, T., 2009. MYST family histone acetyltransferases take center stage in stem cells and development. *BioEssays*, 31, pp.1050-1061.
- Vrana, J. et al., 1999. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21, but independent of p53. *Oncogene*, 18, pp.7016-7025.
- Waclaw, R.R. & Chatot, C.L., 2004. Patterns of expression of cyclins A, B1, D, E and cdk2 in preimplantation mouse embryos. *Zygote*, 12, pp.19-30.
- Waltregny, D. et al., 2005. Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle  $\alpha$ -actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *The FASEB Journal*, 24, pp.1-24.
- Wang, A.H. & Yang, Xiang-jiao, 2001. Histone Deacetylase 4 Possesses Intrinsic Nuclear Import and Export Signals. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), pp.5992-6005.
- Watanabe, H et al., 1998. Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95, pp. 1392
- Weinberg, R.A., 1995. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell*, 81, pp.323-330.

- Wen, Y. Der et al., 2000. The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *PNAS*, 97(13), pp.7202-7207.
- Westhorpe, F.G. et al., 2010. Re-evaluating the role of Tao1 in the spindle checkpoint. *Chromosoma*, 119, pp.371-379.
- Wickliffe, K. et al., 2009. The Multiple Layers of Ubiquitin-Dependent Cell Cycle Control. *Chem. Rev*, 109, pp.1537-1548.
- Wilting, R.H. et al., 2010. Overlapping functions of HDAC1 and HDAC2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *The EMBO Journal*, 29, pp.2586-2597.
- Wiper-bergeron, N. et al., 2003. Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *The EMBO Journal*, 22(9), pp.2135-2145.
- Witt, O. et al., 2009. Mini review HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters*, 277, pp.8-21.
- Xu, W. et al., 2000. Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nature Genetics*, 26, pp.229-232.
- Xu, Yang, 2003. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death and Differentiation*, 10, pp.400-403.
- Yam, C.H. et al., 2002. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 59, pp. 1317-1326.
- Yamagoe, S. et al., 2003. Interaction of Histone Acetylases and Deacetylases In Vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 23, pp.1025-1033.
- Yamauchi, T. et al., 2000. Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B<sup>-</sup>GCN5 in mouse embryogenesis. *PNAS*, 97(21), pp.11303-11306.
- Yan, Y., Frisén, J. & Lee, M.H., 1997. Ablation of the CDK inhibitor p57 Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes & Development*, 11, pp.973-983.

- Yang, X.J. et al., 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382(6589), pp.319-24
- Yang, W Ming et al., 2002. Functional Domains of Histone Deacetylase-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(11), pp.9447-9454.
- Yang , W.M. et al., 2004. Histone deacetylases: purification of the enzymes, substrates, and assay conditions. *Methods Enzymo*, 377, pp.167-79.
- Yao, T Pang et al., 1998. Gene Dosage-Dependent Embryonic Development and Proliferation Defects in Mice Lacking the Transcriptional Integrator p300. *Cell*, 93, pp.361-372.
- Ye, X., Zhu, C. & Harper, J.W., 2001. A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *PNAS*, 98(4), pp.1682-1686.
- You, A. et al., 2001. CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *PNAS*, 98(4), pp.1454-1458.
- Yu, H., 2007. Cdc20: A WD40 Activator for a Cell Cycle Degradation Machine. *Molecular Cell*, 27, pp.3-16.
- Yu, J. et al., 2003. A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *The EMBO Journal*, 22(13), pp.3403-3410.
- Zhang, C.L., Mckinsey, T.A. & Olson, E.N., 2001. The transcriptional corepressor MITR is a signal- responsive inhibitor of myogenesis. *PNAS*, 98(13), pp.7354-7359.
- Zhang, P. et al., 1997. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. , pp.151-158.
- Zhang, Xiaohong, Ozawa, Y., et al., 2005. Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4. *Genes & Development*, 19, pp.827-839.
- Zhang, Z., Yamashita, H., et al., 2005. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research Treatment*, 94, pp.11-16.

*Bibliografia*

Zhou, X. et al., 2000. Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5. *PNAS*, 97(3), pp.1056-1'61.

Zhu, L., Harlow, E & Dynlacht, B D, 1995. p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin /cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes & Development*, 9, pp.1740-1752.

## **ABREVIATURES**



**Abreviatures**

<b>53BP1</b>	<i>p53 binding protein 1</i>
<b>Ada2</b>	<i>Adenosina deaminase</i>
<b>Apc11</b>	<i>Anaphase promoting complex 11</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosina trifosfat</i>
<b>ATR</b>	<i>Ataxia telangiectasia and RAD3-related</i>
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
<b>Brahma</b>	Means "creator" in Hindu
<b>BRCA1</b>	<i>Breast cancer 1</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumina</i>
<b>Bub1</b>	<i>Budding uninhibited by benzimidazole 1</i>
<b>Cdc20</b>	<i>Cell division cycle 20</i>
<b>CDC45</b>	<i>Cell division cell cycle 45</i>
<b>Cdh1</b>	<i>Cdc20 homologue 20</i>
<b>ChIP</b>	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
<b>CHK1</b>	<i>Checkpoint kinase 1</i>
<b>CHK2</b>	<i>Checkpoint kinase 2</i>
<b>COREST</b>	<i>Corepressor to REST(RE1 silencing transcription factor/neural restrictive silencing factor)</i>
<b>DCS</b>	<i>Donor Calf Serum</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>E1A</b>	<i>Adenovirus E1a oncoprotein</i>
<b>Elp3</b>	<i>Elongation protein 3</i>
<b>Emi1</b>	<i>Early mitotic inhibitor 1</i>
<b>FCS</b>	<i>Foetal Calf serum</i>
<b>GCN5</b>	<i>General control non derepressible 5</i>
<b>GMCSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor</i>
<b>GST</b>	<i>Glutatio-S-Transferasa</i>
<b>Hat1</b>	<i>Histone acetiltransferase 1</i>
<b>HMG1</b>	<i>High-motility group protein 1</i>
<b>H3P</b>	<i>Histone 3 phosphorylated</i>
<b>IP</b>	<i>immunoprecipitació</i>
<b>IRF1</b>	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
<b>Mad1</b>	<i>Mitotic arrest deficient 1 like protein 1</i>
<b>Mad2</b>	<i>Mitotic arrest deficient 2-like protein 2</i>



Abreviatures

<b>Mat1</b>	<i>“ménage a trois 1”</i>
<b>MDM2</b>	<i>Murine double minute 2</i>
<b>MEF2C</b>	<i>Myocyte specific enhancer factor 2C</i>
<b>MK2</b>	<i>MAP kinase 2</i>
<b>MOZ</b>	<i>Monocytic leukemia zinc finger protein</i>
<b>MTA2</b>	<i>Metastasis associated protein 2</i>
<b>Myt1</b>	<i>Myelin transcription factor 1</i>
<b>NaB</b>	Butirat sòdic
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor κB</i>
<b>NODE</b>	<i>Nanog and OCT4 associated deacetylase</i>
<b>NuA4</b>	<i>Nucleosome acetiltransferase of H<sub>4</sub></i>
<b>Nurd</b>	<i>Nucleosome remodeling and deacetylating</i>
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
<b>PHA</b>	<i>phytohaemagglutinin</i>
<b>PMA</b>	<i>Phorbol myristate acetate</i>
<b>PMSF</b>	fluorofenilmetilsulfonil
<b>pRB</b>	<i>Proteïna retinoblastoma</i>
<b>PrP4</b>	<i>Pre-messenger RNA processing 4</i>
<b>PSA</b>	Persulfat d'amoní
<b>Puma</b>	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
<b>RanBP2</b>	<i>Ran-binding protein 2</i>
<b>RbAp48</b>	<i>Rb associated-protein 48</i>
<b>Rbx1</b>	<i>Ring-Box protein 1</i>
<b>Rod</b>	<i>Rough deal</i>
<b>Sas2</b>	<i>Something about silencing 2</i>
<b>Sas3</b>	<i>Something about silencing 3</i>
<b>SD</b>	Desviació estàndard
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat sòdic
<b>SE</b>	Error estàndard
<b>SHIP</b>	<i>Spermatogenic cell HDAC-interacting protein 1</i>
<b>STAT1/3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 1/3</i>
<b>Tao1</b>	<i>Thousand and one aminoacid protein kinase 1</i>
<b>TIP60</b>	<i>TAT-interactive protein 60 KDa</i>
<b>TSA</b>	Tricostatina A
<b>ubcH10</b>	<i>Ubiquitin conjugatin enzyme</i>
<b>WB</b>	Western blot

*Abreviatures*

<b>WT</b>	<i>Wild type, de gen o proteïna</i>
<b>YFP</b>	<i>Yellow fluorescent protein</i>
<b>Zw10</b>	<i>Zeste white 10</i>

