



FACULTADE DE MEDICINA

Departamento de fisioloxía

**EFFECTOS DE LA ELIMINACIÓN DE p16
EN CÉLULAS TUMORALES Rb
NEGATIVAS**

Presentada por:

Marta Santamariña Pena

Dirigida por:

Juan Zalvide Torrente

El Dr. **JUAN ZALVIDE TORRENTE**, profesor titular perteneciente al Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “*Efectos de la eliminación de p16 en células tumorales Rb negativas*”, presentado por **Dña. Marta Santamariña Pena** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, y, considerando que cumple las condiciones necesarias, lo considera finalizado y autoriza su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, Noviembre del 2007.

Fdo: Dr. Juan Zalvide Torrente

A miña avoa e a miña nai

*Todo interés por la enfermedad constituye
tan sólo otra manifestación de interés por la vida*

Thomas Mann,

La montaña mágica.

A mi director Juan Zalvide, por su ayuda y ánimo durante el tiempo de realización de esta tesis. Por solventar las dudas y problemas que han ido surgiendo y por permitirme trabajar y aprender todos estos años. Muchas gracias de verdad.

A Anxo y a Carmen por sus conocimientos y por compartirlos conmigo y a Celia por sus consejos siempre sinceros.

A las personas con las que comencé y por que es ley de laboratorio se han ido yendo enfrentándose a la vida real, realmente el laboratorio ya no volvió a ser el mismo: a Sandra por acogerme, a Teresa por enseñarme, a Iría por su alegría, a Pili por ser como es y otras muchas cosas, a Ruth por tantas risas compartidas dentro y fuera de este departamento, a Isa por no olvidarse de Santiago ni de nosotros y a Antía por compartir tantas cosas conmigo y por ser fuente incansable de estupendas anécdotas.

A los compañeros que también se han ido con los que he coincidido durante menos tiempo pero con los que he compartido muy buenos momentos: al original Óscar, a Dani por esos chistes tan “estimulantes” a la hora del café, a Vanesa y a Claudia que han sido muy importantes para mí en este laboratorio.

Agradecerle ante todo y sobre todo a mi compañero Gonzalo, por merecer cada reglón de estos agradecimientos, por su gran trabajo y esfuerzo, por su generosidad, por ser el mejor compañero que me ha podido tocar y por que sin él la conclusión de esta tesis quizá no hubiera sido posible.

A mis compañeros del laboratorio de señalización: a Milo por ser no solo mi compañero sino también mi amigo por que los años de convivencia y trabajo sólo han servido para cerciorarme de que es la “gran persona” que parece y con el que he compartido los mejores momentos en este departamento, a mi compañera Marta C con la que he estado todo este tiempo, a Miguel F trabajador incansable, a Miguel E un estupendo compañero de pupitre, a Marieta por enseñarnos un poco de la cultura china, a Lola por ser como es, a Gloria por su sentido del humor y a la recién llegada Adriana que ha encajado a la perfección.

Agradecimientos

A mis compañeros del departamento de Fisiología y en especial a María y a Susana B por todo lo que me han ayudado siempre con una sonrisa, a las dos Evas por sus ánimos, a Marta Liliana por acordarse de mi y traerme dulces, a Pepe que aunque esté arriba ha encontrado siempre un hueco para interesarse por como me iban las cosas, a Marisol, Rucha, Chus, Olga, Isaben, Marcos, Montse, Paqui, Patri, Roberto y al resto de mis compañeros con los que he compartido muchas cenas y grandes momentos.

A mis amigos por ser los mejores: a Inés por estar siempre a mi lado y por entender mejor que nadie todo lo que me sucede, a Bego por escucharme y ser parte de mi vida desde siempre, a Juan por ofrecerme su apoyo y amistad desde los albores de los tiempos, a Fran por sus ánimos y ayudarme en un sinfín de dudas técnicas, a Ana e Isidro por enseñarme que cualquier situación siempre tiene su lado positivo y al resto por estar deseando que lleguen los pinchos.

A mi madre y a mi abuela, por ser un ejemplo de constancia, por habérmelo dado todo. Gracias por no tirar la toalla ni en el peor de los momentos, gracias por que sin vosotras no lo hubiera conseguido. A Elena por darme grandes lecciones de humildad cuando creo ser la dueña de la verdad absoluta, por ser mucho más que una hermana y una amiga.

A Diego por soportar de manera admirable estos meses, por permanecer siempre a mi lado..

I. INTRODUCCIÓN

1. El ciclo celular.....	1
1.1 Regulación del ciclo celular: ciclinas y ciclinas dependientes de kinasa (cdks).....	2
1.2 Nuevos datos sobre ciclinas y cdks en el ciclo celular, desarrollo y cáncer.....	11
1.3 Regulación de los complejos ciclina/cdk mediante mecanismos postraduccionales.....	20
1.4 Regulación de la transición G1/S.....	35
2. Papel de las familias Rb y E2F en el control del ciclo celular.....	37
2.1 Familia de proteínas Rb.....	37
2.2 La familia E2F.....	42
2.3 Vía E2F/Rb.....	44
3. Relación pRB/p16INK4a.....	47

II. OBJETIVOS.....51

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células.....	57
1.1 Cultivo celular.....	57
1.2 Sincronización celular.....	58
1.3 Proliferación celular.....	59
1.4 Transfecciones.....	61
2. Plásmido.....	63
2.1 Relación de plásmidos empleados.....	63
2.2 Construcción de plásmidos y RNA de interferencia.....	65
3. Análisis de genes <i>reporter</i>.....	67
3.1 Ensayo luciferasa y β -galactosidasa.....	67
3.2 Ensayo X-gal.....	68
4. Análisis de proteína.....	69
4.1 Obtención de extractos proteicos.....	69
4.2 Inmunoprecipitación y Western blot.....	70
4.3 Ensayo kinasa.....	73
5. PCR cuantitativa en tiempo real.....	76
6. Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP).....	81

IV. RESULTADOS

1. Obtención de poblaciones estables con bajos niveles de p16 en células pRB negativas.....	87
1.1 Selección de un modelo de células tumorales Rb1 -/-	

con altos niveles de p16; SaOS2.....	87
1.2 Obtención de shRNAs eficaces contra p16.....	90
1.3 Obtención de poblaciones de SaOS2 con bajos niveles de p16.....	90
2. Estudio de los efectos de la falta de p16 en la línea celular SaOS2.....	92
2.1 Caracterización bioquímica de las poblaciones sin p16.....	93
2.2 Análisis del ciclo celular.....	97
2.3 Efecto de la inhibición de p16 sobre los genes dependientes de E2F.....	99
3. Aproximación a la regulación del ciclo de las células pRB negativas	
por las cdks.....	104
3.1 Efecto del inhibidor químico roscovitina en células con y sin p16.....	105
3.2 Consecuencias de la inhibición de cdk2 en células con y sin p16.....	111
3.3 Estudio del efecto de la inhibición de distintas cdks sobre las células RB negativas.....	117
3.4 Estudio de la inhibición combinada de cdk1 y cdk2 en células con y sin p16.....	127
4. Efecto de inhibición combinada de cdk1, cdk2 y cdk3 sobre el ciclo en	
células con y sin p16.....	130
4.1 Efecto de la inhibición de cdk1, 2 y 3 mediante la utilización de siRNA.....	130
4.2 Efecto de la sobreexpresión de p27 en células con y sin p16.....	133
V. DISCUSIÓN	
1. Alteraciones del ciclo celular en cáncer.....	139
2. Inhibición de p16 en células pRB negativas.....	141
3. Los niveles de p16 no afectan a la proliferación normal de las	
células tumorales pRB negativas.....	143
4. La inactivación de p107 y p130 es independiente de la actividad	
cdk4 en células pRB negativas.....	144
5. Sensibilidad a la inhibición de las cdks en las células pRB negativas.....	146
6. Papel de cdk1, cdk2 y cdk3 en la regulación del ciclo	
de células tumorales pRB negativas.....	147
7. Redundancia entre las cdks en el ciclo de las células pRB negativas.....	150
8. Posible regulación del ciclo independiente a cdk1, cdk2 y cdk3	
en células pRB negativas.....	153
VI. CONCLUSIONES.....	157
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	161

ATCC: *American Type Culture Collection.*

ATP: Adenosina trifosfato.

BrdU: Bromodeoxiuridina.

CAK: Kinasa activadora de cdks.

Cdk: Kinasa dependiente de ciclina.

CHIP: Inmunoprecipitación de cromatina

CKIs: Inhibidor de kinasa dependiente de ciclina.

Cyc: Ciclina.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DHFR: Dihidroxi-fosfato-reductasa.

Dncdk: dominante negativo de cdk

DTT: Dithiothreitol.

E2F: Familia de factores de transcripción.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético.

EGTA: Ácido etilén-bis(oxonitrilo)-tetracético.

FACS: Análisis de citometría de flujo.

FBS: Suero bovino fetal.

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*, Isocianato de fluoresceína

GFP: *Green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde.

GST: Glutation transferasa.

HEPES: Ácido 2-{4-(2-hidroxietil)1-piperazinil}etanosulfónico.

Ip: Inmunoprecipitación.

Luc: Luciferasa.

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón.

ONPG: O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PMSF: Fluorido fenilmetilsulfonil.

pRB: Proteína retinoblastoma.

Rb: Gen de susceptibilidad al retinoblastoma.

RNAi: RNA de interferencia.

Abreviaturas

RT-PCR: Transcripción reversa de la polimerasa.

SDS: Dodecil sulfato sódico.

SiRNA: RNA de secuencia corta.

ShRNA: RNA de secuencia corta de doble cadena.

X-gal: Tinción X-galactosidasa.

WB: Western blot.

I- INTRODUCCIÓN

1. El ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo implicado en el crecimiento y proliferación celular, en la regulación del mecanismo de reparación del daño en el DNA, en la hiperplasia en tejidos como respuesta a una lesión, y en enfermedades como el cáncer. Existen numerosas proteínas implicadas en el desarrollo del ciclo que culmina en la mitosis y la formación de dos células hijas.

Las proteínas principales encargadas de la regulación del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y las ciclinas. Estas proteínas controlan la progresión celular a través de sus diferentes estadios, que comprenden las fases G1, S, G2 y M. El ciclo puede dividirse morfológicamente en Interfase y fase M (mitosis), esta a su vez implica la profase, metafase, anafase y telofase. La interfase a su vez incluye G1, S y G2.

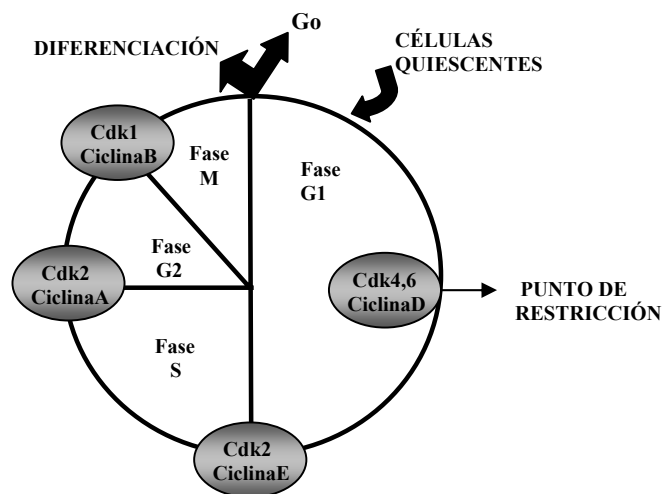


Figura 1. Esquema de la progresión del ciclo celular. Después de la fase de mitosis, una célula puede diferenciarse, entrar en el estadio de quiescencia o reentrar en el ciclo celular. La progresión del ciclo es regulada por varios complejos ciclina-CDK.

Es importante señalar que sólo una parte del ciclo está regulada por factores mitogénicos, que generan los eventos necesarios para la progresión a través de G1. Esta parte del ciclo se denomina G1 temprano, durante esta fase las células pueden tomar la decisión de replicar el DNA y dividirse o, de forma alternativa, salir del ciclo y entrar en un estadio de no división denominado quiescencia (G0). Cuando las células son estimuladas con factores de crecimiento

entran nuevamente en el ciclo desde G₀, necesitándose la presencia de estímulos mitogénicos hasta llegar al denominado punto de restricción. Una vez superado, el ciclo se hace autónomo y ya no es necesaria la presencia de estos estímulos para completar las fases siguientes (Sherr et al., 2000).

1.1 Regulación del ciclo celular: ciclinas y ciclinas dependientes de kinasa (cdks).

Las cdks son una familia de serina/treonina kinasas, cuya activación se debe a fosforilaciones/defosforilaciones y a su unión con subunidades reguladoras o ciclinas con los que forma heterodímeros. El primer miembro de la familia cdk (el ahora conocido como cdk1) fue identificado en un *screening* genético de mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* los cuales presentaban defectos genéticos en la división del ciclo celular (Russell y Nurse, 1986). Esta proteína fue denominada cdc2 en *S. pombe* y CDC28 en *S. cerevisiae*, y mostró ser indispensable para la progresión del ciclo celular. Poco después, se detectaron proteínas homologas en líneas celulares humanas (Draetta et al., 1987; Lee y Nurse, 1987). Así, de forma secuencial se clonaron otros dos miembros de la familia cdk en experimentos independientes. Por un lado Hanks clonó un gen al que denominó PSK-J3 hibridando el cDNA de la librería genómica de la línea celular Hela, con oligonucleótidos homólogos a las serina/treoninas kinasas (Hanks et al., 1987). Por otro lado experimentos basados en complementación de mutantes cdc2 de *S. cerevisiae* o en su capacidad de interacción con ciclina A, permitieron aislar a otra nueva cdk, conocida hoy en día como cdk2 (Elledge y Spottswood, 1991; Tsai et al., 1991). Por esa misma época y gracias a los avances aportados por la técnica de la PCR se llegó a la identificación de nuevos miembros de la familia cdk. Algunos de esos miembros se designaron como PSSALRE o PLSTIRE en base a la secuencia de aminoácidos de un dominio altamente conservado (Meyerson et al., 1992).

Para unificar a esta familia emergente, los científicos que asistieron al *Cold Spring Harbor Symposium* en 1991 decidieron adoptar el término de ciclinas dependientes de kinasas. Como consecuencia de esto cdc2 pasó a denominarse cdk1, PSK-J3 se renombró como cdk4 y PSSALRE y PLSTIRE se convirtieron en cdk5 y cdk6 respectivamente. Posteriormente se han

clonado y caracterizado otros miembros de la familia de cdk's en mamíferos, como es el caso de cdk7 (Fisher y Morgan, 1994), cdk8 (Tassan et al., 1995), cdk9 (Grana et al., 1994), cdk10 (Grana et al., 1994) y cdk11 (Xiang et al., 1994). Sin embargo existe otro gran grupo de proteínas que presentan un alto grado de homología con la familia cdk, pero que no han podido ser formalmente designadas con ese nombre debido a que no se ha encontrado su subunidad activadora o ciclina. Dentro de este grupo están los miembros de PCTAIRE o PFTAIRE, así como CCRK, CHED y CRK7.

El término ciclina surgió del estudio de unas proteínas detectadas en huevos de erizos de mar, donde vieron que eran sintetizadas y degradadas de forma cíclica, es decir, durante los distintos ciclos de división. Estas proteínas fueron clonadas y se demostró que promovían la meiosis en oocitos de *Xenopus laevis* (Evans et al., 1983; Hunt, 1989). La conexión bioquímica entre cdk's y ciclinas se encontró en 1989 cuando un grupo de investigadores demostró la asociación de cdk1 con ciclina A y ciclina B. Las ciclinas C, D y E fueron identificadas por su asociación a cdk's en mutantes de *S. cerevisiae* (Xiong y Beach, 1991).

Recientemente, el análisis del genoma humano ha permitido identificar al menos 29 genes que codifican proteínas similares a las ciclinas, dado que poseen un dominio altamente conservado que consta de 150 aminoácidos que componen la denominada “*ciclin-box*”. Este dominio está formado por 5 regiones helicoidales y es la responsable de la unión a las cdk's o a otras proteínas. Aunque estas proteínas reciben el nombre de ciclinas, en la mayoría de los casos no se conoce su regulación a través del ciclo (Malumbres y Barbacid, 2005).

1.1.1 Papel de los complejos ciclina/cdk en la progresión del ciclo celular: El modelo clásico

Para la activación de todas las cdk's se requiere que estén formando complejo con sus subunidades reguladoras positivas, que en la mayoría de los casos son las ciclinas. Cada una de las fases del ciclo celular está caracterizada por la expresión de un tipo de ciclina, esta fluctuación en los niveles de ciclinas representa el primer mecanismo por el cual se regula la actividad de cdk. Esto permite que en cada fase del ciclo se active la cdk correspondiente, debido que su ciclina reguladora se sintetiza de forma dependiente a cada fase del ciclo.

Tabla 1. Familia de cdk's de mamíferos

Símbolo	Sinónimos	Ciclinas activadoras (otras ciclinas)	Substratos	Función
CDK1	Cdc2, Cdc28	A1, A2, B1, B2 (E, B3)	Actopaxina, APC, BARD1, BRCA2, Caldesmon, Cdc7, Cdc20, Cdc25A, Cdc25C, Cdh1, Cdk7, C/EBPβ, CKII, Dineina, Distrofina, EF-1, Eg5, EGFR, FANG, Fos, GFAP, GM130, GRASP65, Histona H1, Hhr6A, HMG-I(Y), IFAP300, KRC, Receptor de Laminina (A,B, y C), Last1, MAP1B, Marcks, MCM2, MCM4, MKLP1, Myb, NBP60, Neurofilamentos H, NF-I, Nir2, Npm, NPC, Nucleolina, Nucks, Numatrina, Orc1, p18, p47, p53, p54NRB, PAP, Plectina, PP1.12, pRB, R2, Rab4, Rap1GAP, RCC1, RIIα, S6K1, Sam68, Separasa Ski, Survivina, mSTII, Tau, Vimentina, Timidina kinasa	Ciclo celular (G2-M)
CDK2		A1, A2, E1, E2 (D1, D2, B1, B3)	BARD1, B-Myb, BRCA1, BRCA2, CBP/p300, Cdc6, Cdc7, Cdk7, Cdt1, C/EBPβ, DP1, hHR6A, HIRA ku70, Marcks, MCM2, MCM4, MyoD, NPAT, Npm, p107, p21 ^{CIP} , p27 ^{KIP} , p53, pRB, R2, RPA, Smad3, Timidina kinasa	Ciclo celular (G1-S)
CDK3		E1, E2, A1, A2, C	Cables1	Ciclo celular (G0-G1-S)
CDK4	PSK-J3	D1, D2, D3	Cdt1, Marcks, p107, p130, pRB, Smad3	Ciclo celular (G1-S)
CDK5		p35, p39 (D, E, G)	Cables, Anfifisina1, Doblecortin, Munc18, p53, Pctaire1, Inhibidor de la proteína fosfatasa1, PSD95, Stat3, mSds3, SinapsinaI, Tiroxina hidroxilasa	Senescencia, neuronas postmitóticas
CDK6		D1, D2, D3	p107, p130, pRB	Ciclo celular (G1-S)
CDK7	MO15, CAK, STK	H	Cdk1-cdk6, p53, RARγ, RNA pol II	Activación complejos ciclina/cdk, transcripción
CDK8	K35	C	RNA pol II	Transcripción
CDK9		T1, T2, K	pRB, RNA pol II	Transcripción
CDK10		Desconocido	Desconocido	Transcripción, ciclo celular (G2-M)
CDK11	Cdc2L1, Cdc2L2	L1, L2 (D)	9G8, Ciclina L	Transcripción, ciclo celular (M)
PITSLRE		Desconocido	Desconocido	Posible papel en apoptosis
PFTAIRE1	Pftk1	Desconocido	Desconocido	Funciones específicas del cerebro
PFTAIRE2		Desconocido	Desconocido	Desconocido
PCTAIRE1	Pctk1, Crk5	Desconocido	Desconocido	Ciclo celular (S-G2), neuritas
PCTAIRE2	Pctk2	(Cables1)	Desconocido	Específico de neuronas
PCTAIRE3	Pctk3	Desconocido	Desconocido	Específico de cerebro
CRK7	CrkRS, CD2L7	Desconocido	RNA pol II	Transcripción
CHED	Cdc2L5	Desconocido	Desconocido	Señales colinérgicas y proliferación de células hematopoiéticas
CCRK			Desconocido	Desconocido

En la pasada década, el análisis de las cdks, sus reguladores y sus sustratos permitió generar un modelo de regulación del ciclo celular.

a) Fases G1-S

La salida de quiescencia es progresiva, y comienza generalmente con la activación de genes llamados de respuesta temprana como c-fos, c-myc, c-jun o erg (Obaya et al., 1999), importantes en la competencia celular. Hasta el momento, uno de los efectos más conocidos de Myc sobre el ciclo es su capacidad reguladora en la formación y activación de los complejos formados por ciclinas y cdks específicos de la fase G1 del ciclo (Obaya et al, 1999).

Unas horas después de la activación de los genes de respuesta temprana la célula ya se encuentra en G1 temprano, donde se produce en primer lugar un aumento en los niveles de expresión de las ciclinas D (D1, D2 y D3). La regulación de la expresión de esta ciclina depende del tipo celular en el que se expresen. La activación de la transcripción del gen de ciclina D1 depende de la activación de la vía Ras-Raf-MAPK. Ciclina D forma complejo con cdk4 y cdk6, y este complejo tiene como principal sustrato a la familia de proteínas de la familia Rb: pRB, p107 y p130 (Kato et al., 1993; Beijersbergen et al., 1995). Estas proteínas contienen múltiples sitios de fosforilación por cdks, pero sólo unos pocos pueden ser reconocidos por el complejo ciclina D/cdk4-cdk6. Aparte de las proteínas de la familia Rb, se han descubierto otros sustratos que son reconocidos por este complejo, como son Smad3 o Cdt1 (**tabla 1**), pero no se han encontrado evidencias de que estos sustratos sean más específicos de cdk4 o cdk6, o incluso de un tipo de ciclina en concreto. Así, el que alguno de estos sustratos sea fosforilado por un complejo determinado formado por cdk4 o cdk6 junto con uno de los tres tipos de ciclina dependerá de la especificidad del tejido o de la diferente activación durante el desarrollo (Ciemerych y Sicinski, 2005).

La principal función de las proteínas de la familia de Rb es reprimir la transcripción de los genes necesarios para la proliferación, impidiendo así que continúe el ciclo. Esto lo hacen modulando la actividad de factores de transcripción (como son los miembros de la familia E2F), histonas deacetilasas y complejos remodelantes de cromatina mediante unión directa a ellos (Cobrinik, 2005). La formación del complejo ciclina D/cdk4-6 ocurre en G1 temprano, al

sintetizarse ciclina D en respuesta a estímulos mitogénicos. La expresión de cdk4 y cdk6 es continua a lo largo del ciclo por lo que la ciclina D es la responsable de limitar la formación de este complejo. Aún así, en ciertos tipos celulares, la presencia de factores de crecimiento mantiene los niveles de ciclina D constantes a lo largo del ciclo, aunque ésta no está presente en G0. La fosforilación de pRB por parte de este complejo inactiva parcialmente a esta proteína lo que permite la transcripción de ciertos genes, como el gen que codifica para la ciclina E en la mitad de G1 tardío. Esta ciclina es la siguiente en ser expresada y es la responsable de activar a cdk2 que es requerida para entrar en fase S y comenzar con la replicación del DNA. La formación del complejo ciclina D/ckd4 por un lado permite la síntesis de ciclina E y por otro lado secuestra al inhibidor de ciclina E/ cdk2, p27 (Cheng et al., 1998).

El secuestro de p27 por parte de los complejos ciclina D/ckd4-6 tiene dos consecuencias fundamentales, por un lado estabiliza la formación del este complejo y por otro impide que p27 inhiba la actividad kinasa asociada a cdk2. Así fibroblastos embrionarios murinos (MEFS) cdk4-/- presentan una redistribución de p27 que trae como consecuencia la disminución de la actividad kinasa de cdk2 (Tsutsui et al., 1999). Es más, se ha propuesto que la unión a p27 debe ser necesaria para la actividad del complejo ciclina D/ckd4-6, ya que en MEFs que han perdido p21 y p27 no se ha detectado actividad cdk4 (Bagui et al., 2000).

Tanto ciclina E como cdk2 se expresan en todos los tipos de células. El ensamblaje de estas dos proteínas, para la formación del complejo ciclina E/ckd2, al igual que su actividad kinasa es independiente a las señales mitogénicas. La activación de este complejo es necesaria para la transición a la fase S y para la replicación del DNA. Se ha visto que el complejo ciclina E/ckd2 fosforila substratos específicos de la fase S como proteínas implicadas en la activación de histonas y proteínas de la familia de Rb. La fosforilación de pRB, p107 y p130 por parte del complejo ciclina E/ckd2 es en sitios distintos que los realizados por el complejo ciclina D/ckd4. Esta doble fosforilación parece ser necesaria para la completa inactivación de las proteínas de la familia de Rb. Se cree que este proceso corresponde al denominado punto de restricción y que divide a la fase G1 en las dos subfases (Malumbres y Barbacid, 2001). El punto de restricción ha sido definido como el punto durante G1 a partir del cual las células no necesitan estímulos mitogénicos para seguir proliferando y completar así la división celular. Por ese motivo cuando

las células pierden las tres proteínas de la familia Rb, pueden dividirse en ausencia de mitógenos dado que no presentan ningún punto de restricción (Dannenberg et al., 2000; Sage et al., 2000). Una vez que las células entran en fase S, el complejo ciclina E/cdk2 necesita ser eliminado para continuar con la replicación del DNA. Este proceso se lleva a cabo, al menos en parte, por la ubiquitin-ligasa SCF-Fbxw7 que permite una rápida degradación de ciclina E por el proteosoma (Hwang y Clurman, 2005).

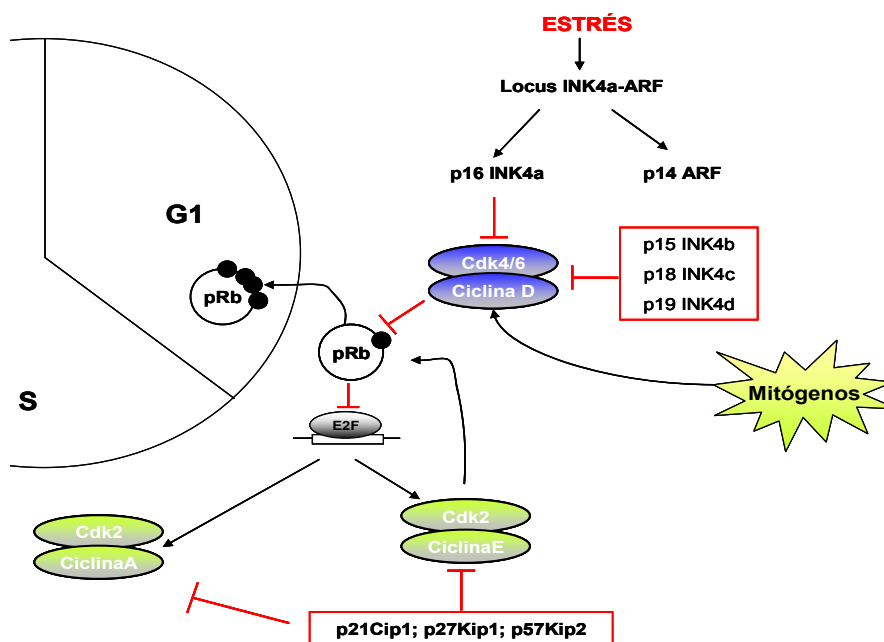


Figura 2. Control del ciclo celular en la transición G1-S. La producción de ciclina D y la activación del complejo formado con cdk4-6 en respuesta a los mitógenos, da como resultado la fosforilación e inactivación de la proteína pRB con la consiguiente derepresión de la transcripción dependiente de E2F. Esto provoca la síntesis de ciclina E y A que junto con cdk2 forman los complejos activos que refuerzan la fosforilación de pRB. La actividad de cdk4 es inhibida por p16INK4a, en respuesta a algún tipo de estrés para la célula, o por otro miembro de la familia INK4. De forma similar la actividad de cdk2 es inhibida por otra familia de inhibidores denominada Cip/Kip, pero a diferencia de la familia INK4, esta familia puede unirse al complejo ciclina D/cdk4 para favorecer la formación de este complejo y no para inhibirlo (Adaptación del esquema de Deshpande et al., 2005).

Otra kinasa, cdk3, también participa en la inactivación de pRB. Esta kinasa presenta un alto grado de homología con cdk1 y cdk2. Hasta hace poco la subunidad activadora de esta cdk era

desconocida, se había reportado que era capaz de interactuar in vitro con ciclina E y ciclina A, pero no se ha encontrado in vivo a cdk3 formando complejos con ninguna de estas dos ciclinas. También se ha demostrado que se une a cdk5 y al enzima cables, pero no hay evidencias que estas interacciones induzcan la actividad kinasa de cdk3, así la importancia biológica de estas uniones todavía se desconoce. Se ha demostrado recientemente que cdk3 también se une a ciclina C durante la salida de la fase G0. En este periodo estimula la fosforilación de pRB favoreciendo la entrada en la fase G1 en algunos tipos celulares (Ren y Rollins, 2004). La expresión de ciclina C es anterior a la expresión de ciclina D, por lo que se ha propuesto que la fosforilación de pRB puede ser secuencial desde G0. Primero por ciclina C/ckd3, luego por los complejos ciclina D/ckd4-6 y por último por los complejos ciclina E/ckd2. La inactivación de pRB promueve la transcripción de genes necesarios para completar las siguientes fases del ciclo, como es el caso de ciclina A y ciclina B.

La ciclina A (A1 y A2) es expresada justo después de ciclina E en el límite de la transición G1/S y también forma complejo con cdk2, y de forma menos extensa con cdk1. La actividad de ciclina A/ckd2 es necesaria para la transición a la fase S, y para el control de la replicación del DNA. Un sustrato de este complejo es Cdc6 cuya fosforilación es necesaria para que esta proteína pueda entrar en el núcleo de las células. Así Cdc6 es necesaria para iniciar la replicación del DNA, por ese motivo si el complejo ciclina A/ckd2 no fosforila a esta proteína no podría replicarse el DNA (Petersen et al., 1999). Otro sustrato conocido de este complejo es HIRA, que es el homólogo humano de las proteínas represoras de la transcripción del gen de histona en bacterias (Hir1p y Hir2p). La fosforilación de HIRA elimina la actividad represora de esta proteína, provocando un aumento en los niveles de transcripción de las histonas (Hall et al., 2001). La fosforilación de estos sustratos y muchos otros (ver tabla) por parte de ciclina A/ckd2 es necesaria para la correcta progresión del ciclo celular.

b) Fases G2-M

Al final de la fase S, ciclina A se asocia con cdk1. De esta manera, los complejos ciclina A/ckd1 y ciclina A/ckd2 fosforilan a numerosas proteínas importantes para la replicación del DNA, además de otras proteínas que participan en el control del ciclo celular (ej: pRB, p53, BARD1 y

BARD2). Los complejos ciclina A/cdk1 y ciclina A/cdk2 parecen tener especificidad por los mismos sustratos, y no se han encontrado funciones que los diferencien en la transición S-G2.

Durante la fase G2, las ciclinas A son degradadas por proteólisis mediada por ubiquitinización, mientras ciclina B (B1, B2 y B3) se sintetiza de forma activa. Cdk1 forma complejo principalmente con ciclina B1 y B2, mientras que la función de ciclina B3 hoy en día no es muy conocida y se ha llegado a postular que es posible que forme complejos con cdk2 (Nguyen et al., 2002). El complejo ciclina B/cdk1 permanece inactivo hasta G2 tardío cuando su activación es necesaria para la entrada en Mitosis (M). Este complejo es necesario para regular los numerosos eventos que tienen lugar en la transición G2-M y para una correcta transición a través de Mitosis.

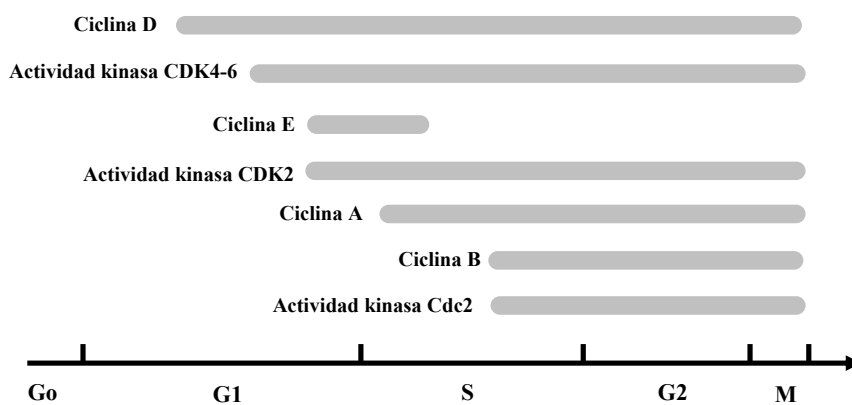


Figura 3. Modelo de expresión de ciclinas y actividades cdk durante el ciclo celular. Se puede resaltar que CDK2 puede ser activada por ciclina E o ciclina A y Cdc2 puede ser activada por ciclina A o ciclina B (figura adaptada de Obaya y Sedivy, 2002).

La lista de los sustratos de ciclina B/cdk1 abarca más de 70 proteínas (Ubersax et al., 2003). Dentro de los sustratos que son necesarios para mitosis nos encontramos laminas nucleares, proteínas nucleolares (nucleolin y NO38), proteína asociada a microtúbulos 4 (MAP-4), proteínas que forman parte del complejo del poro nuclear y proteínas centrosomales entre otras

(Dessev et al., 1991; Eggert et al., 1993; Ookata et al., 1995). Por otro lado se ha demostrado que este complejo también participa en la inhibición de la replicación del DNA fosforilando MCM-4 impidiendo así su interacción con el DNA, y además participa en la inhibición de la transcripción y traducción que ocurre en mitosis mediante fosforilación de la subunidad TFHII de la RNA polimerasa II y la proteína kinasa S6 ribosomal. Es importante resaltar que además este complejo también activa el mecanismo implicado en la proteólisis dependiente de ubiquitinización de la propia ciclina B mediante fosforilación de Cdc20, dado que la inactivación del complejo es necesaria para poder salir de mitosis (Harper et al., 2002).

1.1.2 Papel biológico de otras cdks

Cdk5 es activado por dos proteínas que se expresan únicamente en el cerebro, p35 y p39, aunque esta cdk también es capaz de formar complejos con ciclina E y ciclina D pero sin presentar actividad kinasa (Kesavapany et al., 2004; Cruz y Tsai, 2004). Los complejos formados por cdk5-p35 o p39 son los responsables de fosforilar a un gran número de sustratos implicados en la función neuronal y la transmisión sináptica.

Las cdks comprendidas entre cdk7 y cdk11 muestran actividades relacionadas con el control de la transcripción, en algunos casos con implicaciones directas en el control del ciclo celular. Así cdk7 forma parte del complejo kinasa activador de cdks (CAK), el cual fosforila y activa a todas las cdks del ciclo celular. Más aún, CAK junto con otras 6 subunidades forman el factor de transcripción denominado TFIIF que es el responsable de promover la progresión de la transcripción (Lolli y Johnson, 2005). Los complejos formados por ciclina C/cdk8 y ciclina T/cdk9 también regulan la transcripción mediante fosforilación del dominio C-terminal de la RNA polimerasa II. Ciclina C/cdk8 también fosforila a ciclina H inhibiendo la actividad de CAK. Cdk9 en contraste, unido a ciclina T y ciclina K forma el factor de transcripción P-TEFb implicado en la elongación del transcrito por la RNA polimerasa II (Garriga y Grana, 2004).

Cdk10 se cree que está implicado en la regulación G2-M, pero todavía no se ha encontrado su subunidad activadora. Cdk10 regula de forma indirecta a cdk1, dado que fosforila e inhibe a Ets2 un factor de transcripción que favorece la expresión de cdk1 (Kasten y Giordano, 2001).

Finalmente cdk11 unido a ciclina L, son importantes para la transcripción a través de la RNA polimerasa II (Loyer et al., 2005).

En resumen, el modelo básico de regulación del ciclo celular está formado por ciclinas y cdks, aunque podemos encontrar otras proteínas que también están implicadas en esta regulación. Algunas de ellas son Aurora (Loyer et al., 1999; Bischoff y Plowman, 1999) y Polo kinasa (Nigg, 1998; Glover et al., 1998) que juegan un papel muy importante en la citocinesis, regulando algunos eventos como la separación del centrosoma y la segregación de los cromosomas entre otros.

1.2 Nuevos datos sobre ciclinas y cdks en el ciclo celular, desarrollo y cáncer.

La descripción clásica de la regulación del ciclo celular descrita hasta el momento se ha deducido a partir de numerosos estudios bioquímicos en los que se han usado principalmente como modelo líneas tumorales humanas. En la última década el papel de los principales reguladores del ciclo celular, ciclinas y cdks, ha sido reevaluado debido a todos los datos recogidos del estudio de ratones modificados genéticamente (**tabla 2**).

1.2.1 Papel de las ciclinas y cdks en desarrollo embrionario y ciclo celular.

La información obtenida de los trabajos con modelos *knock out* ha provocado que algunos de los conceptos que estaban aceptados de forma general, sean nuevamente revisados. De forma inesperada la mayoría de los complejos ciclina/cdk que se pensaban indispensables para la correcta proliferación celular lo han dejado de ser debido al alto grado de redundancia funcional, promiscuidad y mecanismos compensatorios existentes entre todas ellas.

Tabla 2. Ratones modificados para ciclinas y cdk's

BLANCO	Mutación	Viabilidad	Fenotipo	Referencia
CDK1	Completa	Letal	Desconocido	Malumbres y Barbacid
CDK2	Completa	viable	Esterilidad debido a defectos meióticos, senescencia temprana en MEFs.	Ortega et al., 2003
CDK3	Codon de parada prematuro	viable	Normal, la mayoría de los ratones del laboratorio presentan esta mutación	Ye et al., 2001
CDK4	Mutante insensible a INK4	viable	Tumores mesenquimáticos y epiteliales con completa penetrancia después de los 14-18 meses, rápida proliferación y aumento de la susceptibilidad a la transformación por Ras	Rane et al., 1999; Sotillo et al., 2001
CDK4	Completa	viable	Pérdida de proliferación de células pancreáticas β postnatales, talla pequeña, disminución de la susceptibilidad a la inmortalización o transformación por oncogenes	Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999; Zou et al., 2001
CDK6	Completa	viable	Desarrollo defectuoso en la línea eritrocitaria, No se observa ningún fenotipo en MEFs pero sí un retraso en las células linfocitarias.	Malumbres et al., 2004
CDK5	Completa	Letalidad perinatal	Desarrollo defectuoso en la estructura del sistema nervioso central	Ohshima et al., 1996
CDK4,CDK6	Doble	Letalidad embrionaria tardía	Proliferación limitante en precursores hematopoyéticos, los MEFs sufren un retraso y disminución de la fosforilación de pRB, respuesta a mitógenos y se vuelven inmortales tras sucesivos pases.	Malumbres et al., 2004
CDK2, CDK6	Doble	viable	Fenotipo similar a los observados en los simples mutantes de cdk2 y cdk6	Malumbres et al., 2004
CDK3,CDK2,CDK6, CDK4	Doble	Letalidad embrionaria E12.5	Graves reducciones en los precursores hematopoyéticos, en la celularidad del hígado y el corazón; MEFs muestran cierto retraso pero responden a mitógenos y se vuelven inmortales después de sucesivos pases, se aprecia cierta fosforilación de pRB.	Santamaría et al., 2007
CDK11	Completa	Letalidad E3.5	Defectos en mitosis, graves defectos en proliferación y apoptosis en embriones en cultivo.	Li et al., 2004
Ciclina D (D1, D2, D3)	Triple	Letal	Idéntico al doble <i>knock out</i> cdk4,cdk6	Kozar et al., 2004
Ciclina E (E1, E2)	Doble	Letal E11.5	Reducción de la vascularización en los tejidos embrionarios, y dramáticos fallos en la placenta. MEFs fallan al salir de quiescencia.	Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003
Ciclina A (A1, A2)	Simple	A1 viable, A2 Letal	Ratones macho <i>knock out</i> A1 son estériles, mientras los <i>knock out</i> A2 letales en etapa de blastocisto	Liu et al., 1998; Murphy et al., 1997
Ciclina B (B1,B2)	Simple	B1 letal, B2 viable	B1 presenta letalidad en la mitad de la gestación, B2 no se aprecia un fenotipo distinto a Wt	Brandeis et al., 1998

a) Complejos ciclina D/cdk4-cdk6

Hasta el momento se pensaba que cdk4 era necesario para la proliferación y el desarrollo embrionario, hoy sabemos que la mutación de cdk4 y cdk6 permite completar el desarrollo embrionario, al menos en ratón. Los ratones defectivos de una sola de estas proteínas presentan

alteraciones en tejidos específicos, similares a los observados en los *knock outs* de ciclinas D individuales, lo que muestra la fuerte correlación existente entre estas dos familias de proteínas.

El *knock out* de *cdk4* es viable, aunque los animales presentan como rasgo fenotípico un tamaño más pequeño que los ratones de genotipo salvaje. Los machos presentan un reducido número de células de Leydig y una disminución en la fertilidad, y las hembras son estériles. Pero el mayor rasgo de estos ratones es el grave defecto observado en las células beta del páncreas. Esto provoca una diabetes insulina dependiente, lo que limita su periodo de vida.

El *knock out* de *cdk6* muestra un fenotipo menos agresivo, sólo las hembras muestran una reducción marginal de su talla corporal pero son fértiles y presentan una longevidad normal. Estos animales presentan defectos en algunos compartimentos hematopoyéticos. Así el timo y el bazo son hipoplásicos lo que muestra una dependencia específica de los tejidos linfáticos de *cdk6*.

La explicación más lógica de que estos animales puedan vivir, puede ser la elevada homología entre estas dos kinasas lo que resulta in vivo en una redundancia funcional. El doble *knock out* *cdk4, cdk6*^{-/-} se desarrolla hasta la mitad de la gestación, mas allá los embriones no son viables y presentan defectos en la línea eritrocitaria lo que provoca una anemia severa. Estos embriones también presentan una elevada disminución en los progenitores de las líneas linfoides y mieloides del bazo lo que sugiere que *cdk4* puede estar compensando en parte la ausencia de *cdk6* en células hematopoyéticas (Malumbres et al., 2004).

El estudio de MEFs derivados de estos ratones, mostró que la falta de estas kinasas no elimina la proliferación celular. Sin embargo, estas células muestran una disminución en la proliferación acompañada por una disminución en la fosforilación de pRB. Además los MEFs *cdk4, cdk6*^{-/-} responden a estímulos mitogénicos después de ser serodeprivadas, indicando que los complejos ciclina D/*cdk4-cdk6* contribuyen pero no son esenciales para la proliferación inducida por mitógenos o para salir del estado de quiescencia (Malumbres et al., 2004).

La eliminación de las tres ciclinas D (D1, D2, y D3) provoca un fenotipo muy parecido al descrito en el doble *knock out* de *cdk4* y *cdk6*. Al igual que ellos la muerte del embrión parece provocada por graves defectos en la línea hematopoyética, lo que causa una anemia severa en el embrión (Kozar et al., 2004). MEFs ciclina D *-/-* también muestran un fenotipo muy similar al observado en el doble *knock out* *cdk4*, *cdk6*. Presentan una disminución en la proliferación que se ve agravada con el tiempo, que da como resultado una senescencia prematura. De forma similar al doble *knock out*, estos MEFs también son capaces de responder a estímulos mitogénicos y reentrar en el ciclo desde quiescencia.

Resumiendo, el complejo ciclina D/*cdk4-cdk6* que hasta el momento se había descrito que era imprescindible para la proliferación de las células en mamíferos, hoy en día gracias a estos ensayos, se ha demostrado que no lo es. Sin embargo, la actividad de este complejo parece ser necesaria para completar el desarrollo embrionario en ratones. La muerte de estos embriones no se produce por un fallo generalizado en todos los tejidos del animal, más bien por fallos específicos en los precursores hematopoyéticos. Esto indica que la actividad de ciclina D/*cdk4-cdk6* es imprescindible para este tipo celular pero no para el resto de las células y tejidos, dado que las células proliferan sin necesidad de esta actividad kinasa. Finalmente las células dobles *knock out* de *cdk4* y *cdk6*, al igual que las que pierden los tres tipos de ciclinas, responden a la inhibición del ciclo por parte de los miembros de la familia Cip/Kip, pero son insensibles a la inhibición mediada por la familia INK4. Esta observación confirma que la familia INK4 inhibe de forma específica a los complejos ciclina D/*cdk4-cdk6* (Malumbres et al., 2004; Kozar et al., 2004).

b) Ciclina E/*cdk2*

La evaluación de la importancia de este complejo en el control del ciclo celular *in vivo* ha sido posible gracias a la generación de *knock out* dobles y simples de ciclina E y ciclina A en paralelo al *knock out* de *cdk2*. Tanto ciclina E como *cdk2* han sido considerados reguladores esenciales del ciclo celular durante mucho tiempo. En general se pensaba que estas proteínas eran necesarias no sólo para la transición G1/S sino para síntesis de histonas, duplicación de centrosomas y cromosomas, y otras funciones. Gracias a recientes trabajos de distintos

laboratorios se ha demostrado que estas proteínas no son esenciales para el desarrollo ni para la proliferación celular.

El *knock out* de *cdk2* ha demostrado ser viable y además estos animales han sobrevivido al menos dos años sin defectos aparentes. Estas observaciones han modificado la visión clásica que existía sobre esta proteína. Por otro lado *cdk2* ha demostrado ser esencial para las células germinales. Así, tanto machos como hembras presentan esterilidad, dado que esta *cdk* parece ser imprescindible para la primera división meiótica en las células germinales. Por ese motivo su carencia origina graves consecuencias en el apareamiento de los cromosomas. Nuestra visión sobre el papel de la familia Cip/Kip sobre *cdk2* también se ha visto afectado, esto es debido a que la inhibición de la proliferación por parte de esta familia es independiente de la presencia de *cdk2*. Así, la sobreexpresión de *p27* y *p21* causa parada de la proliferación en MEFs *cdk2*^{-/-}. El que *cdk2* no sea necesaria puede ser explicado por la presencia de otra *cdk* que compensa su función, y este parece el caso de *cdk1*. Se ha demostrado recientemente que en MEFs derivados del doble *knock out* *cdk2*, *p27*^{-/-} ciclina E se encuentra formando complejo con *cdk1* mostrando una apreciable actividad kinasa. En MEFs *cdk2*^{-/-} esta actividad no es detectable debido a los altos niveles de *p27* que se encuentran unidos a *cdk1*, aunque esto no explique por qué *cdk1* no puede compensar la ausencia de *cdk2* en la meiosis (Ortega et al., 2003; Berthet et al., 2003; Aleem et al., 2005; Martin et al., 2005).

El estudio de los *knock out* de ciclina E al compararlo con el fenotipo de *cdk2* permitió comprobar que esta ciclina posee funciones independientes a *cdk2* en la regulación del ciclo (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). Tanto ciclina E1 como E2 presentan una gran homología en su secuencia, y se expresan de forma solapante en la mayoría de las células. Aunque cierto porcentaje de machos ciclina E2^{-/-} presenta infertilidad, la eliminación individual de ciclina E1 o E2 no tiene grandes consecuencias fenotípicas. Además la presencia de alguno de estos dos alelos permite completar el desarrollo embrionario, lo que pone en evidencia que poseen funciones solapantes. El doble *knock out* es letal embrionario. Aunque los animales presentan una organogénesis y morfogénesis normales muestran cierto retraso en el crecimiento que podría responder a los dramáticos defectos que se encontraron en la estructura de la placenta, debido a una defectuosa endoreplicación del trofoblasto (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003).

MEFs derivadas del doble *knock out* muestran un fenotipo más similar al *knock out* de *cdk2*, ya que proliferan normalmente. Aunque la comparación entre estos dos tipos de MEFs dio como resultado un interesante descubrimiento cuando se analizó la habilidad para salir desde G0. Mientras las MEFs *cdk2*^{-/-} mostraban un ligero retraso en la reentrada a fase S, en MEFs ciclina E^{-/-} las células eran incapaces de salir de quiescencia, pese a mostrar niveles de actividad kinasa asociada a ciclina A normales y fosforilación en pRB. Esto se producía por un defecto en la unión de las proteínas MCM dentro del complejo de pre-replicación del DNA, lo que demostró que ciclina E tenía una función independiente de *cdk2* (Geng et al., 2003).

c) Cdk/ciclinas de G2/M

Recientemente el grupo de Malumbres y Barbacid han demostrado que *cdk1* parece ser la única *cdk* imprescindible en mamíferos. La carencia de *cdk1* es incompatible con el desarrollo embrionario. Esto lo han comprobado mediante cruces entre heterocigotos *Cdc2*^{+/^{mut} que no han dado lugar a animales *knock out* para *cdk1* ni a letalidad embrionaria en estadios tempranos del desarrollo E2.5 (estadio de mórula) o E1.5 (2-4 células) siendo los óvulos y espermatozoides *Cdc2*^{mut} viables (Santamaría et al., 2007). En este trabajo también se ha demostrado que *cdk1* parece ser indispensable no sólo en el desarrollo embrionario sino también para la proliferación de células en mamíferos. Esto está basado en un triple *knock out* donde inhiben *cdk2*, *cdk4* y *cdk6*. Estos animales presentan letalidad embrionaria pero son capaces de proliferar hasta E13.5. Es decir, que pese a carecer de todas estas actividades kinasa son capaces de completar la organogénesis y morfogénesis. Estos embriones presentan graves defectos en la línea hematopoyética que no es compatible con la vida, además presentan una fuerte reducción en el número de cardiomiocitos lo que debe contribuir a la muerte del embrión. Los MEFs aunque son capaces de proliferar, lo hacen de forma más lenta que los MEFs salvajes. Esto es debido a la fosforilación incompleta de las proteínas de la familia Rb, aunque *cdk1* sea capaz de unirse tanto a ciclina D como a ciclina E. Los MEFs derivados de este *knock out* también son capaces de salir de G0 pero con un retraso aproximado de ocho horas. Este trabajo es una representación del alto grado de plasticidad existente entre las *cdks* (Santamaría et al., 2007).}

Dos tipos de ciclina A han sido descritos en células de mamíferos, ciclina A1 y A2, y ambas han sido eliminadas genéticamente en ratones. Los ratones *knock out* para ciclina A1 son viables.

Las hembras son fértiles, pero los machos son estériles ya que presentan una completa disrupción de la espermatogénesis. En cambio el *knock out* de ciclina A2 presenta un fenotipo mucho más agresivo debido a que provoca letalidad embrionaria en estadios muy tempranos del embrión. Estos embriones presentan letalidad justo después de implantarse en estadio de blastocisto (Murphy et al., 1997; Liu et al, 1998).

Si la función en profase se le atribuye a ciclina A2, el control de mitosis recae en ciclina B/cdk1. Existen tres clases de ciclinas B (B1, B2 y B3). Mientras el *knock out* de ciclina B1 provoca letalidad embrionaria en la mitad de la gestación, el *knock out* de ciclina B2 no presenta un fenotipo obvio y tienen un período de vida normal. El *knock out* de ciclina B3 no ha sido publicado (Brandeis et al., 1998).

1.2.2 Papel de las ciclinas y cdks en cáncer.

La implicación de ciclinas y cdks en el desarrollo de los tumores y su potencial terapéutico como diana de futuras terapias con drogas anticancerígenas, necesita ser revisada de acuerdo con los recientes descubrimientos en ratones modificados genéticamente.

Análisis moleculares de cientos de tumores humanos han mostrado que tanto ciclinas como cdks a menudo son sobreexpresadas en células tumorales. Así se cree que existe una relación entre la sobreexpresión de estas proteínas y el desarrollo del tumor. Para el estudio de esto se han generado ratones modificados que sobreexpresan ciclinas y cdks usando diferentes promotores tejido-específicos.

Como se puede deducir en la **figura 2** la actividad aberrante del complejo ciclina D/cdk4 o la pérdida de pRB (lo que supone la pérdida del punto de restricción) provoca que la célula pueda proliferar sin necesidad de estímulos mitogénicos. Así la activación aberrante de cdk o la pérdida de pRB tienen fuertes implicaciones en la formación de procesos tumorales. Es más, tanto la hiperactividad de cdk4 y cdk6 como la pérdida de pRB está descrita en numerosos cánceres humanos (Deshpande et al., 2005).

El análisis de cánceres humanos ha reportado numerosos datos en este punto. Así, tanto la amplificación del gen de ciclina D1 como la sobreexpresión de su proteína ha sido documentada en un amplio abanico de diversos tumores como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y, esófago y laringe, carcinoma de útero, cérvix, astrocitomas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y otros (Lammie et al., 1991; Reissmann et al., 1999; Rodrigo et al., 2000; Cheung et al., 2001; Fujii et al., 2001; Vielba et al., 2003). Hay que resaltar que la sobreexpresión de ciclina D1 tiene una incidencia en el cáncer de mama de aproximadamente un 50%. Los genes que codifican para las ciclinas D2 y D3, también presentan amplificaciones y la sobreexpresión de estas proteínas está presente en muchos tipos de tumores. Así ciclina D2 está implicada en leucemias linfocíticas de células B y linfomas linfoplasmáticos (Delmer et al., 1995), leucemias linfocíticas crónicas (Motokura y Arnold, 1993) y tumores en ovarios y testículos. La sobreexpresión de ciclina D3 está asociada con glioblastomas, carcinoma en células renales, adenocarcinomas pancreáticos y numerosas malignidades en células B (Buschges et al., 1999; Filipits et al., 2002; Hedberg et al., 2002).

La sobreexpresión de ciclina D1 en las glándulas mamarias de ratón, bajo el control del promotor MMTV, causa de forma constitutiva hiperplasia mamaria. Este resultado sugiere que la sobreexpresión de esta ciclina contribuye a la transformación de las células mamarias, aunque otros eventos genéticos también pueden ser necesarios (Wang et al., 1994). Este fenotipo también ha sido observado en la sobreexpresión de ciclina D2 bajo el control del mismo promotor, lo que implica que la propiedad de transformación mamaria no está limitada a ciclina D1. Sin embargo no todos los tejidos presentan la misma sensibilidad a esta ciclina. Así la sobreexpresión en linfocitos no provoca hiperplasia, pero en compañía de la sobreexpresión de la proteína myc provoca la aceleración del desarrollo de linfoma. Este resultado permite concluir que la activación de ciclina D coopera con otras vías oncogénicas para promover la tumorigénesis.

De forma semejante la sobreexpresión de cdk4 es típica en cáncer de mama, en gliomas, glioblastomas multiforme sarcomas y meningiomas (Khatib et al., 1993; Schmidt et al., 1994; He et al., 1994; Wei et al., 1999; An et al., 1999; Simon et al., 2002). Cdk6 está también sobreexpresada en carcinoma de células escamosas y gliomas, además está frecuentemente

alterado en tumores linfoides a menudo asociado a traslocaciones cromosómicas (Ortega et al., 2002).

La sobreexpresión de cdk4 en piel, bajo el control del promotor K5, no genera un fenotipo de transformación aparente dado que la epidermis de estos ratones muestra un modelo normal de diferenciación, aunque con la edad desarrollan hiperplasia epidérmica y fibrosis dérmica pero no tumores. Es de resaltar que estos ratones son más sensibles a desarrollar tumores, siguiendo el clásico modelo de carcinogénesis en piel que desencadena la activación de H-Ras, lo que parece sugerir que la sobreexpresión de cdk4 coopera con el oncogén ras en la tumorigénesis de piel. De forma interesante hay que añadir que la sobreexpresión de ciclina D1 en piel no muestra un incremento en la formación de tumores malignos (Rodríguez et al., 1999).

La sobreexpresión de ciclina E es típica en cáncer de mama, ya que en un 20% de estos tumores la expresión de esta ciclina está aumentada, además este porcentaje se incrementa según va aumentando el grado y estadio del tumor (Keyomarsi et al., 1994). Por todo esto, se ha llegado a una correlación entre la sobreexpresión de ciclina E y la pérdida del receptor de estrógenos junto con un peor pronóstico en estos pacientes (Nielsen et al., 1996; Scott et al., 1997). En pacientes con cáncer de ovario la sobreexpresión de ciclina E también se asocia con un mal pronóstico al igual que en linfomas (Akli y Keyomarsi, 2003).

Se han generado modelos trasgénicos murinos para el estudio de ciclina E en cáncer de mama. La sobreexpresión de esta ciclina en células epiteliales de las glándulas mamarias en ratones lactantes, lleva a la formación de hiperplasias después del primer ciclo de lactación. Como en el caso de ciclina D1 la tumorigénesis inducida por la sobreexpresión de ciclina E es dependiente del ciclo celular (Zwijnsen et al., 1997; Karsunky et al., 1999).

Se ha descrito que ciclina A1 está sobreexpresada en leucemia y cáncer testicular. Al igual que ciclina E y D ha sido sobreexpresada en glándula mamaria para testar su capacidad para actuar como oncogén. Estos ratones trasgénicos muestran anomalías como multinucleación y cariomegalia que son sugestivas de alteraciones preneoplásicas. La coexpresión de cdk2 junto

con ciclina A1 empeora el fenotipo, lo que sugiere que estos dos genes cooperan en la transformación celular (Santamaría et al., 2006).

1.3 Regulación de los complejos ciclina/cdk mediante mecanismos postraduccionales.

1.3.1 Regulación de los complejos por fosforilación

Ciclina y cdk están reguladas mediante fosforilaciones postraduccionales. El ensamblaje de una cdk con su respectiva ciclina da lugar a un complejo ciclina/cdk parcialmente activo. El mayor grado de actividad de este complejo se alcanza cuando la cdk es fosforilada en un residuo treonina altamente conservado próximo al sitio de unión al ATP. Este residuo está localizado en un lazo aminoacídico denominado “T-loop” que bloquea el acceso del ATP al dominio catalítico. Análisis de la estructura cristalográfica del complejo ciclina A/cdk2 han demostrado que la formación de este complejo cambia la conformación del “T-loop” haciéndolo más accesible a la fosforilación. La fosforilación del residuo treonina cambia nuevamente la conformación del “T-loop” permitiendo al ATP acceder al dominio catalítico del complejo (Jeffrey et al, 1995).

La kinasa responsable de la fosforilación del residuo treonina ha sido designada como CAK (kinasa activadora de cdk). CAK a su vez esta formado por dos subunidades que son una cdk y una ciclina. Estas dos subunidades están formadas por cdk7 y ciclina H que son las responsables de fosforilar y activar a todas las demás cdk. La fosforilación de las cdk por CAK es antagonizada por una fosfatasa específica denominada KAP. Esta fosfatasa actúa sobre las cdk dando como resultado la liberación y degradación de las ciclinas (Kaldis, 1999; Hannon et al., 1994).

Como ya hemos comentado cdk7 ha sido implicada en dos funciones distintas. Por un lado, forma parte de CAK, jugando un papel importante en la fosforilación y activación de las demás cdk del ciclo, y por forma parte del factor de transcripción TFIID (Serizawa et al, 1995). De este modo, esta cdk tiene distinta especificidad por un determinado sustrato dependiendo si

está formando parte de CAK o TFIIH lo que implica un papel importante tanto en la regulación del ciclo celular como en la transcripción.

La fosforilación de las cdk's también puede regularlas de forma negativa. Esta fosforilación inhibitoria tiene lugar en el N-terminal de todas las cdk's, específicamente en la tirosina 15 en el caso de cdk2 y en la tirosina 17 en el caso de cdk1, cdk4 y cdk6 (Morgan, 1995). En cdk1 y cdk2 también es necesaria una segunda fosforilación en la tirosina 14. Esto tiene como resultado la inhibición de la actividad de cdk, incluso en presencia del complejo CAK. Las proteínas responsables de estas fosforilaciones en el caso de cdk1 y cdk2 son Wee1 y Myt1 (Parker y Piwnicka-Worms, 1992; Mueller et al., 1995). La kinasa responsable de la fosforilación inhibitoria de cdk4 y cdk6 no ha sido identificada hasta el momento. Por el contrario, las fosforilaciones inhibitorias de las cdk's pueden ser eliminadas por defosforilaciones activadoras. La acción de estas defosforilaciones es desempeñada por la familia de las fosfatasas Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C), que activan a las cdk's defosforilándolas en los mismos residuos. Es interesante saber que a su vez las proteínas Cdc25 son substratos de las cdk's esto genera una regulación positiva entre ellas (Morgan, 1995; Nilsson y Hoffmann, 2000).

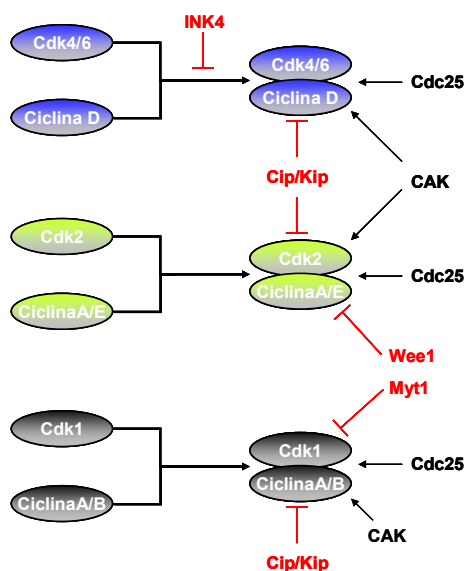


Figura 4. Formación de los complejos ciclina/cdk y la regulación postraducional de su actividad por fosforilación y defosforilación

1.3.2 Regulación de los complejos ciclinas/cdks por inhibidores de cdks

Los complejos ciclina/cdks están regulados negativamente por pequeños polipéptidos denominados CKIs (inhibidores de cdks). En mamíferos, los CKIs están divididos en dos familias:

a) La familia INK4 que específicamente se une e inhibe a cdk4/6. Esta familia está compuesta por p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d.

b) La familia Cip/Kip se une e inhibe de forma específica a los complejos ciclina A-E/cdk2 y Ciclina A-B/cdk1, y está formada por las proteínas p21Cip, p27Kip1 y p57Kip2.

a) Familia INK4

En 1994 se descubrió un nuevo gen supresor de tumores al que denominaron MTS1 (múltiple tumor supresor 1). Este gen se localizó en el cromosoma humano 9p21 y codificaba para una proteína que inhibía el ciclo celular. Hoy en día esta proteína se conoce como p16INK4a y sirve como prototipo de la familia INK4. Estudios posteriores descubrieron que en el cromosoma 9p21 se localizaba otro gen supresor de tumores al que denominaron MTS2 que codificaba para otro miembro de la familia INK4, la proteína p15INK4b (Serrano et al., 1993). Los otros dos miembros de la familia p18INK4c y p19INK4d fueron descubiertos más tarde mediante ensayos de doble híbrido o mediante estrategias basadas en PCR (Hirai et al., 1995; Chan et al., 1995).

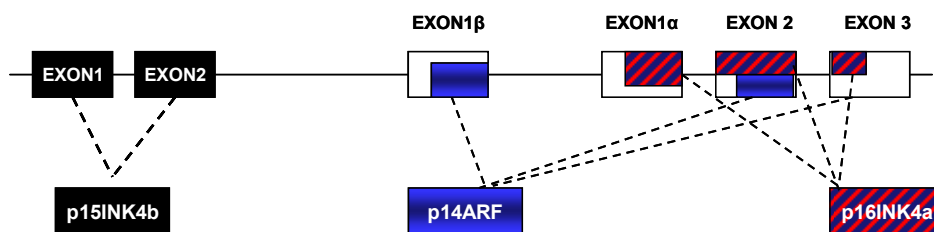


Figura 5. Representación esquemática del loci localizado en el cromosoma 9p21 que codifica para las proteínas p15INK4b, p14ARF y p16INK4a

El locus INK4a que codifica para p16, codifica además para otra proteína. La secuencia codificante para p16 está formada por tres exones designados 1 α , 2 y 3 que dan lugar a un RNAm de aproximadamente 1Kb. En humanos y ratones un primer exón alternativo, designado 1 β , que se encuentra 15-20 Kb antes de la secuencia que codifica para p16, da lugar junto con los exones 2 y 3 (de p16) a un nuevo mRNA que codifica para una proteína designada p14 ARF (*alternative reading frame*) en humanos y p19ARF en ratones (**figura 5**). Esta proteína activa al supresor de tumores p53, por unión directa a su regulador negativo Mdm2, protegiendo así a p53 de su degradación. Así un mismo locus codifica para dos proteínas que interfieren con dos supresores de tumores como son pRB y p53, y son regulados de forma diferente (Quelle et al., 1995; Sharpless et al., 1999; Sherr y Weber, 2000; Sherr et al., 2004).

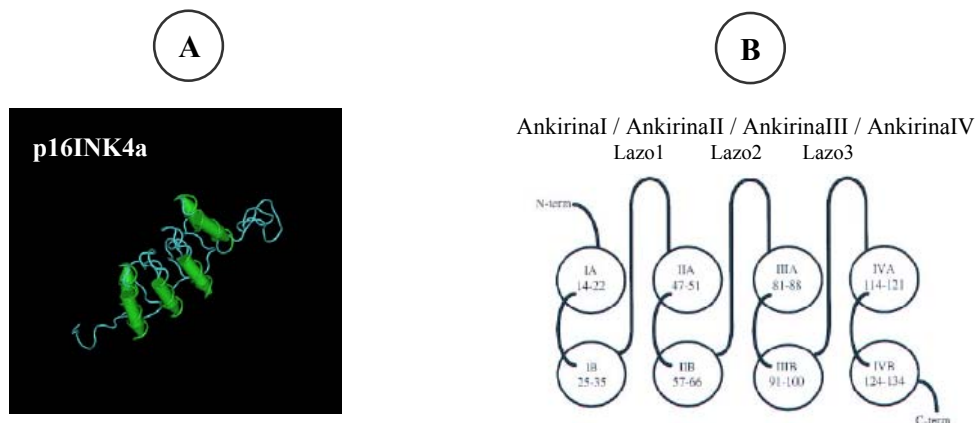


Figura 6. Estructura de p16INK4a. Como se puede ver en la figura A y B la estructura de p16 presenta 4 repeticiones en anquirinas (I-IV). Cada anquirina está formada por estructura en hélice-giro-hélice (H-T-H). Las hélices están designadas como IA, IIA, ..etc. Los H-T-H están unidos por tres lazos, designados como lazo1 (Ala36 a Arg46), lazo2 (GLy67 a Arg80), lazo3 (Gly101 a Leu113). (Adaptación de Byeon et al., 1998).

In vitro las cuatro proteínas de la familia INK4 presentan actividades muy similares. Cuando se expresan ectópicamente provocan que las células se paren en la fase G1 del ciclo, pero sólo en presencia de proteínas funcionales de la familia Rb. Esto está basado en su capacidad de inhibir al complejo ciclina D/cdk4-6 por unión directa a estas cdks. Las proteínas INK4 tienen un tamaño aproximado de entre 15-19 KDa y su estructura está dominada por numerosas repeticiones anquirina, que es un motivo formado por 33 residuos aminoacídicos que consisten en una serie de α -hélices antiparalelas separadas por lazos. Las proteínas p15 y p16 (**figura 6**)

constan de cuatro repeticiones en ankirina mientras que p18 y p19 constan de cinco. Estos dominios estructurales están implicados en la unión a cdk4 y cdk6 a través de sus sitios no catalíticos. El sitio por el cual se unen a estas cdks es opuesto al sitio de unión de la ciclina D. La unión de las proteínas INK4 a cdk4-6 provoca un cambio alostérico en la estructura de estas cdks lo que altera el sitio de unión a ciclina D y reduce su afinidad por el ATP, dos consecuencias que reducen drásticamente la actividad kinasa de cdk4-6 (Reynisdóttir et al., 1995; Bruce et al., 2000).

Los cuatro miembros de esta familia presentan un alto grado de homología (figura 7), por lo que se ha sugerido que podían tener funciones redundantes in vivo, aunque se ha demostrado que se expresan de forma diferencial en el desarrollo embrionario murino. La amplia diversidad en el modelo de expresión de los genes INK4 ha sugerido que esta familia de inhibidores debe tener funciones específicas en un determinado tipo celular o un determinado tejido (Pei y Xiong, 2004; Ortega et al, 2002).

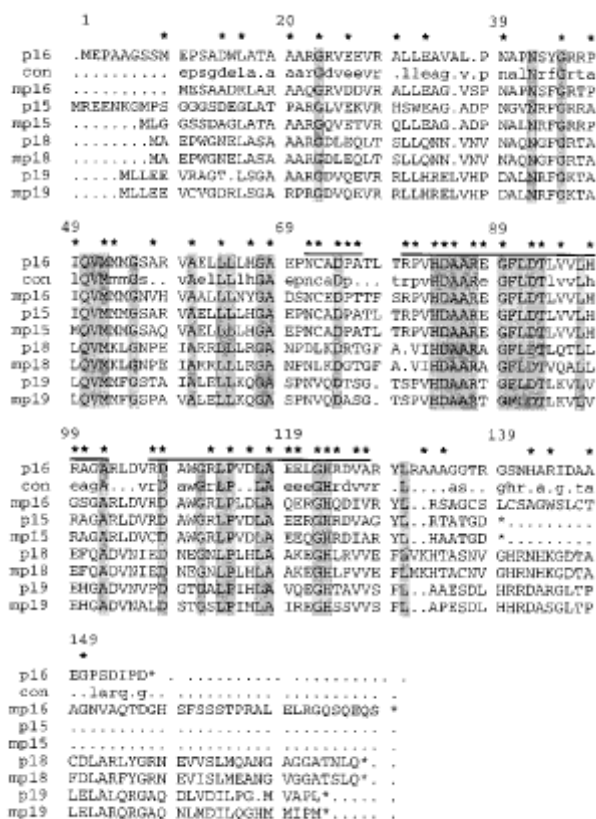


Figura 7. Secuencia de la familia INK4. Secuencias de p15, p16, p18 y p19 humana y murina (m) y la secuencia consenso (con). El porcentaje de semejanza entre p16 y p18 es de un 40% mientras que entre con p19 es de un 48%. Los asteriscos representan las posiciones de las mutaciones identificadas en células tumorales. Las líneas horizontales muestran las tres regiones mutadas más frecuentemente. (Adaptación de Byeon et al., 1998).

Hoy en día se conoce muy poco del mecanismo molecular por el cual uno u otro miembro de la familia INK4 se expresa y se regula en un determinado tipo celular o tejido. De forma general, se conoce que p15INK4b es inducido por TGF- β (Hannon y Beach, 1994), y p16INK4a puede ser inducido por JunB en células de ratón (Passegue y Wagner, 2000). p19INK4d se expresa de forma periódica a través del ciclo celular. La transcripción de p19INK4d tiene lugar durante las fases S y G2, luego es rápidamente degradado por un mecanismo dependiente de proteosomas y ubiquitinización; de esa forma la célula cuando entra en G1, presenta unos niveles de p19INK4d bajos lo que facilita la unión y posterior formación del complejo ciclina D/cdk4-6-. En ratón p18INK4c y p19INK4d se expresan durante el desarrollo embrionario, mientras p16INK4a y p15INK4b sólo se pueden detectar después del parto en muchos tejidos, donde la expresión de p16 se va incrementando con la edad (Zindy et al., 1997; Franklin et al., 1998; Zindy et al., 2000).

Aparte de su papel fisiológico, las proteínas INK4 están alteradas de forma común en diversos tipos de cánceres, siendo esto representativo de su papel como supresor tumoral. Los miembros de esta familia no sólo regulan el ciclo, sino que presentan además otras funciones distintas.

a.1 Función de las proteínas INK4

El nombre de las proteínas INK4 proviene de su habilidad por inhibir la actividad kinasa de cdk4. Estas proteínas secuestran a cdk4/6 del complejo ciclina D/cdk4-6, lo que provoca la liberación de la proteína de la familia Cip/Kip p27 unida a este complejo, que a su vez se une e inhibe al complejo ciclina E/cdk2. Así las proteínas INK4 inhiben a dos complejos necesarios para la proliferación celular, uno de forma directa y el otro de forma indirecta, llevando a la parada del ciclo de las células. La capacidad de las proteínas INK4 de parar a las células en G1 depende de la presencia funcional de las proteínas de la familia Rb. Esto es debido a su capacidad de inhibir al complejo ciclina D/cdk4-6, lo que hace que pRB permanezca en su forma activa hipofosforilada impidiendo a la célula de esa forma la entrada en fase S (Sherr y Roberts 1995).

En un intento de entender el papel de cada uno de los miembros de esta familia, se realizaron *knock out* de cada uno de los genes INK4 (**tabla 3**). Los ratones que han perdido cada uno de los

genes de la familia INK4 exhiben distintos fenotipos. Así los ratones que pierden el gen INK4d (p19INK4d $-/-$) son prácticamente normales pero presentan atrofia testicular y sordera. Los ratones que pierden el gen INK4b (p15INK4b $-/-$) muestran un incremento en la proliferación de las líneas linfoides y una baja incidencia en la formación de tumores espontáneos. Por otro lado los ratones que pierden el gen INK4c (p18INK4c $-/-$) al igual que el que pierde el INK4a (p16INK4a $-/-$) muestran un incremento en la susceptibilidad de tumores espontáneos e inducidos por carcinógenos. Así los ratones p16INK4a $-/-$ desarrollan linfomas espontáneos y sarcomas de baja penetrancia, mientras que la mayoría de p18INK4c $-/-$ desarrollan tumores en la pituitaria (lóbulo intermedio). Todo esto sugiere diferentes papeles in vivo para todas estas proteínas (**tabla 3**).

Aunque los resultados con los *knock out* de los genes de la familia INK4 parecen mostrar distintos papeles para estas proteínas, también se ha visto que esta familia puede desempeñar funciones parcialmente redundantes en el control de las cdks en el ciclo. Así la pérdida p18INK4c $-/-$ en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) se compensa con un incremento en los niveles de p16INK4a, mientras la pérdida de p16INK4a se ve compensada con un incremento en los niveles de p15INK4b. Se ha visto que en ratones doble *knock out* para p18INK4c y p16INK4a se produce un aumento significativo de la actividad de cdk4 al igual que un fenotipo más agresivo que el detectado en los simples mutantes. (Krimpenfort et al., 2007; Ramsey et al., 2007). Todos estos datos son consistentes con un cierto grado de redundancia entre los distintos miembros de la familia INK4.

La expresión de las proteínas INK4 se induce de forma diferencial en respuesta a varias vías inhibitorias del crecimiento así como en respuesta a estímulos oncogénicos. Pero la falta de alguna de estas proteínas puede desencadenar un aumento de la expresión de otra proteína de la misma familia en un intento de controlar la proliferación celular.

Tabla 3. Sumario de fenotipos de ratones knock out simples de la familia INK4

Blanco	Efectos funcionales	Fenotipo	Referencia
p16INK4a	Forma inestable p16INK4a	Linfoma de células B después de una larga latencia	Krimpenfort et al., 2001
p16INK4a	No se expresa p16INK4a	Variedad de tumores después de una corta latencia	Sharpless et al., 2001
INK4 ^{Δ2,3}	No se expresa ni p16INK4a ni p19ARF	Sarcomas y linfomas similar a las observadas en ratones p19arf ^{-/-} y p53 ^{-/-}	Serrano et al., 1996
p15INK4b ^{-/-}	No se expresa p15INK4b	Desórdenes linfoproliferativos y angiosarcomas	Latres et al., 2000
p18INK4c ^{-/-}	No se expresa p18INK4c	Incremento en la talla del animal y de algunos órganos, desórdenes linfoproliferativos, múltiples quistes en glándulas mamarias y riñón, tumores pituitarios y otros.	Franklin et al., 1998; Latres et al., 2000
p19INK4d ^{-/-}	No se expresa p19INK4d	Fenotipo semejante al salvaje pero algunos machos presentan atrofia testicular	Zindy et al., 2000

a.2 Papel de p16INK4a en la célula

En células infectadas con el virus SV40, se observó que cdk4 se asociaba con una proteína de 16Kd. El DNA que codificaba para esta proteína fue aislado mediante el método del doble híbrido utilizando a cdk4 como cebo. A causa de su especificidad como inhibidor de cdk4 se denominó INK4a (Xiong et al., 1993; Serrano et al., 1993).

En la última década se ha visto que el papel de p16 no sólo está limitado a su función como supresor tumoral, sino que además participa en procesos tales como el de senescencia, apoptosis o reparación del DNA.

Supresor de tumores

Como ya se ha comentado la elucidación de la función específica de cada uno de los cuatro miembros de la familia INK4 ha surgido del estudio de aproximaciones genéticas usando como modelo ratones modificados (**Tabla 3**). La inactivación del locus INK4a fue realizada en primer lugar por el grupo de Serrano donde eliminaron los exones 2 y 3 antes de conocerse la existencia de la proteína p19ARF. El ratón homocigoto para esta mutación se designó como

INK4a^{Δ2,3} y no presentaba ninguna de las dos proteínas p16INK4a ni a p19ARF. Estos ratones se desarrollaban con normalidad y eran fértiles, aunque presentaban tumores espontáneos con un periodo corto de latencia y además eran altamente sensibles a los estímulos carcinogénicos. Inicialmente estos resultados se interpretaron como un indicativo de las importantes propiedades de esta proteína como supresor de tumores.

Esta afirmación ha sido revisada dado que se han generado ratones *knock out* de p19ARF y de p16INK4a. Aquí se ha visto que el ratón que pierde exclusivamente p19ARF presenta un fenotipo muy similar al observado en el INK4a^{Δ2,3}, mientras que los que pierden sólo p16INK4a o no desarrollan tumores o lo hacen en un menor porcentaje, lo que sugiere que p19ARF es el primer supresor tumoral de este locus, al menos en ratones.

Se han generado dos modelos de *knock out* de p16INK4a, sin que se encuentre alterada la proteína p19ARF. El ratón desarrollado por Krimpenfort et al., 2001 presenta una versión truncada de p16INK4a. Este animal se desarrolla normalmente y permanece libre de tumores, a excepción de un pequeño porcentaje que presentaban linfomas de células B después de una larga latencia. Por otro lado, el modelo desarrollado por Sharpless et al., 2001 es homocigoto para la mutación en el exón 1α de p16INK4a, lo que da lugar a ratones que carecen de esta proteína. Estos animales parecen desarrollar cierta variedad de tumores que afecta a un 25% en el primer año de vida. Esta diferencia de fenotipo en los dos modelos todavía permanece sin aclarar.

En el caso de humanos, el gen que codifica para p16INK4a fue uno de los primeros que se descubrió que estaba silenciado en tumores. La pérdida de p16INK4a a través de mutaciones puntuales o pequeñas deleciones ha sido reportada en cientos de cánceres. Así la región cromosómica 9p21 que contiene los loci INK4a-ARF-INK4b se encuentra frecuentemente mutada lo que implica pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9p21. Esto lo podemos encontrar en la mitad de los tumores de vejiga y en melanomas. Las deleciones homocigotas son frecuentes en neoplasias y llevan a la pérdida de p16 INK4a, p15 INK4b y p14ARF. Las mutaciones puntuales afectan exclusivamente a p16INK4a y son frecuentes en tumores pancreáticos y melanomas (Ruas y Peters, 1998). Después de descubrir estas mutaciones, se

encontraron evidencias que los loci INK4a-ARF, y INK4b a menudo participan en el desarrollo de tumores mediante mecanismos epigenéticos que implican la pérdida de expresión de estos loci debido a la hipermetilación que sufren sus regiones promotoras. Así p16INK4a no se expresa en un gran número de tumores debido a la metilación específica de su promotor. Esta metilación es común en un amplio panel de tumores así como mielomas, tumores de vejiga, cáncer de colon y otros.

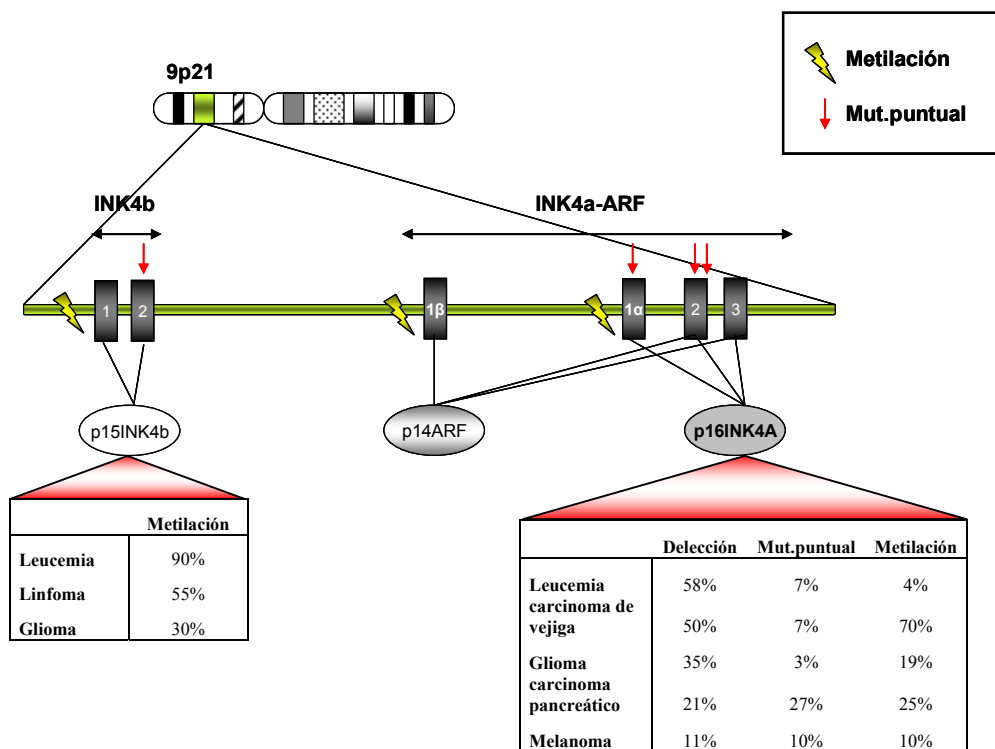


Figura 8. Alteraciones de el loci INK4a-ARF y INK4b en tumores humanos. Representación esquemática de la localización cromosómica, estructura génica y proteínas codificadas en este loci. Tablas descriptivas de la incidencia genética (delecciones y mutaciones puntuales) y epigenéticas (metilación del pormotor) encontradas en tumores humanos (Adapatación de Ortega et al., 2002).

En contraste la inactivación específica del promotor de p14ARF sólo se ha reportado en unos pocos procesos tumorales que incluyen colon y carcinoma de estómago, lo que resalta la

importancia de p16INK4a como supresor de tumores en humanos frente a p15INK4b y p14ARF (Ortega et al, 2002).

Todos estos datos aportan evidencias que el locus INK4b/ARF/INK4a codifica para tres supresores de tumores de gran relevancia que constituyen una de las principales defensas antioncogénicas en mamíferos. Pese a esto hoy en día es poco conocida la regulación que controla la expresión de este locus. Recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de inactivación del locus INK4b/ARF/INK4a. Los autores han localizado una pequeña región del DNA altamente conservada cerca del lugar de transcripción que parece poseer la capacidad de regular a este locus de forma global. La inactivación de esta región, a la que denominaron RD^{INK4/ARF}, provoca el silenciamiento de todo el locus. Esto se produce tras la unión de la proteína replicativa Cdc6 a esta región, que es capaz de captar histonas deacetilasas que finalmente provocan la heterocromatinización y la represión del locus INK4b/ARF/INK4a. La proteína Cdc6 está sobreexpresada en algunos cánceres humanos, lo que puede explicar el silenciamiento de este locus favoreciéndose así la progresión del tumor (Murphy et al., 2005; Kirchmaier y Rine, 2006).

Senescencia

Se ha propuesto que la senescencia juega un papel importante en el envejecimiento celular. Este proceso se caracteriza por una permanente parada de la proliferación, lo que podría perjudicar gravemente la capacidad regenerativa de los órganos según van envejeciendo. Otro papel importante del proceso de senescencia es el de proteger a los organismos contra la transformación neoplásica como consecuencia de ciertos estímulos. Se han identificado un alto número de estímulos que provocan senescencia que incluyen: acortamiento de telómeros, daño en el DNA, estrés oxidativo, estrés oncogénico (como el provocado por una fuerte estimulación mitogénica) y otros.

Numerosos estudios han confirmado que la expresión de p16INK4a se incrementa con el paso del tiempo en la mayoría de los tejidos tanto en roedores como en humanos, por lo que se ha sugerido a p16INK4a como biomarcador del estado fisiológico de tejidos. En tres tipos celulares la inhibición de p16 inhibe parcialmente la disfunción provocada por el envejecimiento. Así en

ratones irradiados deficientes en p16 ya mayores, se ha podido observar un aumento en la capacidad de transplantar o repoblar células en comparación con un ratón de genotipo salvaje de la misma edad. Más aun la pérdida de p16 favorece la neurogénesis en animales viejos pero no en ratones jóvenes. Así el incremento de p16INK4a con la edad no sólo parece contribuir a reducir la capacidad de regeneración sino también la proliferación de los tejidos y de las células en mamíferos (Zindy et al, 1997; Janzen et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006; Molofsky et al., 2006).

Durante la senescencia las células son insensibles a las señales mitogénicas de forma permanente, aunque se conoce poco la maquinaria molecular que conduce y mantiene a las células en este estado de no proliferación. En algunos tipos celulares, la senescencia está asociada a grandes cambios en la estructura de la cromatina, lo que lleva a la acumulación de las proteínas de heterocromatina1 (HP1) e histonas H3 trimetiladas en focos de heterocromatina asociados al proceso de senescencia (SAHF) y en los promotores de ciertos genes importantes para el ciclo celular (Zhang et al., 2005). Así los cambios en la cromatina impiden la transcripción de los genes que promueven la proliferación, lo que provoca una insensibilidad extrema a la estimulación por mitógenos. Con referencia a todo esto, recientemente se ha visto que el grupo A de proteínas de alta movilidad (HMGA), que se asocian con la activación de ciertos genes al igual que con la progresión del ciclo celular y la tumorigénesis, se acumulan en la cromatina de fibroblastos senescentes y forman parte de la estructura de SAHF. Así las proteínas HMGA actúan junto con p16INK4a de forma conjunta promoviendo la formación de SAHF y contribuyendo a la represión estable de la transcripción de los genes dependientes de E2F. La inhibición de estas dos proteínas lleva a las células senescentes a superar este mecanismo y a la reactivación de ciertos genes dependientes de E2F y a reentrar en fase S desde senescencia (Narita et al., 2006).

Apoptosis y regeneración del DNA

Numerosos trabajos han descrito la posible implicación de la familia INK4 en la respuesta celular a agentes genotóxicos. En uno de esos artículos se describe cómo células U2OS (células tumorales sin p16), así como MEFs p16INK4a -/- son sensibles a la apoptosis provocada tras el tratamiento con luz ultravioleta. En cambio células con p16INK4a muestran una menor

sensibilidad lo que parece demostrar que esta proteína protege a las células de la apoptosis inducida por la exposición a la luz ultravioleta. En otro artículo se ha demostrado que después de que las células sufran daño en su DNA la sobreexpresión de p16INK4a al igual que p21Cip y p27Kip en células tumorales, causa parada de la proliferación, lo que inhibe la respuesta genotóxica que finalmente provoca la apoptosis. Esto sugiere que los inhibidores de las cdk's pueden afectar a la sensibilidad de la mitocondria a las señales proapoptóticas inducidas por daño en el DNA (Al Mohanna et al., 2004; Le et al, 2005).

b) Familia Cip/Kip

Tres proteínas constituyen la familia Cip/Kip (proteínas de interacción con CDKs/ proteínas inhibidoras de kinasas): p21Cip1, p27Kip1 y p57Kip2. Estas proteínas muestran dominios inhibidores homólogos entre sí, necesarios para la unión a los complejos formados por cdk4 y cdk2. Aunque estas proteínas inhiben a todas las cdk's de G1 in vitro, se ha observado que in vivo inhiben de forma específica a los complejos formados por cdk2. p21Cip1 y p27Kip1 también se unen al complejo ciclina D/cdk4-6 sin interferir en su actividad kinasa, al menos bajo ciertas condiciones estequiométricas. Al contrario, estos inhibidores parecen contribuir a la formación estable del complejo ciclina D/cdk4-6 durante las fases tempranas del ciclo celular (Soos et al, 1996; Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999).

Se ha propuesto que la unión de p27Kip1 a ciclina D/cdk4-6 provoca el secuestro de la proteína, impidiéndose así la inhibición de su actividad de inhibición de cdk2. La afinidad de p27Kip1 por un complejo u otro depende de propiedades estequiométricas (Reynisdottir et al, 1995). Este modelo se ha visto confirmado mediante estudios derivados de células procedentes del *knock out* de cdk4. Estas presentan un retraso en la reentrada en fase S desde quiescencia, que puede ser explicado siguiendo este modelo. De este modo, la carencia de cdk4 impide la formación del complejo ciclina D/cdk4, esto aumenta los niveles de p27Kip1 libre lo que finalmente inhibiría al complejo de cdk2 provocando el retraso en la entrada a fase S. Así en el doble *knock out* cdk4^{-/-}, p27^{-/-} esto se revierte al no detectarse ningún retraso (Tsutsui et al., 1999).

p27Kip1 fue identificado en primer lugar como un inhibidor de cdk2 en células tratadas con TGF-beta o sometidas a inhibición por contacto (Koff et al., 1993; Polyak et al, 1994). Al mismo tiempo, se clonó como una proteína que interaccionaba con el complejo ciclina D/cdk4

(Toyoshima y Hunter, 1994). Muchos estudios han demostrado que p27Kip1 se acumula en las células tras señales antimitogénicas entre las que se pueden incluir el contacto célula-célula, TGF-beta, cAMP, Rapamicina o tratamiento con lovastatina, lo que finalmente provoca parada del ciclo celular. Así p27Kip1 juega un papel crítico en el ciclo de las células, siendo necesaria su actuación para una correcta regulación de la proliferación celular. Como ya hemos dicho p27Kip1 inhibe al complejo ciclina E/cdk2, pero la activación de este complejo por un lado provoca la entrada en fase S y por otro promueve la degradación de p27Kip1 permitiendo que se formen así otros complejos (Polyak et al., 1994; Slingerland et al., 1994; Toyoshima y Hunter, 1994).

La proteólisis de p27Kip1 es dependiente de cdk2 y Skp2. Por un lado el complejo ciclina E/cdk2 fosforila a la proteína en Treonina 187, lo que permite interactuar a Skp2 con el extremo carboxi-terminal de p27Kip1. Esta asociación da lugar al proceso de ubiquitinización de la proteína y su posterior degradación (Sheaff et al., 1997; Carrano et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999).

p27Kip1 además de actuar sobre cdk2 y cdk4, también tiene la capacidad de inhibir a cdk3 (Braum et al., 1998). Los modelos murinos no han modificado esta visión sobre la función de p27, sino que la han confirmado. Los MEFs cdk4^{-/-} sufren un retraso en la entrada en fase S desde G0 debido a la acumulación de p27 que inhibe a cdk2. De hecho en MEFs cdk4^{-/-}, p27^{-/-} se restaura la actividad de cdk2 (Tsutsui et al., 1999). Se ha visto recientemente que p27 puede inhibir también a cdk1, aunque hace años ya se había presentado una primera evidencia cuando se demostró que cdk1 se unía a p27 in vitro (Montagnoli et al., 1999). En estos últimos años el papel de p27 en el ciclo se ha ampliado, dado que se ha visto que p27 puede actuar también en G2/M. Esto no era comprensible ya que p27 es degradado en esa parte del ciclo a través del proteosoma SCF-SKP2. El *knock out* de SKP2 mostró un aumento en el tamaño de los hepatocitos, que eran capaces de sintetizar ADN pero fallaban en mitosis. Cuando SKP2 era eliminado, se producía una inhibición de cdk2 y cdk1 impidiendo a la célula entrar en mitosis. Una vez más, eliminando p27 mediante un doble knockout SKP2^{-/-}, p27^{-/-} se restablecía la actividad de estas cdks y las células podían entrar en mitosis (Nakayama et al., 2000 y 2004).

En esta familia de inhibidores es importante resaltar que pese a mostrar un mecanismo de acción similar, p27Kip1 y p21Cip1 juegan papeles muy diferentes en la célula. p21Cip1 es un blanco transcripcional de p53 y se cree que es el principal efector de la parada del ciclo celular mediada por p53 (Nakayama y Nakayama, 1998). p27Kip1 en cambio, parece ser un regulador negativo primario durante la proliferación celular (Sherr y Roberts, 1999). La expresión de p27Kip1 está controlada por una amplia familia de factores de transcripción y un grupo de efectores de la vía de señales de traducción de PI3K/Akt (Collado et al., 2000). Más aún p27Kip1 y p21Cip1 presentan un extremo carboxi-terminal muy diferente, que es el responsable de sus funciones específicas (Nakayama y Nakayama, 1998; Sherr y Roberts, 1999).

El *knock out* de p21Cip1 no presenta anormalidades fenotípicas relevantes y los ratones desarrollan una variedad de tumores de baja latencia (Martín-Caballero et al., 2001). Además las células p21Cip1^{-/-} son deficientes en su habilidad para parar el ciclo en G1 tras haber sufrido daños en su DNA (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995). En contraste, la ablación de p27Kip1 en ratón da como resultado hiperplasia llegando a generar organomegalia y un gran incremento en la talla de estos animales, que desarrollan displasias en retina y tumores en el lóbulo intermedio de la hipófisis (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Fero et al., 1996).

En tumores humanos el gen de p21Cip1 no está mutado frecuentemente. Lo mismo sucede con p27Kip1 dado que el locus que codifica para esta proteína tampoco presenta mutaciones en la mayoría de los tumores humanos. Sin embargo los niveles de p27Kip1 sí se encuentran reducidos de forma frecuente en tumores y líneas tumorales humanas, y además esta inhibición está asociada a un mal pronóstico. Estos tumores incluyen mama, próstata y carcinomas gástricos (Lloyd et al., 1999; Tsihlias et al., 1999; Bloom y Pagano, 2003; Blain et al., 2003).

Por su parte, p57Kip2 fue descubierto simultáneamente por dos grupos que buscaban homólogos de p21Cip1 y p27Kip1. El locus de p57 es igual en ratones y humanos, y sólo se expresa el alelo materno. p57Kip2 se ha relacionado con tumores de Wilms y con el síndrome Beckwith-Wiedeman. También se sabe que juega un papel importante en la diferenciación y apoptosis de tejidos concretos (Vidal y Koff, 2000)

Tabla 4. Sumario de fenotipos de ratones knock out de la familia Cip/Kip

Blanco	Fenotipo	Referencia
p21Cip1 -/-	No presentan un fenotipo evidente. MEFs muestran un defectivo punto de control en G1	Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995
p57Kip2 -/-	Cierta letalidad embrionaria y neonatal, alteración de la proliferación y la apoptosis en numerosos tejidos	Yang et al., 1997 ; Zhang et al., 1997
p27Kip1 -/-	Incremento en la talla del animal y de los órganos, infertilidad en hembras, hiperplasia en la pituitaria	Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996

1.4 Regulación de la transición G1/S

En la mayoría de las células las señales mitogénicas son requeridas hasta G1 tardío, punto en el cual la célula se prepara para entrar en fase S e iniciar la replicación del DNA. Este punto es el denominado punto de restricción y coincide con la fosforilación e inactivación de las proteínas de la familia Rb (**figura 9**). En células quiescentes los miembros de esta familia, pRB y p130, están presentes formando complejo con los miembros de la familia de factores de transcripción E2F (Ikeda et al., 1996; Bagui et al., 2000). La fosforilación de las proteínas de la familia Rb libera a E2F que actúa como activador de la transcripción. Los genes dependientes de E2F que están regulados por las proteínas de la familia de Rb abarcan desde los necesarios para la transición G1/S hasta genes implicados en la replicación del DNA (Ohtani, 1999).

Para unirse al DNA, las proteínas E2F están obligadas a formar heterodímeros con la familia de proteínas DP. Los heterodímeros E2F/DP pueden actuar como activadores o represores de la transcripción de ciertos genes. Se sabe que pRB puede interaccionar con histonas deacetilasas y también con el complejo de remodelación de cromatina. Así el reclutamiento de pRB/E2F en los promotores se piensa que reprime a los genes a través de estos complejos y las histonas deacetilasas (Strober et al., 1996; Sherr, 1996; Brehm et al., 1998).

Como ya hemos dicho, el complejo ciclina D/cdk4 es el primero en actuar sobre las proteínas de la familia Rb. Este complejo fosforila a estas proteínas inactivándolas parcialmente, lo que provoca la activación de ciertos genes dependientes de E2F. Uno de esos genes es ciclina E que a su vez aumenta la expresión de los genes dependientes de E2F fosforilando a las proteínas de la familia Rb, lo que provoca una mayor liberación de las proteínas E2F (Koff et al., 1992; Geng et al., 1996). Esta regulación positiva también se ve aumentada gracias a la expresión de los genes E2F1, E2F2 y E2F3 que son a su vez dianas de la activación transcripcional de E2F. La expresión de ciclina A tiene lugar después de la expresión de ciclina E y es necesaria para la fase S. La expresión de esta ciclina es también regulada por E2F. Para la expresión de ciclina E y ciclina A es necesario eliminar de sus promotores a las proteínas de la familia Rb y los complejos de remodelación de cromatina junto con las histonas deacetilasas que los están reprimiendo.

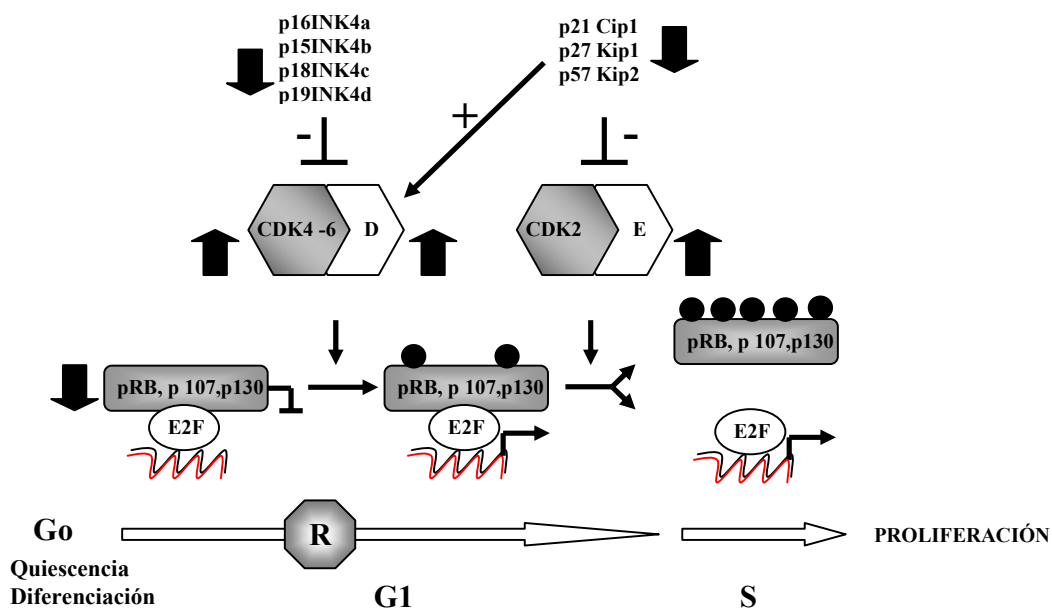


Figura 9. Transición G1/S La progresión a través de la fase G1 es controlada por el estado funcional de la familia pRB. En Go, las proteínas de la familia Rb están en su forma hipofosforilada activa, unidas al factor de transcripción E2F. El primer evento en G1 es la activación del complejo CDK4-6/ciclina D, que fosforila a las proteínas de la familia Rb, por lo que son parcialmente inactivadas, lo que permite una limitada transcripción de genes dependientes de E2F, como el gen de ciclina E, activándose CDK2.

2. Papel de las familias Rb y E2F en el control del ciclo celular.

El gen de retinoblastoma *Rb1* es un gen supresor de tumores que fue identificado primero en el tumor pediátrico de retina conocido como Retinoblastoma. Este tumor es bastante raro, puede ser hereditario o bien puede producirse de forma esporádica (Knudson, 1971). La clonación e identificación de la mutación del gen *Rb1* confirmaron la hipótesis de que este gen ejercía la función de supresor de tumores. Un gran número de tumores presentan mutaciones y deleciones en este gen (Dunn et al., 1988). De este modo es típico encontrarlo inactivado en osteosarcoma y carcinoma de pulmón de células pequeñas (Liu et al., 2004)

Varios estudios han revelado que pRB actúa junto con otras dos proteínas similares para regular la proliferación en la mayoría de los tipos celulares (Cobrinik, 1996; Dyson, 1998, Nevins, 1998). Estas dos proteínas son p107 y Rb2/p130 que junto pRB forman la familia Rb conocida con el nombre de “*Pocket proteins*” (**figura 10**). Este término deriva del dominio altamente conservado que poseen las tres proteínas, a través del cual se unen a oncoproteínas virales y a factores de transcripción como los miembros de la familia E2F. Numerosos estudios han demostrado que la sobreexpresión de estas proteínas puede causar parada en la fase G1 del ciclo celular (Dyson, 1998). Estos estudios han contribuido a definir el papel de las proteínas de la familia de Rb en la regulación de la transición entre proliferación celular y diferenciación. El papel de estas proteínas en la regulación del ciclo se basa en su capacidad de unirse a los ya mencionados factores de transcripción y posiblemente a proteínas implicadas en el control de la replicación del DNA. También juegan un papel importante en el proceso de diferenciación de diversos tejidos como en el caso de los ojos, cerebro, sistema nervioso central y melanocitos entre otros (Giacinti y Giordano, 2006)

2.1 Familia de proteínas Rb

Las proteínas Rb1/p105 y Rb2/p130 se encuentran codificadas en la región cromosómica 13q14 y 16p12.2 respectivamente (Baldi et al., 1996), una región que se ha descrito que está mutada en

numerosos tumores, mientras que p107 se encuentra codificada en la región cromosómica 20q11.2, un locus que raramente se ha encontrado implicado en neoplasias humanas (Paggi y Giordano, 2001). Pese a esto, y a diferencia de pRB, p130 y p107 se encuentran inactivados de forma esporádica en tumores humanos (Modi et al., 2000; Dannenberg y te Riele, 2006). Aun así, p130 se ha visto que está regulado a la baja en numerosas líneas celulares tumorales humanas al igual que en cánceres humanos como carcinoma de endometrio, en cáncer de pulmón, carcinoma oral de células escamosas y melanoma. En todos ellos esta alteración de p130 está relacionada con un mal pronóstico de esos pacientes (Paggi y Giordano, 2001). En el caso de p107 recientemente se han encontrado deleciones o alguna inactivación funcional en el gen que codifica para esta proteína en cánceres humanos (Ichimura et al., 2000).

Las proteínas de esta familia presentan una zona homóloga bipartita, formando el dominio “pocket” (Claudio et al., 2002). , que se caracteriza por presentar dos regiones altamente conservadas denominadas PD-A y B, separadas por una región espaciadora (**figura 10**). Miembros de la familia E2F interactúan con las proteínas de la familia Rb a través de este dominio (Lee et al., 1998).

Los miembros de la familia Rb son regulados de forma postraduccional y su fosforilación gradual lleva a su inactivación funcional. Esta fosforilación es un fenómeno dependiente del ciclo celular que es producido por los complejos formados por ciclinas/cdks. Estos complejos se unen a las proteínas de la familia Rb a través de los dominios A y B, siendo este paso crucial para la inactivación de estas proteínas y para la liberación de los miembros de la familia E2F (De luca et al., 1997).



Figura 10. Estructura de las proteínas de la familia Rb. Los dominios altamente conservados incluyen H1, H2 y los dos subdominios de unión (pocket) PD-A y PD-B

De forma inversa, la defosforilación de las proteínas de la familia Rb se sabe que tiene lugar entre la anafase y la fase G1 (Ludlow et al., 1993) y depende de la proteína fosfatasa I, aunque también puede ocurrir en otras fases en respuesta a señales inhibitorias del crecimiento. Por ejemplo la proteína fosfatasa 2A (PP2A) actúa hipofosforilando a pRB en la fase S, al igual que en respuesta a radiaciones γ y a estrés oxidativo (Avni et al., 2003; Cicchillitti et al., 2003).

La región C-Terminal también juega un papel importante en la regulación de la actividad de estas proteínas. Esta región tiene distintas longitudes entre los miembros de la familia Rb, siendo más parecida entre p130 y p107 que en pRB donde esta región está formada por un menor número de aminoácidos. Esta región es muy importante dado que en ella se encuentra la señal de localización nuclear que controla el transporte de las proteínas del citoplasma al núcleo. Esta región también es importante dado que a través de ella las proteínas de la familia Rb interaccionan con las histonas deacetilasas (Dingwall et al., 1991).

2.1.1 Diferencias entre los miembros de la familia Rb

La expresión de los miembros de la familia Rb es distinta dependiendo del estatus en el que se encuentre la célula. De este modo, Rb2/p130 se expresa en células quiescentes (G0) y en células diferenciadas, disminuyendo rápidamente cuando las células salen del estadio de quiescencia para entrar en el ciclo celular (Classon y Dyson, 2001). Cuando las células están en G0 la proteína p130 se encuentra formando complejo con E2F4 del que se va dissociando según va reentrando en el ciclo. Mientras tanto los niveles de p107 son bajos en células en G0 y van aumentando según la célula va progresando en el ciclo. Los niveles de pRB permanecen prácticamente sin cambios a lo largo del ciclo celular, tanto en células quiescentes como en células proliferantes.

Los miembros de la familia Rb también difieren en su capacidad de unión a los miembros de la familia E2F. Se cree que actúan de forma secuencial para prevenir la entrada en fase S. Así en G0 p130 estaría unida a E2F4, en G1 sería p107 la que formaría complejo con E2F4 y finalmente pRB se uniría a E2F4 al principio de la fase S (Ginsberg et al., 1994, Sardet et al., 1995; De luca et al., 1997; Howard et al., 2000).

De forma similar a pRB, la sobreexpresión de la proteína p107 puede inhibir la proliferación celular en ciertos tipos de células, parándolas en G1. Numerosos experimentos han demostrado que la capacidad de inhibición de estas células no ocurre a través del mismo mecanismo. Así en la línea celular C33A (carcinoma cervical) p107 es capaz de bloquear a la proliferación mientras pRB no (Zhu et al., 1993; Chen et al., 2002). De forma parecida un estudio sobre la funcionalidad de p130 ha demostrado que en ciertos tipos celulares deficientes en p16INK4a la sobreexpresión de p130 puede parar el ciclo de estas células, sin embargo p107 y pRB no. Todos estos resultados indican que aunque los miembros de la familia de Rb puedan complementarse y compensarse entre ellos, no todas sus funciones son redundantes.

Una propiedad común entre p107 y p130 es su capacidad para unirse e inhibir a ciclina A-E/cdk2 in vivo e in vitro. Es más, la sobreexpresión de ciclina A y ciclina E es capaz de rescatar la parada del ciclo inducida por p130, indicando la importancia de esta interacción en el ciclo celular (Claudio et al., 1996).

2.1.2 Evidencias genéticas del papel biológico de las proteínas de la familia Rb

El gen *Rb1* fue el primero de la familia en ser inactivado en ratones modificados genéticamente. Los embriones *Rb* *-/-* mueren en el útero entre los días 13 y 15 de gestación. Los defectos en estos embriones afectan a numerosos tipos celulares y tejidos como neuronas y sistema hematopoyético, pero el mayor daño en estos embriones se encuentra en la placenta. Aquí se observan numerosas alteraciones en su estructura y una proliferación aberrante de las células del trofoblasto que es lo que finalmente provoca hipoxia y la muerte del embrión. Sin embargo, lo más sorprendente de este *knock out* fue en su momento que los animales llegaron a desarrollarse hasta el día 15 de gestación (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Se pensó que quizás la pérdida de pRB podía ser compensada por otro miembro de su familia, de este modo aunque el *knock out* de *Rb* fuera letal, p107 o p130 podían estar desempeñando su función al menos hasta el día 14. Se ha visto que en MEFs *Rb* *-/-* la proteína p107 se encuentra sobreexpresada, quizás en un intento de compensar a pRB, lo que induce la entrada de las células en estadio de quiescencia. El doble *knock out* de p107/pRB provoca defectos en la placenta mucho más graves lo que desemboca en la muerte del embrión dos días antes (Vidal et al., 2007).

También se han generado modelos condicionales para pRB lo que ha permitido estudiar mejor las funciones de esta proteína en células y tejidos. Estos estudios han revelado que las células que han perdido pRB son capaces de contribuir a la mayoría de tejidos adultos incluido el sistema nervioso central y la línea eritrocitaria que se encontraban gravemente afectadas en el *knock out* de *Rb* (Maandag et al., 1994; Williams et al., 1994).

También se han generado *knock out* tejido-específicos para *Rb* y en la mayoría de los casos la inactivación de pRB causa aumento en la proliferación pero los animales no llegan a desarrollar tumores, aparentemente porque al menos se necesitaría la inactivación de p53 para la progresión tumoral completa. Otros modelos han demostrado que la eliminación de pRB no causa ninguna alteración (astrocitos, músculo cardíaco, melanocitos) lo que podría estar indicando una posible compensación de los otros miembros de la familia Rb, que pueden ser importantes para esos tejidos (Vidal et al., 2007).

Los fenotipos de los *knock out* de p107 y p130 dependen de forma importante del fondo genético en los que son analizados. Mientras el ratón p107^{-/-} presenta un fenotipo aparentemente normal en un fondo C57BL/6J o mixto C57/129, los ratones p107^{-/-} en un fondo Balb/cJ muestran alteraciones en su crecimiento e hiperplasia mieloide. Los MEFs derivados de este último modelo tienen una elevada proliferación (Lee et al., 1996; LeCouter et al., 1998). De forma similar la pérdida de p130 en un fondo C57BL/6J muestra un fenotipo normal, en cambio en un fondo Balb/cJ los animales mueren antes de nacer presentando alteraciones en neurogénesis y miogénesis, junto con un aumento de la proliferación y la apoptosis en numerosos tejidos (Cobrinik et al., 1996; LeCouter et al., 1998).

Análisis de las células derivadas de los *knock outs* de p130 y p107 demostraron que estas proteínas son reguladores negativos del ciclo celular y en la mayoría de los casos ambas proteínas presentan papeles solapantes. El doble mutante p130/p107 muere antes de nacer con graves defectos en el desarrollo del hueso endocondrial y proliferación aberrante de los condrocitos, incluso en animales con fondos genéticos en los que los mutantes individuales no presentan fenotipos (Cobrinik et al., 1996).

Estudios recientes han aportado nuevos e interesantes datos sobre la función de p107 y p130. En ellos se ha sugerido que p107 puede desempeñar un papel importante en la regulación del ciclo de células madre en tejido adiposo y en precursores neuronales. p130 también puede tener un papel importante junto con p27Kip1 regulando la proliferación de células hematopoyéticas (Soeiro et al., 2006).

2.2 La familia E2F

Para la actividad transcripcional de E2F es necesario que esta proteína forme heterodímeros con los miembros de la familia DP. Esto les permite la unión al DNA y regular un gran número de genes implicados en diversos aspectos del crecimiento y proliferación celular.

Los miembros de la familia E2F pueden dividirse dentro de dos subgrupos basados en su función en activadores (E2F1-3a), o represores (E2F3b-7). Los activadores son necesarios para la transcripción de los genes implicados en la transición G1/S y para la correcta progresión a través del ciclo celular. Así, la pérdida de los tres miembros de la familia E2F activadores provoca la parada de la proliferación. La sobreexpresión de una de estas proteínas en fibroblastos quiescentes es suficiente para conducirlos hasta la fase S.

E2F4 y E2F5 se cree que poseen funciones represoras y permanecen en el núcleo unidos a las proteínas de la familia Rb durante G0/G1. Además la sobreexpresión de estas proteínas en fibroblastos quiescentes no conduce a la entrada en fase S como pasa con los otros miembros activadores de la familia. De hecho, el principal papel de E2F4 y 5 parece ser el de inducir la salida del ciclo celular y la diferenciación.

E2F6 y E2F7 poseen características distintas a los otros miembros de la familia E2F dado que reprimen la transcripción de manera independiente a los miembros de la familia Rb, al carecer de los dominios de transactivación de unión a ella. Se ha demostrado que E2F6 inhibe la transcripción a través de su asociación con las proteínas del grupo “*Polycomb*” (PcG) y se ha descrito que una posible función puede ser la represión de los genes diana de los E2F activadores, impidiendo la unión de estos últimos al DNA (Trimarchi et al., 2001; Storre et al.,

2002, Otte y Kwaks, 2003). El descubrimiento de E2F7 junto con E2F8 ha añadido un mayor grado de complejidad a esta familia (Attwooll et al., 2004). La estructura de E2F7 sólo se asemeja con los otros miembros de la familia en su dominio de unión al DNA, pero para esa unión, al menos in vitro, no parece depender de la dimerización con las proteínas DP (Blais y Dynlacht, 2004). Se cree que E2F7 puede estar regulando genes diana de E2F a lo largo del ciclo celular mientras tanto, el papel de E2F8 todavía no está claro pero se piensa que puede estar relacionado con quiescencia.

2.2.1 Evidencias genéticas del papel biológico de las proteínas de la familia E2F

Tabla 5. Sumario de fenotipos de ratones knock out de la familia E2F

Blanco	Efectos funcionales	Fenotipo	Referencia
E2F1	Apoptosis	Predisposición al cáncer y aumento en la proliferación de las células del timo por defectos en apoptosis.	Yamasaki et al., 1996; Field et al., 1996; Zhu et al., 1999 ; García et al., 2000 ; Murga et al., 2001
E2F2		Incremento de la proliferación de células hematopoyéticas, a menudo desarrollo de tumores y autoinmunidad	Murga et al., 2001; Zhu et al., 2001
E2F3	Represión del promotor de ARF	Letalidad embrionaria. MEFs fallan en la transcripción de los genes de respuesta E2F	Humbert et al., 2000; Wu et al., 2001, Ziebold et al., 2003 ; Aslanian et al., 2004
E2F1, E2F2, E2F3		Letal. MEFs fallan en la proliferación y reentrada en el ciclo celular	Wu et al., 2001
E2F4	Maduración eritrocitaria	Mueren en edad temprana debido a un aumento a las infecciones, no se ve afectada la proliferación en las MEFs	Humbert et al., 2000 ; Rempel et al., 2000
E2F5	Desarrollo cerebral	Desarrollo de hidrocefalia después del nacimiento	Lindeman et al., 1998
E2F6		Muestran transformación en el esqueleto axial	Storre et al., 2002
DP1		Letalidad temprana	Kohn et al., 2003

Los modelos de los ratones mutantes para estas proteínas han mostrado claros ejemplos de su especificidad biológica. Se han generado ratones *knock out* para E2F1-6 y se han encontrado

funciones en el control del ciclo celular, pero también papeles independientes en desarrollo, homeostasis de tejidos y formación de tumores.

2.3 Vía E2F/pRB

Los miembros de la familia E2F activadores (E2F1, 2 y 3a) están unidos e inhibidos preferentemente con pRB. E2F1-3a están generalmente ausentes o poco expresados en células quiescentes y son inducidos en G1 tardío (Dyson et al., 1998). La forma E2F3b se expresa a través de todo ciclo celular, formando complejos represores de la transcripción con pRB en G0 (Leone et al., 2000) y complejos represores independientes a las proteínas de la familia de Rb en células proliferantes y quiescentes (Aslanian et al., 2004; Ginsberg et al., 2004). E2F4 y la menos abundante E2F5 son malos activadores transcripcionales, se expresan a lo largo de todo el ciclo celular pero en G0 y G1 temprano ambos son reclutados al núcleo por p107 y p130, formando complejos represores de la transcripción. Los otros dos miembros de la familia, E2F6 y 7, no se unen a las proteínas de la familia Rb pero reprimen los genes de respuesta a E2F a través de otros mecanismos (Dimova y Dyson, 2005).

Las proteínas de la familia Rb parecen mediar la parada del ciclo celular en G0/G1 a través de la represión de la actividad transcripcional de E2F. Esto se cree que ocurre a través del reclutamiento, en los promotores de respuesta a E2F, de una amplia variedad de modificadores de cromatina como pueden ser las histonas deacetilasas (HDACs) (Brehm et al., 1998; Brehm et al., 1998; Magnaghi-Jaulin., 1998; Stiegler et al., 1998; Ross et al., 2001) y otros factores como histonas metiltransferasas. Esto se ha podido estudiar gracias a la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que ha permitido comprobar que la unión de las proteínas de la familia Rb a histonas deacetilasas I provoca un cambio en los grupos acetilo de las histonas H3 y H4 que compacta la cromatina e impide la transcripción. Estos estudios mediante ChIP también mostraron que en G1 tardío, los complejos represores formados con las proteínas de la familia Rb se disocian de los promotores de respuesta a E2F. De este modo la unión de E2F a los promotores activa la transcripción y restaura la acetilación de histonas (Takahashi et al., 2000; Ferreira et al., 2001; Morrison et al., 2002; Rayman et al., 2002).

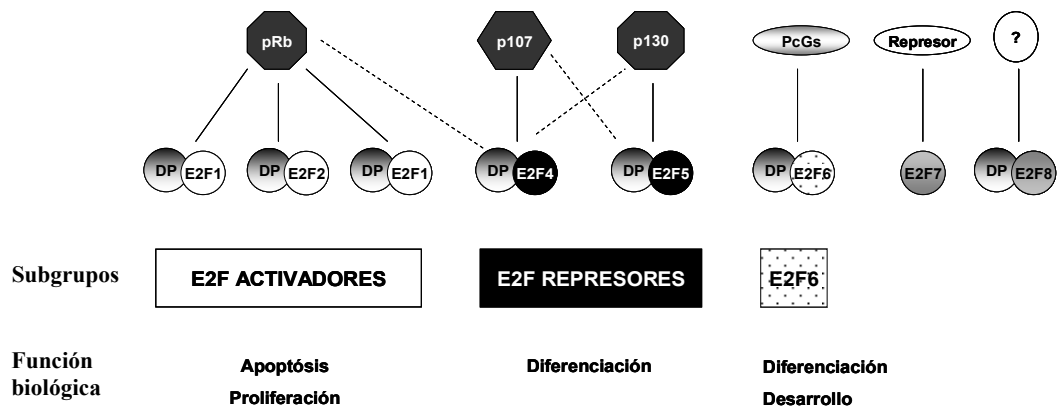


Figura 11. Representación esquemática de los miembros de la familia E2F, de sus subgrupos, papel biológico y específicos inhibidores a los que se unen.

Gracias a todos estos estudios se han generado modelos de regulación de los genes de respuesta a E2F. De este modo en las fases G0 y G1 temprana, los genes necesarios para que continúe el ciclo se encuentran reprimidos mediante tres mecanismos distintos. Por un lado los dos miembros de la familia Rb, p107 y p130, se hallan formando complejos represores con E2F4 o E2F5 en la mayor parte de los promotores de respuesta a E2F (**figura 11**). Por otro lado, el otro miembro de la familia, pRB mantiene reprimido a los E2F (E2F1-3) activadores a través de la unión directa a ellos. Se han encontrado muy pocos promotores reprimidos por unión directa de E2F1-3 y pRB, aunque sucede con el promotor de ciclina E (Wells et al., 2000; Morrison et al., 2002). Un tercer mecanismo represor tiene lugar a este nivel del ciclo, que implica la unión de E2F6 a proteínas represoras distintas a la familia Rb (**figura 12A**) (Ogawa et al., 2002).

En G1 tardío las proteínas de la familia de Rb se encuentran normalmente fosforiladas y disociadas de sus E2Fs. E2F4 y E2F5 se encuentran relocalizados en el citoplasma y los promotores se encuentran unidos a los E2F activadores de la transcripción (E2F1-3). Esto generalmente se asocia con un reclutamiento de histonas acetiltransferasas (HATs) que incrementa la acetilación de las histonas y estimula la transcripción (**Figura 12B**) (Takahashi et al., 2000, Rayman et al., 2002; Zhu et al., 2004; Taubert et al., 2004). En la transición G1-S, e incluso en fase S tardía aún se pueden encontrar a E2F1, 2 y 3 unidos a ciertos promotores;

otros en cambio están unidos a otros factores de transcripción. Otros genes a estas alturas del ciclo necesitan ser silenciados como es el caso de Cdc6 y E2F1, lo que se consigue a través de la unión de los promotores al factor de represión E2F7 (**figura 12C**) (Di Stefano et al., 2003)

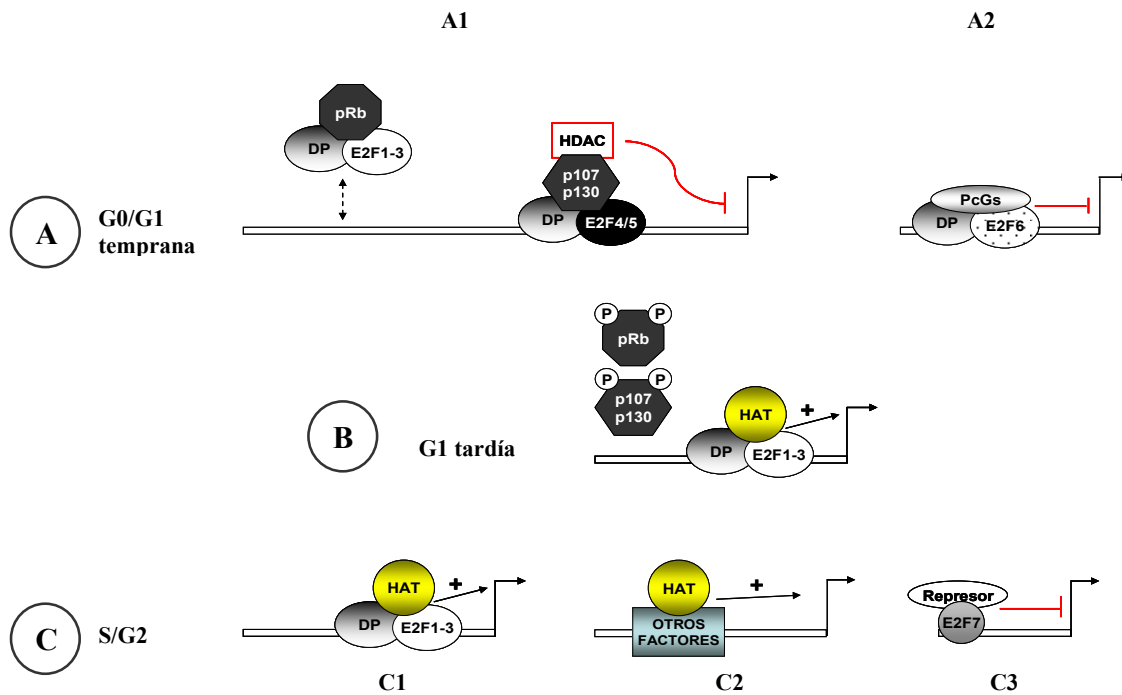


Figura 12. Modelo de regulación de los genes de respuesta E2F. La figura es una representación de los resultados de varios trabajos obtenidos mediante la técnica de ChIP. Aquí se muestran las proteínas de la familia Rb unidas a los promotores en las fases G0 y G1 temprana, G1 tardía y S/G2. **A) Fases G0 y G1 temprana A1:** E2F4/5 junto con p107/p130 y HDAC han sido detectados unidos a los promotores de la mayoría de los genes de respuesta E2F como pueden ser ciclina A, E2F1, Cdc2 y B-myb. E2F1-3 unido a pRB se ha encontrado unido a muy pocos promotores como es el caso de ciclina E. **A2:** E2F6 unido a otra proteína represora distinta que las proteínas de la familia Rb, también ha sido encontrado unido a promotores en esta fase. **B) Fase G1 tardía.** Los E2F activadores se unen a los promotores y reclutan acetilasa de histonas (HAT) que aumenta la actividad de transcripción. **C) Transición S/G2. C1:** Muchos de los promotores activos en G1 permanecen activos en fase S. **C2:** Otros necesitan ser activados por otros factores de transcripción. **C3:** Y otros promotores se encuentran reprimidos por E2F7 (Adaptación Cobrinik, 2005).

En algunos casos la regulación de ciertos promotores depende de la proteína reclutada por parte de las proteínas de la familia Rb. Por ejemplo p107 se ha encontrado que interviene en la represión de c-Myc inducida por TGF- β a través del reclutamiento de Smad3 (Frederick et al., 2004). Aquí p107 está implicado en un promotor de respuesta a E2F-Smad3, y puede regularlo a través de su capacidad de unión a E2F4 y Smad3. Así pues, p107 y p130 pueden regular otros promotores de respuesta a E2F a través de la unión con E2F4 en cooperación con otros factores de transcripción (Le Cam et al., 1999; Araki et al., 2003; Zhu et al., 2004).

3. Relación pRB/p16INK4a

Como ya se ha explicado, pRB regula la transición desde fase G1 a la fase S del ciclo celular, un proceso que implica principalmente la actividad kinasa asociada al complejo ciclina D/cdk4. Estudios de mutaciones de numerosos tumores humanos han revelado que ciclina D/cdk4/INK4a/pRB forman parte de una vía que se encuentra alterada en la mayoría, si no en todas las células tumorales (Sherr et al., 1996; Harbour et al., 1999). Las señales proliferativas oncogénicas desencadenan varios mecanismos antioncogénicos, como la apoptosis y senescencia. Ambos procesos se cree que surgen para evitar la formación de neoplasias (Serrano y Blasco, 2001; Sharpless y DePinho, 2005). La senescencia celular consiste en la pérdida del potencial proliferativo, y se ha considerado como un mecanismo antioncogénico importante. La senescencia se produce por un número de vías que juntas resultan en una parada del ciclo permanente e irreversible. Mutaciones en estas vías permiten superar la senescencia, lo que permite a las células proliferar de forma ilimitada (Bringold y Serrano., 2000). En las principales vías de inducción de la senescencia los componentes importantes son los productos de los genes supresores de tumores, p53 y pRB (Serrano y Blasco, 2001). La actividad de estas proteínas se incrementa durante la senescencia celular. Además, la inactivación de p53 y pRB en MEFs senescentes revierte el fenotipo llevando a la reentrada del ciclo celular, lo que sugiere que estas proteínas no sólo son necesarias para inducir senescencia sino también para mantener este fenotipo en células murinas (Sage et al., 2003; Dirac y Bernards, 2003).

Sin embargo en células humanas la senescencia es irreversible a pesar de la inactivación de p53 y pRB. Es interesante resaltar que la pérdida de estas dos proteínas en células senescentes

humanas permite reiniciar la síntesis de DNA pero las células fallan en completar el ciclo celular (Dai y Enders, 2000; Beausejour et al., 2003). p16 también parece tener un papel importante en senescencia en células humanas, dado que sus niveles aumentan considerablemente en respuesta al estrés oncogénico, y su sobreexpresión puede iniciar senescencia autónoma programada (Dai y Enders, 2000; Beausejour et al., 2003). La inhibición de p16 en células senescentes humanas en condiciones limitantes de mitógenos también provoca que estas células reinicien la proliferación celular. Todo esto muestra que la vía p16-pRB asegura la irreversibilidad de la senescencia.

De forma consistente con el papel de pRB y p16 en senescencia, la inactivación de esta vía en las células da como resultado su immortalización y la capacidad a las células, donde esto ocurra, de dar lugar a un cáncer clínicamente relevante. De esta manera los genes de p16 y pRB se encuentran mutados frecuentemente en cánceres y líneas tumorales. También es típico encontrar otras alteraciones en la vía p16/pRB como hiperactivación de cdk4 y cdk6, sobreexpresión de ciclina D, o mutaciones en cdk4 que la hacen insensible a los efectos inhibitorios de p16 (Ortega et al., 2002; Deshpande et al., 2005). Sorprendentemente son raros los casos en donde p16 y pRB estén ausentes al mismo tiempo. Así, se ha descrito que en ausencia de una de ellas en células cancerígenas, la otra se encuentra presente, de modo que células tumorales pRB negativas presentan altos niveles de p16 y al revés. Esta relación inversa es estadísticamente muy significativa (Okamoto et al., 1994). Esta relación parece el producto del intento fallido de poner en marcha el mecanismo de senescencia. Se cree habitualmente que los altos niveles de p16 no tienen ningún efecto sobre la biología de la célula *Rb* negativa, dado que las células que no tienen pRB no responden a la sobreexpresión de p16, pero esta idea se basa en el concepto lineal donde p16 tan solo puede ejercer su efecto inhibitorio a través de pRB (Medema et al., 1995). Hoy en día se sabe que esto no es estrictamente cierto dado que por un lado los complejos ciclina D/cdk4 fosforilan e inactivan al menos a p107 y p130 (Beijersbergen et al., 1995; Bruce et al., 2000) y se ha encontrado que para que p16 pueda parar la proliferación celular se requiere la presencia de estas dos proteínas ya que con la presencia de pRB no es suficiente (Bruce et al., 2000). Incluso se ha descrito que los tres miembros de la familia Rb son capaces de regular a p16 negativamente. Así la inhibición individual de p107, p130 o pRB provoca una elevación en la expresión de p16 (Kotake et al., 2007). En las células tumorales *Rb*

negativas las proteínas p130 y p107 están presentes, por lo que p16 puede estar regulando de alguna manera a estas proteínas.

II-OBJETIVOS

1. Obtener y caracterizar poblaciones estables de células *Rb* negativas con bajos niveles de p16.

A) Obtener, a partir de células tumorales humanas *Rb*. negativas, poblaciones con niveles de p16 lo suficientemente bajos como para que se reconstituyan complejos ciclina/cdk con cdk4 activo.

B) Estudiar el efecto de la inhibición de p16 sobre la actividad transcripcional de los genes dependientes de E2F, así como sobre la capacidad de las células de inactivar a las proteínas de la familia Rb: p107 y p130.

2. Estudiar la regulación del ciclo de las células *Rb*^{-/-} con y sin p16.

A) Determinar si las cdk's son responsables de regular el ciclo de las células *Rb* negativas en las células con y sin p16.

B) Estudiar la importancia real de cdk1, cdk2 y cdk3 en el ciclo de las células *Rb* negativas con y sin p16.

**III-MATERIALES Y
MÉTODOS**

1. Células

1.1 Cultivo celular

La línea celular SaOS2 (constituida por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico) al igual que las líneas 293 (línea embrionaria humana de riñón y transformadas para que produzcan de forma constitutiva E1), MCF-7 (línea procedente de adenocarcinoma mamario humano) y U2OS (línea procedente de osteosarcoma humano) se cultivaron en medio completo; DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, sigma) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen) y 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (sigma). Para el subcultivo, las monocapas celulares se lavaron con solución salina (PBS) y desadheridas de la placa de cultivo con Tripsina-EDTA (sigma) al 0,25%, durante 5 minutos a 37°C. Las células se subcultivaron según los requerimientos de los ensayos.

A partir de la línea SaOS2, se generaron clones que expresan una proteína transmembrana de ratón que permite que las SaOS2 sean susceptibles de ser infectadas con retrovirus ecotrópico. Para la obtención de estos clones las células se transfectaron por fosfato de calcio de forma conjunta con el plásmido que codifica para la proteína transmembrana murina denominado pJET (Kim et al, 1991), que nos fue cedido por la doctora Bárbara Schurierle, y un plásmido que confiere resistencia a geneticina (pRcCMV) en una proporción 1:3. Las células se seleccionaron en medio suplementado con 1mg/ml de geneticina (G418, Amersham) durante varias semanas, y de esta manera se obtuvieron clones que fueron aislados y expandidos directamente. Para seleccionar cuáles de aquellos clones expresaban la proteína murina, se infectaron con retrovirus ecotrópicos que contenían la secuencia que codifica para la enzima β -galactosidasa, de forma que al añadir el sustrato X-gal los clones que presentaban dicha proteína se volvieron azules (**figura 15**).

A partir de uno de los clones de SaOS2, se generaron poblaciones con bajos niveles de p16 mediante dos infecciones secuenciales con retrovirus ecotrópicos que contenían shRNA contra el exón 1 de p16, y poblaciones control mediante dos infecciones con retrovirus ecotrópico que

contenía shRNA contra luciferasa. La primera infección fue realizada o bien con el plásmido retroviral pRetroSuper enviado por el doctor Ruvkum Agami del Netherland Kancer Institute que confiere resistencia a puromicina y que contiene la secuencia de un shRNA diseñado por nosotros siguiendo las indicaciones recogidas en la página web <http://www.nki.nl/nkidep/agami/psuper.html> de Ruvkum Agami, o bien con el plásmido retroviral p16/1 MSCV puro-HpaI que nos fue cedido por Scott Lowe (Cold Spring Harbor Laboratory) . Estas poblaciones se seleccionaron con medio suplementado con 2µg/ml de puromicina (sigma) durante una semana, tras la cual fueron infectadas nuevamente con otro sobrenadante retroviral que contenía un shRNA distinto contra p16 y que le confería resistencia a higromicina. El plásmido retroviral utilizado es el pRetroSuper-Hygro. Finalmente las poblaciones fueron seleccionadas con medio suplementado con 0,4 mg/ml de Higromicina (BD clontech) durante varias semanas, tras las cuales se comprobó por western blot la expresión de p16. Las poblaciones resultantes se denominaron como Si1 y Si2.

Para la realización de los experimentos, se sembró el número adecuado de células para cada protocolo en medio completo. La sincronización fue mediante doble bloqueo con timidina o serodeprivación según el caso.

1.2 Sincronización celular

Para los estudios de ciclo celular las células fueron sincronizadas en distintas fases mediante doble bloqueo de timidina o bien mediante serodeprivación.

1.2.1 Doble bloqueo de timidina

Se sembraron 500.000 células en una placa de 90mm de diámetro, 24 horas después se añadió al medio timidina (sigma) a una concentración final de 2mM. 14 horas después, las células se lavaron con solución salina (PBS) y se dejaron en medio completo 11 horas, tiempo tras el cual se bloquearon otra vez con timidina a la misma concentración. Esta segunda incubación se dejó distintos tiempos según se indica a continuación:

- Fase G1: después de 19 horas en presencia del segundo bloqueo de timidina, las células se lavaron 3 veces con PBS y se dejaron 18 horas en medio suplementado con 20% de suero y 1% de penicilina/estreptomicina, tiempo tras el cual las células se recogieron para diferentes ensayos.
- Fase S: después de 14 horas en presencia del segundo bloqueo de timidina, las células se lavaron 3 veces con PBS y se dejaron 6 horas en medio suplementado con 20% de suero y 1% de penicilina/estreptomicina, tiempo tras el cual las células se recogieron para diferentes ensayos.

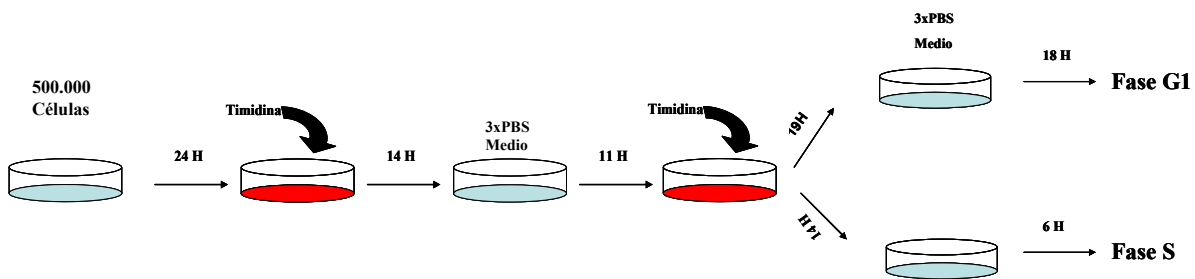


Figura 13. Representación del doble bloqueo de timidina

1.2.2 Serodeprivación

Se sembraron 10^6 células en medio completo en placas de 90mm, las células al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS y se mantuvieron en medio sin FBS durante 3 días. Las células fueron reestimuladas añadiéndoseles medio al 20% de suero. Las células fueron recogidas a 12, 22 y 36 horas.

1.3 Proliferación celular

Las diferencias en proliferación de las células SaOS2 con respecto a sus poblaciones se realizaron mediante las siguientes técnicas.

1.3.1 Contaje celular

Se sembraron 40.000 células en placas de 60mm de diámetro, 48 horas después se contaron en cámaras de *Neubauer*, repitiéndose cada 2 días, alrededor de 4 veces más. Este experimento se realizó dos veces, con triplicados para cada punto.

1.3.2 Incorporación de Bromouiridina

Se empleó la técnica de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timina. Para ello, se sembraron 35.000 células sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos, y al día siguiente se añadió al medio BrdU (Sigma) a una concentración final de 10 μ M durante una hora. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con etanol al 70% frío durante al menos 30 minutos. Posteriormente, se procedió a la desnaturalización del DNA celular mediante una incubación de 30 minutos en HCl 4 M, seguida de una permeabilización de 10 minutos de las membranas mediante la incubación con 0,5% de tritón X-100 (Sigma) en PBS. La incorporación de BrdU por las células proliferantes fue visualizada mediante inmunofluorescencia directa empleando el anticuerpo anti-BrdU conjugado con un fluorocromo verde (FITC-conjugated BrdU antibody set, BD PharmingenTM) a una dilución 1:2 en PBS durante 45 minutos.

Para la visualización de los núcleos, las células se incubaron con Dapi (4'-6-diaminodiono-2-phenylindole) (Sigma) diluido en PBS a una concentración de 5 μ g/ml durante 15 minutos. Para el montaje de los cubres, se añadió 5 μ l de gel de montaje (Biomedica corp., Foster City) sobre los portaobjetos. Las células se analizaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio invertido Olympus IX70 con fluorescencia y sistema de contraste Hoffman, empleando un objetivo de magnificación de 40x. Para visualizar la fluorescencia verde se empleó un filtro con una longitud de onda de excitación de 470-490 nm, y para la azul de 360-370 nm. Las imágenes se obtuvieron con la cámara Olympus DP50. Se contaron más de 300 células en duplicados. El procesamiento posterior de las imágenes obtenidas se realizó con el programa Adobe Photoshop versión 8.0.1 y el conteo celular se realizó utilizando el programa UTHSCSA Image Toll versión 3.00.

1.3.3 Citometría de Flujo

Las células fueron tripsinizadas y recogidas en medio completo, a continuación se centrifugaron a 1000g durante 5 minutos, después se resuspendieron en PBS y se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones. Las células se resuspendieron cuidadosamente en 500 µl de PBS y se fijaron con 7,5 ml de etanol al 70% toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugaron a 1000g durante 15 minutos sin freno, se eliminó la totalidad del etanol y se resuspendieron en 500 ml de PBS con 100 µg/ml de RNAsa (Sigma). Tras una incubación de 30 minutos a 37°C se añadieron 500 µl de solución de yoduro de propidio. La cantidad de DNA en cada célula se determinó con un citómetro FacScan (Becton Dickinson), y los datos resultantes se analizaron con el programa ModFit.

1.4 Transfecciones

1.4.1 Fosfato de calcio

Este método está basado en el protocolo descrito en el artículo de Chen y Okayama (MCB 1987, 7: 2748-2751). El día anterior a la transfección, las células fueron tripsinizadas y se sembraron en medio completo 1,5 millones de células, cantidad adecuada para que 24 horas después llegaran a un porcentaje de confluencia del 80% en una placa de 90mm de diámetro. La cantidad total de plásmido transfectado fue de 25µg en agua (hasta alcanzar los 250µl) y 250µl cloruro cálcico 0,5 M. Esta mezcla se añadió sobre 500 µl de tampón HBBS gota a gota favoreciendo la formación de precipitado mediante el burbujeo simultáneo de aire con una pipeta pasteur. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla resultante se añadió sobre las células.

12 horas después, el precipitado se eliminó mediante aspiración y 3 lavados de PBS. Las células se mantuvieron en medio completo durante una hora, después de esto se lavaron 2 veces más con PBS y se dejaron en medio completo 48 horas. Tiempo estimado para recoger las células para los distintos experimentos

HBBS	
HEPES	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1.5 mM
Glucosa	12 mM
KCl	10 mM

Se ajustó el pH a 7,05

1.4.2 Infección Retroviral.

Este método, descrito previamente por Garry Nolan (Nolan et al., 1999) se empleó para la obtención de las poblaciones Si1 y Si2, que sirvieron como modelo de estudio para ver los efectos de la disminución por siRNA de p16 en células tumorales *Rb* negativas. Para ello se utilizaron los clones de la línea celular SaOS2 que expresaban un receptor ecotrópico que las hacía susceptibles de ser infectadas con virus murinos.

Para la construcción de retrovirus, se utilizó como vector viral el pRetroSuper en el que se clonaron los oligos de los shRNAs contra p16 y Luci33. Los otros vectores retrovirales utilizados para la obtención de las poblaciones Si1 y Si2 fueron p16/1 MSCVpuro-HpaI, pRetroSuper-Hygro y pRetroSuper p16-Hygo. Las partículas virales se obtuvieron a partir de la línea celular empaquetadora 293T, derivada de las 293 por transfección del antígeno T del virus SV40. En primer lugar se sembraron 3×10^6 células en una placa de 90 mm de diámetro, 24 horas después y momentos antes de la transfección se añadió al medio cloroquina (Sigma) 25mM como inhibidor de lisosomas, la transfección se llevó a cabo mediante el protocolo de fosfato de calcio con 15µg de vector retroviral y 15µg de pHELPER, que codifica para los genes estructurales del retrovirus, necesarios para la formación de las partículas virales. Las cantidades de agua, cloruro cálcico y HBBS son las mismas que en el protocolo clásico de transfección, la diferencia es que a los 500µl de la mezcla formada por DNA, agua, cloruro cálcico se le añadió gota a gota 500µl HBBS, añadiéndoseles directamente a las células empaquetadoras el

precipitado, sin esperar ningún tiempo de incubación. El precipitado se retiró 12 horas después y se añadió medio completo. 48 horas después se recogió el sobrenadante viral que fue centrifugado a 900g durante 5 minutos y filtrado con filtros de 45µm de diámetro (Millipore) se alicuotearon y se guardaron a -80°C.

Para la infección de las células diana se sembraron $1,5 \times 10^6$ de SaOS2 o 500.000 de los fibroblastos de ratón D3T3. 24 horas después de la siembra se añadió 3ml de sobrenadante viral con 30µl de polibreno 400µg/ml. Tras una incubación de 6 horas, se completó con medio completo hasta los 8 ml.

1.4.3 Electroporación

Esta técnica se empleó para la sobreexpresión de p27 o bien en los experimentos de silenciamiento de cdk1 y cdk2 y cdk3 mediante RNA de interferencia comerciales. Tanto p27 como los siRNAs se transfectaron por electroporación con el electroporador Nucleofector II (Amaxa). Para la electroporación se necesitaron 10^6 células que se centrifugaron a 1000g durante 5 minutos, tras esto fueron resuspendidas en 100µl utilizando la solución comercial del Cell line Nucleofector Kit V (Amaxa). Se añadió 5 µl de cada siRNA 20 µM o 5µg del plásmido con p27 a los 100 µl. La electroporación se realizó con el programa específico para las SaOS2, según las indicaciones del fabricante.

2. Plásmidos y RNA de interferencia (RNAi)

2.1 Relación de plásmidos empleados

El plásmido **pJET** (Kim et al., 1991) contiene un cDNA que codifica un transportador de L-aminoácidos catiónicos murinos clonado en el vector de expresión eucariota pJAY3. Este plásmido fue enviado por Bárbara Schmierle (Institute for Medical Research, Main), y se utilizó para la obtención de clones de la línea celular SaOS2 junto con el plásmido pRcCMV con resistencia a geneticina.

Los plásmidos **pSHAG** y **pSHAGff** (Paddison et al., 2002) fueron enviados por G.J. Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, NY). **pSHAG** fue construido a partir del vector **pENTR/D** topo, y es un vector de expresión que contiene el promotor de la polimerasa III, U6, utilizado en los vectores que contienen shRNAs; **pSHAGff** contiene el shRNA homólogo a los nucleótidos 1340-1368 del gen de la luciferasa.

pSuper y **pRetroSuper** (Brummelkamp et al., 2002) fueron obtenidos de Dr Agami (Netherland Kancer Institute) **pRetroSuper** es un vector de expresión derivado a partir del vector **pMSCV** puro autoinactivado. Tanto **pSuper** como **pRetroSuper** (vector retroviral) contienen un promotor de la polimerasa III, H1. .

p16/1 MSCVpuro-HpaI (Carnero et al., 2000) vector retroviral de desarrollado por clonación por el sistema gateway (Promega) usando **pSHAG-1** y **MSCV-HpaI** que contiene la secuencia de shRNA contra p16. Este plásmido fue cedido por Scott Lowe (Cold Spring Harbor Laboratory, NY)

pRetroSuper-Hygro y **pRetroSuper p16-Hygo** (Voorhoeve et al., 2003) desarrollado a partir del plásmido **pRetroSuper**.

pCMV dncdc2 (van den Heuvel y Harlow, 1993) fue enviado por Michael Brandeis (The Hebrew University of Jerusalem), los otros dos dominantes negativos (**pCMV dncdk1** y **pCMV dncdk3**) se obtuvieron de Sander van den Heuvel (Developmental Biology at Utrecht University).

Los plásmidos utilizados en el ensayo luciferasa fueron **3xE2F-luc** que es un vector que tiene como región promotora 3 sitios de respuesta a E2F, **DHFRwt-luc** y **DHFRmut-luc** vectores enviados por Peggy Farnham (Department of oncology, University of Wisconsin Madison) que tienen como región promotora de respuesta a E2F la secuencia normal y mutada del promotor de la enzima dehidrofolato reductasa), y **pCMV β -gal**

pBabe lacZ vector retroviral que contiene la secuencia que codifica para la enzima β -galactosidasa.

2.2 Construcción de plásmidos y RNA de interferencia

2.2.1 Diseño de los shRNAs contra p16

Para eliminar la expresión de p16 tanto en SaOS2 como en otras células, se crearon diferentes shRNAs contra el exón1 del mRNA de p16. El oligo p16i3 fue diseñado para pSHAG mediante el programa oligos de Hannon http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi_web/scripts/main2.pl, los diseñados para los vectores pRetro y pSuper, p16i34 con secuencia homologa a p16i3 pero compatible para estos vectores, p16i107 y luci33, se hicieron siguiendo las indicaciones recogidas en la página web de Ruvkum Agamin <http://www.nki.nl/nkidep/agami/psuper.html>.

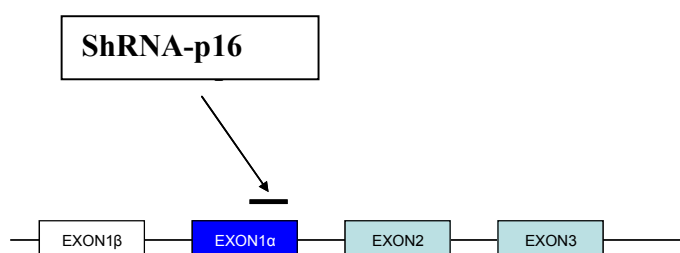


Figura 14. Mapa del locus que codifica para p16 donde se muestra que los siRNAs diseñados son específicos del exón 1 α , para el transcritor de p16.

Una vez diseñados los oligos fueron sintetizados por Sigma a una escala 0,05 unidades y clonados en sus respectivos vectores.

Los oligos p16i3 fueron diseñados para ser clonados dentro del plásmido pSHAG mediante extremos cohesivos para los enzimas de restricción BseRI en 3' y BamHI en 5'.

Los oligos p16i34, como ya comentamos fueron diseñados de forma semejante a los anteriores pero adaptados a pRetroSuper mediante la inserción de nuevos nucleótidos, que eliminan los

extremos cohesivos para BseRI y BamHI formando nuevas secuencias de extremos cohesivos para BglIII en 3' y hndi en 5'.

Los oligos p16i107 y luci33 fueron diseñados adaptados al plásmido pRetroSuper, de forma que pudieran ser clonados mediante extremos cohesivos para BglIII en 3' y HindIII en 5'.

Una vez clonados dentro de los plásmidos, la purificación de estos vectores al igual que la de todos los demás vectores se realizaron utilizando el Jet Star Plasmad Kit (Genycell) o Nucleobond AX (Cultek).

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la generación de shRNA

siRNA	Cadena molde	SECUENCIA
p16i3	Sentido	GTC CATGCTGCTCCCCGCCGCGCTCGAAGCTTGGGGCTGGTGGCGGGGAGCAGCATGGGGCCTTTT TTTT
	antisentido	GATAAAAAAAAAAGCCGCATGCTGCTCCCCGCCACCAGCCCCAAGCTTCGAGCCGGCGGGGAGCAT GGAGCCG
p16i34	Sentido	GATCCGGCCGCGGCCGTGGCCAGCCAGTCAGCCGGGAATTCGCGGCTGATTGGCTGGCTACGGCTGCG GCTCGTTTTTT
	antisentido	AGCTAAAAAACGAGCCGCAGCCGTAGCCAGCCAATCAGCCGCGAATTCGCCGCTGACTGGCTGGCCAC GGCCGCGGCCG
p16i107	Sentido	GATCACCGTAACTATTCCGGTGCCTGGCCAGCGGAATCGGTTGCCCGACGCATGCAATGGTTACGGTCG GTTTTTT
	antisentido	AGCTAAAAAACCGACCCTAACCATTCGATGCGTCCGGCAACCGAATTCGCTGCCAACGCACCGAAT AGTTACGGT
Luci33	Sentido	GATCCGTTCATCCTCTAGAGGATAGAATGGCGCGGAATTCGGTGCTATTCTATCTTCTAGGGGATGGA ACCGTTTTTT
	antisentido	AGCTAAAAAACGTTCCATCCCCTAGAAGATAGAATAGCACCGAATTCGCGCCATTCTATCCTCTAGA GGATGGAACG

2.2.2 siRNA sintéticos

Para los experimentos de silenciamiento de cdk1, cdk2 y cdk3 se utilizaron siRNA comerciales contra esas proteínas, HP validated siRNA cdk1 (Qiagen) y ON-target plus smart pool cdk2 y cdk3 (Dharmacon) y un siRNA control (Dharmacon). Estos siRNAs se transfectaron por electroporación. Una vez realizada la electroporación las células se sembraron en p90 con medio completo; los tiempos de recogida de extracto proteico para ver la disminución de las proteínas

por los siRNAs variaron entre los 3 días para siRNA de cdk2 y 4 días para cdk1 y cdk3. Las células con siRNA control se recogieron al mismo tiempo que los siRNAs de estudio.

3. Análisis de genes reporter

3.1 Ensayo luciferasa y β -gal

Se sembraron 350.000 células SaOS2 y Si-2, en placas de 6 pocillos. 24 horas después fueron transfectadas con 3 μ g del plásmido de expresión de luciferasa, 1,5 μ g del plásmido de expresión de β -gal, que se emplea como control de transfección, y con 21,5 μ g del plásmido de análisis: o bien con pCMV-dncdks o bien de relleno (pBluescrip o pCMV). 48 tras el lavado del precipitado las células se recogieron en un tampón comercial de lisis pasiva (Promega). La medición de la actividad luciferasa se realizó en el luminómetro Lumat LB9597 (Berthold Technologies) al mezclar 25 μ l de extracto proteico con la solución LAB junto con 100 μ l de solución D-luciferina 1mM (sigma) inyectada a través del luminómetro.

La actividad β -gal sirvió para normalizar la actividad luciferasa, de posibles variaciones en la eficacia de transfección. Para ello, se añadió 40 μ l de extracto proteico junto con 250 μ l de tampón Z y 60 μ l de una solución de ONPG 4mg/ml (sigma). Esta mezcla se dejó a 37°C hasta que adquirió un color amarillento, momento en el que se paró la reacción con 100 μ l de Na₂CO₃ 1M. La absorbancia se midió a 420 nm en un espectrofotómetro. Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado.

LAB	
Glicilglicina	25 mM
Tampón fosfato pH 7,8	15 mM
MgSO ₄	15 mM
EGTA	4 mM
DTT	1 mM
ATP	2 mM

Tampón Z	
Na ₂ PO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
MgSO ₄	15 mM
KCl	4 mM
β-mercaptoetanol	1 mM

3.2 Ensayo X-gal

Para comprobar cuáles de los clones de las SaOS2 presentaban el receptor ecotrópico, se sembraron 1,5 millones de cada uno de los clones y medio millón de fibroblastos de ratón como control positivo (D3T3), al día siguiente fueron infectados con retrovirus ecotrópicos obtenidos transfectando el plásmido pBABE lacZ en células empaquetadoras ecotrópicas Phoenix. 48 horas después se sembraron 250.000 células en p60, y pasadas 24 horas se lavaron 3 veces con PBS y se cubrieron con glutaraldehído 0.05% durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se repitieron los tres lavados con PBS. Finalmente, se añadió 1ml de solución X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactósido = X-gal) completa, dejando en ésta a las células durante toda la noche a temperatura ambiente. Las células positivas se pudieron ver azules bajo el microscopio

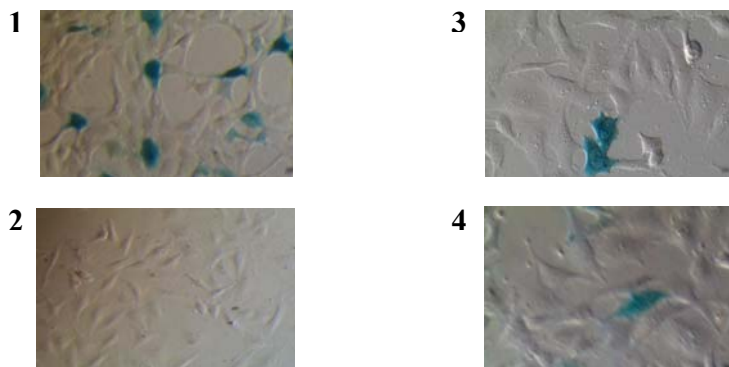


Figura15. Ensayo X-Gal. 1. D3T3, células de fibroblasto de ratón. 2. SaOS2 2, infectadas como control negativo. 3 y 4. Clones de SaOS2 que fueron transfectadas con el plásmido pJET, que contiene un cDNA que codifica para un receptor ecotrópico transmembrana, y con un plásmido de resistencia a geneticina.

Solución completa X-GAL	
Ferricianuro potásico	5 mM
Ferrocianuro potásico	5 mM
X-Gal	1 mg/ml (solución stock 20mg/ml en dimetilformamida)
MgCl ₂	1 mM
PBS	1x

4. Análisis de proteína

4.1 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos se lavaron las células sembradas en placas de 90 mm con PBS estéril, se tripsinizaron y se recogieron en 5 ml de medio completo. Posteriormente se centrifugaron a 900 g durante 5 minutos, se resuspendieron en 5 ml de PBS, y se centrifugaron siguiendo las mismas condiciones anteriores. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en tampón de lisis con una mezcla de inhibidores de proteasas adecuada. La lisis se realizó durante 15 minutos a 4°C, con agitación regular de la muestra. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. En todos los casos, excepto en los extractos recogidos para el ensayo kinasa de cdk4, la proteína fue extraída con el tampón de lisis EBC; en el caso del ensayo kinasa cdk4 el tampón de lisis que se utilizó fue DIP cuyo detergente es tween-20 (Sigma) ya que otros detergentes podrían inhibir la actividad del complejo. La cuantificación de la proteína total fue determinada por espectroscopía con el reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay (Biorad) siguiendo el método de Bradford, (Bradford, 1976).

Tampón de lisis	
EBC	
Tris pH 8	50mM
NaCl	120mM
NP-40	0.5 %

Los inhibidores añadidos a este tampón fueron aprotinina 1µg/ml, PMSF 1mM, Ortovanadato 1mM y DTT 1mM.

Tampón de lisis	
DIP	
HEPES pH 7,2	50mM
NaCl	150mM
EDTA	1mM
EGTA	2,5mM
Glicerol	10%
Tween-20	0,1%

Los inhibidores añadidos a este tampón fueron aprotinina 1µg/ml, PMSF 100µg/ml, Ortovanadato 0,5mM, NaF 1Mm, β-glicerofosfato 10Mm y DTT 1mM.

4.2 Inmunoprecipitación y Western blot.

Para la inmunoprecipitación de proteínas, una cantidad de extracto proteico se llevó a un volumen de 1ml con su tampón de lisis y se incubó con 1 µg del anticuerpo correspondiente a 4°C en rotación toda la noche. Al día siguiente se añadió 30µl de proteína G/agarosa (Roche) que había sido preequilibrada con el tampón de lisis correspondiente, y se incubó 1 hora a 4°C en rotación. A continuación se procedió al lavado de los complejos 3 veces con el tampón de

lisis y 2 veces más con tampón kinasa en el caso de los ensayos kinasa. Por último a la proteína G y a los complejos unidos a ella se les añadieron 30 μ l de tampón de carga 1x, y se incubaron a 95°C durante 10 minutos, tiempo tras el cual se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante.

Solución de carga 5x	
Glicerol	50 %
SDS	10 % (p/v)
β -mercaptoetanol	5 %
Tris pH 6.8	400 mM
Azul de bromofenol	0.4 %

Las electroforesis se realizaron en un tampón de electroforesis a un voltaje constante de 130 voltios. Las proteínas así separadas según su peso molecular se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) a 4°C utilizando un método de transferencia húmedo a 250 miliamperios durante distintos tiempos dependiendo del tamaño de la proteína a detectar. Tanto la electroforesis como la transferencia se llevaron a cabo utilizando un aparato Hoefer miniVE Vertical Electroforesis System (Amersham Biosciences).

Tampón de electroforesis10X	
Tris	0.5M
SDS	2%
Glicina	4M

Tampón de transferencia	
Tris	20mM
Metanol	20%
Glicina	150mM

Material y métodos

Las membranas se bloquearon en leche en polvo 50 mg/ml en TNT al 0,05% de tween-20 durante 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, y después se lavaron 2 veces con TNT al mismo porcentaje durante 10 minutos. La incubación con los anticuerpos primarios (ver tabla adjunta con los anticuerpos utilizados), se realizó en TNT al 1% a una dilución 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C; tras 3 lavados con el mismo porcentaje de TNT se incubaron con una dilución 1:5000 de los anticuerpos secundarios (Pierce) con la especificidad adecuada conjugados con peroxidasa en TNT al 0,5% durante 1 hora. Tras 3 lavados con el mismo porcentaje de TNT para la detección de las proteínas se incubó a la membrana durante 5 minutos con las soluciones comerciales del Kit West Dura (Pierce) basado en la reacción de quimioluminiscencia de la peroxidasa.

TNT	
Tris pH 7,4	25mM
NaCl	150mM
Tween-20	Depende del porcentaje

Para reincubar las membranas, se incubaron en una solución de reincubación con β -mercaptoetanol (sigma) durante 30 minutos a 55°C, tras la cual se lavaron 5 veces con TNT 0,5%.

Solución de reincubación	
TRIS pH 6,8	62 mM
SDS	10%
B-Mercaptoetanol	0,7%

Tabla 7. Relación de anticuerpos y porcentaje del gel de poliacrilamida utilizados para la detección de cada proteína

Proteína	% gel	1 ^{ER} ANTICUERPO	2° ANTICUERPO
p16	12	BD	Ratón
p107	6	SC-318 (Santa Cruz)	Conejo
p130	6	SC-317 (Santa Cruz)	Conejo
E2F1	10	SC-193 (Santa Cruz)	Conejo
E2F3	10	SC-878(Santa Cruz)	Conejo
E2F4	10	SC-866 (Santa Cruz)	Conejo
Ciclina A	10	SC-751 (Santa Cruz)	Conejo
Ciclina D3	10	Ab1 (Lab.Vision)	Ratón
Ciclina E	10	SC-481 (Santa Cruz)	Conejo
CDK1	10	SC-34(Santa Cruz)	Ratón
CDK2	10	SC-163 (Santa Cruz)	Conejo
CDK3	10	SC-826 (Santa Cruz)	Conejo
CDK4	10	SC-601 (Santa Cruz)	Conejo
α -tubulina	10	(Sigma)	Ratón
P19	6	BD	Ratón

4.3 Ensayo kinasa

4.3.1 Ensayo de actividad kinasa asociada a ciclina D3.

La extracción de proteína se realizó incubando las células con el tampón de lisis DIP durante 30 minutos. Los extractos resultantes se pasaron a través de una aguja de 23G entre tres y cinco veces y se centrifugaron a 14000 g a 4°C durante 15 minutos. Los extractos proteicos se preaclararon con proteína G/agarosa durante 20 minutos a 4°C en agitación. Posteriormente se añadió 1µg de anticuerpo anti-ciclina D3 a cada muestra y se dejó 3 horas en rotación a 4°C.

Pasado este tiempo se incubaron con 25 μ l de proteína G durante 1 hora, y se lavaron tres veces con tampón de lisis y dos veces más con tampón kinasa 1x.

Para la reacción de fosforilación se resuspendieron los complejos de ciclina D3 unidos a la proteína G en 25 μ l de solución kinasa 1x que contenía 10 μ Ci γ -³²P ATP, 1 μ g de GST-Rb (sigma) como sustrato, y 20 μ M ATP; esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras los que se paró la reacción con 6 μ l de solución de carga 5x. Las muestras se incubaron a 95°C durante 10 minutos y se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 10%. La proteína pRB fosforilada se visualizó por autorradiografía del gel una vez seco.

Tampón Kinasa 5x	
HEPES pH 7,2	250mM
MgCl ₂	10mM
MnCl ₂	5 mM
DTT	1 mM

4.3.2 Ensayo kinasa de cdk2

Se incubaron 50 μ g de proteína con 1 μ g de anticuerpo anti-cdk2 en 1ml de tampón de lisis, toda la noche a 4°C en rotación. Pasado este tiempo los extractos se incubaron con 30 μ l de proteína G-agarosa durante 1 hora, y el complejo resultante se lavó tres veces con el tampón de lisis y dos veces más con la solución kinasa.

Para la reacción de fosforilación se resuspendieron los complejos unidos a la proteína G en 30 μ l de solución kinasa que contenía 10 μ Ci γ -³²P ATP, 1 μ g de histona H1 como sustrato, y ATP 20 μ M. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C, la reacción se paró con 6 μ l de tampón de carga 5x. Las muestras se incubaron a 95°C durante 10 minutos, y se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 12%. El gel resultante del ensayo kinasa fue secado a 80°C durante dos horas y expuesto en presencia de placas amplificadoras de la señal a -80°C.

Tampón Kinasa cdk2	
HEPES pH 7,5	100mM
MgCl ₂	100mM
EGTA	4 mM
DTT	2 mM

4.3.3 Ensayo kinasa de cdk1

Este ensayo se realizó para ver la actividad de los complejos ciclina-cdk1. Una vez obtenidos los extractos celulares, se incubaron 50µg de proteína en 1ml de tampón de lisis con 2µg de anticuerpo anti-cdk1 durante 3 horas a 4°C en rotación. Pasado este tiempo se añadió 20 µl de proteína G durante 1 hora, tras esto, se lavaron tres veces con el tampón de lisis EBC y dos veces más con el tampón kinasa.

Para la reacción de fosforilación se resuspendieron los complejos unidos a la proteína G en 20µl de solución kinasa que contenía 10µCi γ -³²P ATP, como sustrato 2,5µg de histona H1 y ATP 5µM; esta mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, la reacción se paró con 5µl de tampón de carga 5x. Las muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%. El gel resultante del ensayo kinasa fue secado a 80°C durante dos horas y expuesto en presencia de placas amplificadoras de la señal a -80°C.

Tampón Kinasa cdk1	
Tris-HCl pH 7,5	20mM
MgCl ₂	10mM
EGTA	0,1mM
DTT	1 mM

4.3.3 Ensayo kinasa de cdk3

Este ensayo se realizó para ver la actividad de los complejos ciclina-cdk3. Una vez obtenidos los extractos celulares, se incubaron 50µg de proteína en 1ml de tampón de lisis con 1µg de anticuerpo anti-cdk3 durante toda la noche a 4°C en rotación. Pasado este tiempo se añadió 25 µl de proteína G durante 1 hora, tras esto, se lavaron tres veces con el tampón de lisis EBC dos veces con el tampón de equilibrado (50mM HEPES pH7,4 y 1mM DTT) y finalmente dos veces más con el tampón kinasa.

Para la reacción de fosforilación se resuspendió a los complejos unidos a la proteína G en 25µl de solución kinasa que contenía 10µCi γ -³²P ATP, como substrato 1µg de histona H1 (por muestra) y ATP 50µM; esta mezcla se incubó a 37°C durante 25 minutos, la reacción se paró con 5µl de tampón de carga 5x. Las muestras se hirvieron a 95°C durante 10 minutos y cargadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%. El gel resultante del ensayo kinasa fue secado a 80°C durante dos horas y expuesto en presencia de placas amplificadoras de la señal a -80°C.

Tampón Kinasa cdk3	
Tris-HCl pH 7,4	50mM
MgCl ₂	10mM
DTT	1 mM

5. PCR cuantitativa en tiempo real

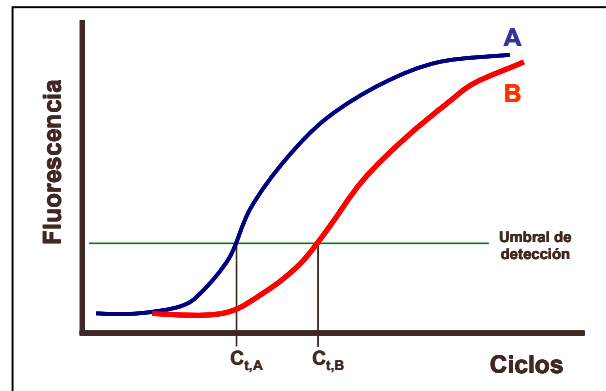
Para el análisis de los genes dependientes de E2F *Cdc6*, *CCNA2* (ciclina A2) y *DHFR* en células SaOS2 y las poblaciones derivadas de ella, Si1 y Si2 se realizó una RT-qPCR a tiempo real. Se procedió a la siembra de 1,5 millones de células (SaOS2, LRH, Si1, Si2) en placas p90, y tras 24 h se obtuvo el RNA total de los cultivos a partir de 1 mL de Trizol (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante, resuspendiendo el total del RNA en 34 µL de H₂O DEPC.

Para eliminar el posible DNA genómico contaminante que pudiera causar resultados erróneos, se llevó a cabo una digestión del RNA con DNasa I libre de RNasa (Roche Diagnostics). Para ello, a los 34 μL de RNA total se añadieron 8,0 μL de MgCl_2 50 mM (Invitrogen), 0,8 μL de DTT 50 mM (Invitrogen), 0,5 μL (20 U) de RNase OUT (Invitrogen), 1,0 μL de DNase I RNase free (Roche Diagnostics) y se llevó a un volumen final de 50 μL con H_2O DEPC, tras lo cual se procedió a incubar la reacción a 37 °C durante 45 min. A continuación se recuperó el RNA realizando un nuevo reparto con Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se resuspendió el precipitado en 25 μL de H_2O DEPC.

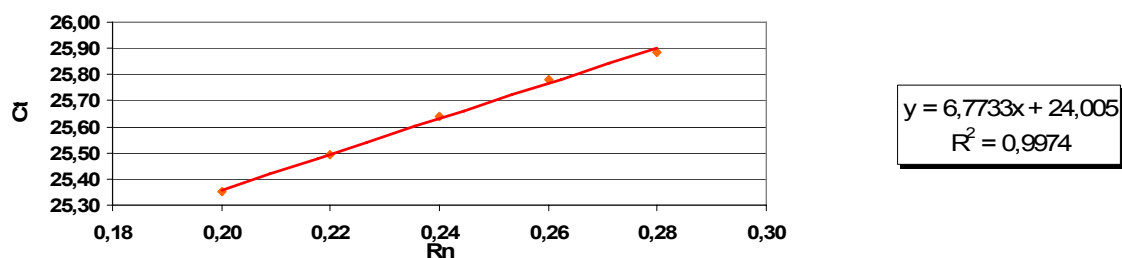
El RNA fue cuantificado por espectrofotometría UV a 260 nm, y el estado de integridad del RNA se visualizó por medio de electroforesis no desnaturizante en geles de agarosa al 1 % en TAE 1X. A continuación se diluyó el RNA a una concentración final de 60 ng/ μl en H_2O DEPC. Para la transcripción inversa, se empleó la M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) a partir de Random Primers (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante (empleando dNTPs adquiridos a Invitrogen) a partir de 300 ng de RNA libre de DNA genómico y añadiendo en cada reacción 10 U del inhibidor de RNasa RNase OUT (Invitrogen). El cDNA resultante se diluyó a la mitad en agua milliQ y se almacenó a 4°C hasta el momento de la realización de la PCR.

Para la qPCR se empleó el termociclador Amersham AV7300, empleando los kits Taqman© de amplificación necesarios para la detección de la presencia de cDNA de los genes de interés distribuidos por Applied Biosystems. Mediante este sistema se puede detectar a tiempo real la amplificación de productos específicos de la PCR, con lo que se evita la presencia de falsos positivos. Para ello, la mezcla de cebadores facilitados por el distribuidor presenta una sonda de DNA específica para la región que se amplifica por PCR que presenta en un extremo un fluoróforo y en el otro un extintor de la fluorescencia; si no hay amplificación la sonda permanece intacta, de modo que el extintor de la fluorescencia impide que el detector presente en el termociclador detecte nada; en caso de que haya amplificación, la sonda hibrida con el molde de DNA, y conforme avanza la polimerasa, su actividad 5'-3' exonucleasa va degradando la sonda, lo que causa una separación física del fluoróforo y del extintor que se traduce en un

de reacción supera un valor umbral de fluorescencia establecido (llamado umbral de detección). El valor del Ct es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA.



Para establecer el valor de umbral de detección, se llevó a cabo la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia detectada (R_n) frente al ciclo de PCR, y con esto se buscó un valor umbral en el que se cumpliera que la relación entre fluorescencia y número de ciclo de PCR estuviese dentro de la linealidad, para lo que se consideró un valor de coeficiente de correlación lineal $R^2 \geq 0,99$. De este modo se escogió un valor de umbral de detección para cada uno de los genes que se analizaron.



Para la cuantificación relativa de la PCR se emplearon por separado los valores de expresión de tres genes de expresión constitutiva, a saber RPLP0 (proteína ribosomal), GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) y TFRC (Receptor de transferrina C). A partir de estos valores de expresión, se empleó el método del $\Delta\Delta C_t$, que considera que las eficiencias de PCR

son similares para todos los genes que amplifican y en todas las reacciones de PCR (Pfaffl, 2001).

$$\Delta C_t = C_t(\text{gen expresión constitutiva}) - C_t(\text{gen problema})$$

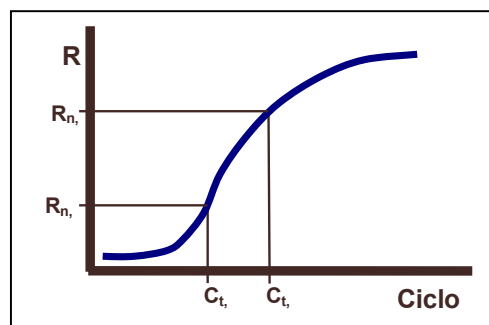
$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Si2}) - \Delta C_t(\text{Saos2})$$

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

La elección de éste método se realizó en base a la simplificación del proceso y porque, en efecto, se estimaron las eficiencias de PCR para todos los genes y se comprobó que en todos los casos eran todas aproximadamente del 100%. Para calcular las eficiencias seguimos el método descrito en el artículo Liu y Saint, 2002 donde se describe que para calcular las eficiencias basta con llevar a cabo la representación gráfica de Rn frente a Ct y aplicar la siguiente fórmula:

$$Ef = \left[\left(\frac{R_{n,A}}{R_{n,B}} \right)^{\frac{1}{C_{t,A} - C_{t,B}}} \right] - 1$$

Para eso fue necesario pasar a excel todos los datos de Ct y Rn ajustándolos a una curva y asignar dos valores aleatorios de Rn que estuvieran en esa curva; a partir de esos dos valores de Rn se tomaban dos de Ct y se aplicaba la fórmula anterior. El resultado obtenido era semejante a lo siguiente:



6. Inmunoprecipitación de cromatina (CHIP)

Las células se incubaron en formaldehído al 37% durante 10 minutos en agitación, tras lo cual se añadió glicina 2M durante 5 minutos; después se recogieron y centrifugaron las células a 2000 rpm g a 4°C durante 5 minutos. Tras tres lavados con PBS frío y dos en tampón CHIP, las células se resuspendieron en 800 µl del tampón CHIP y se sonicaron en 15 pulsos de 1 segundos con una amplitud del 30%. Se hicieron 20 rondas por muestra dejando pasar al menos 30 segundos entre cada ronda; de esta forma se obtuvieron fragmentos de DNA entre 500-1000 pb. Tras una centrifugación de 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C, se determinó la cantidad de cromatina obtenida por cuantificación de su absorbancia a 260nm. Para cada inmunoprecipitación se utilizaron como mínimo 2 unidades de absorbancia de cromatina

Tampón CHIP	
IGEPAL-CA630 / NP40	0,5 %
Tritón X-100	1,00 %
EDTA	5 mM
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM

El preaclerado de la cromatina se realizó incubando cada una de las inmunoprecipitaciones con 40 µl de proteína G a 4°C en rotación durante 1 hora. Posteriormente se añadieron 3µg de los anticuerpos relevantes a cada una de las muestras y éstos se incubaron a 4°C durante toda la noche en rotación. Al día siguiente se añadieron 40µl de proteína G a 4°C durante 1 hora. El precipitado se lavó con los siguientes tampones:

a. 2 lavados con tampón de lavado 1.

Tampón de lavado 1	
SDS	0,1 %
Tritón X-100	1 %
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
Tris-HCl, pH 8,1	20 mM

b. 2 lavados con tampón de lavado 2.

Tampón de lavado 2	
SDS	0,1 %
Tritón X-100	1 %
NaCl	500 mM
EDTA	2 mM
Tris-HCl, pH 8,1	20 mM

c. 2 lavados con tampón de lavado 3.

Tampón de lavado 3	
LiCl	0,25 M
IGEPAL-CA630 / NP40	1 %
Deoxicolato sódico	1 %
EDTA	1 mM
Tris-HCl, pH 8,1	10 mM

d. 2 lavados con TE pH 8,0.

Tampón de elución	
NaHCO ₃	50 mM
SDS	1 %

Para eluir la proteína se incubó cada muestra con 300 µl de tampón de elución a 65°C durante 10 minutos, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se dejó toda la noche a 65°C para revertir el crosslinking. Las muestras se fenolizaron con un volumen 1:1 de fenol/cloroformo, y a la fase acuosa recuperada se le añadieron 20µg de glucógeno, 1/10 de volumen de AcONa 3 M pH 5,2 y dos volúmenes de EtOH frío al 96%. Tras incubar a -80°C un mínimo de 30 min o a -20°C toda la noche, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 30 µl de TE. En cada reacción de PCR se emplearon 2 µL.

Tabla 8. Relación de oligos utilizados para la PCR

Oligos	Casa comercial	Cadena molde	SECUENCIA
E2F1	Sigma	Sentido	AAGCCAATAGGACCGCCG
		Antisentido	CTGCAAAGTCCCGGCCACTTTTA
CdC6	Sigma	Sentido	AAGGCTCTGTGACTACAGCCA
		Antisentido	GATCCTTCTCACGTCTCTCACA
p107	Sigma	Sentido	AGGCAGACGGTGGATGACAACAC
		Antisentido	TCAGCGTGGGGCTTGTCTCTCGAA
Cyc A	Sigma	Sentido	CTGCTCAGTTTCCTTTGGTTTAC
		Antisentido	AAAGACGCCCCAGAGATGCAGC
DHFR	THERMO	Sentido	CTGCACAAATGGGGACGAG
		Antisentido	CCATGTTCTGGGACACAGC
Actina	Sigma	Sentido	AACTCTCCCTCCTCCTCTTCCTC
		Antisentido	GAGCCATAAAAGGCAACTTTTCGG

Material y métodos

La reacción de amplificación o PCR consistió de 1 ciclo de 3 minutos a 95°C seguido de 31 ciclos a: 91°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos; finalmente se realizó un único ciclo de 72°C durante 10 minutos. Las condiciones de PCR fueron las mismas para los siguientes promotores: E2F1, Cdc6, p107, CycA, DHFR y Actina como control negativo. Su secuencia se obtuvo del laboratorio de Brian Dynlacht (Balciunate et al., 2005).

Para la cuantificación del CHIP se densitometraron las bandas del gel mediante el programa Quantity one (Biorad), el área medida fue idéntica en todos los casos. Los valores obtenidos se expresaron en intensidad/mm², y la unión relativa de p107 y p130 al DNA se calculó a través de la siguiente fórmula.

$$\text{UNIÓN} = \frac{\text{Int. banda CHIP} - \text{Int. MOCK}}{\text{Int. banda INPUT} - \text{Int. MOCK}}$$

Donde el INPUT es la PCR del ADN antes de ser inmunoprecipitado y que sirvió como control del DNA de partida, y MOCK es la intensidad base del gel. Los datos representados en resultados son la media de al menos dos experimentos independientes.

IV-RESULTADOS

1. Obtención de poblaciones estables con bajos niveles de p16 en células *Rb* negativas.

1.1 Selección de un modelo de células tumorales *Rb* ^{-/-} con altos niveles de p16; SaOS2.

La mayoría de los tumores cuyas células no tienen un pRB funcional presentan altos niveles de p16. En esta Tesis nos propusimos estudiar el papel de p16 en células tumorales *Rb*^{-/-}, y si en definitiva esta proteína juega algún papel importante en la fisiología de estas células. Para desarrollar esto, nos planteamos que un modelo acertado sería estudiar los posibles efectos de la eliminación de p16 en una línea celular tumoral *Rb* negativa. Para esto escogimos la línea tumoral humana SaOS2 por presentar altos niveles de p16 y un gen de retinoblastoma no funcional. Esta línea celular proviene de un sarcoma osteogénico primario de mujer caucasiana (ATCC HTB85), y presenta como ventajas frente a otras líneas tumorales *Rb*^{-/-} su facilidad para ser transfectadas, y su gran manejabilidad, condiciones importantes para conseguir una disminución eficaz de p16 en estas células.

La eliminación de p16 viene a continuar el estudio del efecto de la sobreexpresión de p16 en fibroblastos de ratón inmortalizados D3T3 *Rb*^{-/-} realizado por nuestro grupo de investigación (Gonzalez et al., 2003) en la que se demostró que la sobreexpresión de p16 provocaba un retraso en la salida de G0 en células quiescentes provocada por la carencia del complejo ciclina D/cdk4 en estas células.

1.2 Obtención de shRNAs eficaces contra p16

Nuestro primer objetivo fue obtener una disminución de los niveles endógenos de p16 y así restablecer la actividad cdk4 en las células *Rb* negativas. Para eso decidimos disminuir la proteína a través de RNA de interferencia, lo que nos permite obtener una disminución específica de esa proteína sin alterar nada más de la biología de esa célula. El locus INK4a que

codifica para p16 también lo hace para la proteína denominada p14ARF, esto se produce por *splicing* alternativo del primer exón de forma que se generan dos secuencias alternativas: una del exón1 α que junto a los exones 2 y 3 da lugar al mRNA de p16, y otra del exón1 β junto con los exones 2 y 3 que dan lugar a la proteína p14ARF. Teniendo en cuenta esto diseñamos unos oligos contra el exón 1 α específico de p16INK4a, evitando de esta forma que los shRNAs sintetizados tuvieran ningún tipo de efecto sobre la proteína p14ARF.

La forma más sencilla de comprobar si los shRNA contra p16 eran eficaces era transfectándolos de forma transitoria. Como validación inicial, testamos la habilidad de estos shRNAs para disminuir p16 en la línea celular 293T, que expresa altos niveles de p16 y presenta las funciones de las proteínas de la familia Rb abolidas por la expresión de la proteína adenoviral E1a y el antígeno T de SV40.

Para la transfección de esta línea celular utilizamos el plásmido pSHAG con el shRNA contra p16 y como control negativo un plásmido denominado pSHAGff que contiene un shRNA contra luciferasa. Recogimos las células a los 3, 4 y 5 días para determinar cuándo se producía el mayor grado de inhibición. La reducción de la expresión de p16 la confirmamos mediante el análisis por western blot.

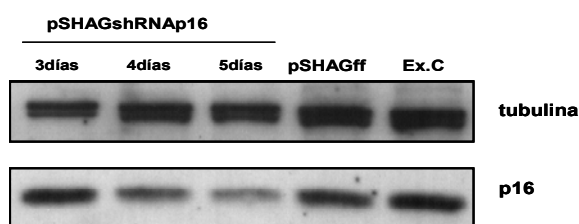


Figura 17. Inhibición transitoria de p16 en células 293. Las 293T fueron transfectadas con 25 μ g de los plásmidos pSHAGp16i3 y el plásmido control pSHAG Ff. Para analizar los niveles endógenos de p16 en las células se recogieron extracto proteico de 293T sin transfectar (Extrancto crudo (Ex.c)). Las células se recogieron a los 3, 4 y 6 días (junto con las células sin transfectar y las células transfectadas con el plásmido control). El extracto proteico fue analizado por western blot utilizando un anticuerpo específico contra p16 o α -tubulina para el control de carga

Como podemos ver en la **figura 17**, el máximo nivel de inhibición de p16 endógeno era a los 6 días. En contraste, no observamos ningún efecto a nivel de p16 en el extracto de las células transfectadas con el shRNA contra luciferasa (pSHAGff). Concluimos que el efecto de la disminución de p16 era causada por el shRNA contra esta proteína y no por un efecto inespecífico de la transfección de un shRNA.

Otro control de la eficiencia de nuestros shRNAs la realizamos cotransfectando p16 junto con los distintos shRNAs diseñados contra esa proteína (pSHAGi3, pSuper65i y pSuper107i) en una línea tumoral p16 negativa de cáncer de mama, las MCF-7.

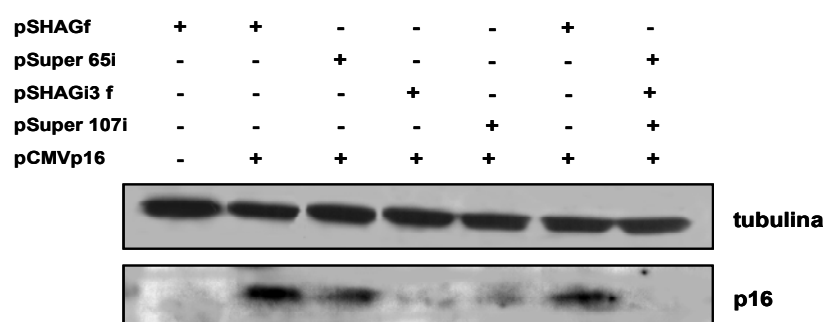


Figura 18. Inhibición transitoria de p16 en células MCF-7 cotransfectado distintos shRNAs contra p16. Las células MCF-7 fueron cotransfectadas mediante fosfato de calcio con los distintos shRNAs contra p16 y con p16 humano. Como control de la especificidad de los shRNA contra p16 se utilizó otro shRNA contra el gen de la luciferasa. Las células se recogieron 72 horas después y se analizaron por western blot utilizando un anticuerpo específico contra p16 o α -tubulina para el control de carga.

Nuevamente y a través del análisis por western blot vimos que la expresión de p16 se veía disminuida bajo la presencia de los shRNA contra p16 y en mayor medida cuando introducíamos los tres a la vez. Al igual que antes, la transfección del shRNA contra luciferasa no provocaba ningún efecto en los niveles de p16.

La transfección transitoria de los shRNAs contra p16 que habíamos diseñado, mostró una eficaz disminución de esta proteína. Por tanto, decidimos comprobar si eran igual de efectivos en nuestro modelo celular SaOS2.

1.3 Obtención de poblaciones de SaOS2 con bajos niveles de p16

Pasamos a probar los shRNAs contra p16 en nuestro modelo celular SaOS2 mediante transfecciones transitorias. A diferencia de antes, los análisis realizados mediante western blot tras estas transfecciones y después de esperar el tiempo en el que se alcanzaba la máxima inhibición, no mostraban una inhibición eficaz de p16 (**figura 19**). Por tanto, decidimos introducir los shRNAs mediante transducción retroviral. Además, teníamos interés en inhibir p16 de forma estable en estas células. Esto nos permitiría obtener poblaciones derivadas de SaOS2 que tendrían inhibido p16 de forma constitutiva. El uso de poblaciones heterogéneas nos aseguraba que el efecto de p16 no se debiera a la alteración en una sola célula, como podría ocurrir con el uso de clones y además nos permitiría estudiar la bioquímica de la célula *Rb*^{-/-} sin p16 y los posibles efectos biológicos a largo plazo.

Los shRNAs contra p16 ya diseñados fueron clonados dentro del vector retroviral pRetroSuper con resistencia a puromicina y además utilizamos los vectores p16/1 MSCVpuro-HpaI (Carnero et al., 2000) y pRetroSuper p16-Hygo (Voorhoeve et al., 2003).

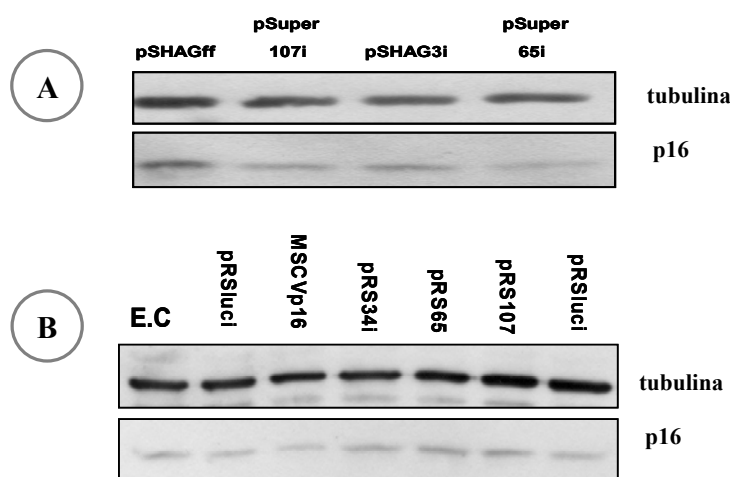


Figura 19. Inhibición de p16 en células Saos2. Western blot de extracto total de células proliferantes utilizando un anticuerpo específico contra p16 o α -tubulina. A) Las células Saos-2 fueron transfectadas mediante fosfato de calcio con $12\mu\text{g}$ de plásmidos pSHAG o pSuper con los distintos shRNAs contra p16, 72 horas después se recogieron y analizaron por western blot, donde se aprecia una ligera disminución en los niveles de p16. B) Western blot de extractos de Saos-2 infectadas con los plásmidos retrovirales que contienen las secuencias de los shRNAs contra p16 y el gen de resistencia a puromicina, y recogidas tras una semana en selección; no se aprecia una disminución clara de p16.

A partir de los plásmidos mencionados se obtuvieron partículas retrovirales ecotrópicas, transfectando las células empaquetadoras 293T, junto con el plásmido HELPER que codifica para las proteínas de la envuelta viral. Estos retrovirus se utilizaron a su vez para infectar un clon de SaOS2 que expresa un receptor ecotrópico. Se optó por este sistema para minimizar el riesgo que supondría trabajar con virus anfotrópicos. Tras la infección, las células se seleccionaron con puomicina durante una semana.

Como podemos ver en la **figura 19B** las poblaciones resultantes mostraban una escasa disminución de p16. Estimamos que esta inhibición no sería suficiente para inducir los posibles efectos que la pérdida de p16 pudiera desencadenar en las células *Rb* negativas, como reconstituir una actividad de cdk4 detectable. Por tanto, realizamos una segunda infección con sobrenadante retroviral obtenido a partir del vector retroviral pRetroSuper p16-Hygro, que lleva en su secuencia el gen de resistencia a higromicina.

Tras la infección, las células se seleccionaron con higromicina durante 15 días y las poblaciones resultantes se denominaron:

- Luci: se trata de la población control. La primera infección se realizó con el plásmido pRetro con el oligo luci33 y la segunda con pRetroSuper-Hygro vacío.
- Si1: la primera infección se realizó con el plásmido p16/1 MSCVpuro-HpaI y la segunda con pRetroSuper p16-Hygro.
- Si2: la primera infección se realizó con el plásmido pRetro con el oligo p16i34 y la segunda con pRetroSuper p16-Hygro.

Las poblaciones si1 y si2 presentaban una disminución de p16 mayor que el 90% respecto a los controles (**figura 20**), esto se comprobó mediante western blot del extracto proteico de las poblaciones tras dos semanas de selección con el antibiótico. Como control utilizamos la línea celular U2OS que son 16 negativas.

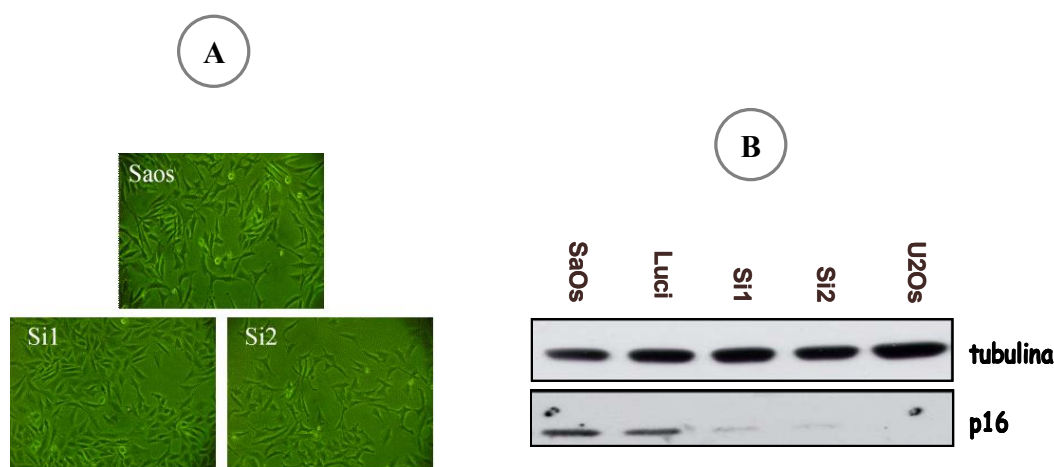


Figura 20. Poblaciones derivadas de Saos-2. Las poblaciones Si1 y 2 surgieron tras infectar Saos-2 en dos ocasiones con RNAs en horquilla (shRNA) contra p16. La población control Luci surgió tras infectar dos veces a las células Saos-2 primero con el RNA en horquilla contra Luciferasa y posteriormente con el vector retroviral vacío con resistencia a higromicina. Todas las poblaciones se seleccionaron primero con puromicina y después con higromicina B) Western blot de las poblaciones de Saos-2, Si1 y Si2 utilizando un anticuerpo específico contra p16 o α -tubulina como control de carga. Como control positivo se usó la línea celular p16 negativa U2OS. Tanto Si1 como Si2 presentan inhibido p16 de forma estable.

Habíamos conseguido una gran disminución de p16 en estas poblaciones, pero era necesario comprobar si esta inhibición era capaz de inducir en nuestro modelo celular una respuesta bioquímica esperada, como es la formación del complejo ciclina D/cdk4 activo. Así, podríamos empezar con el estudio del papel que está desempeñando p16 en las células tumorales *Rb* negativas.

2. Estudio de los efectos de la falta de p16 en la línea celular SaOS2

Aunque los niveles de p16 están alterados en un número alto de tumores, el papel que juega dentro de la biología de células cancerígenas cuando está ausente o bien cuando está sobreexpresado todavía no está claro. Dado que habíamos conseguido inhibir la expresión de p16 en la línea celular SaOS2, decidimos estudiar si esta disminución era suficiente para poder

detectar los posibles efectos biológicos que la pérdida de esta proteína pudiera suponer para las células tumorales *Rb* -/-.

2.1 Caracterización bioquímica de las poblaciones sin p16.

Como ya se ha comentado p16 inhibe específicamente a ciclina D/*cdk4*, y en las células tumorales *Rb* negativas, los altos niveles de p16 dan como resultado la inhibición de los complejos ciclina D/*cdk4-6*. Para saber si la inhibición de p16 en nuestras células era funcional quisimos ver si conseguíamos restablecer el complejo y si este era activo.

Para comprobar la existencia de complejos ciclina D/*cdk4* realizamos una inmunoprecipitación contra *cdk4* y western blot contra ciclina D3, dado que es la única ciclina D presente en SaOS2 (Ewen et al., 1993), en células asincrónicas. Posteriormente como control de la inmunoprecipitación se rehibridó la membrana contra *cdk4*. Utilizamos la línea celular U2OS, como control positivo de células que presentan el complejo ciclina D/*cdk4* ya que son p16 negativas.

Como se muestra en la **figura 21** sólo existe el complejo ciclina D3/*cdk4* en las poblaciones sin p16. En las SaOS2 y en la población control Luci no se detecta la proteína ciclina D3 en el inmunoprecipitado contra *cdk4*, a pesar de que hay la misma cantidad de esta última proteína. Por el contrario, *cdk4* coinmunoprecipita con p16 en las SaOS2 y en la población Luci, demostrando que esta proteína es la responsable de que no se forme este complejo en las células *Rb* negativas. Esto probaba que la inhibición de p16 era suficiente para provocar la formación del complejo ciclina D3/*cdk4*.

Para verificar que estos complejos eran activos pasamos a comprobar si presentaban actividad kinasa sobre su sustrato pRB. Para ello inmunoprecipitamos ciclina D3 de células asincrónicas, y utilizamos el inmunoprecipitado en un ensayo kinasa, donde incubamos los complejos ciclina D3/*cdk4* inmunoprecipitados junto con la proteína de fusión GST-RB. Como control positivo utilizamos las U2OS, que como se ha dicho son p16 negativas, y por tanto presentan un

complejo ciclina D/cdk4 activo. En la **figura 21B** sólo se aprecia fosforilación del sustrato en las poblaciones Si1 y Si2 que tienen inhibido p16, al igual que en las U2OS.

Estos resultados demostraron finalmente que la inhibición de p16 en las células *Rb* negativas no solo permitía la formación del complejo ciclina D3/cdk4, sino que además este complejo era activo. De esta manera, llegamos a la conclusión que las poblaciones Si1 y Si2 eran el modelo de estudio adecuado para poder analizar la repercusión de la falta de p16 en las células tumorales *Rb* negativas.

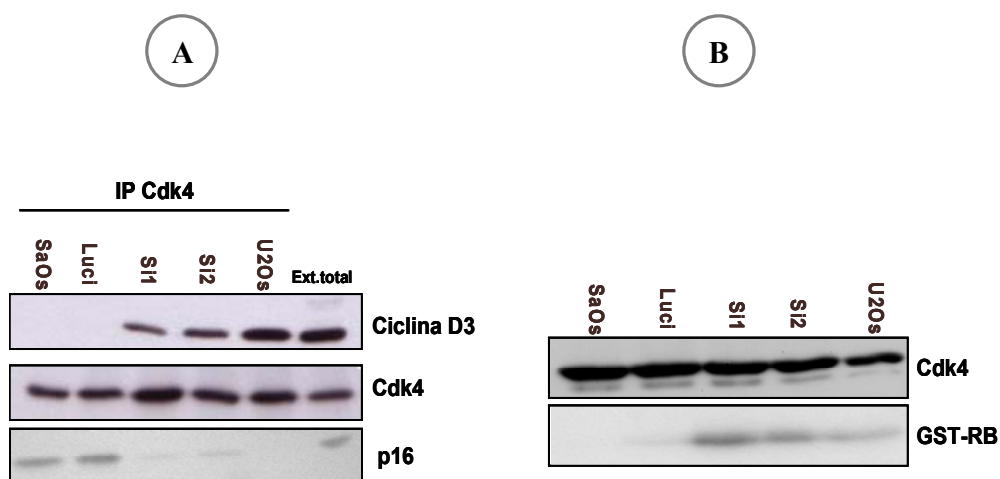


Figura 21. Formación de los complejos activos cdk4/ciclinaD. A) La eliminación de p16 en las células Saos-2 provoca la formación del complejo cdk4/ciclinaD. Se inmunoprecipitó cdk4 de extracto proteico de células asincrónicas y se realizó un western blot contra ciclinaD3, cdk4 y p16. Como control positivo se inmunoprecipitó extracto de células U2OS que son p16 negativas. B) La eliminación de p16 de Saos-2 induce la actividad kinasa del complejo ciclina D3/cdk4. Realizamos un ensayo kinasa dependiente de ciclinaD3, para esto inmunoprecipitamos ciclinaD3 de extractos proteicos de células asincrónicas. Los complejos se incubaron en presencia del sustrato GST-Rb y $\{\alpha^{32}p\}$ ATP.

2.1.1 Estudio de los niveles de proteínas relacionadas con el ciclo celular.

Hasta hace unos años se pensaba que la inhibición del complejo ciclina D/cdk4 por p16 sólo regulaba a pRB. Hoy en día se sabe que este complejo fosforila también a las proteínas de la familia Rb: p107 y p130 (Alevizopoulos et al., 1997). Además para que p16 induzca parada en G1 en una célula, es necesario que ésta contenga no sólo pRB sino también p107 y p130 (Bruce

et al., 2000). Por todo esto, sería esperable que la reconstitución de complejos ciclina D/*cdk4* activos en células *Rb* negativas produjera una alteración en la fosforilación de estas proteínas.

En nuestro caso, una vez comprobada la eficacia de la inhibición de p16 y la presencia del complejo activo ciclina D/*cdk4*, pasamos a ver el estado de fosforilación de las proteínas de la familia de *Rb*, p107 y p130. Separamos extractos de células proliferantes no sincronizadas en geles de poliacrilamida de bajo porcentaje para asegurarnos de que las formas fosforiladas de las proteínas fueran detectables. Como se ve en la **figura 22**, en las poblaciones sin p16 la proteína p130 endógena muestra un cambio en su fosforilación, lo que resulta en un patrón comparable con la existente en la línea celular U2OS. Este cambio de fosforilación no es evidente en la proteína p107.

La causa de la fosforilación de p130 podía deberse a un aumento en la actividad kinasa de *cdk2*, resultado del secuestro de p27 por parte de los complejos ciclina D/*cdk4* formados en las poblaciones Si1 y Si2. p27 forma parte de la familia de inhibidores del ciclo celular, la familia CIP/KIP. El principal papel de esta familia es inhibir a ciclina E/*cdk2*, pero por otro lado se ha descrito que los inhibidores de esta familia son capaces de unirse al complejo ciclina D/*cdk4-6* lo que previene que se una al complejo de ciclina E/*cdk2* permitiendo que este se active, contribuyendo a la progresión de la fase G1. Se ha comprobado que fibroblastos embrionarios murinos derivados del knockout de *cdk4* (MEFs *cdk4*^{-/-}) no presentan actividad kinasa de *cdk2* a causa de la redistribución de p27 (Tsutsui et al., 1999). Para comprobar el estado de activación de *cdk2* inmunoprecipitamos esta kinasa de células asincrónicas, y utilizamos el inmunoprecipitado en un ensayo kinasa, donde incubamos los complejos inmunoprecipitados junto con su sustrato Histona H1. Como podemos ver en la **figura 22B** no se aprecian diferencias entre las poblaciones sin p16, las células SaOS2 y la población control Luci. Esto demuestra que la fosforilación de p130 no era el resultado de un aumento en la actividad kinasa de *cdk2*.

La inhibición de p16 no sólo permitía el ensamblaje del complejo ciclina D/*cdk4*, sino que además provocaba un aumento en la fosforilación de p130. Estas diferencias mostraban que la inhibición de esta proteína provocaba efectos apreciables en las células *Rb* negativas, por lo

tanto sería necesario analizar otras proteínas importantes en la regulación del ciclo para ver si estas también se veían afectadas.

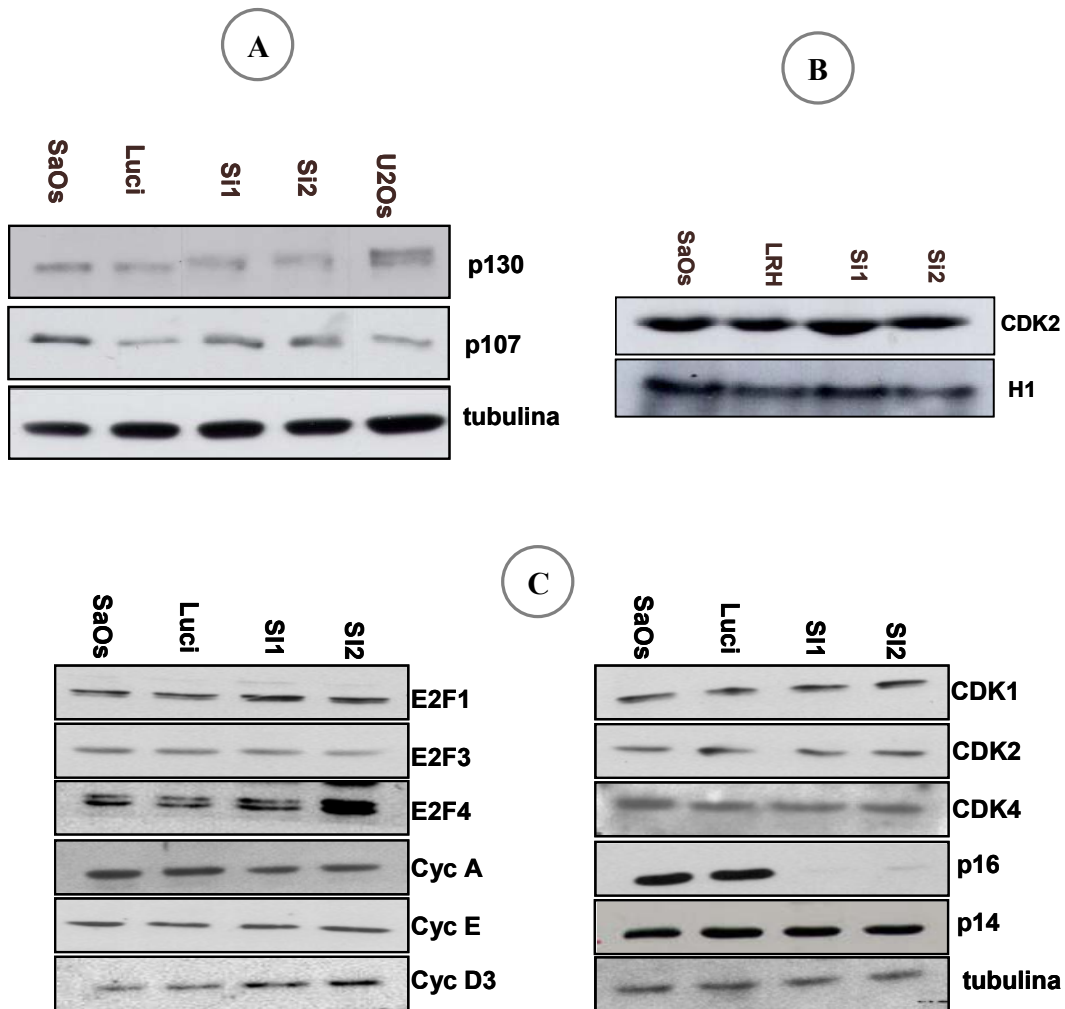


Figura 22. La inhibición de p16 provoca un aumento en la fosforilación de p130 sin que induzca cambios aparentes en el resto de las proteínas del ciclo analizadas. A) La inhibición de p16 y formación del complejo activo de cdk4/ciclinaD3 tiene como consecuencia la aparición de una forma de fosforilación de p130. Western blot contra p130 y p107 de extractos proteicos totales de células asincrónicas, se utilizó como control de carga el anticuerpo contra tubulina. B) Ensayo kinasa de cdk2 donde se muestra que la inhibición de p16 no provoca un aumento de la actividad kinasa asociada a cdk2. Se inmunoprecipitaron 100µg de extracto con anti-cdk2, y los complejos precipitados fueron incubados con histona H1 y (α -32P)ATP. C) La inhibición de p16 no tiene un efecto significativo en las proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular. Western blot contra distintas proteínas importantes para la proliferación celular, se utilizó como control de carga el anticuerpo contra α -tubulina

El análisis de estas proteínas se realizó mediante western blot de células proliferantes. Los resultados no mostraron grandes diferencias entre las poblaciones Si1 y Si2 frente a las SaOS2 y la población control Luci. Se puede resaltar un ligero aumento en los niveles de ciclina D3 que puede estar relacionado por la formación de los complejos activos con cdk4. Cabe resaltar que no se aprecia disminución en la proteína p14ARF en las células si1 o si2, lo que refleja la especificidad de los shRNAs diseñados contra p16.

Que no detectáramos cambios en la expresión en las proteínas que regulan el ciclo celular, no significaba que la inhibición de p16 no fuera efectiva, dado que la formación del complejo de ciclina D/cdk4 y la fosforilación de p130 demostraban de forma convincente que esta inhibición provocaba en las células *Rb* negativas las consecuencias bioquímicas esperadas. Por lo que decidimos estudiar las posibles consecuencias de la inhibición de p16 en la biología de las células *Rb* negativas.

2.2 Análisis del ciclo celular.

Para comenzar la caracterización biológica de las poblaciones sin p16, estudiamos la distribución de estas células comparándolas con las células parentales a través del ciclo. En primer lugar analizamos la distribución de las células en las distintas fases del ciclo mediante citometría de flujo de células proliferantes. Los datos resultantes mostraron que no había diferencias en la distribución del ciclo entre las poblaciones sin p16 y las SaOS2.

Pese a no presentar diferencias en la distribución en fases del ciclo, la inhibición de p16 podía provocar una mayor tasa de proliferación. Se conoce bien el papel de p16 como supresor de tumores, y la pérdida de esta proteína junto con la sobreexpresión de ciclina D provoca efectos hiperproliferativos en células normales (Ortega et al., 2002). Por ese motivo estudiamos la capacidad de proliferación, mediante contaje celular de células asincrónicas con y sin p16. Las células se sembraron en medio completo, contándose cada dos días, para obtener una tasa de crecimiento aproximada de las poblaciones y de las células parentales. Como se aprecia en la **figura 23B** no encontramos diferencias en la tasa de crecimiento entre los distintos tipos celulares.

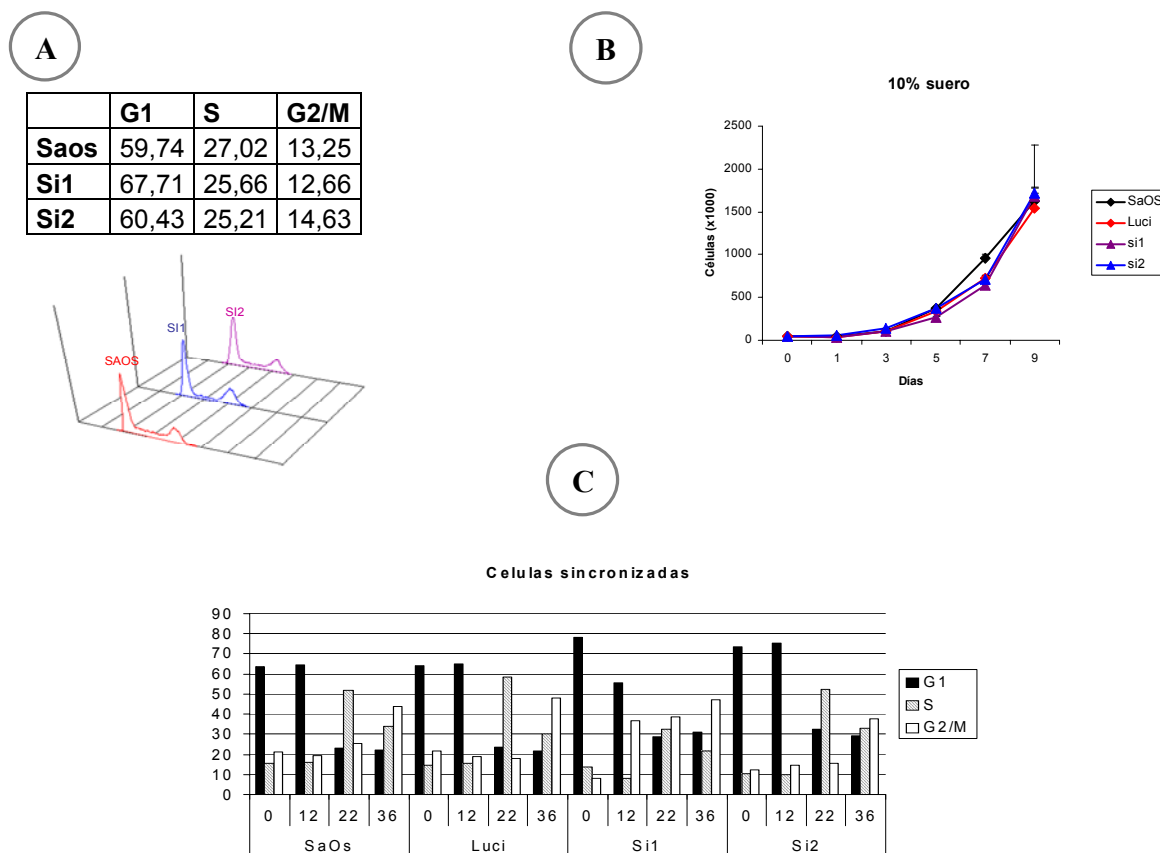


Figura 23. Comportamiento del ciclo de las poblaciones sin p16. A) No hay diferencias en células proliferantes con y sin p16. Células Saos-2 y sus poblaciones se sembraron en medio completo, 48 horas después se recogieron y analizaron por citometría de flujo. Los datos fueron obtenidos mediante el programa Flow Jo. B) Las células Saos-2 y sus poblaciones sin p16 presentan igual crecimiento en condiciones normales de proliferación Se sembraron 30.000 células en medio suplementado con 10% de suero, al día siguiente las células se recogieron y se contaron en una cámara de Neubauer, para asegurarnos que el número sembrado era el adecuado. El conteo se repitió a los 3, 5, 7 y 9 días, cada punto es la media de 3 placas independientes. C) Las poblaciones sin p16 no presentan una reentrada en el ciclo diferente a las Saos y la población control. Se sembraron 500.000 células en medio completo. Tras ser sincronizadas mediante serodeprivación, fueron liberadas en medio al 20% de suero se recogieron a distintos tiempos (0, 12, 22 y 38 horas) y analizaron mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos se representan en la gráfica de la figura.

La inhibición de p16 aparentemente no afectaba a la biología de las células tumorales *Rb* negativas, ni en proliferación ni en distribución del ciclo al menos en células proliferantes. Sin embargo, habíamos visto que la actividad kinasa dependiente de ciclina D provocaba un aumento en la fosforilación de p130. La principal función de estas dos proteínas es ejercida

prioritariamente durante el transcurso G0/G1 (Coats et al., 1999; Harbour et al., 2000), además en el trabajo publicado anteriormente por nuestro grupo vimos que la sobreexpresión de p16 provocaba un retraso en la entrada en fase S, en las células llevadas desde G0 (Gonzalez et al., 2003). Para ver cómo se comportaban las células sin p16 desde G0, las serodeprivamos durante 72 horas obligándolas a entrar en quiescencia. Las células analizadas por citometría de flujo mostraron una parada efectiva en el estadio de quiescencia G0. La estimulación mitogénica con altos contenidos de suero en el medio, provocó una entrada en el ciclo de forma sincronizada. Estas células se recogieron a lo largo de 36 horas, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los datos analizados no mostraron diferencias entre las células con y sin p16 ni en la salida de G0 ni en otras etapas del ciclo.

De los experimentos que se acaban de describir, concluimos que la inhibición de la expresión de p16 no tiene efecto sobre la progresión del ciclo de estas células en presencia de una alta concentración de suero.

Hasta este momento la inhibición de p16 había permitido la formación de complejos ciclina D3/cdk4 junto con la fosforilación de p130. Estos efectos en la bioquímica de las células tumorales no parecían tener repercusiones a nivel de la proliferación. Pese a esto, el aumento en la fosforilación de p130 en las poblaciones Si1 y Si2 podía suponer un cambio en los niveles de expresión de los genes dependientes de E2F.

2.3 Efecto de la inhibición de p16 sobre los genes dependientes de E2F.

Se sabe que tanto pRB como p107 y p130 regulan la transcripción de los genes dependientes de E2F, inhibiendo este factor de transcripción mediante unión directa a esta proteína. La fosforilación e inactivación de pRB, mediada por los complejos ciclina/cdk, es esencial para la progresión G1/S. En células normales la fosforilación de p107 y p130 depende de la actividad del complejo ciclina D/cdk4, y coincide con la liberación de E2F y del comienzo de la transcripción de los genes dependientes de E2F (Beijersbergen R et al., 1995).

Como ya hemos comentado, las SaOS2 y en general en células tumorales *Rb* negativas tienen anulada la actividad ciclina D/*cdk4* debido a los elevados niveles de p16 que presentan. Realmente se conoce poco sobre las consecuencias de la falta de actividad de este complejo sobre la regulación de las proteínas p107 y p130 y los genes dependientes de E2F en las células *Rb*^{-/-}. Se podría esperar que en estas células la capacidad para inactivar p107 y p130 estuviera comprometida, al igual que la actividad transcripcional de E2F. Esto puede verse modificado al restablecer la actividad del complejo ciclina D/*cdk4* después de la inhibición de p16.

Para el análisis de los genes dependientes de E2F en las células sin p16, comenzamos estudiando los niveles de mRNA mediante PCR a tiempo real. Los genes analizados fueron *B-myb*, *cdc6*, *CycA* y *DHFR*, que están regulados directamente por p130 y p107 (Hurford et al., 1997). La extracción del mRNA la realizamos de células asincrónicas sembradas 24 horas antes en medio completo; los resultados obtenidos corresponden a la media de 4 experimentos independientes tomando como valor control el valor de las células de partida SaOS2.

El resultado mostró que los niveles de los mRNAs de estos genes son similares en las poblaciones Si1 y Si2 y en las células con p16 (**figura 24**), sin que hubiera diferencias significativas, aunque sí se podía destacar un ligero aumento no estadísticamente significativo en los niveles del gen *DHFR* en las poblaciones Si1 y Si2. Para ver si la transcripción de este gen podía verse aumentada por la inhibición de p16, analizamos la actividad de su promotor.

El promotor de *DHFR* tiene un sitio de respuesta a E2F. Si alguna de nuestras células presentara una mayor actividad de E2F sobre este promotor, esto provocaría un aumento en la actividad del gen *reporter*. Los valores obtenidos los corregimos comparándolos con la actividad del mismo promotor del gen *DHFR* pero con el sitio de respuesta a E2F mutado. De esa manera la actividad transcripcional resultante dependía de E2F exclusivamente. Los datos del ensayo luciferasa no mostraron diferencias entre las células con y sin p16, por que concluimos que la inhibición de p16 no afectaba a la transcripción de los genes dependientes de E2F.

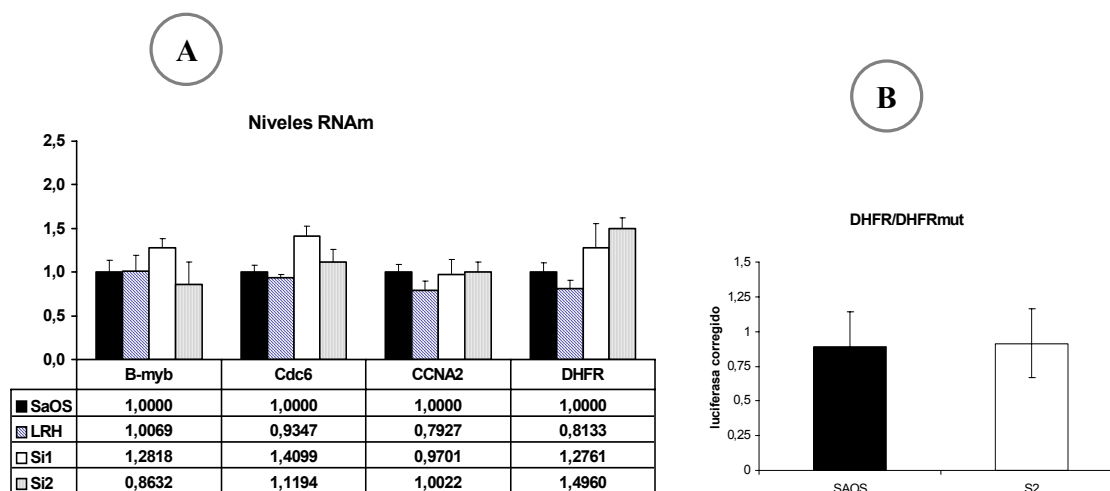


Figura 24. La inhibición de p16 no parece tener ningún efecto significativo sobre los genes dependientes de E2F. A) La inhibición de p16 no afecta, o lo hace marginalmente, a la transcripción de los genes dependientes de E2F. Se sembraron células Saos-2 junto con la población control Luci y las poblaciones sin p16 (Si1 y Si2) en medio completo, 24 horas después se extrajo RNA y se analizaron los genes dependientes de E2F mediante PCR a tiempo real. Los datos representados en la gráfica son la media y la desviación de 4 experimentos independientes. B) La transcripción del gen DHFR dependiente de E2F no se ve afectada tras la falta de p16. Las células Saos y Si2 se transfectaron de forma paralela con los plásmidos con el promotor de DHFR (WT) y con el mismo promotor pero con el sitio de respuesta a E2F mutado (MUT), unidos al gen de luciferasa. La gráfica representa el cociente del de las unidades obtenidas del promotor WT y el MUT corregido por los valores de β -galactosidasa. La gráfica son la media y la desviación de 4 experimentos independientes.

Hasta aquí los resultados obtenidos mostraban que las células *Rb* negativas eran capaces de proliferar y estimular de alguna forma a E2F a pesar de presentar p16 y de carecer de actividad cdk4-6. Durante G1 las proteínas de la familia Rb son inactivadas mediante fosforilación secuencial de los complejos ciclina D/cdk4-6 y ciclina E/cdk2. La inactivación de estas proteínas da como resultado la liberación de las proteínas de la familia E2F, necesarias para el paso G1/S (Sherr et al., 2000). Nosotros hemos visto que las células *Rb* negativas son capaces de estimular a los genes dependientes de E2F. Esta estimulación podía producirse por inactivación de las proteínas de la familia de Rb presentes en nuestras células, o porque estas proteínas no fueran funcionales en células tumorales *Rb* negativas, o por un mecanismo completamente distinto, independiente de p107 y p130. Por ello, necesitábamos estudiar si en las células *Rb* negativas p107 y p130 eran funcionales, y si las células eran capaces de

inactivarlas permitiendo la transcripción de los genes dependientes de E2F. Por supuesto también queríamos saber si esto se veía afectado por la inhibición de p16.

Este estudio lo realizamos mediante inmunoprecipitación de cromatina de células sincronizadas tras doble bloqueo con timidina. Las células se recogieron en las fases G1 y S del ciclo, lo que comprobamos analizando a las células mediante citometría. La cromatina de estas células la inmunoprecipitamos con anticuerpos contra p107, p130 y E2F4 (proteína de la familia de E2F a la que se unen tanto p107 como p130) utilizando como control negativo suero no inmune. Las regiones de los promotores de respuesta a E2F que amplificamos fueron las de los genes *de DHFR*, *CycA2*, *cdc6*, *p107* y *E2F1*. Utilizamos *actina* como control negativo ya que este gen no está regulado por E2F.

Como podemos ver en la **figura 25**, tanto en SaOS2 como en su población en la que está inhibido p16, en la fase S del ciclo hay una disociación de p107 y p130 de la región del DNA analizada. Justo lo contrario sucede en G1 donde la unión de p107 y p130 a los promotores es mayor. Esto sugiere que las células *Rb* negativas con altos niveles de p16 son capaces de inactivar a p107/p130 y por lo tanto disociarlas de los promotores dependientes de E2F en la transición G1/S. Todo esto parece demostrar que en las células *Rb* negativas la inactivación de p107/p130 es independiente a la fosforilación mediada por ciclina D/cdk4, y la reconstitución de la kinasa tras ser inhibido p16 no afecta ni a la regulación de los genes dependientes de E2F ni a las proteínas de la familia de Rb, al menos en las condiciones estudiadas.

Nuestros resultados demostraban que tanto p107 como p130 se podían inactivar en ausencia de actividad kinasa dependiente de cdk4-6. Esto podía significar que el ciclo de estas células podía estar regulado por otras kinasas.

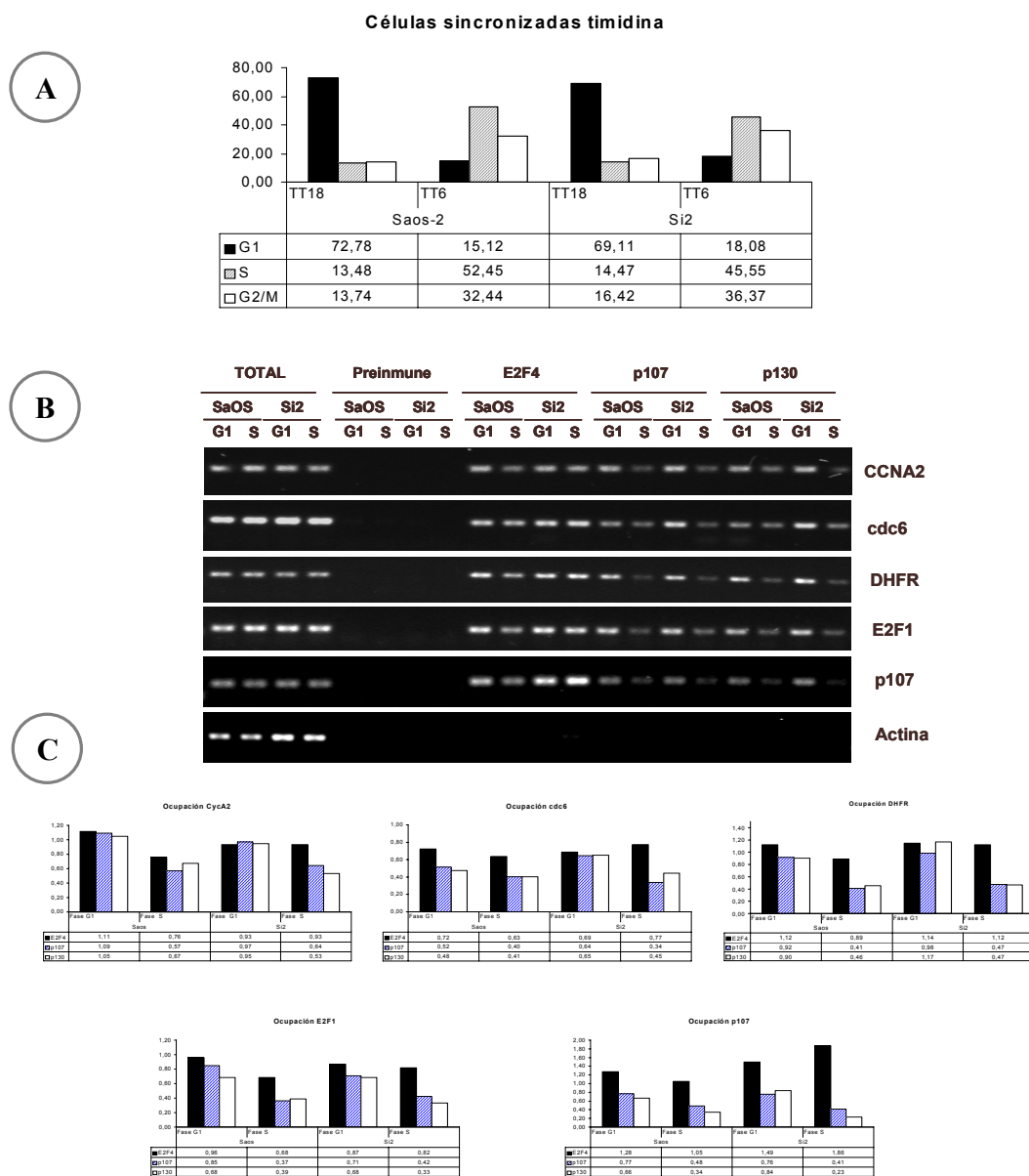


Figura 25. Las células RB negativas con altos niveles de p16 regulan la ocupación de los genes dependientes de E2F, por p107 y p130, a través del ciclo celular y esto no se ve afectado con la inhibición de p16. A) Las células Saos y Si2 fueron sincronizadas tras doble bloqueo de timidina y se recogieron a las 6 horas (fase S) y a las 18 horas (fase G1). El porcentaje de células en cada fase del ciclo se determinó por citometría de flujo. B) Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina de las células sincronizadas. Las células recogidas en fase G1 y S del ciclo celular fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos p107, p130, E2F4 y suero preimmune. Tras la inmunoprecipitación de cromatina se amplificó mediante PCR los promotores de DHFR, Ciclina A2 cdc6, p107 y como control negativo el promotor de actina (que no se une a E2F). C) Las gráficas muestran los valores de la densitometría de las bandas de cada uno de los promotores. Estos valores demuestran que las células RB negativas son capaces de liberar a los promotores dependientes de E2F p107 y p130 de los promotores a través de E2F en fase S.

3. Aproximación a la regulación del ciclo de las células *Rb* negativas por las cdk.

Para comprobar cómo se comportaban nuestras células frente a condiciones limitantes de estímulos mitogénicos (por tanto con escasa actividad de los complejos ciclina/cdk), y sabiendo que los dos tipos celulares se paran en condiciones de serodeprivación (**figura 23C**), pusimos a crecer las células con y sin p16 en medio con un 0,5% de suero.

Todas las células presentaban una marcada disminución de la proliferación en comparación con su tasa de crecimiento en condiciones óptimas de suero (**figura 26**). Sorprendentemente las poblaciones sin p16 presentaban una mayor tasa de crecimiento que las células parentales y la población control en estas condiciones. Una posible explicación podría ser que las cantidades limitantes de suero provocaran una actividad baja de cdk, y que en estas condiciones el complejo ciclina D/cdk4, formado en las poblaciones sin p16, supusiera una ventaja.

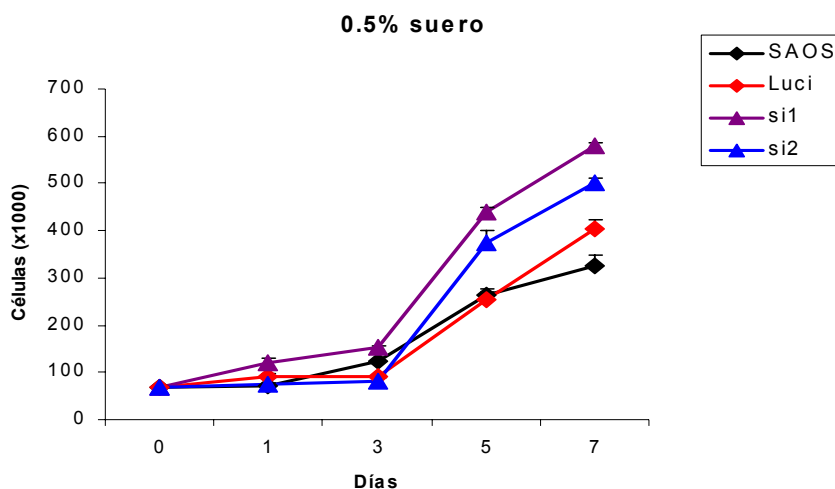


Figura 26. La proliferación de las células sin p16 parece ser menos sensibles a condiciones limitantes de medio. Se sembraron 90.000 células SaOS2, Luci, Si1 y Si2, al día siguiente se les añadió medio al 0,5% de suero. Las células fueron recogidas a los días indicados en la gráfica y contadas en una cámara de Neubauer. Cada punto de la gráfica corresponde a la media de tres cuentas independientes de triplicados.

Para comprobar de forma más específica que los niveles de p16 en células *Rb* negativas pudieran modificar su sensibilidad a la actividad cdk, decidimos usar un inhibidor de cdk de amplio espectro.

3.1 Efecto del inhibidor químico Roscovitina en células con y sin p16.

Hoy en día se han desarrollado un amplio número de inhibidores de cdk para el tratamiento contra el cáncer, provocado por la frecuente desregulación de los complejos ciclina/cdk en células tumorales. La Roscovitina ha sido utilizada en el tratamiento de numerosos tumores y está probada su efectividad en la inhibición de la actividad sobre cdk1, cdk2, cdk3, cdk5 y cdk7 (De Azevedo et al., 1997; Keezer y Gilbert, 2002).

La actividad de la roscovitina ha sido probada contra varias proteínas kinasas distintas a las cdk. Sus IC_{50} fueron calculados mediante curvas dosis-respuesta, y se vio que la mayoría estaban poco inhibidas o no inhibidas. Con respecto a la actividad de cdk4 y cdk6 se ha visto que este inhibidor tiene un pobre efecto sobre ellas siendo sus $IC_{50} > 100\mu M$ (Meijer et al., 1997).

Este inhibidor nos serviría para aclarar si estas cdk (cdk1, cdk2 y cdk3) podían ser las responsables de la regulación del ciclo de las células *Rb* negativas, dada su alta especificidad contra todas ellas. Además la utilización de roscovitina presentaba otras ventajas como la baja actividad sobre cdk4-6 y otras kinasas que podrían estar sustituyendo el papel de las cdk en estas células, así los resultados nos darían una respuesta más aproximada de si realmente la actividad de cdk4-6 podía suplir o suponer alguna ventaja en ausencia de otras cdk, como parecía sugerir el experimento anterior, o bien si la regulación de las células *Rb* negativas dependía de otras kinasas no inhibibles por este inhibidor químico.

Para investigar los efectos de la roscovitina en la proliferación de nuestras células, tratamos a las SaOS2 y Si2 con una concentración $50\mu M$ durante 48 horas, tiempo tras el cual las células se recogieron y fueron analizadas por citometría de flujo. La inhibición de cdk1 y cdk2 por este inhibidor debería provocar que las células se parasen en G1 y G2/M respectivamente, si realmente eran las responsables de la regulación del ciclo. Los datos muestran cierta

acumulación en G2/M, y una disminución en la fase S (**figura 27**) aunque esto no nos permitía concluir que las células estuvieran paradas en esas fases.

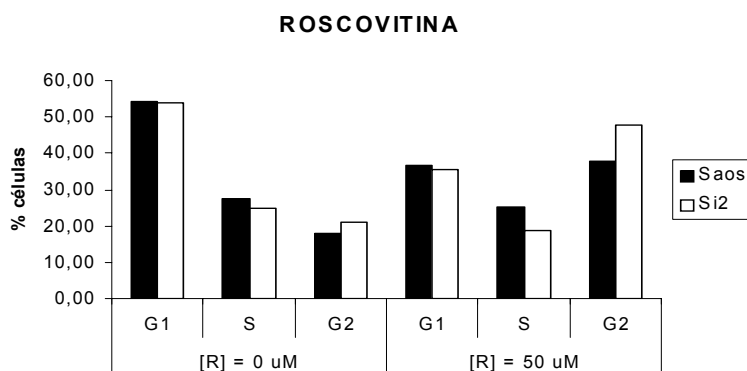


Figura 27. El tratamiento con roscovitina provoca un aumento en G2/M a una concentración de 50µM. SaOS2 y Si2 fueron tratadas con roscovitina a una concentración de 50µM durante 48 horas, tiempo tras el cual fueron recogidas y analizadas mediante citometría de flujo. Las gráficas representan la distribución de células que se haya en cada fase del ciclo.

Para comprobar si el inhibidor de las cdk's impedía la proliferación de las células *Rb* negativas, tratamos a las SaOS2 y Si2 con nocodazol que para a las células en G2 mediante desorganización de microtúbulos, impidiendo a la célula entrar fase M. De esta manera, se produciría un aumento en la fase G2 sólo si las células no estuvieran paradas.

Las células se cultivaron en presencia de roscovitina 50µM durante 48 horas, 24 horas antes se trataron con Nocodazol. Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron y analizaron por citometría de flujo. Como se ve en la **figura 28** las células cultivadas en presencia de 50 µM y nocodazol no presentan aumento de la fase G2, lo que indica que a esta concentración las células estarían paradas. Esto lo corroboramos mediante incorporación de BrdU en células tratadas con una concentraciones de roscovitina 50 µM (**figura 28B**). El análisis de la incorporación de las células nuestra una disminución completa en la incorporación de BrdU en células tratadas con 50 µM de roscovitina. Esto claramente demostraba que el inhibidor de cdk's era capaz de suprimir la proliferación.

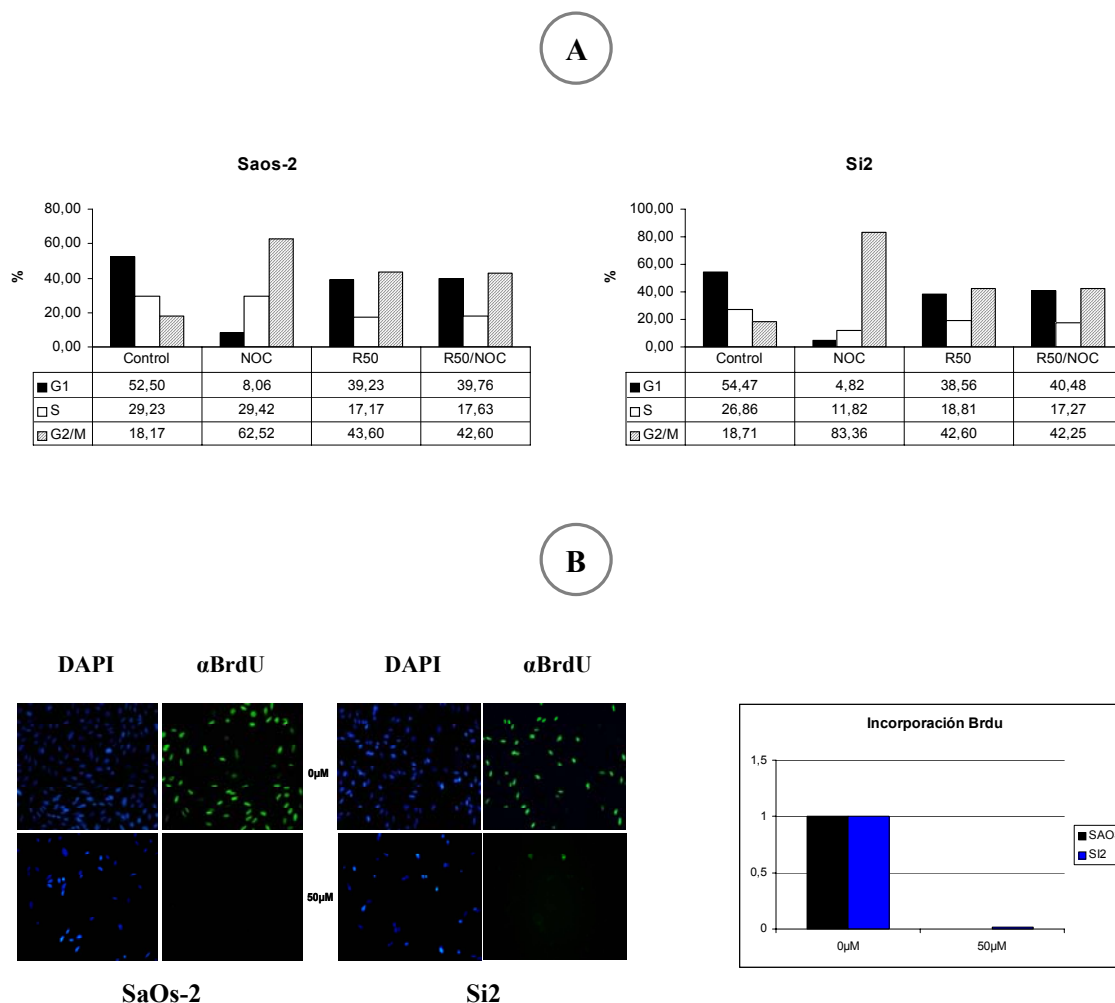


Figura 28. Las células tratadas con 50µM de roscovitina no proliferan. A) Represtación de los porcentajes de las células en cada fase del ciclo. SaOS2 y Si2 fueron tratadas con roscovitina 50 µM durante 72 horas, 24 horas antes de ser recogidas se les añadió Nocodazol 400ng/ml para ver una posible parada de las células en G1. B) Ensayo de incorporación de Brdu de células tratadas con 50µM de roscovitina durante 48 horas. Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear de la inmunofluorescencia. La gráfica es una representación significativa de varios ensayos de Brdu

Todos los datos parecían sugerir que la actividad de las *cdks* debe ser inhibida para impedir la proliferación de las células *Rb* negativas, de forma independiente a la presencia o no de p16. Así los dos tipos celulares presentan parada en la progresión del ciclo celular cuando las tratamos con roscovitina 50 µM, mostrando un perfil con un porcentaje similar de células tanto en G1 como en G2 y una disminución completa en la incorporación de BrdU.

Resultados

Pese a no encontrar diferencias significativas entre SaOS2 y Si2 en cuanto a la sensibilidad a la roscovitina, se sabe que tanto p16 como de cdk4-6 son importantes para la transición G1/S. Por ese motivo decidimos estudiar si había alguna diferencia específica entre las SaOS2 y Si2 en la transición de estas fases cuando inhibimos todas las demás cdk's. Para ver el efecto de la roscovitina a ese nivel, sincronizamos a las células mediante doble bloqueo de timidina liberándolas en presencia o no de 50 μ M de roscovitina. Tras el tratamiento y el período de incubación las células fueron analizadas por citometría de flujo.

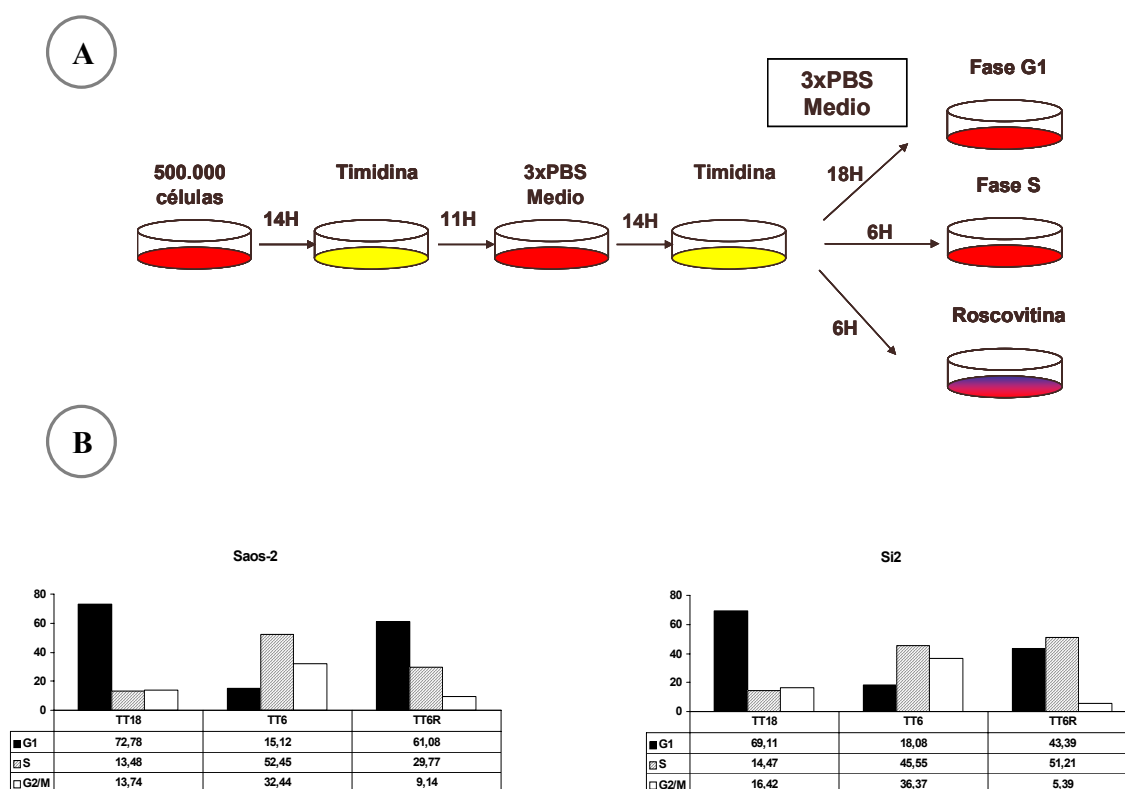


Figura 29. Sincronización de las células SaOS2 y Si2 mediante doble bloqueo de timidina. Las células fueron recogidas a las 18 horas (TT18) para fase G1 o a las 6 horas (TT6) para fase S en presencia o ausencia de Roscovitina (TT6R). **A)** Esquema del procedimiento experimental. **B)** Las células sincronizadas fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las gráficas son una representación del porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo.

Los resultados muestran que la roscovitina provoca distintos efectos entre las células. Así en las SaOS2, la roscovitina provoca una acumulación en G1 lo que indica cierto impedimento de estas células para entrar en fase S, mientras en las Si2 este efecto no es tan evidente, dado que son capaces de pasar a fase S en presencia de roscovitina. Esto demuestra nuevamente que las células sin p16 eran menos sensibles a la inhibición de las cdk's (**figura 29**).

Dado que las células si2 parecían menos sensibles a la roscovitina cuando estaban sincronizadas, decidimos estudiar el efecto de la roscovitina en la regulación de los genes dependientes de E2F en estas circunstancias.

3.1.1 Efecto transcripcional de la roscovitina en células con y sin p16.

Hasta el momento habíamos visto que las células *Rb* negativas eran capaces de regular su ciclo de forma independiente a la presencia de actividad kinasa de cdk4, esto se correlacionaba con la regulación de los genes dependientes de E2F y las proteínas de la familia Rb, p107/p130. También habíamos demostrado que las células tumorales *Rb* negativas eran capaces de inactivar a estas proteínas sin la presencia de la actividad kinasa de cdk4 que se suponía que era indispensable para su fosforilación e inactivación. Los ensayos realizados en condiciones limitantes de mitógenos al igual que los realizados con el inhibidor de cdk's, la roscovitina, habían mostrado por su parte que las células con complejos cdk4 reconstituidos parecían menos sensibles a la inhibición de cdk's.

Para saber si la inhibición de las cdk's por roscovitina podía tener un efecto en p107/p130 y si la actividad de cdk4 podría estar sustituyendo a las demás cdk's en la inactivación de estas proteínas decidimos realizar inmunoprecipitación de cromatina de células sincronizadas con doble bloqueo de timidina y recogidas en G1 (TT18) o en fase S tratadas o no con roscovitina 50 μ M (TT6 o TT6R).

La inmunoprecipitación de cromatina de estas células las realizamos contra los anticuerpos contra p107 y p130, utilizando como control negativo suero preinmune. Las regiones de los

Resultados

promotores de respuesta a E2F que amplificamos fueron la de los genes de DHFR, CycA2 y cdc6. La actina la utilizamos como control negativo ya que no esta regulada por E2F.

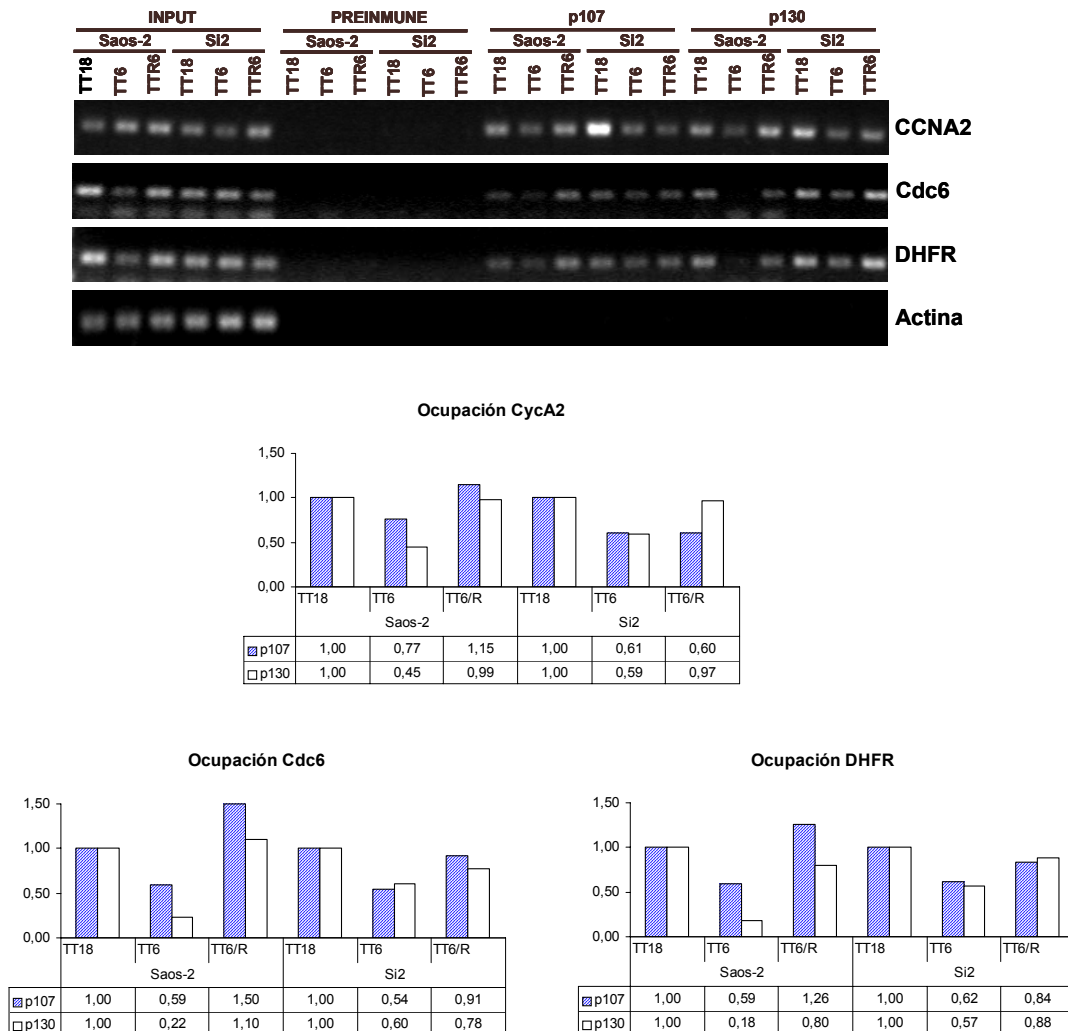


Figura 30. El tratamiento con roscovitina previene la liberación de p107 y p130 de los promotores dependientes de E2F tanto en Saos como en Si2. Las células Saos y Si2 fueron sincronizadas tras doble bloqueo de timidina y se recogieron a las 18 horas (TT18, fase G1) y a las 6 horas (fase S) en presencia (TT6R) o ausencia (TT6) de roscovitina 50µM. Las células recogidas fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos p107, p130 y suero preinmune como control. Se amplificaron mediante PCR los promotores de DHFR, Ciclina A2 cdc6 y actina (como control negativo). Las gráficas muestran la media de los valores obtenidos de densitometrar las bandas de cada una de las amplificaciones de los promotores.

Como podemos ver en la **figura 30**, y como ya habíamos visto en ausencia de roscovitina, las células *Rb* negativas son capaces de inactivar a p107 y p130 y así liberar a estas proteínas de los promotores de respuesta a E2F en la fase S del ciclo (TT6). En cambio esto no es así en células en presencia roscovitina (TT6R), dado que las proteínas p107 y p130 se encuentran unidas a los promotores analizados, de forma similar que en fase G1 del ciclo. En conjunto los datos demostraban que en presencia de roscovitina tanto las SaOS2 como las Si2 son incapaces de inactivar a p107 y p130 y por tanto de liberarlos de los promotores dependientes de E2F. Lo que supone una prueba de que las cdk4 son las responsables no solo de la regulación del ciclo de las células sino también de la inactivación de las proteínas de la familia Rb, y además que la actividad de cdk4 por sí sola no es suficiente para la inhibición de la unión de p107/p130 a promotores dependientes de E2F.

Parece evidente por tanto que las responsables de regular el ciclo en estas células son las cdk4 dado que su inhibición es capaz de inducir inactivación en la transición G1/S. Los complejos ciclina/cdk no inhibibles por p16 parecen ser los candidatos obvios para desempeñar este papel por lo que decidimos estudiar la importancia de estos complejos en la biología de las células *Rb* negativas.

3.2 Consecuencias de la inhibición de cdk2 en células con y sin p16.

Existen numerosos estudios que hablan de la importancia de cdk2 en la biología de las células tumorales y no tumorales. Se ha sugerido que cdk2 dirige muchos eventos del ciclo celular, como la transición G1/S, la progresión a fase S a través de la iniciación y el mantenimiento de la replicación del DNA, la salida de la fase S y la progresión dentro de la fase G2, y posiblemente la entrada en mitosis (Morgan et al., 1997; Hu et al., 2001). La importancia de cdk2 en el ciclo celular ha sido demostrada utilizando distintas formas de inhibición: dominantes negativos, anticuerpos específicos contra cdk2 o contra ciclinas A o E o sobreexpresión de p27 (Pagano et al., 1992; Van den Heuvel y Harlow, 1993; Polyak et al., 1994; Ohtsubo et al., 1995). Esto ha demostrado que el papel de cdk2 en el ciclo celular no sólo es importante sino que además se consideró imprescindible. La función de cdk2 mejor caracterizada es la regulación de la progresión desde G1 a fase S, que ocurre mediante la fosforilación secuencial de pRB primero

por el complejo ciclina D/cdk4 y después por ciclina E/cdk2. Recientemente se ha cuestionado el papel de cdk2, dado que parece ser prescindible para la proliferación celular e incluso para el desarrollo embrionario. Así, se ha descrito que los ratones *cdk2*^{-/-} son viables aunque presentan esterilidad (Berthet et al., 2003), y que la inhibición esta proteína en ciertas líneas tumorales tampoco parece afectar a la proliferación de estas células (Tetsu y McCormick, 2003).

Se ha visto que la inhibición de *cdk2* interrumpe la proliferación de MEFs *cdk4*^{-/-}, *cdk6*^{-/-} lo que parece indicar que en ausencia de *cdk4* la acción de *cdk2* bastaría para mantener la proliferación en esas células (Maumbres et al., 2004). Decidimos por tanto estudiar la repercusión de la pérdida de actividad *cdk2* en nuestras células mediante un dominante negativo.

3.2.1 Efecto de la transfección del dominante negativo de *cdk2* (*dncdk2*)

Comenzamos el estudio de las posibles consecuencias de la inhibición de *cdk2* en las células *Rb* negativas transfectando distintas cantidades del *dncdk2* (este dominante negativo resulta de la mutación de Asp145 en *cdk2* (van den Heuvel y Harlow, 1993)) a las células SaOS2. 48 horas después las células se recogieron para diversos ensayos. La expresión del *dncdk2* se comprobó mediante western blot con un anticuerpo contra *cdk2* que reconoce también a la proteína mutada. Como podemos ver en la **figura 31** el análisis de las células por citometría de flujo muestra un perfil de ciclo normal lo que parecía indicar que la expresión del dominante negativo de *cdk2* no afectaba a las células *Rb* negativas. Esto era posible o bien porque el dominante negativo no fuera suficientemente efectivo o bien porque las células ya estuvieran paradas.

La eficiencia de inhibición de la actividad de *cdk2* por el dominante negativo la comprobamos mediante un ensayo quinaza **figura 31B**. Aquí observamos que la expresión del *dncdk2* provoca una disminución significativa de la actividad de la proteína endógena. Todos estos resultados parecían indicar que efectivamente la inhibición de la actividad quinaza de *cdk2* por el dominante negativo no afectaba a la distribución de las células SaOS2 en el ciclo por lo que decidimos analizar si había una disminución en la síntesis de DNA como ocurría en el caso de las MEFs *cdk4*^{-/-}, *cdk6*^{-/-}. Nuevamente transfectamos a las SaOS2 con la máxima cantidad del *dncdk2*, y 48 horas después realizamos un ensayo de incorporación de BrdU.

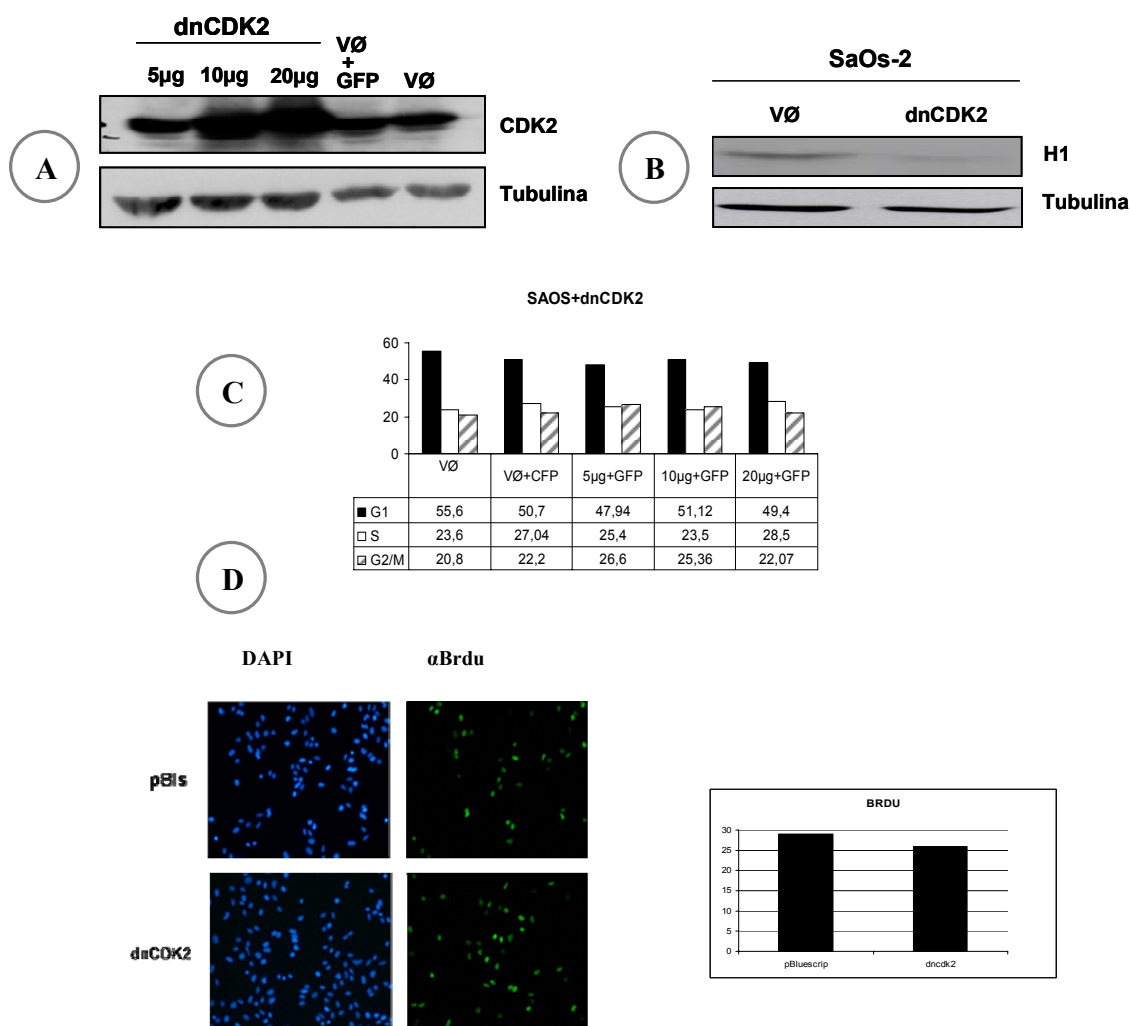


Figura 31. El dominante negativo de cdk2 no tiene ningún efecto en las células Saos-2. Las células Saos-2 fueron cotransfectadas con cantidades crecientes del plásmido pCMVdnck2 (5, 10 y 20µg) o bien con plásmido pBluescript (BS) mediante fosfato de calcio. 48 horas después se recogieron las células para ser analizadas A) Western blot contra cdk2. El anticuerpo utilizado reconoce a la proteína mutada del dnck2 transfectada, ya que es capaz de detectar las concentraciones crecientes del dnck2 transfectado. Como control de carga se utilizó el anticuerpo específico de α -tubulina. B) Ensayo kinasa de cdk2 de 100µg de extracto proteico de células Saos-2 transfectadas con con 20µg de plásmido pCMV dnck2 o bien con BS. Aquí se observa que la actividad asociada a cdk2 de las células transfectadas con el dnck2 está inhibida. C) Las células fueron cotransfectadas con GFP en una proporción 1:5 para poder analizar el efecto del dnck2 en el ciclo mediante citometría de flujo. La gráfica representa la distribución de las células en cada fase del ciclo donde no se observan grandes diferencias D) Las Saos-2 fueron transfectadas con 20µg de plásmido pCMV dnck2 o bien con BS. 48 horas después se realizó un pulso de Brdu. Las células fueron fijadas y se les realizó la inmunofluorescencia con un anticuerpo específico contra Brdu (fotos de la derecha). Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por dapi. La gráfica es una representación significativa de varios ensayos de Brdu

Los resultados obtenidos no muestran diferencias entre las células transfectadas con el dominante negativo y las células control. Esto parecía demostrar que en las células *Rb* negativas las actividades kinasas de *cdk2* y *cdk4* no son necesarias para la progresión del ciclo.

Estos resultados entran en conflicto con los publicados por Cheng et al., 2000; donde se mostraba que la inhibición de *cdk2* con un mutante dominante negativo producía una parada en G1/S en células *Rb* negativas con altos niveles de p16. En este mismo trabajo la expresión de *dncdk2* impide la disociación de p130 y E2F4 en estas células, lo que nos llevó a analizar las consecuencias de la expresión del *dncdk2* en nuestras manos más en detalle.

3.2.2 Estudio transcripcional de los genes dependientes de E2F tras la transfección con el *dncdk2*

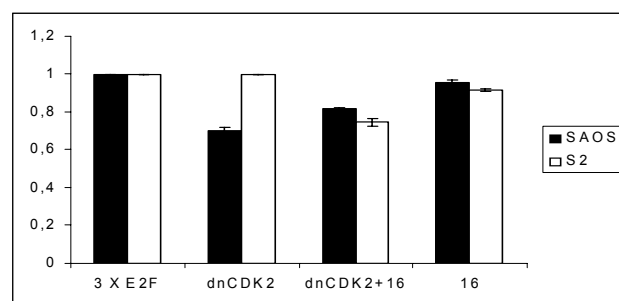
La inhibición de una proteína que fuera esencial para la inactivación de p107 y p130 debería provocar una represión de los promotores dependientes de E2F en las células con p16 altos pero no en aquellas que lo tienen inhibido. Por ello, cotransfectamos a las células con el *dncdk2* junto con un promotor unido al gen reporter de luciferasa, que responde a la actividad transcripcional de E2F. Este promotor es artificial y contiene 3 sitios de respuesta a E2F (3xE2F-Luc).

Como vemos en la **figura 32A** no parecen existir grandes diferencias en la respuesta transcripcional de E2F a la inhibición de *cdk2* en células con y sin p16, aunque sí podemos destacar una pequeña disminución en la actividad dependiente de E2F en SaOS2 cuando estas son transfectadas con el *dncdk2*, lo que no ocurre en Si2. Para comprobar si el efecto diferencial que veíamos entre SaOS2 y Si2 era debido a la inhibición de p16, cotransfectamos junto con el *dncdk2* el plásmido de codifica para p16 de ratón. Esta proteína murina no puede ser reconocida por los shRNA contra p16 humano, pero conserva la capacidad de unirse a *cdk4* humano. Significativamente, la presencia de p16 de ratón provoca que la actividad dependiente de E2F en Si2 disminuya hasta los valores alcanzados por las SaOS2. La disminución de la actividad en SaOS2 parece ser dependiente de p16, dado que en Si2 esta disminución sólo era patente cuando cotransfectábamos el *dncdk2* junto con p16 de ratón.

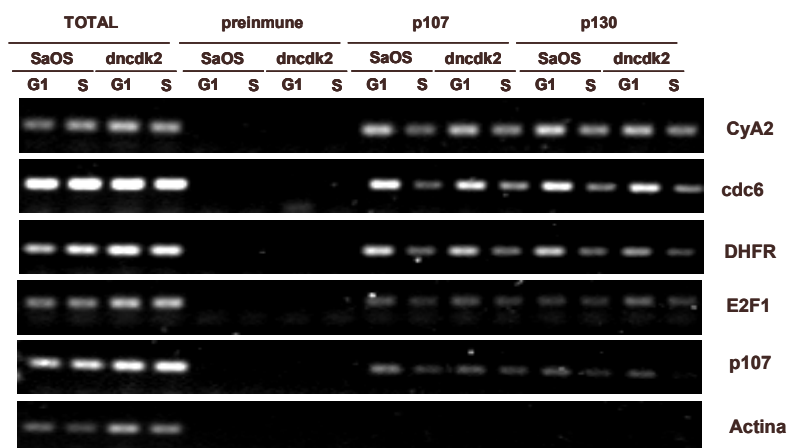
Parecía pues que la expresión de un dominante negativo de *cdk2* inducía un pequeño efecto transcripcional en promotores dependientes de E2F en células *Rb* negativas con niveles altos de p16, pero no en aquellas en las que p16 estuviera inhibido. Se ha planteado en numerosos estudios que esta proteína es necesaria para la fosforilación de p107/p130 en ausencia de *cdk4*, por lo que la pequeña disminución en SaOS2 podía ser el reflejo de un posible efecto sobre p107/p130.

Para estudiar el efecto de *cdk2* sobre la inactivación de p107 y p130, decidimos realizar inmunoprecipitación de cromatina de células SaOS2 transfectadas con y sin el dominante negativo de *cdk2* tras ser sincronizadas con doble bloqueo de timidina. Las células se recogieron en las fases G1 y S del ciclo, lo que comprobamos analizando a las células a por citometría. La cromatina de estas células la inmunoprecipitamos con los anticuerpos contra p107, p130 utilizando como control negativo suero no inmune. Las regiones de los promotores de respuesta a E2F que amplificamos fueron las de los genes de *DHFR*, *CycA2*, *cdc6*, *p107* y *E2F1*. Utilizamos actina como control negativo ya que no está regulada por E2F.

A



B



C

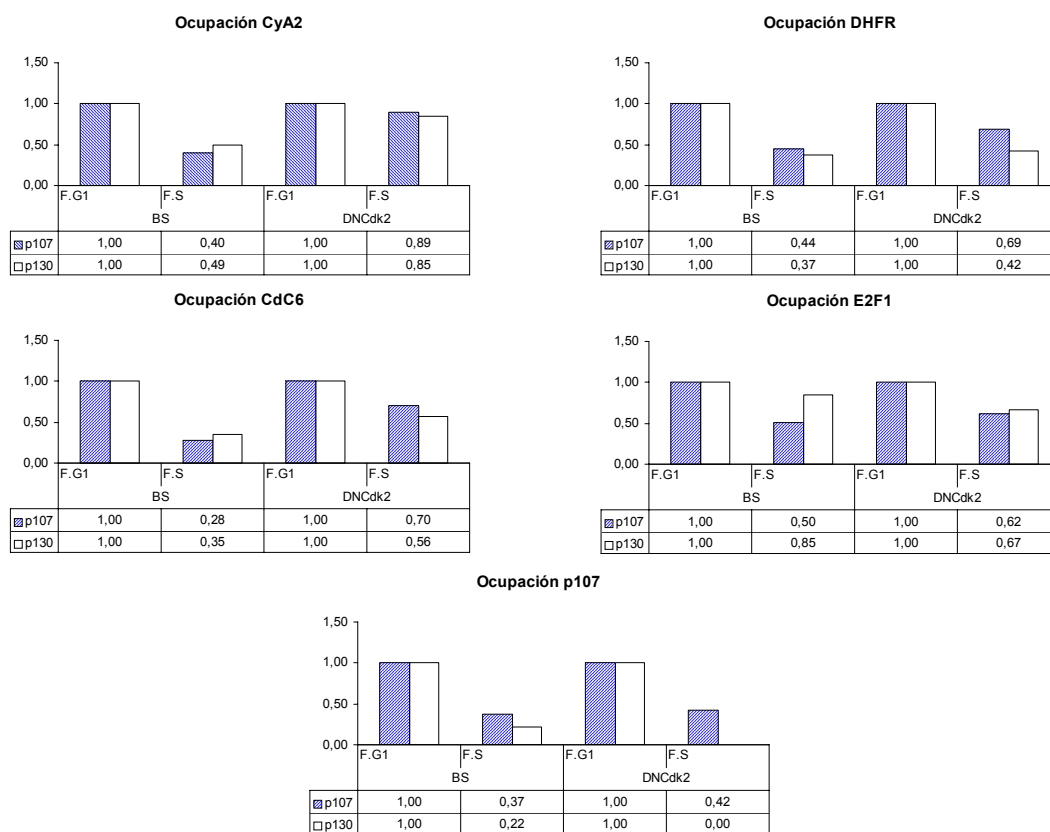


Figura 32. La transfección con el dncdk2 provoca una ligera disminución en la actividad transcripcional dependiente de E2F en Saos pero no en Si2. A) Saos y Si2 fueron cotransfectadas con el plásmido 3xE2F-luc, dncdk2 y con o sin p16 de ratón, 72 horas después se recogieron las células. La gráfica representa la media de las unidades de luciferasa, corregidas por β -galactosidasa de al menos tres experimentos independientes. B) El dncdk2 prácticamente no afecta en la ocupación de los genes dependientes de E2F por p107 y p130. Las células Saos fueron sincronizadas tras doble bloqueo de timidina y se recogieron a las 6 horas (fase S) y a las 18 horas (fase G1). Las células recogidas en fase G1 fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos p107, p130, E2F4 y suero preimmune como control. Se amplificaron mediante PCR los promotores de DHFR, Ciclina A2 cdc6, p107 y actina como control negativo. C) Las gráficas muestran la media de los valores obtenidos de densitometrar las bandas de cada una de las amplificaciones de los promotores.

La disociación de los promotores de p107 y p130 en fase S no parecía verse afectada en las células transfectadas con el dncdk2. Es decir, la inhibición de cdk2 no parecía afectar a la proliferación de las células *Rb* negativas ni tampoco a la capacidad de inactivar tanto p107 como p130.

Esto demostraba un hecho sorprendente, ya que las células tumorales no sólo eran capaces de inactivar a las proteínas de la familia de Rb en ausencia de actividad kinasa cdk4-6, sino que lo eran además en ausencia de actividad de cdk2.

En los últimos años se ha reevaluado el papel de las ciclinas y las cdks en células normales y tumorales. Desde los años 90 el estudio con ratones knockout ha demostrado que cdks y ciclinas que se consideraban indispensables para el ciclo celular no lo eran. Esto puso en evidencia el alto grado de redundancia que existe entre ellas, de forma que la falta de una cdk puede ser compensada por otra que cumpla su función, como el caso de los MEFs cdk4^{-/-}, cdk6^{-/-} donde cdk2 sustituye a cdk4. En las células tumorales *Rb* negativas la causa de que la inhibición de las actividades de cdk2 y cdk4 no provoque una parada en la proliferación, quizás se explique por la presencia de otra cdk que esté compensando sus funciones.

3.3 Estudio del efecto de la inhibición de distintas cdks sobre las células *Rb* negativas.

Para comprobar si las células *Rb* negativas se aprovechaban de la redundancia de los cdks para proliferar, decidimos inhibir los otros posibles cdks solos o en combinación. Para poder estudiar el efecto a nivel transcripcional de las distintas cdks, decidimos cotransfectar las SaOS2 y Si2 con los distintos dominantes negativos de las principales cdks (cdk1, cdk2 y cdk3) junto con el promotor 3xE2F unido al gen *reporter* de luciferasa. Así si alguno de estos dominantes negativos fuera importante tanto en la inactivación de p107 como la de p130, esto provocaría una disminución en la actividad transcripcional de E2F que se vería reflejada en una disminución en las unidades de luciferasa. Además Si2, al tener el complejo cdk4 activo, se podría esperar que el efecto de la inactivación de alguna de estas cdks fuera menos apreciable que en SaOS2, ya que cdk4 podría estar compensando de alguna manera su función (**figura 33**).

Como podemos ver en la **figura 33B** los datos resultantes del ensayo luciferasa muestran que las células sin p16 parecen ser menos sensibles a la inhibición de las cdks que las SaOS2, donde se aprecia un mayor grado de disminución de la actividad transcripcional en presencia de los dncdks. Esta diferencia se reduce cuando cotransfectábamos a la vez los dominante negativo de

cdk1, 2 y 3; de forma que en ese momento es cuando se apreciaba una mayor disminución de la actividad luciferasa del promotor 3xE2F tanto en SaOS2 como en Si2. Esto podía indicar que en la regulación de las células *Rb* negativas existía un alto grado de redundancia entre las distintas cdk's, sin que hubiera ninguna imprescindible.

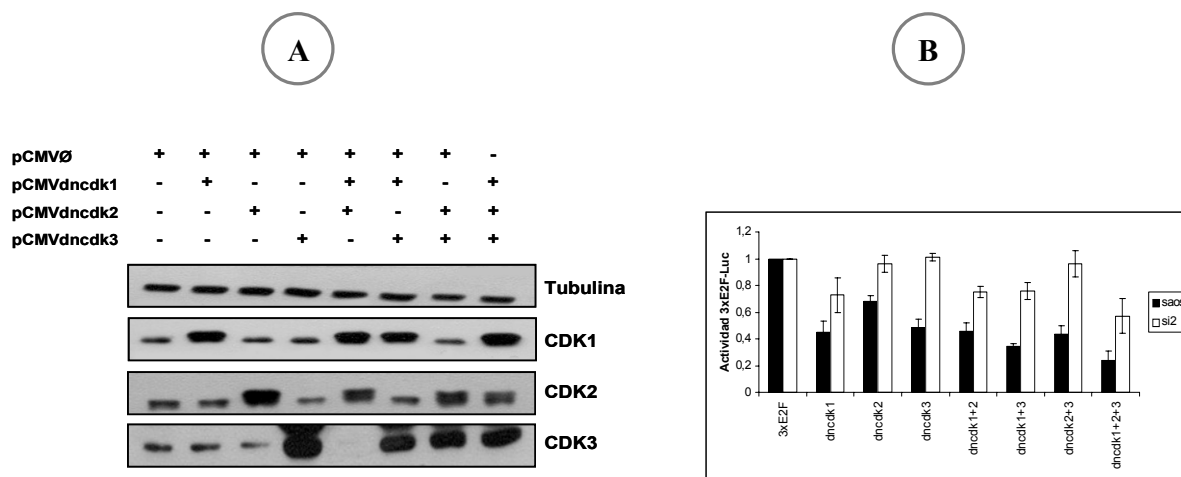


Figura 33. Los dominantes negativos de cdk1, cdk2 y cdk3 sobre la actividad E2F, provocan un mayor efecto en Saos que en Si2. Las células Saos y Si2 fueron transfectadas de forma transitoria con los dncdk (1,2 y 3) junto con el promotor 3xE2F y con un vector de expresión de β-galactosidasa. 48 horas después de la transfección las células fueron recogidas y analizadas. A) Western blot de las células transfectadas con los distintos dncdks utilizando anticuerpos específicos para cdk1, cdk2, cdk3 y como control de carga α-tubulina B) Se midió la actividad luciferasa y se normalizó respecto a la actividad β-galactosidasa. La gráfica representa la media de al menos tres experimentos independientes.

Hasta hace unos pocos años, para el estudio del papel de las cdk's en el ciclo se utilizaban principalmente los dominantes negativos contra esas proteínas, que ayudaron a caracterizar su función. Así por ejemplo se caracterizaron a cdk2, cdk3 y cdk4 como reguladores esenciales para la transición G1/S en el ciclo celular de mamíferos (Meyerson et al 1992; Heuvel y Harlow, 1993; Hofmann y Livingston, 1996). Sin embargo, es muy probable que el efecto causado por estos dominantes negativos esté asociado a su interacción con otras proteínas del ciclo, más que a un efecto directo de los dominantes negativos. Actualmente estudios más específicos con siRNAs y con ratones Knockout, sugieren que las ideas establecidas sobre el

papel de estas cdk2 en el ciclo pueden estar equivocadas. Para conocer el efecto real que la pérdida de las distintas actividades de las cdk2 supondría en el ciclo de las células *Rb* negativas con diferentes niveles de p16, decidimos inhibir a estas proteínas con siRNAs específicos.

3.3.1 Estudio del efecto del siRNA contra cdk2 en células con y sin p16.

La utilización de un siRNA específico para la inhibición de cdk2 ya había sido descrita en una reciente publicación, en la que se describía cómo en células tumorales la actividad de cdk2 era también innecesaria para la proliferación celular. (Osamu y McCormick., 2003).

En nuestro caso, los resultados con el *dncdk2* sugerían que esta cdk no parecía importante para la regulación del ciclo de nuestras células. Para verificar esto, dado que se podía tratar de un artefacto provocado por el *dncdk*, inhibimos la proteína mediante un siRNA sintético usando como control un siRNA de secuencia aleatoria. Para conseguir el mayor grado de inhibición posible necesitábamos un método que nos asegurara un elevado porcentaje de transfección. Por esto decidimos introducir el siRNA contra cdk2 mediante electroporación. Una vez electroporadas las SaOS2 y las Si2, se esperó 3 días para analizar el efecto del siRNA (tiempo optimizado en el que se alcanza el mayor grado de inhibición).

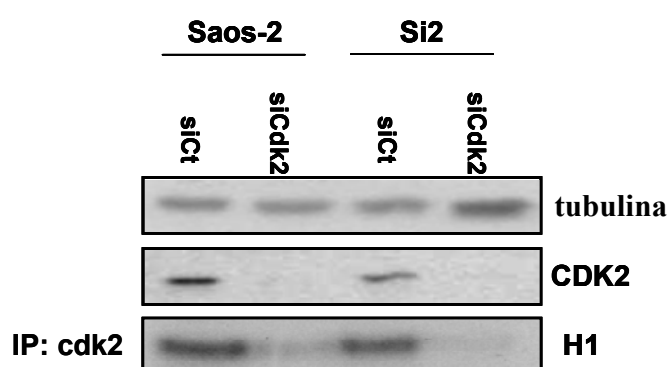


Figura 34. Efecto del siRNA contra cdk2 endógeno. Las células Saos y Si2 fueron electroporadas con 1,5 μ g de siRNA contra cdk2 y el siRNA contra una proteína control. 3 días después se recogieron los extractos proteicos que posteriormente fueron analizados mediante western blot de cdk2: Los niveles de la proteína tras la electroporación del siRNA prácticamente son indetectables, se utilizó α -tubulina como control de carga. Ensayo quinaasa de cdk2: 50 μ g de extracto fue inmunoprecipitado con anti-cdk2, los complejos precipitados fueron incubados con histona H1 y (α -32p) ATP. La actividad quinaasa de las células electroporadas con el siRNA de cdk2 tiene una actividad muy reducida.

La comprobación de la eficiencia de este siRNA la realizamos mediante western blot (**figura 34**) donde se ve que la depleción de cdk2 es prácticamente completa en los dos tipos celulares. Significativamente, esta disminución también afecta a los niveles de actividad asociados a cdk2 que son prácticamente inexistentes como se ve en el ensayo kinasa. Esto demostraba que la inhibición del siRNA no sólo afectaba a la expresión de la proteína, sino también a su actividad, punto importante si queríamos ver alguna consecuencia derivada de esta inhibición.

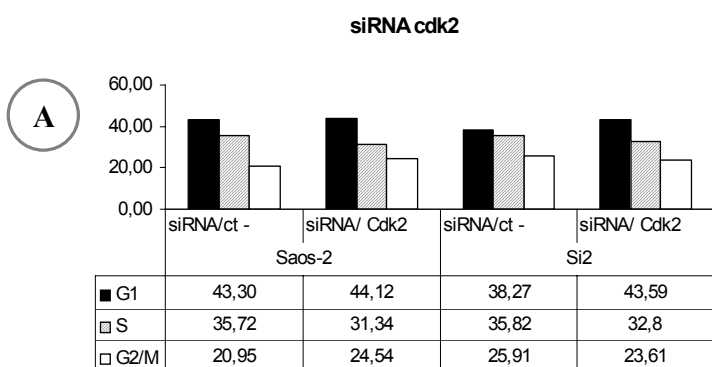
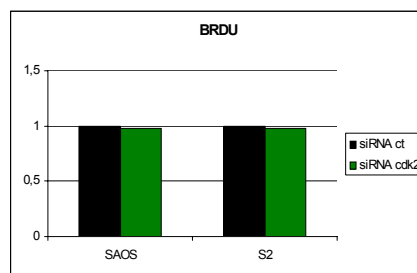
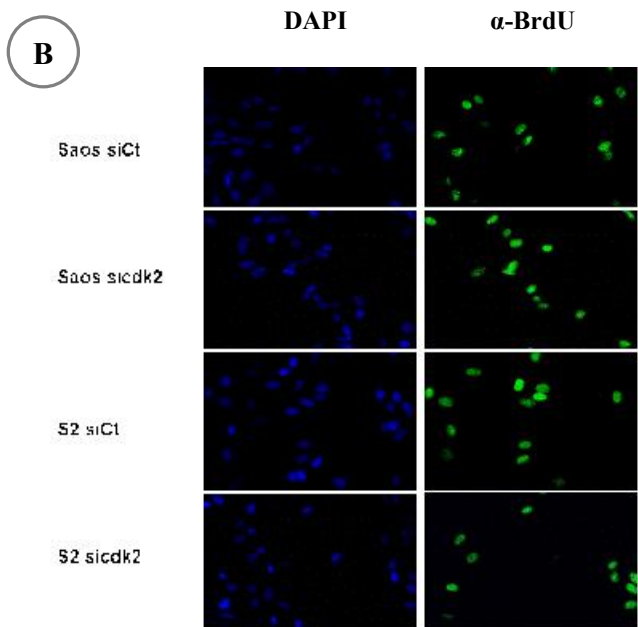


Figura 35. La proliferación celular no se ve afectada tras la inhibición de cdk2. A) Análisis de las células electroporadas recogidas y analizadas por citometría de flujo 3 días después. B) Inmunofluorescencia de la incorporación de Brdu. Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por DAPI, como control utilizamos un siRNA contra proteínas no relevantes. La gráfica es una representación de los experimentos realizados de la incorporación de Brdu.



Como en el estudio con el dominante negativo contra cdk2, decidimos estudiar las posibles consecuencias de la inhibición de cdk2 en ausencia o no de p16. Esto lo analizamos en primer lugar mediante citometría de flujo. Nuevamente, como en el caso del dncdk2 no apreciamos ningún efecto significativo, siendo los perfiles analizados tanto en SaOS2 como en Si2 bastante similares. También analizamos el porcentaje de células que incorporaban BrdU en SaOS2 y en Si2. Los datos obtenidos no mostraron disminución en la incorporación en ninguno de los dos casos, lo que finalmente nos permitía llegar a la misma conclusión que en el estudio con el dncdk2, es decir que en estas células la actividad de cdk2 no parece ser necesaria.

Todos estos datos demostraban en células *Rb* negativas tanto la actividad de cdk4 como la de cdk2 no son limitantes para la progresión del ciclo celular. Esto daba lugar a nuevas preguntas a la hora de estudiar cómo se comportaban estas células y cuál era su mecanismo de regulación.

3.3.2 Estudio del efecto del siRNA contra cdk3 en células con y sin p16.

Hasta hace unos años cdk3, al igual que cdk2, se había descrito como una proteína imprescindible para la fase G1 del ciclo, ya que la expresión del dominante negativo de cdk3 bloqueaba a las células en fase G1 (Van den Heuvel et al., 1993). Cdk3 puede formar complejos con ciclina E promoviendo la entrada en fase S de células quiescentes de forma tan efectiva como cdk2 (Connell-Crowley et al., 1998). Hoy en día se ha visto que en ratones de laboratorio cdk3 está ausente, esto es debido a una mutación espontánea que no parece afectar al fenotipo de estos animales.

En nuestro caso para inhibir a cdk3 utilizamos siRNA sintéticos específicos contra esta proteína. Para probar su efectividad se transfectó mediante electroporación, junto con un siRNA control, a las SaOS2 y a las Si2. Después de esperar 4 días (tiempo en el que se alcanza el mayor grado de inhibición) se recogieron las células para su posterior análisis.

Mediante western blot analizamos la inhibición de cdk3 en SaOS2 y Si2. El anticuerpo utilizado para la detección de cdk3 ya había demostrado ser específico en la **figura 33**, cuando transfectábamos a las células con los dominantes negativos de cdks. Este anticuerpo, en la cotransfección de los tres cdks, sólo detectaba al dncdk3 sobreexpresado y no reconocía la

sobreexpresión ni del *dncdk1* ni *dncdk2*. Con respecto al siRNA como se puede ver en la **figura 36** detectamos una fuerte inhibición de *cdk3* con respecto al control. Para comprobar que dicha inhibición provocaba una disminución en la actividad de esta proteína realizamos un ensayo kinasa. Como podemos ver en la **figura 36** la disminución de la actividad de *cdk3* es patente, aunque hay que resaltar que la actividad total de esta proteína es inferior a la detectada en el caso de la inhibición de *cdk2*.

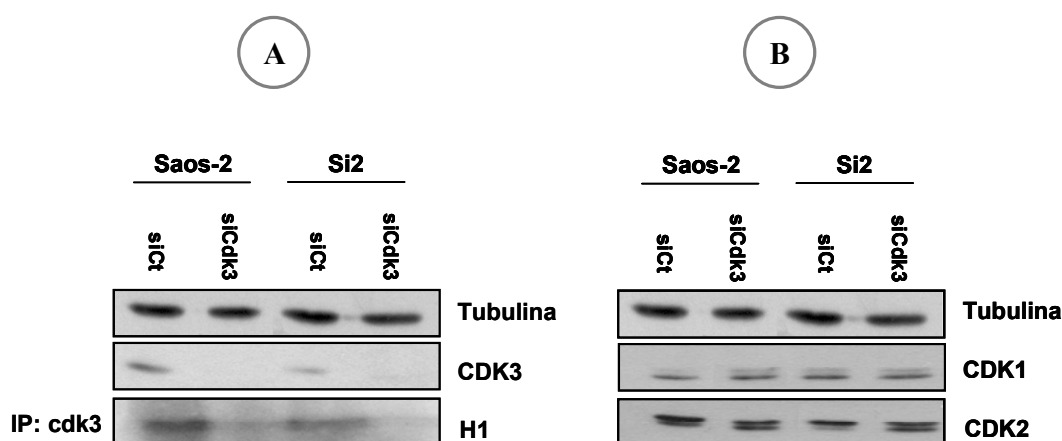


Figura 36. Efecto del siRNA contra *cdk3* endógeno. Las células SaOS2 y Si2 fueron electroporadas con 1,5µg de siRNA contra *cdk3* y proteína control, 4 días después se recogieron y posteriormente fueron analizadas mediante. A) Western blot y ensayo kinasa de los extractos proteicos de las células electroporadas con el siRNA*cdk3*. Analizamos los niveles de *cdk3* endógeno mediante la utilización de anticuerpo contra *cdk3* específico. Como control de carga se utilizó α -tubulina. Para el ensayo kinasa de *cdk3* se inmunoprecipitó 50µg de extracto con anti-*cdk3*. Los complejos precipitados fueron incubados con histona H1 y (α -32p)ATP. B) Los niveles de *cdk1* y *cdk2* no sufren reducciones por lo que la disminución de *cdk3* es específica. Analizamos los niveles de *cdk1* y *cdk2* mediante anticuerpos específicos α -*cdk1* de ratón o α -*cdk2* de conejo. Se utilizó el anticuerpo α -tubulina como control de carga

Para comprobar que la disminución de la proteína de *cdk3* era específica y dado que estos siRNAs no habían sido testados, realizamos un western blot contra *cdk1* y *cdk2* que presentan una alta homología con esta proteína. Los niveles de estas proteínas no se veían afectadas tras la inhibición de *cdk3* lo que confirma la especificidad de la inhibición del siRNA. Hay que resaltar un aumento de la banda activa de *cdk2* que corresponde a la de menor peso. Esto supone una evidencia a una posible redundancia en el ciclo de estas células donde *cdk2* puede sustituir a *cdk3* para la continuidad de la proliferación celular.

Una vez comprobada la eficiencia de la inhibición del siRNA, analizamos mediante citometría de flujo a las SaOS2 y Si2 electroporadas con el siRNA de cdk3 o con el siRNA control. Los resultados muestran que la inhibición de esta cdk no provoca ningún efecto significativo en la distribución de las distintas fases del ciclo celular. También realizamos un ensayo de incorporación de BrdU donde no se aprecia ninguna variación significativa de las células con el siRNA control frente a las que tienen inhibido cdk3. Los resultados nos permitían concluir que cdk3 no es imprescindible en la progresión del ciclo celular de células *Rb* negativas.

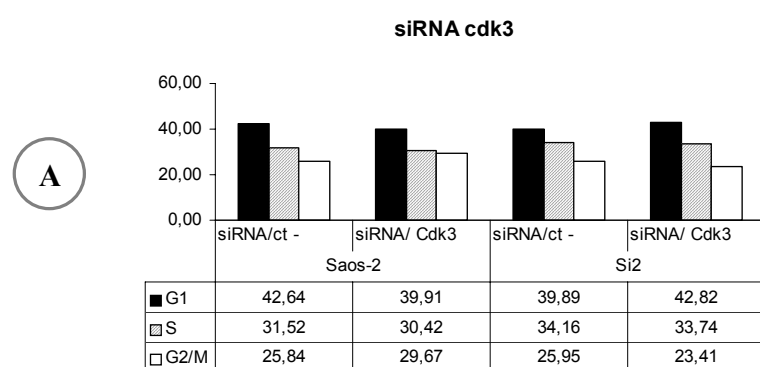
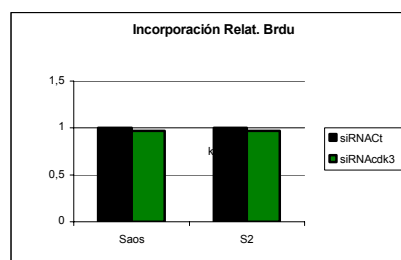
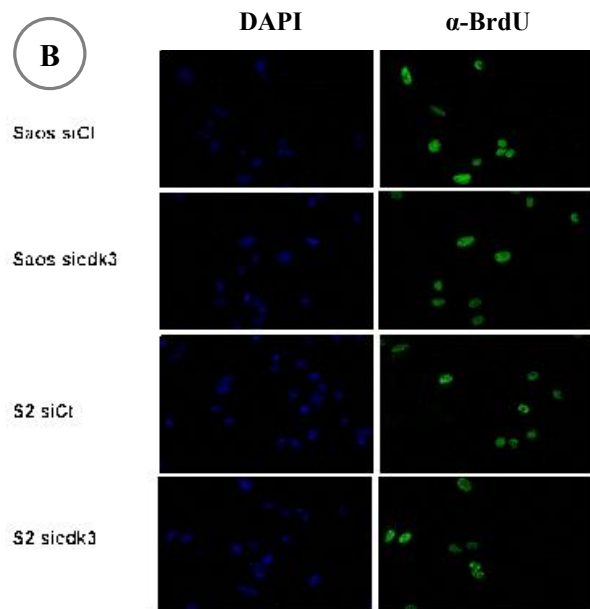


Figura 37. La proliferación celular no se ve afectada tras la inhibición de cdk3.

A) Análisis de las células electroporadas, recogidas y analizadas por citometría de flujo 4 días después. B) Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU. Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por DAPI, como control utilizamos un siRNA contra proteínas no relevantes. La gráfica es una representación de los experimentos realizados de la incorporación de BrdU.



Como en el caso de *cdk2*, la ausencia de actividad de *cdk3* en el ciclo de las células *Rb* negativas no provoca ningún efecto en la proliferación de estas células, por lo que ni *cdk4-6*, ni *cdk2* ni *cdk3* parecen ser indispensables para su ciclo. Gracias a estudios con ratones knockout esto empieza a ser también evidente en células somáticas. Así se había empezado a pensar que ninguna *cdk* era realmente necesaria para la proliferación, dado su capacidad de unirse a distintas ciclinas, lo que les permite ejercer funciones redundantes. Se sabe que *cdk2* se puede unir a ciclina B y ciclina D, mientras que *Cdk3* se puede unir a ciclina E, ciclina A y ciclina C (Harper et al., 1995; Ren y Rollins, 2004; Malumbres et al., 2004; Cai et al., 2006). Sin embargo, un reciente estudio ha desmentido que la redundancia entre *cdks* sea total, ya que después de eliminar *cdk2*, *cdk3*, *cdk4* y *cdk6* las células son capaces de proliferar gracias a la presencia de *cdk1*, y en cambio la eliminación de tan sólo *cdk1* bloquea completamente la proliferación celular (Santamaría et al., 2007).

3.3.3 Estudio del efecto de la reducción de *cdk1* en células con y sin p16.

Dado el papel fundamental que se le atribuye a *cdk1* en la regulación del ciclo, quisimos estudiar el posible papel de *cdk1* en nuestras células *Rb* negativas con y sin p16, para comprobar si la actividad de *cdk1* era necesaria para su proliferación. En mamíferos, según el modelo clásico, el complejo *cdk1/ciclina B1* regula la transición entre G2/M mediante la fosforilación de substratos responsables de la correcta reorganización estructural de la envuelta nuclear, del huso mitótico o del citoesqueleto de actina (Payton et al., 2006).

Para la inhibición de *cdk1* en nuestras células utilizamos un siRNA sintético contra la proteína endógena, que introdujimos mediante electroporación junto con un siRNA control. Las células se recogieron 4 días después (tiempo en el que se alcanza el mayor grado de inhibición). Los extractos fueron analizados mediante western blot y ensayo kinasa. Los resultados muestran un alto grado de inhibición de *cdk1*, tanto en células SaOS2 como en Si2. El ensayo kinasa demostró que la inhibición de *cdk1* además causaba una disminución de su actividad. Es importante resaltar esto, ya que niveles bajos de la proteína podían ser suficientes para mantener una actividad normal, si el factor limitante de la actividad del complejo fuera la disponibilidad de ciclina o alguna modificación postraduccional del *cdk*. También comprobamos los niveles de la proteína *cdk2*, para comprobar que el siRNA no afectaba a su expresión dado el alto grado de

homología que hay entre ellas. La expresión de *cdk2* permanece inalterada, demostrándose así la especificidad del siRNA contra *cdk1* (**figura38**).

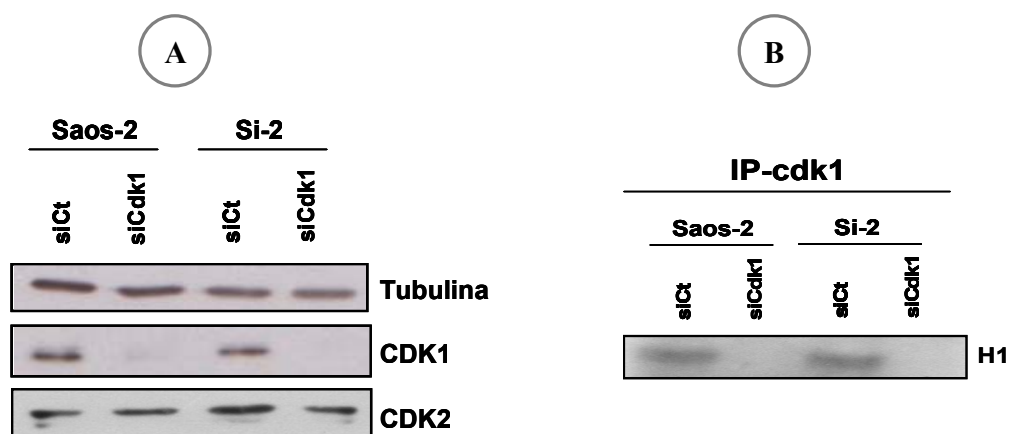


Figura 38. Efecto del siRNA contra *cdk1* endógeno. Las células SaOS2 y Si2 fueron electroporadas con 1,5µg de siRNA contra *cdk1* y proteína control, 4 días después se recogieron y posteriormente fueron analizadas mediante A) Western blot de los extractos proteicos de las células electroporadas con el siRNAcdk1. Analizamos los niveles de *cdk1* y *cdk2* mediante anticuerpos específicos α -*cdk1* o α -*cdk2*. Se utilizó el anticuerpo α -tubulina como control de carga. B) Ensayo kinasa de *cdk1*. 50µg de extracto fue inmunoprecipitado con anti-*cdk1*. Los complejos precipitados fueron incubados con histona H1 y (α -32p)ATP.

Una vez obtenida la disminución de *cdk1* y de su actividad, pasamos a ver las posibles consecuencias de esto sobre el ciclo de estas células. Para ello analizamos su perfil de proliferación mediante citometría de flujo, así como la incorporación de BrdU (**figura 39**). La distribución del ciclo tras la inhibición de *cdk1*, sorprendentemente no mostraba grandes diferencias respecto a las células con *cdk1* normal, tan solo un ligero aumento de la fase G2/M. Esto parecía indicar que la actividad de *cdk1* debía estar compensada, al no haber un aumento notable en la fase G2/M. Los resultados sobre la síntesis de ADN mediante la incorporación de BrdU no mostraban ningún efecto significativo en comparación con las células control. En resumen, la inhibición de *cdk1* no paraba a las células en G2/M ni provocaba disminución de la síntesis de DNA. Esto claramente es distinto a lo descrito en células de ratón no transformadas, donde *cdk1* es indispensable. Esto prueba que las células no transformadas y las células

tumorales regulan su ciclo de forma distinta. En nuestro estudio de células tumorales *Rb* negativas, al igual que en otros casos, la actividad de cdk1 parece no ser necesaria.

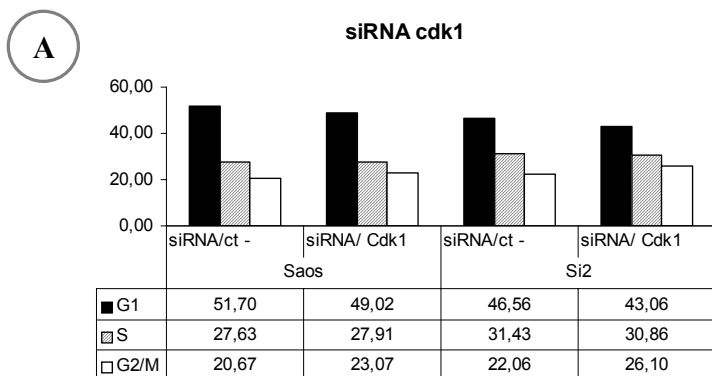
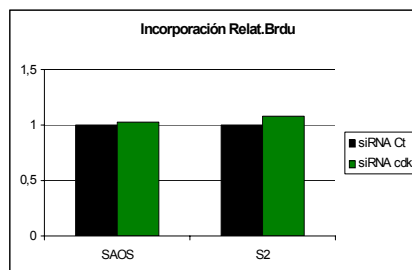
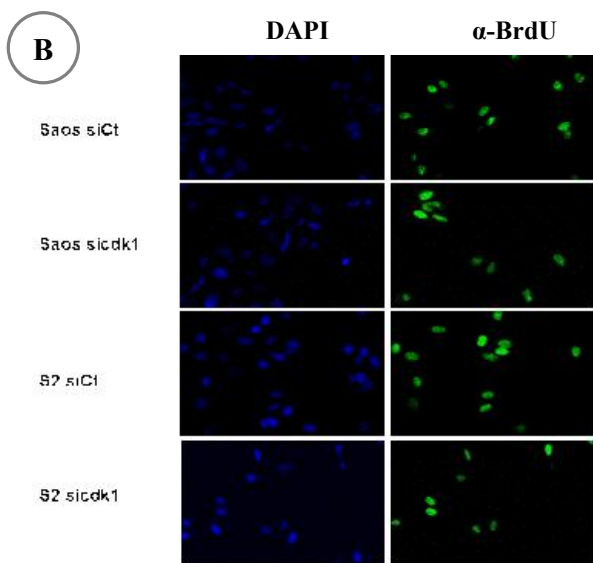


Figura39. La proliferación celular no se ve afectada tras la inhibición de cdk1. A) Análisis de las células electroporadas, recogidas y analizadas por citometría de flujo 4 días después. B) Inmunofluorescencia de la incorporación de Brdu. Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por DAPI, como control utilizamos un siRNA contra proteínas no relevantes. La gráfica es una representación de los experimentos realizados de la incorporación de Brdu.



Se conoce que cdk1 no se une solamente a ciclina B o a ciclina A, sino también a ciclina E, principal compañero de cdk2 y por lo tanto, en teoría, tanto cdk1 como cdk2 podrían compensarse la una a la otra (Kaldis y Aleem, 2005). En el caso de cdk2 se ha descrito recientemente su capacidad de unirse a ciclina B1 en ausencia de cdk1 (Cai et al., 2006), lo que explicaría cómo las células pueden pasar G2/M cuando cdk1 no está presente. Todo esto parece

indicar una fuerte redundancia entre estas dos cdk's, por lo que era posible que una doble inhibición fuera más efectiva que la inhibición de cada una por separado. Para comprobar si esto era así, decidimos inhibir tanto cdk1 como cdk2 y así poder estudiar el efecto de la reducción de la actividad de estas cdk's en nuestras células tumorales con y sin p16.

3.4 Estudio del efecto de la reducción de cdk1 y cdk2 en células con y sin p16.

Parece pues que tanto la inhibición individual de cdk1 como la de cdk2 pueden ser compensadas. Sin embargo, existía la posibilidad de que la inhibición de las dos mostrara un fuerte efecto antiproliferativo. Para saber si esto era así decidimos inhibir estas dos proteínas utilizando los mismos siRNAs sintéticos de los anteriores estudios, mediante dos electroporaciones independientes en dos días consecutivos, primero con siRNA de cdk1 y al día siguiente con el siRNA de cdk2. Cuatro días después la primera electroporación las células fueron recogidas para su posterior análisis (**figura 40**).

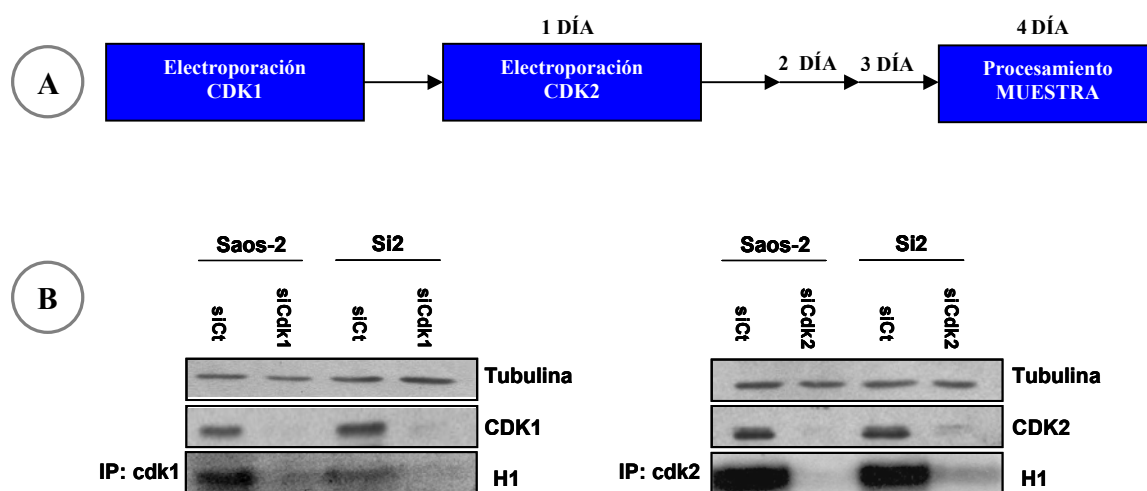


Figura 40. Doble inhibición de cdk1 y cdk2 en SaOS2 y Si2. A) Esquema experimental de la electroporación con los dos siRNAs. B) Las células SaOS2 y Si2 fueron electroporadas con 1,5µg de siRNA contra cdk1 y cdk2, 4 días después se recogieron los extractos proteicos que posteriormente fueron analizadas mediante western blot. Analizamos los niveles de cdk1 y cdk2 mediante anticuerpos específicos α -cdk1 de ratón o α -cdk2 de conejo, se utilizó el anticuerpo α -tubulina como control de carga. El Ensayo kinasa de cdk1 y cdk2 se realizó inmunoprecipitando 50µg de extracto con un anticuerpo específico contra cdk1 y cdk2, los complejos precipitados fueron incubados con histona H1 y (α -32p)ATP.

La reducción de los niveles endógenos de las proteínas cdk1 y cdk2 al igual que su actividad los analizamos mediante western blot y ensayo kinasa. Como podemos ver en la figura la electroporación de los dos siRNAs no disminuyó la eficacia de la inhibición, dado que los niveles de las dos proteínas se hallan prácticamente eliminados. Nuevamente nos aseguramos de que la actividad de las dos cdks estuviera disminuida mediante un ensayo kinasa para asegurarnos de que la inhibición obtenida fuera funcionalmente significativa.

Comenzamos la caracterización del efecto de la doble ablación de cdk1 y cdk2 en SaOS2 y en Si2, estudiando la citometría una vez pasados los 4 días. Comparado con la reducción de cdk1 o cdk2, la combinación de ambas cdks mostró consecuencias evidentes en la distribución del ciclo de nuestras células. La inhibición de las dos cdks provocó un fuerte aumento en las fases G2/M, mucho mayor que la detectada en la reducción de cdk1. También se aprecia una disminución en la fase S aunque menos aparente. Parece pues que la inhibición de estas dos actividades es importante para nuestras células. Para ver si la síntesis de DNA también estaba afectada, analizamos a las células tras la inhibición mediante incorporación de BrdU. Significativamente, la inhibición de cdk1 y cdk2 en comparación con las inhibiciones individuales de las cdks, provoca una disminución significativa de la proliferación en SaOS2, mientras que en la población Si2 no se aprecia este efecto.

La inhibición combinada de cdk1 y cdk2 provoca efectos mucho más evidentes que la inhibición por separado de las cdks. Por un lado la fuerte acumulación en G2/M de las células con y sin p16, sugiere que ambas cdks contribuyen al control de G2/M en este tipo celular. Además la disminución en la síntesis de DNA detectada en la incorporación de BrdU en SaOS2 sugiere que cdk1 y cdk2 también son importantes para la transición G1/S y/o para la progresión de la fase S. En la población Si2 la disminución de la síntesis de DNA no es tan aparente. Esto podría ser debido a que cdk4 actúa en la transición G1/S y podría estar supliendo la función de cdk1 y cdk2.

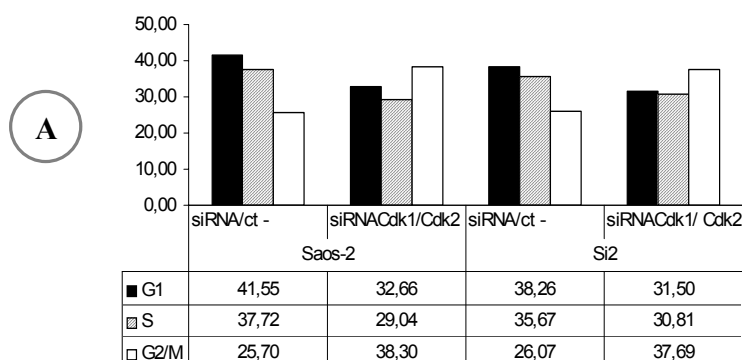
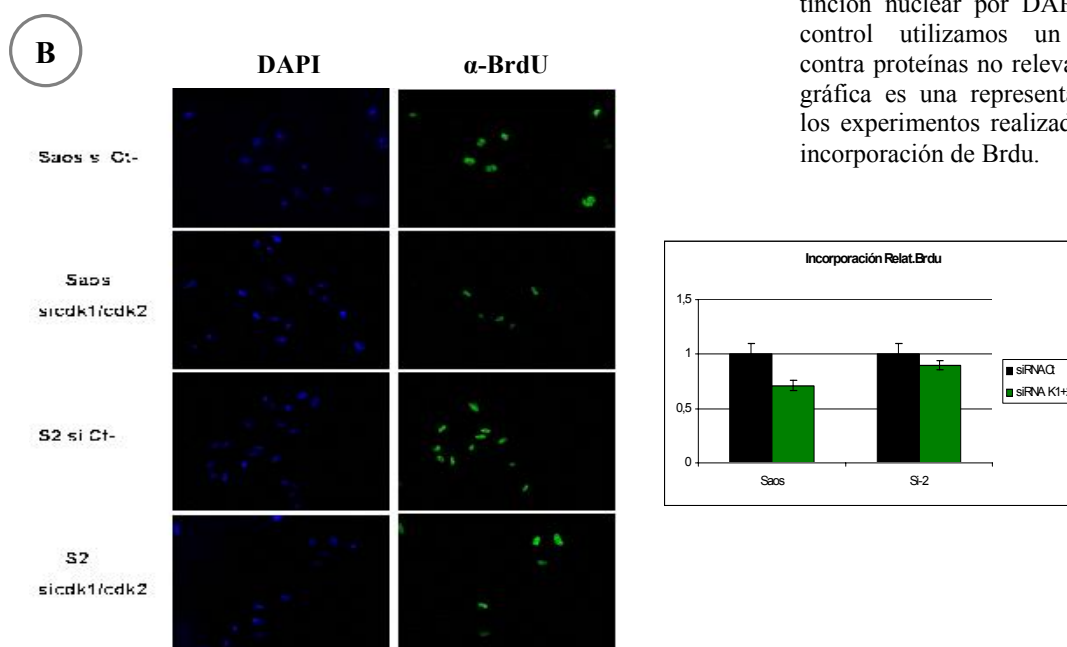


Figura 41. Efecto en la proliferación y el ciclo celular tras la inhibición de cdk1 y cdk2. A) La síntesis de ADN en las células con p16 se ve reducida tras la inhibición de las dos cdk's. A) Análisis de las células electroportadas, recogidas y analizadas por citometría de flujo 4 días después. B) Inmunofluorescencia de la incorporación de Brdu. Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por DAPI, como control utilizamos un siRNA contra proteínas no relevantes. La gráfica es una representación de los experimentos realizados de la incorporación de Brdu.



La reducción de cdk1 y cdk2 en SaOS2 no provoca una parada completa de la síntesis de DNA. Esto puede indicar que otra cdk puede desempeñar la función de cdk2 en el paso de G1/S en ausencia de cdk4. Por esto nos planteamos que quizás la actividad de cdk3 fuera suficiente para que cierto porcentaje de células fuera capaz de entrar en fase S en ausencia de las actividades de cdk1 y cdk2, dado su capacidad de formar complejo con ciclina E y ciclina A.

Hasta el momento los resultados obtenidos en nuestras células muestran que su regulación no se corresponde con el modelo clásico de regulación del ciclo, que asigna a las cdk's papeles indispensables en etapas determinadas del ciclo. Hemos visto que parece existir una gran redundancia entre las principales cdk's dado que es necesaria una combinación en la inhibición de distintas cdk's para afectar a la proliferación celular en nuestras células. Así el efecto observado con el inhibidor de cdk's, la roscovitina no parece deberse a la inhibición de una determinada cdk, sino más bien al conjunto de la inhibición de varios cdk's. Está descrito que este inhibidor químico inhibe principalmente a cdk1, cdk2 y cdk3, al menos a las concentraciones a las que en nuestras células provocaba parada en G1 y G2/M (50 μ M). La necesidad de inhibir varios cdk's para afectar a la proliferación de estas células es consistente también con nuestra observación de que la mayor disminución a nivel transcripcional dependiente de E2F se producía en SaOS2 y Si2 cuando cotrasfectábamos los tres dominantes negativos de cdk's junto con el promotor 3xE2F. Intentamos pues inhibir el otro posible cdk de G1, cdk3 y observar los efectos de la inhibición de cdk1, cdk2 y cdk3 sobre el ciclo de SaOS2 y Si2.

4. Efecto de la combinación de la inhibición de cdk1, cdk2 y cdk3 sobre el ciclo en células con y sin p16.

Para comprobar cómo podía afectar a la regulación de nuestras células el efecto de la combinación de la inhibición de cdk1, 2 y 3, decidimos realizar dicha inhibición utilizando en primer lugar los siRNA que ya habían sido utilizados para estas proteínas.

4.1 Efecto de la inhibición de cdk1, cdk2 y cdk3 mediante la utilización de siRNA.

Para poder inhibir a las cdk's utilizando los siRNAs utilizados hasta el momento, recurrimos al protocolo experimental que se detalla en la **figura 42**.

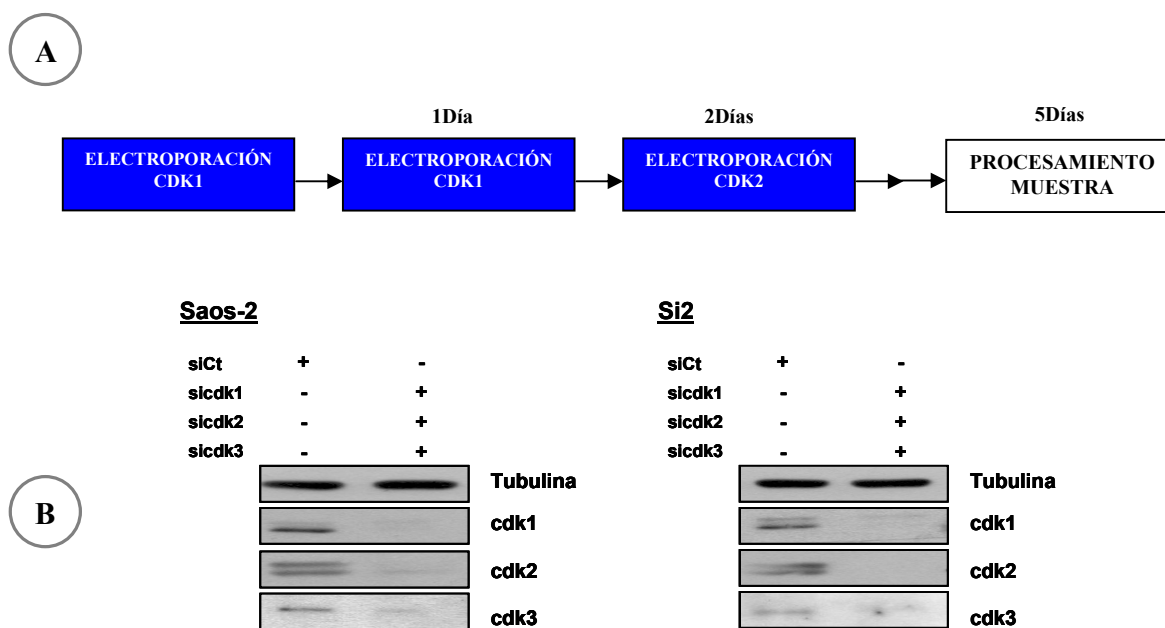


Figura 42. Inhibición de $cdk1$, $cdk2$, $cdk3$ tras ser electroportadas con los tres siRNA. A) Esquema experimental de la electroportación con los siRNAs. B) Western blot de las células SaOS2 y Si2 electroportadas con $1,5\mu\text{g}$ de siRNA contra $cdk1$, $cdk2$ y $cdk3$ y recogidas 5 días después. Analizamos los niveles de $cdk1$, $cdk2$ y $cdk3$ mediante anticuerpos específicos α - $cdk1$ de ratón, α - $cdk2$ de conejo y α - $cdk3$ de conejo, se utilizó el anticuerpo α -tubulina como control de carga.

La detección de la inhibición de las proteínas la realizamos por western blot. Observamos una reducción clara en los niveles de las proteínas, aunque hay que destacar una eficacia menor que en casos anteriores.

Una vez comprobada la inhibición analizamos la distribución del ciclo de la célula por citometría de flujo. Sorprendentemente y pese a lo esperado, las células se comportaban de forma muy similar a cuando se les eliminaba sólo $cdk1$ y 2 . Las células se acumulaban en G2/M mientras en la fase G1 no se apreciaba ningún aumento.

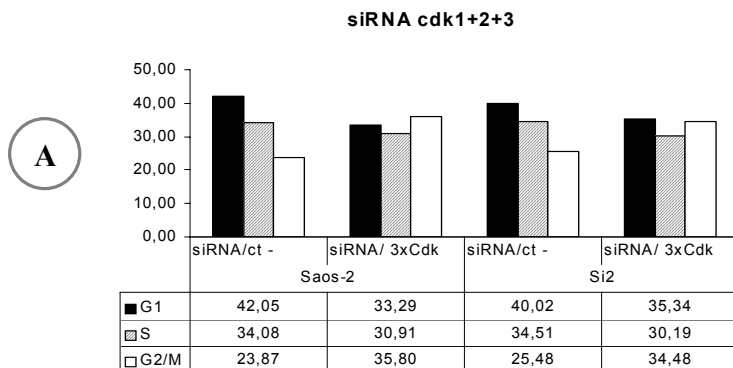
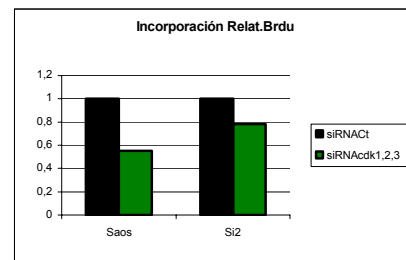
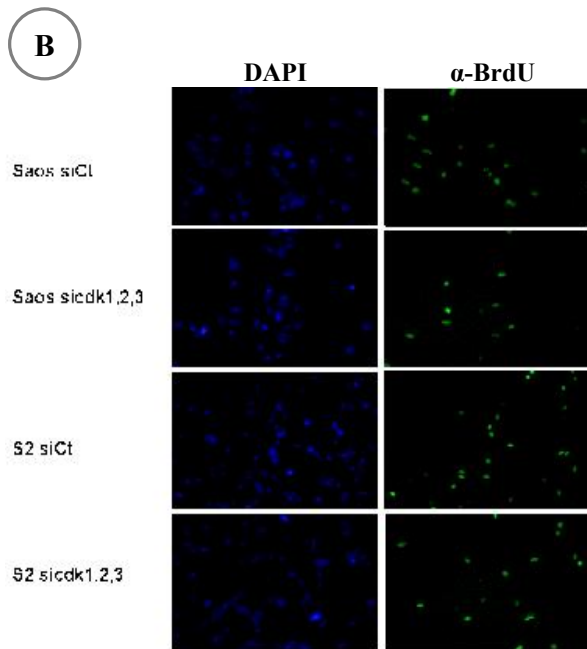


Figura 43. El efecto en la proliferación del ciclo celular tras la depleción de cdk1, 2 y 3 era equivalente al observado durante la eliminación de cdk1 y 2. A) Análisis de las células electroporadas, recogidas y analizadas por citometría de flujo 5 días después. B) Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU. Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por DAPI, como control utilizamos un siRNA contra proteínas no relevantes. La gráfica es una representación de los experimentos realizados de la incorporación de BrdU



El estudio de la síntesis de DNA después de la inhibición de las tres cdk, lo realizamos mediante incorporación de BrdU. El análisis de los datos reveló que si bien había una aparente disminución de la en la síntesis, las células no estaban paradas completamente. Hay que destacar que nuevamente en el caso de la población Si2, esta disminución no era tan marcada.

Los resultados analizados muestran efectos muy parecidos a los observados con la inhibición de cdk1 y cdk2. Quizá haya que resaltar una mayor inhibición en la síntesis de DNA pero en ningún caso el cese completo de la misma.

La explicación de la falta de efecto podía deberse a que en este caso, las electroporaciones sucesivas no habían sido tan efectivas y las actividades residuales de las proteínas fueran suficientes para continuar con la proliferación y el ciclo celular. En función de los resultados obtenidos decidimos modificar el planteamiento inicial y inhibir a las proteínas mediante la transfección con el inhibidor de cdks p27.

4.2 Efecto de la sobreexpresión de p27 en células con y sin p16.

Hasta la fecha se sabe que la sobreexpresión de p27 provoca la inhibición de la proliferación de un gran número de células. Hasta hace poco dicha inhibición era explicada principalmente por su capacidad para unirse e inhibir la actividad de cdk2. Hoy en día se ha comprobado que p27 no solo regula a cdk2, sino que es capaz de unirse e inhibir a cdk1 (Kaldis y Aleem, 2005) y a cdk3 (Braun et al., 1998). Dada su capacidad para inhibir a las tres cdks, decidimos sobreexpresar esta proteína en las células *Rb* negativas y comprobar los efectos de esta sobreexpresión.

Para obtener altos niveles de la proteína dentro de las células, transfectamos mediante electroporación un plásmido que expresaba p27. Los niveles de la proteína sobreexpresada se comprobaron mediante western blot. Parecía que los niveles de transfección eran menores en Si2, esto podía causar un distinto grado de inhibición de las cdks en los dos tipos celulares. Para comprobar si la sobreexpresión de esta proteína era suficiente para provocar una inhibición de las cdks similar en las dos células, decidimos realizar un ensayo kinasa de cdk2. Como podemos ver en la **figura 44** los niveles de inhibición son similares. Así pues, consideramos que las posibles consecuencias de dicha transfección podían ser comparadas.

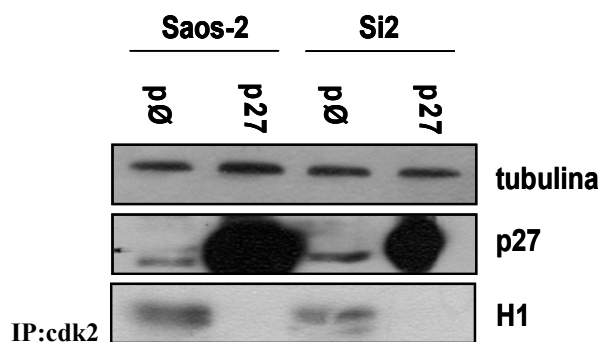
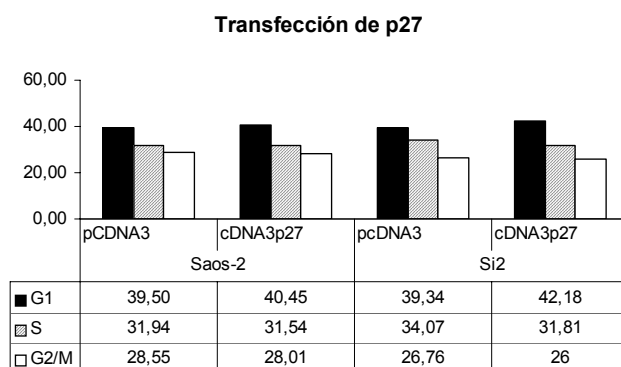


Figura 44. Transfección del inhibidor de cdk p27. Las células SaOS2 y Si2 fueron electroporadas con 5µg de pCDNA3p27 y como control pCDNA3Ø, 48 horas después se recogieron y posteriormente fueron analizadas mediante western blot y ensayo kinasa. Analizamos los niveles de p27 electroporado mediante la utilización de un anticuerpo específico contra p27 y como control de carga se utilizó α -tubulina. Para el ensayo kinasa de cdk2 se inmunoprecipitó 50µg de extracto con anti-cdk2, los complejos precipitados fueron incubados con histona H1 y (α -32p)ATP.

Para ver cómo afectaba la expresión de p27 a la progresión del ciclo en células con y sin p16, como en casos anteriores procedimos a analizar la distribución del ciclo celular por citometría de flujo. Nos encontramos que la distribución del ciclo de ambas células era similar al ciclo analizado en las células control. Por esto fue necesario cuantificar la síntesis de DNA para determinar si p27 causaba algún efecto en estas células. Este estudio lo realizamos mediante incorporación de BrdU. Nuevamente las SaOS2 mostraban una disminución significativa en la incorporación de BrdU, pero no completa. Esta disminución era similar a la hallada en la inhibición mediante siRNA de cdk1 y cdk2, o la obtenida cuando inhibíamos las tres cdks. En cuanto a las Si2 la disminución de la proliferación de nuevo no era tan aparente con respecto a las SaOS2.

A



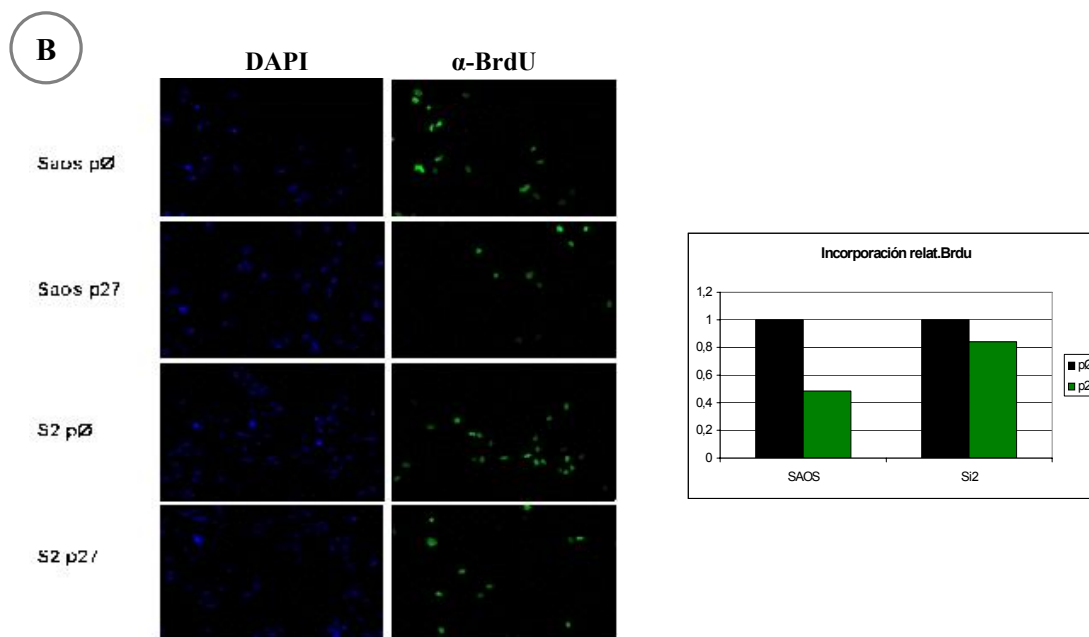


Figura45. El efecto en la proliferación del ciclo celular tras la transfección de p27. A) Análisis de las células electroporadas que fueron recogidas en el tiempo indicado y analizadas por citometría de flujo B) Las células SaOS2 y Si2 fueron electroporadas con 2 μ g pCDNA3 p27 o con el plásmido vacío, tras esperar 48 horas se les realizó la inmunofluorescencia de la incorporación de Brdu (verde). Las fotos de la izquierda corresponden a la tinción nuclear por DAPI, como control utilizamos el plásmido vacío. La gráfica es una representación de la incorporación de Brdu representativa de los experimentos realizados.

La transfección de p27 en los dos tipos celulares hace disminuir la síntesis de DNA de forma más efectiva en SaOS2 que en Si2. Esto podría ser explicado dado que las SaOS2 al no presentar actividad cdk4 por lo tanto serían más susceptibles a la inhibición por p27, todo lo contrario a lo que ocurría con las Si2 donde la actividad de cdk4 podría evitar la parada provocada por el inhibidor, dado que el complejo ciclina D3/cdk4 no es susceptible de ser inhibido por p27. Esto es consistente con otros datos obtenidos en este trabajo, donde las poblaciones sin p16 han mostrado mayor resistencia a disminuir su proliferación en condiciones inhibitorias de cdks como tras tratamiento con un inhibidor químico, por baja concentración de estímulos mitogénicos en el medio, o por inhibición directa de los cdks mediante siRNAs. Esto si bien podría ser responsable de la actividad de cdk4, también podría ser causado por alguna

acción de p16 independiente de esta cdk. Por esto, sería importante establecer el papel de la actividad de cdk4-6 en la resistencia a la inhibición de estas cdks.

Por otro lado hemos visto que si bien las células *Rb* negativas disminuyen su proliferación tras la sobreexpresión de p27, y de forma similar tras la inhibición conjunta de cdk1, cdk2 y cdk3 mediante siRNA, siguen proliferando. Esto implica que en células *Rb* negativas la ausencia de las actividades de estas cdks si bien provoca un efecto significativo no es suficiente para parar el ciclo. Esto que podría implicar la existencia de otros mecanismos que podrían sustituir las funciones de los cdks de G1/S en estas células. El estudio de esto es importante para el desarrollo de futuras terapias antitumorales, dado que estas células parecen comportarse de forma distintas a las células no transformadas, donde por ejemplo cdk1 ha demostrado ser indispensable, lo contrario que sucede en nuestras células. Así la combinación con estudios bioquímicos con siRNAs y estudios genéticos de las cdks usando como modelos ratones knockout o líneas tumorales, podrá ayudar a buscar diferencias significativas así como el papel real que desempeñan las cdks en el desarrollo tumoral y en la biología de las células no transformadas, para validar posibles blancos que ayuden a desarrollar inhibidores químicos más efectivos contra distintos tumores.

V-DISCUSIÓN

1. Alteraciones del ciclo celular en cáncer.

El estudio del ciclo celular ha aportado grandes descubrimientos sobre la biología de la célula cancerosa, y en concreto sobre los mecanismos que la diferencian de una célula normal. El esquema básico del ciclo celular se divide en cuatro fases: G1/S/G2/M. A grandes rasgos durante las fases S y M las células realizan dos eventos sin los cuales no podría llegar a término el ciclo celular: síntesis de una copia de su material genético (fase S) y dividir todos los componentes celulares entre dos células hijas (fase M). G1 y G2 representan los períodos de unión entre estas dos fases, durante las cuales las células se preparan para completar la fase S y M respectivamente. Cuando la proliferación celular cesa debido a señales específicas antimitogénicas o por la ausencia de señales mitogénicas las células salen del ciclo y entran en un estadio de no división denominado quiescencia (G0).

Uno de los procesos que a menudo está desregulado en el cáncer es el ciclo celular. Durante el proceso de oncogénesis se dan una serie de pasos en los que la futura célula cancerosa va encontrando barreras antioncogénicas y desarrollando formas de proliferar a pesar de ellas. Muchas de las alteraciones de este proceso oncogénico tienen lugar en los elementos que regulan la transición entre las fases G1/S.

La progresión entre G1/S está regulada de forma positiva por ciclinas/cdks y de forma negativa por los inhibidores de kinasas y por la familia de Rb. El gen *Rb1* es un gen supresor de tumores, que fue descrito por primera vez en un tumor maligno de retina denominado retinoblastoma. El estudio de este tumor data de hace más de 50 años. Por aquel entonces se descubrió que este tumor podía afectar a niños de forma esporádica, pero que también podía hacerlo de forma hereditaria (Falls y Neel, 1951). Posteriormente se hipotetizó que el retinoblastoma era el resultado de la mutación de los dos alelos del gen *Rb1*, dándose el primer paso para llegar al concepto de *Rb* como supresor tumoral (Knudson, 1971). Esta idea se afianzó cuando se clonó el gen *Rb* (Cavenee et al., 1983) y se identificó la mutación bialélica que tenía lugar en este gen, demostrándose que era la responsable de la formación del retinoblastoma (Dunn et al., 1988). Todo esto abrió un nuevo capítulo en la biología del cáncer dado el nuevo concepto

surgido, y que tenía como base la idea de una nueva función de ciertos genes como supresor de tumores.

Derivado de todo esto, surgieron estudios donde se analizaron una gran variedad de tumores. Aquí descubrieron que *Rb* no sólo estaba mutado en Retinoblastoma sino que un alto porcentaje de estos tumores presentaban esta mutación (Harbour et al., 1988; Lee et al., 1988; Horowitz et al., 1989). Posteriores análisis, demostraron que existían otros genes dentro de la vía pRB que también estaban alterados (Sherr, 1996). Estas alteraciones comprendían mutaciones inactivantes de p16 o pRB, sobreexpresión o amplificación de ciclina D o mutaciones puntuales en *cdk4* que hacen a la célula menos sensible a la inhibición mediada por p16 (He et al., 1994; Otterson et al., 1994; Shapiro et al., 1995). Todas ellas tenían como finalidad la anulación del punto de restricción de G1, lo que daba lugar a una proliferación aberrante que terminaba con carcinogénesis y progresión tumoral.

Estudios de la misma época encontraron una relación entre p16 y pRB. Estas proteínas parecen tener una correlación inversa en cáncer, ya que en la mayoría de las células tumorales que mantienen la expresión de pRB, raramente expresan p16 y a la inversa, tumores *Rb* negativos raramente expresan p16, siendo esta correlación estadísticamente significativa ($p < 0,0006$) (Okamoto et al., 1994). La explicación más sencilla de esto parte de la idea que tanto p16 como pRB son dos proteínas que participan en el mecanismo de senescencia, estado al que recurren las células cuando están sometidas a un gran estrés oncogénico. Esto provoca un aumento en los niveles de p16 y pérdida de actividad de los complejos ciclina D/*cdk4*, que trae como consecuencia una no fosforilación de pRB que finalmente provoca una parada de las células (Malumbres y Carnero, 2003). Si *Rb* está mutado, a pesar de los altos niveles de p16, no permite que la célula pueda entrar en senescencia, aumentando la posibilidad de transformación neoplásica. Esta explicación tiene como base la idea lineal donde p16/pRB forman parte de una única vía, así los niveles elevados de p16 se entienden como un mecanismo fallido de la célula para entrar en senescencia, tras el estrés oncogénico que supone la pérdida de *Rb*.

Pese a esto, hoy se conoce que pRB no es la única proteína sobre la que puede actuar p16 a través del complejo ciclina D/*cdk4*. Este complejo también fosforila a otros dos miembros de la

familia Rb, p107 y Rb2/p130 (Beijersbergen et al., 1995; Bruce et al., 2000) que al igual que pRB, son capaces de ejercer acciones antiproliferativas a través de su unión al factor de transcripción E2F (Hurford et al., 1997; Mulligan y Jacks, 1998). La sobreexpresión de cualquiera de los tres miembros de la familia Rb, al igual que ocurre con la sobreexpresión de p16, provoca parada en G1 en la mayoría de las células (Dyson, 1998). Pero para que p16 provoque dicha parada necesita no sólo la presencia de pRB, sino que tanto p107 como p130 estén también presentes (Bruce et al., 2000), lo que pone en entredicho la idea lineal que se creía existente entre pRB y p16.

2. Inhibición de p16 en células *Rb* negativas

Esta tesis doctoral supone la continuación del trabajo publicado por nuestro grupo de investigación (González et al., 2003) en el que, como ya hemos comentado, se estudió el efecto de la sobreexpresión de p16 en fibroblastos de ratón *Rb* *-/-* (D3T3 *Rb* *-/-*). Aquí se demostró que la sobreexpresión de p16 en estas células, no tenía consecuencia alguna en células proliferantes. Pero si se serodeprivaban, mostraban un retraso de 3 horas en la entrada a fase S. Esta diferencia se debía a la acumulación de p27 durante la serodeprivación, que inhibía la actividad de cdk2 y esto era lo que provocaba dicho retraso.

En este trabajo de investigación nos hemos centrado en el estudio de la regulación de las células tumorales *Rb* *-/-* humanas y en las posibles consecuencias que la pérdida de p16 pudiera causar en estas células. El modelo celular elegido para abordar dicho estudio fue la línea celular SaOS2 (osteosarcoma), que presenta la característica de ser *Rb* negativas p16 positivas. La inhibición de p16 se realizó mediante la utilización de 2 shRNAs específicos contra esa proteína que fueron transducidos de forma estable mediante infección retroviral. Como resultado obtuvimos dos poblaciones denominadas Si1 y Si2 que presentaban una inhibición de p16 mayor del 90%. Es importante resaltar la falta de diferencias en p14^{ARF} en las poblaciones transducidas con los shRNAs contra p16, con respecto a su población parental. El locus INK4a da lugar a p16 y p14^{ARF}, mediante splicing alternativo (Quelle et al 1995). El shRNA contra p16 lo diseñamos contra el exón 1 α de este locus, que es específico de p16. La inhibición mediante este shRNA no parece afectar a p14, lo que confirma la especificidad de la inhibición de p16.

Las células tumorales *Rb* negativas no pueden formar los complejos ciclina D/cdk4 debido a los altos niveles de p16 existentes en estas células. En este trabajo hemos visto que la inhibición de p16 que hemos conseguimos es bioquímicamente relevante dado que permite el ensamblaje del complejo ciclina D3/cdk4. Es más, tanto en las células Saos como en la población control Luci (derivada de Saos pero que contiene un shRNA contra luciferasa) que siguen presentando elevados niveles de p16, cdk4 se encuentra formando complejos con esta proteína, lo que demuestra que esta proteína es la responsable de la inhibición de la actividad kinasa de cdk4 en células *Rb* negativas. El nuevo complejo formado tras la inhibición de p16 es activo, esto lo hemos comprobado mediante un ensayo kinasa contra el mismo, en el que además hemos visto que esta actividad es comparable a la existente a la línea celular U2Os que son p16 negativas. En un estudio pormenorizado de las proteínas más importantes del ciclo celular, es patente el aumento en los niveles de ciclina D3 lo que probablemente guarda relación con la formación del complejo con cdk4, dado que de esta forma puede verse aumentada su vida media. Todo esto apoya la idea que la inhibición de p16 alcanzada en este trabajo es bioquímicamente relevante.

Como ya hemos descrito en la introducción, se sabe que el complejo ciclina D/cdk4 regula mediante fosforilación a las proteínas de la familia Rb. Siguiendo con el estudio bioquímico de las poblaciones sin p16 y viendo que habíamos conseguido restaurar la actividad de cdk4, analizamos a los otros dos miembros de la familia Rb: p130 y p107 presentes en estas células, y que al igual que pRB, regulan la actividad transcripcional de la familia E2F mediante unión directa a esta proteína. La fosforilación de pRB/p130/p107 por cdks, trae como resultado la inactivación de estas proteínas y la liberación de E2F, regulándose así la transcripción de numerosos genes (Muller et al., 2001). El análisis de p130 mediante western blot, mostró que tanto Si1 como Si2 presentan un aumento de la fosforilación de p130 de la forma 2b a la forma 3, existente en la línea tumoral humana U2OS.

La fosforilación de p130 podía deberse o bien a la actividad kinasa de cdk4 conseguida, o bien a un aumento en la actividad de cdk2. Sin embargo, en nuestro sistema la formación de los complejos con cdk4 tras la inhibición de p16, no producía ningún aumento significativo de la actividad kinasa de cdk2, por lo que concluimos que esta actividad no era la culpable del aumento de la fosforilación de p130. Por el contrario en p107 que es inactivada principalmente

por la actividad cdk4 (Beijersbergen et al., 1995; Farkas et al., 2002), no se observaron diferencias de fosforilación entre las células SaOS2 y sus poblaciones sin p16. Aunque también es cierto que existen sitios de fosforilación en p107 dependiente de cdk4 que no conllevan un cambio de movilidad en el gel.

3. Los niveles de p16 no afectan a la proliferación normal de las células tumorales *Rb* negativas.

La inhibición de p16 no altera la distribución de las células en las fases del ciclo. Las células *Rb* negativas con y sin p16, presentaban en células proliferantes una tasa de crecimiento y un perfil de ciclo muy similar. Esto es consistente con el trabajo publicado por nuestro grupo de investigación, en el que la sobreexpresión de p16 en MEFS *Rb* -/- no tenía ningún efecto en células proliferantes, pero sí cuando se sincronizaban en G0 mediante serodeprivación (Gonzalez et al., 2003). Es evidente que existen grandes diferencias entre las células que están proliferando y aquellas que tienen que progresar desde G0, donde los elementos que regulan el ciclo son más restrictivos. Nuestros resultados, tras serodeprivar a las células con y sin p16, mostraron que las poblaciones Si1 y Si2 al igual que las parentales podían entrar en G0, y no mostraban ninguna diferencia cuando eran reestimuladas a entrar en el ciclo.

Como ya hemos dicho, la actividad cdk4 junto con la actividad cdk2 fosforilan e inactivan a las proteínas de la familia Rb, permitiendo la liberación del factor de transcripción E2F. En células *Rb*-p16+, las mutaciones en p130 son extremadamente raras (Helin et al., 1997) y en p107 no han sido reportadas hasta el momento. Esto supone que en la mayoría de los tumores *Rb* negativos tanto p107 como p130 están presentes. Hoy en día se sabe poco de la modulación de estas proteínas dentro del ciclo de estas células tumorales. En nuestro caso la inhibición de p16 había mostrado efectos relevantes en la bioquímica de nuestras células, como un aumento en la fosforilación de p130 y la formación del complejo activo ciclina D/cdk4. Era posible que la actividad de cdk4 pudiera estar ejerciendo algún efecto sobre la regulación de p107/p130, y esto se reflejara en alguna variación en los niveles de los genes dependientes de E2F. De hecho, hoy en día se conocen los genes que son regulados directamente por p107/p130 como es el caso de *B-Myb*, *Cdc6*, *ciclina A2* y *DHFR* (Black et al 2003). Para ver si había alguna variación en sus

niveles del mRNA, analizamos estos genes mediante PCR a tiempo real. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre las células sin p16 y las células parentales. Además, la actividad transcripcional dependiente de E2F tampoco se ve alterada por la falta de p16. Esto lo corroboramos midiendo la actividad transcripcional del promotor DHFR de respuesta a E2F unido al gen reporter luciferasa. Los niveles de estimulación del promotor eran similares en los dos casos. Todo esto indicaba que, de alguna manera, las células *Rb* negativas son capaces de estimular E2F, pese a no tener actividad cdk4-6 y que además proliferan con normalidad pese a presentar altos niveles de p16.

4. La inactivación de p107 y p130 es independiente de la actividad cdk4 en células *Rb* negativas.

Los genes de respuesta a E2F, regulados por p107/p130 son importantes para la progresión G1/S. Nuestros resultados mostraban que se estaban transcribiendo, lo que sugería cierta modulación de las proteínas de la familia Rb no dependiente de la actividad kinasa de cdk4. Realizamos inmunoprecipitación de cromatina analizando los mismos genes de respuesta a E2F anteriores. Esto nos mostró que en células sincronizadas, tanto p107 como p130 permanecían unidas a los promotores de respuesta a E2F, pero durante la fase S eran capaces de liberarse

La fosforilación de p130 y p107 es importante para la progresión del ciclo celular. La mutación de sus sitios de fosforilación provoca parada del ciclo en aquellas células tumorales transfectadas que no mostraban parada cuando se sobreexpresaba la forma salvaje de estas dos proteínas (Hansen et al 2001). En los últimos diez años se ha intentado contestar a la pregunta de cómo se modulan estas proteínas dentro de las células *Rb* negativas, llegando incluso a suponer que permanecían unidas a sus respectivos E2F de forma independiente al ciclo, al carecer las células de actividad cdk4-6. Por otra parte, la actividad de ciclina E/cdk2 causa fosforilación de p130 hasta la forma 2b, siendo esta fosforilación suficiente para separar el complejo p130/E2F4, incluso en ausencia de actividad kinasa asociada a ciclina D (Calbó et al., 2002). De los resultados que hemos obtenido se desprende que en las células *Rb* negativas tanto p107 como p130 se pueden inactivar sin la presencia de actividad kinasa cdk4-6. Siguiendo con esta línea y como venía pasando hasta el momento, las células *Rb* negativas sin p16 no

mostraban ninguna mejora sobre la capacidad de inactivar a p107/p130 y por lo tanto de liberar a E2F, al menos bajo estas condiciones. Parecía que los altos niveles de p16 eran irrelevantes para la regulación de p107/p130 en células *Rb* negativas, lo que implicaba una regulación del ciclo distinta que en células no transformadas.

Otras células en las que p107 y p130 parecen inactivarse sin la presencia de la actividad kinasa de cdk4-6 son los fibroblastos embrionarios derivados del ratón knockout de ciclina D (MEFs D1^{-/-}, D2^{-/-}, D3^{-/-}). Estos al ser llevados a quiescencia mediante serodeprivación, podían reentrar en fase S y además presentaban fosforilación de pRB al igual que en p107, aunque disminuida. Cuando no estaban sincronizadas, esta disminución no era tan apreciable por lo que los autores concluían que otros complejos (posiblemente los formados por ciclina E-A/cdk2) podían estar fosforilando los sitios específicos de ciclina D en p107 y p130. Esta fosforilación sería suficiente para inactivar a estas proteínas y liberar a E2F (Kozar et al., 2004; Cobrinik, 2005). Además, estudios anteriores habían encontrado evidencias sobre la capacidad de ciclina E-A/cdk2 de unirse directamente a p107 durante la transición G1/S. Es habitual que el complejo ciclina E/cdk2 se una directamente a sus substratos.

La regulación de p107 y p130 en células *Rb* negativas con altos niveles de p16 podía deberse o bien a la actividad de complejos formados por una ciclina y una determinada cdk, o bien a la actividad de otras kinasas. Hay un alto grado de homología entre cdks y otras proteínas kinasas de las cuales sólo una minoría han sido suficientemente estudiadas (Caenepeel et al., 2004). Se sabe que pRB puede ser fosforilada por otras kinasas que no son cdks. Así, mientras los mitógenos inducen fosforilación de pRB y la liberación de E2F en horas, ya que dependen de la inducción de ciclina D o ciclina E, en otros mecanismos esto sucede en minutos. Un ejemplo son tratamientos en células del músculo liso con angiotensina II y serotonina, que dan como resultado la fosforilación de pRB en serina 795 dependiente de ERK y cdk4, lo que provoca la disociación de E2F a los 10 minutos (Garnovskaya et al., 2004). También la estimulación de Fas provoca la fosforilación de pRB y liberación de E2F a los 30 minutos. Aquí pRB parece ser fosforilada por p38MAPK en residuos distintos a los dependientes por cdks (Wong et al., 1999; Nath et al., 2003). A pesar de la falta de efecto de la inhibición de p16 sobre la proliferación de células *Rb* negativas en condiciones de concentraciones altas de suero, la situación es

completamente distinta si las concentraciones de suero son limitadas. En nuestras manos, los niveles de p16 condicionan la proliferación de células *Rb* negativas en condiciones restrictivas de suero donde las células con altos niveles de p16 proliferan menos que las poblaciones sin p16. Esto podía sugerir que las células *Rb* negativas podían ser sensibles a la inhibición de la actividad kinasa asociada a los complejos ciclina/cdk, lo que podía sugerir una posible regulación del ciclo dependiente de cdk.

5. Sensibilidad a la inhibición de las cdk en las células *Rb* negativas.

Utilizamos un inhibidor químico de cdk de amplio espectro, la roscovitina, para verificar que la regulación del ciclo de estas células dependía de las cdk. La roscovitina es un inhibidor de cdk de la clase de las purinas, que compite con el ATP en su unión con las cdk, inhibiendo así su actividad kinasa. Su eficacia ha sido demostrada contra cdk1, cdk2, cdk3 y cdk5 (De Acaredo et al., 1997; Roy y Sausville, 2001; Keezer y Gilbert, 2002; Raynaud et al., 2005). Nosotros tratamos a las células con una concentración de 50 μ M de roscovitina, los resultados mostraron que no había incorporación de BrdU ni en SaOS2 ni en la población sin p16. Todo esto indica claramente que las células *Rb* negativas con y sin p16 son sensibles a la inhibición de cdk.

Por otra parte, los datos obtenidos del análisis por citometría de flujo de las células recogidas en fase S, en presencia o no de roscovitina, mostraron que las Si2 tratadas con el inhibidor eran capaces de progresar a través de fase S, mientras que las SaOS2 presentaban parada o retraso en G1. Estos resultados volvían a demostrar una menor sensibilidad de las células sin p16 a la inhibición de las cdk. Por otro lado la inhibición de las cdk por la roscovitina era suficiente para impedir la separación de p107/p130 de los promotores dependientes de E2F en células *Rb* negativas, independientemente de los niveles de p16. No hemos logrado determinar el evento bioquímico exacto que afecta a células con p16 alto pero no en células con p16 bajo. En un reciente artículo, se habla sobre una nueva función de p16 en la regulación de la replicación del DNA. Según este modelo, p16 actuaría en G1 previniendo la formación del complejo de Pre-replicación antes de tiempo, mediante la inhibición de cdk. En este modelo pRB también actúa como regulador negativo de la replicación pero a otro nivel que p16, al actuar más tarde en G1. Pese a tener dos funciones independientes, p16 no es efectivo si no está pRB presente (Braden

et al., 2006). En nuestro caso la inhibición de p16 en células *Rb* negativas puede que tenga algún efecto a nivel de la replicación del DNA, al faltar dos piezas de la regulación negativa a este nivel. Además la actividad cdk4 puede permitir cierta ventaja en la replicación del DNA y eso puede explicar la capacidad de Si2 para entrar en fase S en presencia de roscovitina, sin que esto suponga un cambio a nivel de p107/p130.

6. Papel de cdk1, cdk2 y cdk3 en la regulación del ciclo de células tumorales *Rb* negativas

En un intento de entender los mecanismos que regulan el ciclo de las células *Rb* negativas, y después de haber demostrado que eran sensibles a la pérdida de actividad kinasa asociada a cdk, pasamos a estudiar la importancia de las principales cdk en el ciclo de estas células.

Sorprendentemente nuestros resultados demostraron que ninguna cdk individual era esencial para la progresión del ciclo de células *Rb* negativas que no contienen complejos cdk4 activos. En un primer momento en base al artículo de Cheng et al., 2000 supusimos que el papel de cdk2 podía ser indispensable para las células *Rb* negativas. Si esto fuera así, los inhibidores contra esta proteína serían más eficaces en el tratamiento de este tipo de tumores. La inhibición de cdk2 mediante un dominante negativo y con un siRNA no mostró ningún efecto ni sobre la progresión del ciclo de las células *Rb* negativas ni sobre la regulación de los promotores dependientes de E2F por parte de p107 y p130. Estas proteínas podían liberarse de estos promotores en la fase S pese a carecer de la actividad de cdk2 y cdk4. Estos resultado son contrarios a los descritos por Cheng et al, donde se describió el papel de cdk2 como indispensable en el mismo tipo celular al utilizado en nuestro trabajo. En este artículo demuestran que p130 puede liberarse de E2F de forma dependiente de cdk2, así la inhibición de cdk2 por un dominante negativo impide esta liberación. En este artículo también muestran la incapacidad de estas células para inactivar a p107 y liberarlo de E2F, mientras que nuestros datos revelan lo contrario.

Hasta hace unos años, cdk2 se consideraba indispensable para la progresión del ciclo celular. Esto parecía firmemente apoyado en estudios que demostraban que, en la mayoría de los casos,

la eliminación de la actividad de esta proteína provocaba parada en G1. La eliminación de la actividad de cdk2, se había realizado mediante la expresión de dominantes negativos de cdk2 (Heuvel y Harlow, 1993; Hofmann y Livingston, 1996), microinyección de anticuerpos contra ciclina E o cdk2, inhibidores químicos contra cdk2 o la sobreexpresión de p21 ó p27 (Polyak et al., 1994; Sherr y Roberts, 1999). En los últimos años varios trabajos vienen demostrando lo contrario, así se ha descrito que la inhibición de cdk2 mediante siRNA no afecta a la mayoría de las células de mamífero, incluso se ha descrito la inhibición mediante un siRNA contra cdk2 células *Rb* negativas con altos niveles de p16, sin que se observara ningún efecto en la proliferación de estas células (Tetsu y McCormick, 2003). Esta idea ha sido apoyada con la creación del el knockout (k.o) contra cdk2, dado que este animal resultó ser viable (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003). Todos estos trabajos al igual que nuestros resultados apoyan la idea de que cdk2 no es indispensable ni para células tumorales *Rb* negativas ni para las células no tumorales. Esto no es así en todos los casos ya que en melanoma cdk2 es imprescindible, y su inhibición en estas células tumorales tiene como consecuencia la parada de la proliferación (Du et al., 2004). Esto pone de manifiesto que es importante no solo del perfil genético de las células tumorales, sino el origen celular o el tejido donde se ha desarrollado el tumor para la selección de los tratamientos más efectivos.

Cdk3 es otro miembro de la familia de cdk. Al igual que cdk2 y cdk4 se pensaba que esta proteína era otra kinasa imprescindible para el ciclo de las células de mamífero. Esto estaba basado en estudios con dominantes negativos donde la inhibición de esta proteína paraba a las células en la fase G1 del ciclo. Se ha demostrado que in vitro cdk3 puede formar complejos con ciclina A y ciclina E, y que además estos complejos pueden ser activos y fosforilar a pRB (Harper et al., 1995). En base a esto, era posible que cdk2 y cdk3 presentaran cierto grado de redundancia, es decir que cdk3 podía ser la responsable de sustituir a cdk2 en nuestras células. Hasta hace poco la ciclina asociada a cdk3 in vivo era desconocida. En un reciente estudio se demostró que cdk3 se une a ciclina C para que las células puedan salir de G0 eficientemente mediante fosforilación de pRB (Ren y Rollins, 2004). Esto puede ser un ejemplo del alto grado de redundancia existente entre cdk's, dado que ciclina C forma complejo con cdk8 (Tassan et al., 1995). Nuestros resultados han demostrado que la inhibición de cdk3 y su actividad kinasa mediante un siRNA no tenía repercusiones significativas en el ciclo de nuestras células. Los

datos obtenidos con la incorporación de BrdU al igual que las células analizadas por citometría no mostraron ningún defecto ni alteración significativa. Al igual que *cdk2*, el papel de *cdk3* en el desarrollo embrionario murino es irrelevante. Esto puede verse reflejado en los modelos murinos donde la mayoría de los ratones de laboratorio presentan mutado *cdk3* de forma espontánea (Ye et al., 2001) sin causar ninguna alteración conocida, por lo que la actividad de *cdk3* in vivo parece que también puede ser compensada.

La inhibición de *cdk1* mediante un siRNA, resulta en una reducción eficaz de los niveles de la proteína al igual que su actividad kinasa. Los resultados obtenidos en la incorporación de BrdU no mostraron ninguna disminución respecto al control, lo cual demuestra que la actividad de *cdk1* no es limitante en la entrada y progresión en fase S de células *Rb* negativas. Los datos del análisis por citometría de flujo mostraron un ligero aumento en G2/M. Esto nos permitió concluir que la inhibición de *cdk1* no parecía tener un gran efecto sobre la progresión del ciclo de las células *Rb* negativas. En cuanto a *cdk1* en tumores, se están desarrollando inhibidores químicos altamente específicos contra esta *cdk*, como por ejemplo RO-3306. Este inhibidor provoca parada del ciclo en G2/M en numerosas células tumorales, pero no en todas ni en células derivadas de otras especies (Vassilev et al., 2006). En células derivadas de cáncer de mama, MDA-MB-453 la inhibición de *cdk1* con un siRNA provoca una importante parada en la proliferación junto con una marcada acumulación en G2/M, y un incremento significativo de la apoptosis (Payton et al., 2006). En cambio nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en el artículo de Cai et al., donde la inhibición con el siRNA contra *cdk1* en células *Rb* +/p16-, provoca una disminución de la fase S y un aumento de G2/M, pero esto no inhibe la proliferación celular (Cai et al., 2006). Esto es sorprendente si se lo compara con los resultados más recientes sobre la biología de esta kinasa. En un reciente artículo se ha demostrado que *cdk1* (*cdc2*) es la única *cdk* indispensable en el ciclo celular de células de mamífero (Santamaría et al., 2007). Todo esto sugiere una regulación diferente en células tumorales que en células no transformadas. Nuestros resultados pueden estar indicando que la actividad de *cdk1* puede estar compensada por otra *cdk*, como en el trabajo de Cai et al, donde se demostró que *cdk1* puede ser compensada por *cdk2*, gracias a la formación de complejos ciclina B/*cdk2*.

7. Redundancia entre las cdks en el ciclo de las células *Rb* negativas.

La primera indicación de que las distintas cdks podían estar efectuando funciones redundantes en el ciclo la obtuvimos tras transfectar a las células *Rb* negativas con distintos dominantes negativos de las principales cdks (cdk1, cdk2, cdk3) solos y en combinación, junto con el plásmido 3x $E2F$. Esto nos permitió ver cómo afectaban los distintos dominantes negativos a la actividad transcripcional dependiente de $E2F$. Los resultados mostraron que la combinación de los 3 dominantes negativos era la que reducía en mayor magnitud la actividad transcripcional en las células con y sin p16. Nuevamente la población sin p16 mostró tener una menor sensibilidad a la inhibición de los cdks, ya que en todos los casos la actividad transcripcional había sido mayor que en SaOS2. Es importante resaltar que pese a la disminución de la actividad dependiente de $E2F$ en las células *Rb* negativas, en ningún caso esta disminución era total.

La inhibición de la actividad cdk con dominantes negativos ha sido cuestionada por ser susceptible a efectos inespecíficos y por tanto no adecuada para analizar qué cdk o combinación es importante en un proceso biológico. Sin embargo, en nuestro caso este resultado ha quedado confirmado usando combinaciones de siRNAs. Así la combinación de cdk1 y cdk2 provocó una inhibición mayor que la inhibición de cada cdk individualmente. Esto era patente en la disminución en la incorporación de BrdU que mostraba una reducción de la síntesis de DNA, y en las células analizadas por citometría donde observamos un aumento más pronunciado en G2/M. Esto sugiere que ambas cdks contribuyen al control G2/M. Nuevamente las células sin p16 mostraban un efecto menor a la inhibición de cdk1 y cdk2 que las células con p16. Esto era apreciable en la incorporación de BrdU, donde la inhibición de estas cdks no causaba una gran disminución en las Si2, lo que indicaba que la inhibición de estas cdks afectaba en menor medida a las células sin p16, al menos en fase S.

Resumiendo, todos los datos obtenidos hasta el momento mostraban que en las células *Rb* negativas, las actividades individuales de cdk1, cdk2, cdk3 y cdk4 no eran indispensables para la progresión del ciclo. Solo conseguimos un efecto significativo al combinar la inhibición de cdk1 y cdk2, lo que indica que las actividades de estas dos cdks son importantes para la progresión de las células tumorales humanas *Rb* negativas. Aun así, no conseguimos una parada

clara de la proliferación del ciclo celular, como observamos con el inhibidor químico de cdk's. El efecto combinado de la inhibición de cdk1, cdk2 y cdk3 podía acercarnos al conseguido con la roscovitina, dado que también inhibe a cdk3. Además en el caso de la depleción de cdk1+cdk2, la actividad de cdk3 podía estar compensando a estas cdk's en G1 ya que como comentamos puede formar complejos in vitro con ciclina E. La inhibición de estas cdk's (cdk1, cdk2, cdk3) la realizamos mediante los siRNAs específicos, consiguiendo unos niveles de inhibición de las proteínas endógenas óptimos. Los resultados de esta inhibición no fueron muy distintos a los obtenidos con la doble inhibición de cdk1+cdk2, sólo podríamos resaltar un ligero aumento en la disminución de la incorporación de BrdU. La transfección de los siRNAs de cdk1, cdk2 y cdk3 inhibe la actividad kinasa de estas proteínas con gran eficacia, lo que indica que el sistema de inhibición es bioquímicamente relevante. Sin embargo, existe la posibilidad de que la actividad residual de las cdk's tras la transfección de los siRNAs sea suficiente para hacer progresar el ciclo. Por esto nos propusimos obtener una inhibición más completa usando p27.

Nuestros resultados después de sobreexpresar p27 mostraron consecuencias muy similares a las observadas con la inhibición de los 3 cdk's. La expresión de p27, como era de esperar, inhibió eficazmente la actividad kinasa de cdk2. No hemos evaluado la actividad de cdk1 tras la transfección con p27, aunque se ha descrito recientemente en el *knock out* de SKP2 (responsable de la degradación de p27) que el aumento de p27 en los MEFs provocaba la inhibición de cdk1 y cdk2 por parte de esta proteína (Nakayama et al., 2000 y 2004). En cuanto a las células *Rb*-/*p16*⁺ la expresión de p27 no provocó diferencias significativas en las células analizadas por citometría, mientras que en la incorporación de BrdU mostró una marcada disminución indicando un descenso en la progresión del ciclo en estas células. Como se venía repitiendo hasta el momento, en las células sin p16 la sobreexpresión de p27 no mostró un tan efecto apreciable. Esto puede ser debido a la presencia del complejo ciclina D/cdk4, que no es susceptible de ser inhibido por p27. Podría considerarse que esta proteína tenía un menor efecto en las células sin p16 dado que, como ya hemos explicado, p27 es secuestrado por este complejo. Sin embargo, el ensayo kinasa de cdk2 tras la transfección con p27 mostró valores de inhibición semejantes en los dos tipos celulares.

En cuanto a las células *Rb* negativas, hemos visto que son capaces de regular a p107/p130 de forma independiente a la actividad kinasa cdk4. Recientes estudios han puesto en evidencia la alta redundancia que existe entre las cdks, que permite que puedan sustituir la función de otra cdk uniéndose a ciclinas no específicas, protegiendo a la célula de la posibilidad de que alguna cdk falle. Nosotros hemos comprobado que el inhibidor químico de cdks roscovitina, suprime la proliferación e impide la inactivación de estas proteínas, indicando que la regulación de estas células parece depender de cdks. Aunque las células *Rb* negativas parecen ser sensibles a la pérdida de actividad de cdks, la inhibición individual de cada una de ellas no provoca ningún cambio significativo en la proliferación, debido quizás al alto grado de redundancia. Esto es distinto a lo reportado en células no transformadas, donde se ha visto que cdk1 es indispensable para la progresión del ciclo celular (Santamaría et al., 2007). Hasta el momento se han desarrollado un gran número de antitumorales, que tienen como diana alguna de las cdks importantes para la proliferación celular (como son cdk1, cdk2 y cdk4-6). Esto parte de conocimiento de que en la mayoría de los procesos cancerígenos estas cdks presentan grandes alteraciones.

Se ha visto que no todas las células tumorales presentan la misma sensibilidad a la inhibición de determinadas cdks. Así, algunos estudios muestran a cdk4 como futuro candidato como diana para terapia génica. Aunque se ha reportado que no es necesario para la progresión del ciclo en células de mamífero, se ha demostrado que es imprescindible para el desarrollo del cáncer de mama (Yu et al., 2006). Cdk4 también parece ser un buen blanco para células *Rb*⁺/p16⁻, que junto con las células derivadas de cáncer de colon presentan una gran sensibilidad a la eliminación de la actividad relacionada con el complejo ciclina D/cdk4, la cual provoca parada del ciclo celular (Tetsu y McCormik, 2006). En este mismo artículo también se demuestra que la actividad de cdk2 es innecesaria para las células anteriormente citadas. Hasta hace pocos años cdk2 era el blanco de numerosos tratamientos antitumorales. Numerosos estudios tanto en células tumorales como en el desarrollo embrionario y en proliferación celular, han puesto de manifiesto que el papel de cdk2 es prescindible.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en las células *Rb* negativas no sólo las actividades individuales de cdk2 y cdk4 no son necesarias para la proliferación, sino que las de

cdk3 y cdk1 tampoco lo son. En nuestros resultados al igual que en otros trabajos ya publicados, se ha demostrado la necesidad de eliminar a más de una determinada cdk para conseguir algún efecto en el ciclo de las células tumorales. En un reciente artículo se ha estudiado una posible relación entre cdk1 y cdk4 que sólo está presente en células tumorales y en tumores clínicos, pero no en células humanas no transformadas. Aquí cdk4 estimula a cdk1 y este a su vez regula negativamente a cdk4. Se ha comprobado que la eliminación de cdk1 en ciertos tipos de células tiene efectos citotóxicos. La expresión de cdk4 minimiza el potencial de apoptosis al estimular cdk1, por lo que quizás sea necesario la disrupción cdk4/cdk1 en algunos tumores, para que prime la apoptosis frente a la proliferación (Seabra y Wahrenius, 2007). Como en las células *Rb* +/p16-, nuestras células mostraron ser sensibles a la inhibición combinada de cdk1 y cdk2, provocando una disminución en la proliferación y un aumento significativo en G2/M. Esto es debido a que la actividad de cada una de estas cdks puede ser sustituida por la otra. Este resultado sugiere que en tratamientos futuros, la combinación de la eliminación de estas dos cdks puede ser más efectiva que el aquel tratamiento que tenga como diana una de esas cdks (Payton et al., 2006).

8. Posible regulación del ciclo independiente a cdk1, cdk2 y cdk3 en células *Rb* negativas.

Hay que resaltar que, pese a conseguir disminuir la proliferación de forma significativa con la inhibición de cdk1 y cdk2, las células *Rb* negativas siguen proliferando. Esto sigue siendo así aunque inhibamos además cdk3, ya sea con siRNAs específicos o mediante la sobreexpresión de p27. Es decir, en las células *Rb* negativas la eliminación de las actividades combinadas de cdk1, cdk2, cdk3 y cdk4 provoca efectos antiproliferativos no totales. Esto puede estar indicando la actuación de otra proteína que no sea de la familia de las cdks, como hemos sugerido al principio. La actividad de Aurora kinasa es suficiente para conducir el ciclo en los primeros estadios de *Xenopus* (Nigg, 2001) y en cánceres humanos muestra alteraciones semejantes al de las cdks (Reed, 1997; Bischoff et al., 1998) Aunque un ciclo dependiente de Aurora Kinasa es una posibilidad, la inhibición de la proliferación de nuestras células por roscovitina indica que son sensibles a la inhibición de las cdks. Este inhibidor está descrito que inhibe a cdk1, cdk2, cdk3 y cdk5; pero esta última cdk sólo está activa en neuronas. En nuestro caso la inhibición de

cdk1, cdk2 y cdk3 (e incluso cdk4), no para la proliferación de las células *Rb* negativas en su totalidad. Pese a haber comprobado la eficiencia de la inhibición de los siRNAs, niveles traza de estas proteínas pueden finalmente permitir que continúen proliferando. En cuanto a p27 la explicación no es tan clara dado que hemos comprobado la inhibición de cdk2. Pese a esto la inhibición de cdk1 puede que no sea tan efectiva como la de cdk2 y esto sea lo que finalmente permita la continuación del ciclo de estas células.

Se sabe que la roscovitina inhibe en cierta forma a cdk7 y cdk9 (Raynaud et al., 2005) que están relacionadas con la fosforilación del dominio carboxi-Terminal (CTD) de la RNA polimerasa II. CiclinaH/cdk7 juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular. Por un lado forma parte del complejo activador de kinasas (CAT) que son los encargados de activar, mediante fosforilación en residuos treonina, a los complejos formados por cdk1, cdk2, cdk4-6 y cdk5. Se sabe que cdk1 y cdk2 pueden fosforilar a cdk7 uniéndose a ella. Cdk7 puede actuar tanto en G1 como en G2/M regulando de esa forma todo el ciclo celular (Larochelle et al., 2007; Lolli y Johnson, 2007). Esto junto con su capacidad de controlar la actividad transcripcional de las células mediante la regulación de la RNAPolIII (Koff et al., 1992; Kaldis et al., 1999) permite comprender por qué la roscovitina inhibe la proliferación de forma más efectiva.

CiclinaT/cdk9 también fosforila al CTD de la RNAPolIII, favoreciendo la elongación de la transcripción (Peng et al., 1998). Es importante resaltar la importancia de Cdk9, dado que en el ya comentado artículo de Cai et al en células *Rb* positivas, la depleción combinada de cdk1+cdk2 reduce la fosforilación de CTD y la expresión de la RNAPol II en las células U2OS provocando parada del ciclo celular y aumentando el porcentaje de apoptosis. En cambio en la otra línea tumoral de cáncer de pulmón de células no pequeñas, no se ve una parada de la proliferación tan aparente después de la misma depleción. En estas células la inhibición de cdk9 mediante un shRNA o un inhibidor químico de cdk9 provocan un aumento en el porcentaje de apoptosis y la parada de la proliferación.

Esta puede ser una posible explicación del por qué las células *Rb* negativas muestran mayor efecto frente a la roscovitina dada su capacidad de actuar sobre cdk7 y cdk9. Sería necesario inhibir esas cdks en combinación con cdk1 y cdk2 para ver su posible repercusión en el ciclo de

nuestras células. Esto podría servir en un futuro para el desarrollo de inhibidores químicos más específicos para las células tumorales *Rb* negativas.

VI-CONCLUSIONES

1. La inhibición de p16 de las células *Rb* negativas permite la formación del complejo ciclina D/cdk4-cdk6 y la aparición de una forma más fosforilada de p130 sin que se vea afectada la transcripción de los genes dependientes de E2F.
2. Las células *Rb* negativas son capaces de regular y por lo tanto inactivar a las proteínas de la familia de Rb p107 y p130, y por lo tanto regular y transcribir los genes dependientes de E2F sin necesidad del complejo ciclina D/cdk4.
3. La inhibición de las actividades kinasa individuales de cdk1, cdk2 y cdk3 no provoca ningún efecto significativo en el ciclo de las células *Rb* negativas.
4. La inhibición combinada de las cdks resulta en una disminución significativa pero no completa en la síntesis de DNA de las células *Rb* negativas.
5. Las células *Rb* negativas sin p16 son más resistentes a la inhibición de las actividades kinasa de las cdks que las células con altos niveles de p16.

VII-BIBLIOGRAFÍA

Akli,S. and Keyomarsi,K. (2003). Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2, S38-S47.

Ref ID: 6

Al Mohanna,M.A., Manogaran,P.S., Al Mukhalafi,Z., Al Hussein,A., and Aboussekhra,A. (2004). The tumor suppressor p16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin. *Oncogene* 23, 201-212.

Ref ID: 3100

Aleem,E., Berthet,C., and Kaldis,P. (2004). Cdk2 as a master of S phase entry: fact or fake? *Cell Cycle* 3, 35-37.

Ref ID: 3021

Aleem,E., Kiyokawa,H., and Kaldis,P. (2005). Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell Biol.* 7, 831-836.

Ref ID: 3020

Alevizopoulos,K., Vlach,J., Hennecke,S., and Amati,B. (1997). Cyclin E and c-Myc promote cell proliferation in the presence of p16INK4a and of hypophosphorylated retinoblastoma family proteins. *EMBO J.* 16, 5322-5333.

Ref ID: 3171

An,H.X., Beckmann,M.W., Reifenberger,G., Bender,H.G., and Niederacher,D. (1999). Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 154, 113-118.

Ref ID: 3082

Araki,K., Nakajima,Y., Eto,K., and Ikeda,M.A. (2003). Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter. *Oncogene* 22, 7632-7641.

Ref ID: 3146

Aslanian,A., Iaquinta,P.J., Verona,R., and Lees,J.A. (2004). Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev.* 18, 1413-1422.

Ref ID: 3138

Attwooll,C., Lazzarini,D.E., and Helin,K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* 23, 4709-4716.

Ref ID: 3130

Attwooll,C., Oddi,S., Cartwright,P., Prosperini,E., Agger,K., Steensgaard,P., Wagener,C., Sardet,C., Moroni,M.C., and Helin,K. (2005). A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J. Biol. Chem.* 280, 1199-1208.

Ref ID: 3131

Avni,D., Yang,H., Martelli,F., Hofmann,F., ElShamy,W.M., Ganesan,S., Scully,R., and Livingston,D.M. (2003). Active localization of the retinoblastoma protein in chromatin and its response to S phase DNA damage. *Mol. Cell* 12, 735-746.

Ref ID: 3229

Bagui,T.K., Jackson,R.J., Agrawal,D., and Pledger,W.J. (2000). Analysis of cyclin D3-cdk4 complexes in fibroblasts expressing and lacking p27(kip1) and p21(cip1). *Mol. Cell Biol.* 20, 8748-8757.

Ref ID: 3114

Balciunaite,E., Spektor,A., Lents,N.H., Cam,H., te,R.H., Scime,A., Rudnicki,M.A., Young,R., and Dynlacht,B.D. (2005). Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 8166-8178.

Ref ID: 2471

Baldi,A., Boccia,V., Claudio,P.P., De,L.A., and Giordano,A. (1996). Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4629-4632.

Ref ID: 1361

Beausejour,C.M., Krtolica,A., Galimi,F., Narita,M., Lowe,S.W., Yaswen,P., and Campisi,J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212-4222.

Ref ID: 2119

Beijersbergen,R.L., Carlee,L., Kerkhoven,R.M., and Bernards,R. (1995). Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev.* 9, 1340-1353.

Ref ID: 288

Berthet,C., Aleem,E., Coppola,V., Tessarollo,L., and Kaldis,P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.* 13, 1775-1785.

Ref ID: 3022

Berthet,C., Klarmann,K.D., Hilton,M.B., Suh,H.C., Keller,J.R., Kiyokawa,H., and Kaldis,P. (2006). Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev. Cell* 10, 563-573.

Ref ID: 3017

Berthet,C. and Kaldis,P. (2006). Cdk2 and Cdk4 cooperatively control the expression of Cdc2. *Cell Div.* 1, 10.

Ref ID: 3016

Bischoff,J.R., Anderson,L., Zhu,Y., Mossie,K., Ng,L., Souza,B., Schryver,B., Flanagan,P., Clairvoyant,F., Ginther,C., Chan,C.S., Novotny,M., Slamon,D.J., and Plowman,G.D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17, 3052-3065.

Ref ID: 3221

Bischoff,J.R. and Plowman,G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 9, 454-459.

Ref ID: 3158

Black,E.P., Huang,E., Dressman,H., Rempel,R., Laakso,N., Asa,S.L., Ishida,S., West,M., and Nevins,J.R. (2003). Distinct gene expression phenotypes of cells lacking Rb and Rb family members. *Cancer Res.* 63 , 3716-3723.

Ref ID: 3201

Blain,S.W., Montalvo,E., and Massague,J. (1997). Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J. Biol. Chem.* 272, 25863-25872.

Ref ID: 316

Blain,S.W., Scher,H.I., Cordon-Cardo,C., and Koff,A. (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3, 111-115.

Ref ID: 3112

Blais,A. and Dynlacht,B.D. (2004). Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 527-532.

Ref ID: 2477

Bloom,J. and Pagano,M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41-47.

Ref ID: 3042

Braden,W.A., Lenihan,J.M., Lan,Z., Luce,K.S., Zagorski,W., Bosco,E., Reed,M.F., Cook,J.G., and Knudsen,E.S. (2006). Distinct action of the retinoblastoma pathway on the DNA replication machinery defines specific roles for cyclin-dependent kinase complexes in prereplication complex assembly and S-phase progression. *Mol. Cell Biol.* 26, 7667-7681.

Ref ID: 3211

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Ref ID: 3170

Brandeis,M., Rosewell,I., Carrington,M., Crompton,T., Jacobs,M.A., Kirk,J., Gannon,J., and Hunt,T. (1998). Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4344-4349.

Ref ID: 3065

Braun,K., Holzl,G., Soucek,T., Geisen,C., Moroy,T., and Hengstschlager,M. (1998). Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation. *Oncogene* 17, 2259-2269.

Ref ID: 3189

Bibliografía

Brehm,A., Miska,E.A., McCance,D.J., Reid,J.L., Bannister,A.J., and Kouzarides,T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription [see comments]. *Nature* 391, 597-601.

Ref ID: 58

Bringold,F. and Serrano,M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp. Gerontol.* 35, 317-329.

Ref ID: 3148

Bruce,J.L., Hurford,R.K., Jr., Classon,M., Koh,J., and Dyson,N. (2000). Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol. Cell* 6, 737-742.

Ref ID: 1601

Brugarolas,J., Chandrasekaran,C., Gordon,J.I., Beach,D., Jacks,T., and Hannon,G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.

Ref ID: 2312

Brummelkamp,T.R., Bernards,R., and Agami,R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.

Ref ID: 3166

Buschges,R., Weber,R.G., Actor,B., Lichter,P., Collins,V.P., and Reifenberger,G. (1999). Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol.* 9, 435-442.

Ref ID: 3077

Byeon,I.J., Li,J., Ericson,K., Selby,T.L., Tevelev,A., Kim,H.J., O'Maille,P., and Tsai,M.D. (1998). Tumor suppressor p16INK4A: determination of solution structure and analyses of its interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol. Cell* 1, 421-431.

Ref ID: 3239

Caenepeel,S., Charydczak,G., Sudarsanam,S., Hunter,T., and Manning,G. (2004). The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11707-11712.

Ref ID: 3204

Cai,D., Latham,V.M., Jr., Zhang,X., and Shapiro,G.I. (2006). Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 66, 9270-9280.

Ref ID: 3187

Calbo,J., Parreno,M., Sotillo,E., Yong,T., Mazo,A., Garriga,J., and Grana,X. (2002). G1 cyclin/cyclin-dependent kinase-coordinated phosphorylation of endogenous pocket proteins differentially regulates their interactions with E2F4 and E2F1 and gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 50263-50274.

Ref ID: 3203

- Canepa,E.T., Scassa,M.E., Ceruti,J.M., Marazita,M.C., Carcagno,A.L., Sirkin,P.F., and Ogara,M.F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB. Life* 59 , 419-426.
Ref ID: 3099
- Carnero,A., Hudson,J.D., Price,C.M., and Beach,D.H. (2000). p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat. Cell Biol.* 2, 148-155.
Ref ID: 3167
- Carrano,A.C., Eytan,E., Hershko,A., and Pagano,M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* 1, 193-199.
Ref ID: 1431
- Cavenee,W.K., Dryja,T.P., Phillips,R.A., Benedict,W.F., Godbout,R., Gallie,B.L., Murphree,A.L., Strong,L.C., and White,R.L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779-784.
Ref ID: 3191
- Chan,F.K., Zhang,J., Cheng,L., Shapiro,D.N., and Winoto,A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol. Cell Biol.* 15, 2682-2688.
Ref ID: 1394
- Chen,C.R., Kang,Y., Siegel,P.M., and Massague,J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110, 19-32.
Ref ID: 2053
- Cheng,L., Rossi,F., Fang,W., Mori,T., and Cobrinik,D. (2000). Cdk2-dependent phosphorylation and functional inactivation of the pRB- related p130 protein in pRB(-), p16INK4A(+) tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275, 30317-30325.
Ref ID: 1603
- Cheng,M., Sexl,V., Sherr,C.J., and Roussel,M.F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1091-1096.
Ref ID: 1191
- Cheng,M., Olivier,P., Diehl,J.A., Fero,M., Roussel,M.F., Roberts,J.M., and Sherr,C.J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* 18, 1571-1583.
Ref ID: 1187
- Cheung,T.H., Yu,M.M., Lo,K.W., Yim,S.F., Chung,T.K., and Wong,Y.F. (2001). Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. *Cancer Lett.* 166, 199-206.
Ref ID: 3071

Bibliografia

Cicchillitti,L., Fasanaro,P., Biglioli,P., Capogrossi,M.C., and Martelli,F. (2003). Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. *J. Biol. Chem.* 278, 19509-19517.

Ref ID: 3230

Ciemerych,M.A. and Sicinski,P. (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene* 24, 2877-2898.

Ref ID: 2982

Clarke,A.R., Maandag,E.R., van Roon,M., van der Lugt,N.M., van,d., V, Hooper,M.L., Berns,A., and te,R.H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-330.

Ref ID: 3240

Classon,M. and Dyson,N. (2001). p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* 264, 135-147.

Ref ID: 1696

Claudio,P.P., De Luca,A., Howard,C.M., Baldi,A., Firpo,E.J., Koff,A., Paggi,M.G., and Giordano,A. (1996). Functional analysis of pRb2/p130 interaction with cyclins. *Cancer Res.* 56, 2003-2008.

Ref ID: 3125

Claudio,P.P., Tonini,T., and Giordano,A. (2002). The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol.* 3, reviews3012.

Ref ID: 3120

Coats,S., Whyte,P., Fero,M.L., Lacy,S., Chung,G., Randel,E., Firpo,E., and Roberts,J.M. (1999). A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells. *Curr. Biol.* 9, 163-173.

Ref ID: 3172

Cobrinik,D., Dowdy,S.F., Hinds,P.W., Mittnacht,S., and Weinberg,R.A. (1992). The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem. Sci.* 17, 312-315.

Ref ID: 1546

Cobrinik,D. (1996). Regulatory interactions among E2Fs and cell cycle control proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 208, 31-61.

Ref ID: 1543

Cobrinik,D., Lee,M.H., Hannon,G., Mulligan,G., Bronson,R.T., Dyson,N., Harlow,E., Beach,D., Weinberg,R.A., and Jacks,T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* 10, 1633-1644.

Ref ID: 267

Cobrinik,D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.

Ref ID: 2567

Collado,M., Medema,R.H., Garcia-Cao,I., Dubuisson,M.L., Barradas,M., Glassford,J., Rivas,C., Burgering,B.M., Serrano,M., and Lam,E.W. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 275, 21960-21968.

Ref ID: 3106

Connell-Crowley,L., Elledge,S.J., and Harper,J.W. (1998). G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts. *Curr. Biol.* 8, 65-68.

Ref ID: 3182

Cruz,J.C. and Tsai,L.H. (2004). Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 10, 452-458.

Ref ID: 3226

Dai,C.Y. and Enders,G.H. (2000). p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19, 1613-1622.

Ref ID: 3150

Dannenberg,J.H., van Rossum,A., Schuijff,L., and te,R.H. (2000). Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth- restricting conditions [In Process Citation]. *Genes Dev.* 14, 3051-3064.

Ref ID: 1560

Dannenberg,J.H. and te Riele,H.P. (2006). The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis. *Results Probl. Cell Differ.* 42, 183-225.

Ref ID: 3161

De Azevedo,W.F., Leclerc,S., Meijer,L., Havlicek,L., Strnad,M., and Kim,S.H. (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* 243, 518-526.

Ref ID: 3208

De Luca,A., Baldi,A., Esposito,V., Howard,C.M., Bagella,L., Rizzo,P., Caputi,M., Pass,H.I., Giordano,G.G., Baldi,F., Carbone,M., and Giordano,A. (1997). The retinoblastoma gene family pRb/p105, p107, pRb2/p130 and simian virus-40 large T-antigen in human mesotheliomas. *Nat. Med.* 3, 913-916.

Ref ID: 1671

Delmer,A., Ajchenbaum-Cymbalista,F., Tang,R., Ramond,S., Faussat,A.M., Marie,J.P., and Zittoun,R. (1995). Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood* 85, 2870-2876.

Ref ID: 3074

Delmer,A., Ajchenbaum-Cymbalista,F., Tang,R., Ramond,S., Faussat,A.M., Marie,J.P., and Zittoun,R. (1995). Over-expression of cyclin D1 in chronic B-cell malignancies with abnormality of chromosome 11q13. *Br. J. Haematol.* 89, 798-804.

Ref ID: 3075

Bibliografía

Deng,C., Zhang,P., Harper,J.W., Elledge,S.J., and Leder,P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.

Ref ID: 3108

Deshpande,A., Sicinski,P., and Hinds,P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909-2915.

Ref ID: 2981

Dessev,G., Iovcheva-Dessev,C., Bischoff,J.R., Beach,D., and Goldman,R. (1991). A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* 112, 523-533.

Ref ID: 3052

Di Stefano,L., Jensen,M.R., and Helin,K. (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.* 22, 6289-6298.

Ref ID: 3144

Dimova,D.K. and Dyson,N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24, 2810-2826.

Ref ID: 2458

Dingwall,C. and Laskey,R.A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16, 478-481.

Ref ID: 3123

Dirac,A.M. and Bernards,R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J. Biol. Chem.* 278, 11731-11734.

Ref ID: 3149

Draetta,G., Brizuela,L., Potashkin,J., and Beach,D. (1987). Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by cdc2+ and suc1+. *Cell* 50, 319-325.

Ref ID: 3043

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

Ref ID: 3212

Dunn,J.M., Phillips,R.A., Becker,A.J., and Gallie,B.L. (1988). Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* 241, 1797-1800.

Ref ID: 3117

Dyson,N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245-2262.

Ref ID: 217

Eggert,M., Radomski,N., Linder,D., Tripiet,D., Traub,P., and Jost,E. (1993). Identification of novel phosphorylation sites in murine A-type lamins. *Eur. J. Biochem.* 213, 659-671.

Ref ID: 3053

Elledge,S.J. and Spottswood,M.R. (1991). A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a *cdc28* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1. *EMBO J.* 10, 2653-2659.

Ref ID: 3044

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

Ref ID: 3046

Ewen,M.E., Sluss,H.K., Sherr,C.J., Matsushime,H., Kato,J., and Livingston,D.M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497.

Ref ID: 3235

FALLS,H.F. and NEEL,J.V. (1951). Genetics of retinoblastoma. *AMA. Arch. Ophthalmol.* 46, 367-389.

Ref ID: 3190

Farkas,T., Hansen,K., Holm,K., Lukas,J., and Bartek,J. (2002). Distinct phosphorylation events regulate p130- and p107-mediated repression of E2F-4. *J. Biol. Chem.* 277, 26741-26752.

Ref ID: 68

Fero,M.L., Rivkin,M., Tasch,M., Porter,P., Carow,C.E., Firpo,E., Polyak,K., Tsai,L.H., Broudy,V., Perlmutter,R.M., Kaushansky,K., and Roberts,J.M. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.

Ref ID: 1651

Ferreira,R., Naguibneva,I., Mathieu,M., Ait-Si-Ali,S., Robin,P., Pritchard,L.L., and Harel-Bellan,A. (2001). Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep.* 2, 794-799.

Ref ID: 3140

Field,S.J., Tsai,F.Y., Kuo,F., Zubiaga,A.M., Kaelin,W.G., Jr., Livingston,D.M., Orkin,S.H., and Greenberg,M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 85, 549-561.

Ref ID: 3132

Filipits,M., Jaeger,U., Pohl,G., Stranzl,T., Simonitsch,I., Kaider,A., Skrabs,C., and Pirker,R. (2002). Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 8, 729-733.

Ref ID: 3078

Bibliografía

Fisher,R.P. and Morgan,D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.

Ref ID: 1166

Franklin,D.S., Godfrey,V.L., Lee,H., Kovalev,G.I., Schoonhoven,R., Chen-Kiang,S., Su,L., and Xiong,Y. (1998). CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev.* 12, 2899-2911.

Ref ID: 1391

Frederick,J.P., Liberati,N.T., Waddell,D.S., Shi,Y., and Wang,X.F. (2004). Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol. Cell Biol.* 24, 2546-2559.

Ref ID: 3233

Fujii,M., Ishiguro,R., Yamashita,T., and Tashiro,M. (2001). Cyclin D1 amplification correlates with early recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer Lett.* 172, 187-192.

Ref ID: 3072

Garcia,I., Murga,M., Vicario,A., Field,S.J., and Zubiaga,A.M. (2000). A role for E2F1 in the induction of apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ.* 11, 91-98.

Ref ID: 3134

Garnovskaya,M.N., Mukhin,Y.V., Vlasova,T.M., Grewal,J.S., Ullian,M.E., Tholanikunnel,B.G., and Raymond,J.R. (2004). Mitogen-induced rapid phosphorylation of serine 795 of the retinoblastoma gene product in vascular smooth muscle cells involves ERK activation. *J. Biol. Chem.* 279, 24899-24905.

Ref ID: 3205

Garriga,J., Jayaraman,A.L., Limon,A., Jayadeva,G., Sotillo,E., Truongcao,M., Patsialou,A., Wadzinski,B.E., and Grana,X. (2004). A dynamic equilibrium between CDKs and PP2A modulates phosphorylation of pRB, p107 and p130. *Cell Cycle* 3, 1320-1330.

Ref ID: 3059

Geng,Y., Eaton,E.N., Picon,M., Roberts,J.M., Lundberg,A.S., Gifford,A., Sardet,C., and Weinberg,R.A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12, 1173-1180.

Ref ID: 429

Geng,Y., Yu,Q., Sicinska,E., Das,M., Schneider,J.E., Bhattacharya,S., Rideout,W.M., Bronson,R.T., Gardner,H., and Sicinski,P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114, 431-443.

Ref ID: 2120

Giacinti,C. and Giordano,A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25, 5220-5227.

Ref ID: 3118

Giet,R. and Prigent,C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 21), 3591-3601.

Ref ID: 3157

Ginsberg,D., Vairo,G., Chittenden,T., Xiao,Z.X., Xu,G., Wydner,K.L., DeCaprio,J.A., Lawrence,J.B., and Livingston,D.M. (1994). E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.* 8, 2665-2679.

Ref ID: 303

Ginsberg,D. (2004). E2F3-a novel repressor of the ARF/p53 pathway. *Dev. Cell* 6, 742-743.

Ref ID: 52

Glover,D.M., Hagan,I.M., and Tavares,A.A. (1998). Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12, 3777-3787.

Ref ID: 3156

Gonzalez,T., Seoane,M., Caamano,P., Vinuela,J., Dominguez,F., and Zalvide,J. (2003). Inhibition of Cdk4 activity enhances translation of p27kip1 in quiescent Rb-negative cells. *J. Biol. Chem.* 278, 12688-12695.

Ref ID: 3173

Grana,X., De Luca,A., Sang,N., Fu,Y., Claudio,P.P., Rosenblatt,J., Morgan,D.O., and Giordano,A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3834-3838.

Ref ID: 3045

Hall,C., Nelson,D.M., Ye,X., Baker,K., DeCaprio,J.A., Seeholzer,S., Lipinski,M., and Adams,P.D. (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol. Cell Biol.* 21, 1854-1865.

Ref ID: 3050

Hanks,S.K. (1987). Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 388-392.

Ref ID: 24

Hannon,G.J., Casso,D., and Beach,D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1731-1735.

Ref ID: 2327

Hannon,G.J. and Beach,D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.

Ref ID: 3084

Hansen,K., Farkas,T., Lukas,J., Holm,K., Ronnstrand,L., and Bartek,J. (2001).

Phosphorylation-dependent and -independent functions of p130 cooperate to evoke a

sustained G1 block. *EMBO J.* 20, 422-432.

Ref ID: 3202

Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Kaye, F.J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241, 353-357.

Ref ID: 3236

Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei, S.A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98, 859-869.

Ref ID: 3234

Harbour, J.W. and Dean, D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393-2409.

Ref ID: 2027

Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., and . (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6, 387-400.

Ref ID: 3213

Harper, J.W. and Adams, P.D. (2001). Cyclin-dependent kinases. *Chem. Rev.* 101, 2511-2526.

Ref ID: 3055

He, J., Allen, J.R., Collins, V.P., Allalunis-Turner, M.J., Godbout, R., Day, R.S., III, and James, C.D. (1994). CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res.* 54, 5804-5807.

Ref ID: 3193

Hedberg, Y., Roos, G., Ljungberg, B., and Landberg, G. (2002). Cyclin D3 protein content in human renal cell carcinoma in relation to cyclin D1 and clinico-pathological parameters. *Acta Oncol.* 41, 175-181.

Ref ID: 3079

Helin, K., Holm, K., Niebuhr, A., Eiberg, H., Tommerup, N., Hougaard, S., Poulsen, H.S., Spang-Thomsen, M., and Norgaard, P. (1997). Loss of the retinoblastoma protein-related p130 protein in small cell lung carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6933-6938.

Ref ID: 3200

Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell Biol.* 15, 2672-2681.

Ref ID: 988

- Hofmann,F. and Livingston,D.M. (1996). Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRb and E2F function during G1 exit. *Genes Dev.* *10*, 851-861.
Ref ID: 47
- Horowitz,J.M., Yandell,D.W., Park,S.H., Canning,S., Whyte,P., Buchkovich,K., Harlow,E., Weinberg,R.A., and Dryja,T.P. (1989). Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* *243*, 937-940.
Ref ID: 3192
- Howard,C.M., Claudio,P.P., De Luca,A., Stiegler,P., Jori,F.P., Safdar,N.M., Caputi,M., Khalili,K., and Giordano,A. (2000). Inducible pRb2/p130 expression and growth-suppressive mechanisms: evidence of a pRb2/p130, p27Kip1, and cyclin E negative feedback regulatory loop. *Cancer Res.* *60*, 2737-2744.
Ref ID: 3124
- Hu,B., Mitra,J., van den,H.S., and Enders,G.H. (2001). S and G2 phase roles for Cdk2 revealed by inducible expression of a dominant-negative mutant in human cells. *Mol. Cell Biol.* *21*, 2755-2766.
Ref ID: 3177
- Humbert,P.O., Verona,R., Trimarchi,J.M., Rogers,C., Dandapani,S., and Lees,J.A. (2000). E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev.* *14*, 690-703.
Ref ID: 1522
- Hunt,T. (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opin. Cell Biol.* *1*, 268-274.
Ref ID: 3047
- Hurford,R.K., Jr., Cobrinik,D., Lee,M.H., and Dyson,N. (1997). pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev.* *11*, 1447-1463.
Ref ID: 3174
- Hwang,H.C. and Clurman,B.E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* *24*, 2776-2786.
Ref ID: 2539
- Ichimura,K., Hanafusa,H., Takimoto,H., Ohgama,Y., Akagi,T., and Shimizu,K. (2000). Structure of the human retinoblastoma-related p107 gene and its intragenic deletion in a B-cell lymphoma cell line. *Gene* *251*, 37-43.
Ref ID: 3119
- Ikeda,M.A., Jakoi,L., and Nevins,J.R. (1996). A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 3215-3220.
Ref ID: 3113

Bibliografia

Jacks,T., Fazeli,A., Schmitt,E.M., Bronson,R.T., Goodell,M.A., and Weinberg,R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.

Ref ID: 3241

Janzen,V., Forkert,R., Fleming,H.E., Saito,Y., Waring,M.T., Dombkowski,D.M., Cheng,T., DePinho,R.A., Sharpless,N.E., and Scadden,D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443, 421-426.

Ref ID: 3094

Jeffrey,P.D., Russo,A.A., Polyak,K., Gibbs,E., Hurwitz,J., Massague,J., and Pavletich,N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.

Ref ID: 3085

Kaldis,P., Sutton,A., and Solomon,M.J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 86, 553-564.

Ref ID: 3024

Kaldis,P., Russo,A.A., Chou,H.S., Pavletich,N.P., and Solomon,M.J. (1998). Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol. Biol. Cell* 9, 2545-2560.

Ref ID: 676

Kaldis,P., Pitluk,Z.W., Bany,I.A., Enke,D.A., Wagner,M., Winter,E., and Solomon,M.J. (1998). Localization and regulation of the cdk-activating kinase (Cak1p) from budding yeast. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 24), 3585-3596.

Ref ID: 3023

Kaldis,P. (1999). The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 284-296.

Ref ID: 3223

Kaldis,P. and Aleem,E. (2005). Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. *Cell Cycle* 4, 1491-1494.

Ref ID: 3018

Karsunky,H., Geisen,C., Schmidt,T., Haas,K., Zevnik,B., Gau,E., and Moroy,T. (1999). Oncogenic potential of cyclin E in T-cell lymphomagenesis in transgenic mice: evidence for cooperation between cyclin E and Ras but not Myc. *Oncogene* 18, 7816-7824.

Ref ID: 7

Kasten,M. and Giordano,A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20, 1832-1838.

Ref ID: 3060

Kato,J., Matsushime,H., Hiebert,S.W., Ewen,M.E., and Sherr,C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin

D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 7, 331-342.

Ref ID: 3049

Keezer, S.M. and Gilbert, D.M. (2002). Evidence for a pre-restriction point Cdk3 activity. *J. Cell Biochem.* 85, 545-552.

Ref ID: 3186

Kesavapany, S., Li, B.S., Amin, N., Zheng, Y.L., Grant, P., and Pant, H.C. (2004). Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 143-153.

Ref ID: 3056

Keyomarsi, K., O'Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H.J., and Pardee, A.B. (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res.* 54, 380-385.

Ref ID: 3086

Khatib, Z.A., Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D.N., Sherr, C.J., and Look, A.T. (1993). Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res.* 53, 5535-5541.

Ref ID: 1211

Kim, J.W., Closs, E.I., Albritton, L.M., and Cunningham, J.M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728.

Ref ID: 3164

Kirchmaier, A.L. and Rine, J. (2006). Cell cycle requirements in assembling silent chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 26, 852-862.

Ref ID: 3087

Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-732.

Ref ID: 1652

Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 68, 820-823.

Ref ID: 3116

Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R., and Roberts, J.M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689-1694.

Ref ID: 1420

Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J.M., and Massague, J. (1993). Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 260, 536-539.

Ref ID: 100

Bibliografia

Kohn,M.J., Bronson,R.T., Harlow,E., Dyson,N.J., and Yamasaki,L. (2003). Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development* 130, 1295-1305.

Ref ID: 3139

Kotake,Y., Cao,R., Viatour,P., Sage,J., Zhang,Y., and Xiong,Y. (2007). pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 21, 49-54.

Ref ID: 3154

Kozar,K., Ciemerych,M.A., Rebel,V.I., Shigematsu,H., Zagozdzon,A., Sicinska,E., Geng,Y., Yu,Q., Bhattacharya,S., Bronson,R.T., Akashi,K., and Sicinski,P. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491.

Ref ID: 2360

Krimpenfort,P., Quon,K.C., Mooi,W.J., Loonstra,A., and Berns,A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83-86.

Ref ID: 1924

Krimpenfort,P., Ijpenberg,A., Song,J.Y., van,d., V, Nawijn,M., Zevenhoven,J., and Berns,A. (2007). p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature* 448, 943-946.

Ref ID: 3238

Krishnamurthy,J., Ramsey,M.R., Ligon,K.L., Torrice,C., Koh,A., Bonner-Weir,S., and Sharpless,N.E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443, 453-457.

Ref ID: 3095

LaBaer,J., Garrett,M.D., Stevenson,L.F., Slingerland,J.M., Sandhu,C., Chou,H.S., Fattaey,A., and Harlow,E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847-862.

Ref ID: 3102

Lammie,G.A. and Peters,G. (1991). Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells* 3, 413-420.

Ref ID: 3067

Lammie,G.A., Fantl,V., Smith,R., Schuurin,g,E., Brookes,S., Michalides,R., Dickson,C., Arnold,A., and Peters,G. (1991). D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene* 6, 439-444.

Ref ID: 3068

Larochelle,S., Merrick,K.A., Terret,M.E., Wohlbold,L., Barboza,N.M., Zhang,C., Shokat,K.M., Jallepalli,P.V., and Fisher,R.P. (2007). Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol. Cell* 25, 839-850.

Ref ID: 3222

Latres,E., Malumbres,M., Sotillo,R., Martin,J., Ortega,S., Martin-Caballero,J., Flores,J.M., Cordon-Cardo,C., and Barbacid,M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* *19*, 3496-3506.

Ref ID: 1573

Le Cam,L., Polanowska,J., Fabrizio,E., Olivier,M., Philips,A., Ng,E.E., Classon,M., Geng,Y., and Sardet,C. (1999). Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *EMBO J.* *18*, 1878-1890.

Ref ID: 1699

Le,H.V., Minn,A.J., and Massague,J. (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 32018-32025.

Ref ID: 3101

LeCouter,J.E., Kablar,B., Whyte,P.F., Ying,C., and Rudnicki,M.A. (1998). Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene. *Development* *125*, 4669-4679.

Ref ID: 529

LeCouter,J.E., Kablar,B., Hardy,W.R., Ying,C., Megeney,L.A., May,L.L., and Rudnicki,M.A. (1998). Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the Rb-related p107 gene. *Mol. Cell Biol.* *18*, 7455-7465.

Ref ID: 207

Lee,E.Y., Chang,C.Y., Hu,N., Wang,Y.C., Lai,C.C., Herrup,K., Lee,W.H., and Bradley,A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* *359*, 288-294.

Ref ID: 3242

Lee,J.O., Russo,A.A., and Pavletich,N.P. (1998). Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* *391*, 859-865.

Ref ID: 3121

Lee,M.G. and Nurse,P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* *327*, 31-35.

Ref ID: 16

Lee,M.G. and Nurse,P. (1987). Cell cycle genes of the fission yeast. *Sci. Prog.* *71*, 1-14.

Ref ID: 23

Lee,W.H., Bookstein,R., and Lee,E.Y. (1988). Studies on the human retinoblastoma susceptibility gene. *J. Cell Biochem.* *38*, 213-227.

Ref ID: 3237

Bibliografia

Leone,G., Nuckolls,F., Ishida,S., Adams,M., Sears,R., Jakoi,L., Miron,A., and Nevins,J.R. (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol. Cell Biol.* *20*, 3626-3632.

Ref ID: 1521

Li,T., Inoue,A., Lahti,J.M., and Kidd,V.J. (2004). Failure to proliferate and mitotic arrest of CDK11(p110/p58)-null mutant mice at the blastocyst stage of embryonic cell development. *Mol. Cell Biol.* *24*, 3188-3197.

Ref ID: 3064

Lin,S.C., Skapek,S.X., and Lee,E.Y. (1996). Genes in the RB pathway and their knockout in mice. *Semin. Cancer Biol.* *7*, 279-289.

Ref ID: 1519

Liu,D., Matzuk,M.M., Sung,W.K., Guo,Q., Wang,P., and Wolgemuth,D.J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* *20*, 377-380.

Ref ID: 816

Liu,H., Dibling,B., Spike,B., Dirlam,A., and Macleod,K. (2004). New roles for the RB tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *14*, 55-64.

Ref ID: 2690

Liu,W. and Saint,D.A. (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *294*, 347-353.

Ref ID: 3183

Liu,W. and Saint,D.A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal. Biochem.* *302*, 52-59.

Ref ID: 3184

Lloyd,R.V., Erickson,L.A., Jin,L., Kulig,E., Qian,X., Cheville,J.C., and Scheithauer,B.W. (1999). p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am. J. Pathol.* *154*, 313-323.

Ref ID: 3110

Lolli,G. and Johnson,L.N. (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* *4*, 572-577.

Ref ID: 3058

Loyer,P., Trembley,J.H., Katona,R., Kidd,V.J., and Lahti,J.M. (2005). Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal.* *17*, 1033-1051.

Ref ID: 3061

Ludlow,J.W., Glendening,C.L., Livingston,D.M., and DeCarprio,J.A. (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* *13*, 367-372.

Ref ID: 3122

- Luo,R.X., Postigo,A.A., and Dean,D.C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463-473.
Ref ID: 4
- Maandag,E.C., van,d.V., Vlaar,M., Feltkamp,C., O'Brien,J., van,R.M., van,d.L., Berns,A., and te,R.H. (1994). Developmental rescue of an embryonic-lethal mutation in the retinoblastoma gene in chimeric mice. *EMBO J.* 13, 4260-4268.
Ref ID: 346
- Magnaghi-Jaulin,L., Groisman,R., Naguibneva,I., Robin,P., Lorain,S., Le,V.J., Troalen,F., Trouche,D., and Harel-Bellan,A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase [see comments]. *Nature* 391, 601-605.
Ref ID: 57
- Malumbres,M. and Barbacid,M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 222-231.
Ref ID: 2355
- Malumbres,M. and Carnero,A. (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog. Cell Cycle Res.* 5, 5-18.
Ref ID: 3197
- Malumbres,M., Sotillo,R., Santamaria,D., Galan,J., Cerezo,A., Ortega,S., Dubus,P., and Barbacid,M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504.
Ref ID: 2349
- Malumbres,M. and Barbacid,M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630-641.
Ref ID: 2948
- Martin-Caballero,J., Flores,J.M., Garcia-Palencia,P., and Serrano,M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res.* 61, 6234-6238.
Ref ID: 3107
- Martin,A., Odajima,J., Hunt,S.L., Dubus,P., Ortega,S., Malumbres,M., and Barbacid,M. (2005). Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell* 7, 591-598.
Ref ID: 2951
- Medema,R.H., Herrera,R.E., Lam,F., and Weinberg,R.A. (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6289-6293.
Ref ID: 1319
- Meijer,L., Borgne,A., Mulner,O., Chong,J.P., Blow,J.J., Inagaki,N., Inagaki,M., Delcros,J.G., and Moulinoux,J.P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J.*

Bibliografía

Biochem. 243, 527-536.

Ref ID: 3176

Meyerson,M., Enders,G.H., Wu,C.L., Su,L.K., Gorka,C., Nelson,C., Harlow,E., and Tsai,L.H. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. EMBO J. 11, 2909-2917.

Ref ID: 3

Modi,S., Kubo,A., Oie,H., Coxon,A.B., Rehmatulla,A., and Kaye,F.J. (2000). Protein expression of the RB-related gene family and SV40 large T antigen in mesothelioma and lung cancer. Oncogene 19, 4632-4639.

Ref ID: 3163

Molofsky,A.V., Slutsky,S.G., Joseph,N.M., He,S., Pardal,R., Krishnamurthy,J., Sharpless,N.E., and Morrison,S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. Nature 443, 448-452.

Ref ID: 3096

Morgan,D.O. (1995). Principles of CDK regulation. Nature 374, 131-134.

Ref ID: 1162

Morrison,A.J., Sardet,C., and Herrera,R.E. (2002). Retinoblastoma protein transcriptional repression through histone deacetylation of a single nucleosome. Mol. Cell Biol. 22, 856-865.

Ref ID: 2585

Motokura,T. and Arnold,A. (1993). Cyclin D and oncogenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 3, 5-10.

Ref ID: 3076

Mueller,P.R., Coleman,T.R., Kumagai,A., and Dunphy,W.G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. Science 270, 86-90.

Ref ID: 3088

Mueller,P.R., Coleman,T.R., and Dunphy,W.G. (1995). Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase. Mol. Biol. Cell 6, 119-134.

Ref ID: 3089

Muller,H., Bracken,A.P., Vernell,R., Moroni,M.C., Christians,F., Grassilli,E., Prosperini,E., Vigo,E., Oliner,J.D., and Helin,K. (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. Genes Dev. 15, 267-285.

Ref ID: 3199

Mulligan,G. and Jacks,T. (1998). The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. Trends Genet. 14, 223-229.

Ref ID: 3198

Murga,M., Fernandez-Capetillo,O., Field,S.J., Moreno,B., Borlado,L.R., Fujiwara,Y., Balomenos,D., Vicario,A., Carrera,A.C., Orkin,S.H., Greenberg,M.E., and Zubiaga,A.M. (2001). Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity*. *15*, 959-970.

Ref ID: 3135

Murphy,M., Stinnakre,M.G., Senamaud-Beaufort,C., Winston,N.J., Sweeney,C., Kubelka,M., Carrington,M., Brechot,C., and Sobczak-Thepot,J. (1997). Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat. Genet.* *15*, 83-86.

Ref ID: 818

Murphy,N., Ring,M., Heffron,C.C., King,B., Killalea,A.G., Hughes,C., Martin,C.M., McGuinness,E., Sheils,O., and O'Leary,J.J. (2005). p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* *58*, 525-534.

Ref ID: 22

Nakayama,K., Ishida,N., Shirane,M., Inomata,A., Inoue,T., Shishido,N., Horii,I., Loh,D.Y., and Nakayama,K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* *85*, 707-720.

Ref ID: 1650

Nakayama,K. and Nakayama,K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* *20*, 1020-1029.

Ref ID: 3105

Nakayama,K., Nagahama,H., Minamishima,Y.A., Matsumoto,M., Nakamichi,I., Kitagawa,K., Shirane,M., Tsunematsu,R., Tsukiyama,T., Ishida,N., Kitagawa,M., Nakayama,K., and Hatakeyama,S. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* *19*, 2069-2081.

Ref ID: 3216

Nakayama,K., Nagahama,H., Minamishima,Y.A., Miyake,S., Ishida,N., Hatakeyama,S., Kitagawa,M., Iemura,S., Natsume,T., and Nakayama,K.I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev. Cell* *6*, 661-672.

Ref ID: 3217

Narita,M., Narita,M., Krizhanovsky,V., Nunez,S., Chicas,A., Hearn,S.A., Myers,M.P., and Lowe,S.W. (2006). A novel role for high-mobility group A proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* *126*, 503-514.

Ref ID: 3098

Nath,N., Wang,S., Betts,V., Knudsen,E., and Chellappan,S. (2003). Apoptotic and mitogenic stimuli inactivate Rb by differential utilization of p38 and cyclin-dependent kinases. *Oncogene* *22*, 5986-5994.

Ref ID: 3207

Bibliografia

- Nevins,J.R. (1998). Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 9, 585-593.
Ref ID: 3228
- Nguyen,T.B., Manova,K., Capodiecì,P., Lindon,C., Bottega,S., Wang,X.Y., Refik-Rogers,J., Pines,J., Wolgemuth,D.J., and Koff,A. (2002). Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J. Biol. Chem.* 277, 41960-41969.
Ref ID: 2135
- Nielsen,N.H., Arnerlov,C., Emdin,S.O., and Landberg,G. (1996). Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br. J. Cancer* 74 , 874-880.
Ref ID: 5
- Nigg,E.A. (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 776-783.
Ref ID: 3155
- Nigg,E.A. (2001). Cell cycle regulation by protein kinases and phosphatases. Ernst. Schering. Res. Found. Workshop 19-46.
Ref ID: 3219
- Nilsson,I. and Hoffmann,I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.* 4, 107-114.
Ref ID: 14
- Obaya,A.J., Mateyak,M.K., and Sedivy,J.M. (1999). Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18, 2934-2941.
Ref ID: 1661
- Obaya,A.J. and Sedivy,J.M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 126-142.
Ref ID: 3159
- Ogawa,H., Ishiguro,K., Gaubatz,S., Livingston,D.M., and Nakatani,Y. (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-1136.
Ref ID: 3142
- Ohshima,T., Kozak,C.A., Nagle,J.W., Pant,H.C., Brady,R.O., and Kulkarni,A.B. (1996). Molecular cloning and chromosomal mapping of the mouse gene encoding cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit p35. *Genomics* 35, 372-375.
Ref ID: 3063
- Ohtani,K. (1999). Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication. *Front Biosci.* 4, D793-D804.
Ref ID: 3115

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

Ref ID: 3180

Okamoto,A., Demetrick,D.J., Spillare,E.A., Hagiwara,K., Hussain,S.P., Bennett,W.P., Forrester,K., Gerwin,B., Serrano,M., Beach,D.H., and . (1994). Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 11045-11049.

Ref ID: 3153

Ookata,K., Hisanaga,S., Bulinski,J.C., Murofushi,H., Aizawa,H., Itoh,T.J., Hotani,H., Okumura,E., Tachibana,K., and Kishimoto,T. (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* *128*, 849-862.

Ref ID: 3054

Ortega,S., Malumbres,M., and Barbacid,M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1602*, 73-87.

Ref ID: 2128

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

Ref ID: 2125

Otte,A.P. and Kwaks,T.H. (2003). Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 448-454.

Ref ID: 3129

Otterson,G.A., Kratzke,R.A., Coxon,A., Kim,Y.W., and Kaye,F.J. (1994). Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene* *9*, 3375-3378.

Ref ID: 3194

Paddison,P.J., Caudy,A.A., Bernstein,E., Hannon,G.J., and Conklin,D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* *16*, 948-958.

Ref ID: 3165

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

Ref ID: 3178

Pagano,M., Draetta,G., and Jansen-Durr,P. (1992). Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* *255*, 1144-1147.

Ref ID: 3179

Bibliografia

- Paggi,M.G. and Giordano,A. (2001). Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little brother. *Cancer Res.* 61, 4651-4654.
Ref ID: 3162
- Pardee,A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.
Ref ID: 3175
- Parisi,T., Beck,A.R., Rougier,N., McNeil,T., Lucian,L., Werb,Z., and Amati,B. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J.* 22, 4794-4803.
Ref ID: 3066
- Parker,L.L. and Piwnica-Worms,H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257, 1955-1957.
Ref ID: 12
- Pasgue,E. and Wagner,E.F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* 19, 2969-2979.
Ref ID: 3160
- Payton,M., Chung,G., Yakowec,P., Wong,A., Powers,D., Xiong,L., Zhang,N., Leal,J., Bush,T.L., Santora,V., Askew,B., Tasker,A., Radinsky,R., Kendall,R., and Coats,S. (2006). Discovery and evaluation of dual CDK1 and CDK2 inhibitors. *Cancer Res.* 66, 4299-4308.
Ref ID: 3188
- Pei,X.H. and Xiong,Y. (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 24, 2787-2795.
Ref ID: 2533
- Peng,J., Marshall,N.F., and Price,D.H. (1998). Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb. *J. Biol. Chem.* 273, 13855-13860.
Ref ID: 3224
- Peng,J., Zhu,Y., Milton,J.T., and Price,D.H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.* 12, 755-762.
Ref ID: 3225
- Petersen,B.O., Lukas,J., Sorensen,C.S., Bartek,J., and Helin,K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* 18, 396-410.
Ref ID: 757
- Polyak,K., Lee,M.H., Erdjument-Bromage,H., Koff,A., Roberts,J.M., Tempst,P., and Massague,J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.
Ref ID: 1976

Polyak,K., Kato,J.Y., Solomon,M.J., Sherr,C.J., Massague,J., Roberts,J.M., and Koff,A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9-22.

Ref ID: 1207

Quelle,D.E., Zindy,F., Ashmun,R.A., and Sherr,C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.

Ref ID: 10

Quelle,D.E., Ashmun,R.A., Hannon,G.J., Rehberger,P.A., Trono,D., Richter,K.H., Walker,C., Beach,D., Sherr,C.J., and Serrano,M. (1995). Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* 11, 635-645.

Ref ID: 439

Ramsey,M.R., Krishnamurthy,J., Pei,X.H., Torrice,C., Lin,W., Carrasco,D.R., Ligon,K.L., Xiong,Y., and Sharpless,N.E. (2007). Expression of p16Ink4a compensates for p18Ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues. *Cancer Res.* 67, 4732-4741.

Ref ID: 19

Rane,S.G., Dubus,P., Mettus,R.V., Galbreath,E.J., Boden,G., Reddy,E.P., and Barbacid,M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* 22, 44-52.

Ref ID: 1320

Rayman,J.B., Takahashi,Y., Indjeian,V.B., Dannenberg,J.H., Catchpole,S., Watson,R.J., te,R.H., and Dynlacht,B.D. (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 16, 933-947.

Ref ID: 2483

Raynaud,F.I., Whittaker,S.R., Fischer,P.M., McClue,S., Walton,M.I., Barrie,S.E., Garrett,M.D., Rogers,P., Clarke,S.J., Kelland,L.R., Valenti,M., Brunton,L., Eccles,S., Lane,D.P., and Workman,P. (2005). In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin. Cancer Res.* 11, 4875-4887.

Ref ID: 3185

Reed,S.I. (1997). Control of the G1/S transition. *Cancer Surv.* 29, 7-23.

Ref ID: 3220

Reinberg,D., Orphanides,G., Ebright,R., Akoulitchev,S., Carcamo,J., Cho,H., Cortes,P., Drapkin,R., Flores,O., Ha,I., Inostroza,J.A., Kim,S., Kim,T.K., Kumar,P., Lagrange,T., LeRoy,G., Lu,H., Ma,D.M., Maldonado,E., Merino,A., Mermelstein,F., Olave,I., Sheldon,M., Shiekhattar,R., Zawel,L., and . (1998). The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63,

Bibliografía

83-103.

Ref ID: 11

Reissmann,P.T., Koga,H., Figlin,R.A., Holmes,E.C., and Slamon,D.J. (1999). Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *125*, 61-70.

Ref ID: 3069

Rempel,R.E., Saenz-Robles,M.T., Storms,R., Morham,S., Ishida,S., Engel,A., Jakoi,L., Melhem,M.F., Pipas,J.M., Smith,C., and Nevins,J.R. (2000). Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol. Cell* *6*, 293-306.

Ref ID: 3232

Ren,S. and Rollins,B.J. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* *117*, 239-251.

Ref ID: 2258

Reynisdottir,I., Polyak,K., Iavarone,A., and Massague,J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* *9*, 1831-1845.

Ref ID: 1844

Rodrigo,J.P., Garcia,L.A., Ramos,S., Lazo,P.S., and Suarez,C. (2000). EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* *6*, 3177-3182.

Ref ID: 3070

Rodriguez,A., Armstrong,M., Dwyer,D., and Flemington,E. (1999). Genetic dissection of cell growth arrest functions mediated by the Epstein-Barr virus lytic gene product, Zta. *J. Virol.* *73*, 9029-9038.

Ref ID: 3090

Ross,J.F., Naar,A., Cam,H., Gregory,R., and Dynlacht,B.D. (2001). Active repression and E2F inhibition by pRB are biochemically distinguishable. *Genes Dev.* *15*, 392-397.

Ref ID: 1860

Roy,K.K. and Sausville,E.A. (2001). Early development of cyclin dependent kinase modulators. *Curr. Pharm. Des.* *7*, 1669-1687.

Ref ID: 3210

Ruas,M. and Peters,G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta* *1378*, F115-F177.

Ref ID: 21

Russell,P. and Nurse,P. (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* *45*, 145-153.

Ref ID: 13

Sage,J., Mulligan,G.J., Attardi,L.D., Miller,A., Chen,S., Williams,B., Theodorou,E., and Jacks,T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev.* *14*, 3037-3050.

Ref ID: 2681

Sage,J., Miller,A.L., Perez-Mancera,P.A., Wysocki,J.M., and Jacks,T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* *424*, 223-228.

Ref ID: 2677

Santamaria,D. and Ortega,S. (2006). Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci.* *11*, 1164-1188.

Ref ID: 8

Santamaria,D., Barriere,C., Cerqueira,A., Hunt,S., Tardy,C., Newton,K., Caceres,J.F., Dubus,P., Malumbres,M., and Barbacid,M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* *448*, 811-815.

Ref ID: 3062

Sardet,C., Vidal,M., Cobrinik,D., Geng,Y., Onufryk,C., Chen,A., and Weinberg,R.A. (1995). E2F-4 and E2F-5, two members of the E2F family, are expressed in the early phases of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 2403-2407.

Ref ID: 1544

Schmidt,E.E., Ichimura,K., Reifenberger,G., and Collins,V.P. (1994). CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.* *54*, 6321-6324.

Ref ID: 3080

Scott,K.A. and Walker,R.A. (1997). Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br. J. Cancer* *76*, 1288-1292.

Ref ID: 3091

Seabra,L. and Wahrenius,H. (2007). Proteomic co-expression of cyclin-dependent kinases 1 and 4 in human cancer cells. *Eur. J. Cancer* *43*, 1483-1492.

Ref ID: 3218

Serizawa,H., Makela,T.P., Conaway,J.W., Conaway,R.C., Weinberg,R.A., and Young,R.A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature* *374*, 280-282.

Ref ID: 3092

Serrano,M., Hannon,G.J., and Beach,D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* *366*, 704-707.

Ref ID: 2329

Bibliografía

Serrano,M., Lee,H., Chin,L., Cordon-Cardo,C., Beach,D., and DePinho,R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.

Ref ID: 801

Serrano,M. and Blasco,M.A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 748-753.

Ref ID: 3147

Shapiro,G.I., Edwards,C.D., Kobzik,L., Godleski,J., Richards,W., Sugarbaker,D.J., and Rollins,B.J. (1995). Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.* 55, 505-509.

Ref ID: 3196

Sharpless,N.E. and DePinho,R.A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 22-30.

Ref ID: 15

Sharpless,N.E., Bardeesy,N., Lee,K.H., Carrasco,D., Castrillon,D.H., Aguirre,A.J., Wu,E.A., Horner,J.W., and DePinho,R.A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.

Ref ID: 2448

Sharpless,N.E. and DePinho,R.A. (2005). Cancer: crime and punishment. *Nature* 436, 636-637.

Ref ID: 2468

Sheaff,R.J., Groudine,M., Gordon,M., Roberts,J.M., and Clurman,B.E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11, 1464-1478.

Ref ID: 1830

Sherr,C.J. and Weber,J.D. The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000. Feb. ;10. (1.):94. -9. 10, 94-99.

Ref ID: 1177

Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149-1163.

Ref ID: 1202

Sherr,C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Ref ID: 66

Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.

Ref ID: 1182

Sherr,C.J. (2000). Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* 96, 73-92.

Ref ID: 2

Sherr,C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60, 3689-3695.

Ref ID: 18

Sherr,C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.

Ref ID: 17

Simon,R., Struckmann,K., Schraml,P., Wagner,U., Forster,T., Moch,H., Fijan,A., Bruderer,J., Wilber,K., Mihatsch,M.J., Gasser,T., and Sauter,G. (2002). Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* 21, 2476-2483.

Ref ID: 3083

Slingerland,J.M., Hengst,L., Pan,C.H., Alexander,D., Stampfer,M.R., and Reed,S.I. (1994). A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 3683-3694.

Ref ID: 3227

Soeiro,I., Mohamedali,A., Romanska,H.M., Lea,N.C., Child,E.S., Glassford,J., Orr,S.J., Roberts,C., Naresh,K.N., Lalani,e., Mann,D.J., Watson,R.J., Thomas,N.S., and Lam,E.W. (2006). p27Kip1 and p130 cooperate to regulate hematopoietic cell proliferation in vivo. *Mol. Cell Biol.* 26, 6170-6184.

Ref ID: 3127

Soos,T.J., Kiyokawa,H., Yan,J.S., Rubin,M.S., Giordano,A., DeBlasio,A., Bottega,S., Wong,B., Mendelsohn,J., and Koff,A. (1996). Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ.* 7, 135-146.

Ref ID: 1963

Sotillo,R., Dubus,P., Martin,J., de la,C.E., Ortega,S., Malumbres,M., and Barbacid,M. (2001). Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *EMBO J.* 20, 6637-6647.

Ref ID: 2049

Stiegler,P., De,L.A., Bagella,L., and Giordano,A. (1998). The COOH-terminal region of pRb2/p130 binds to histone deacetylase 1 (HDAC1), enhancing transcriptional repression of the E2F-dependent cyclin A promoter. *Cancer Res.* 58, 5049-5052.

Ref ID: 526

Storre,J., Elsasser,H.P., Fuchs,M., Ullmann,D., Livingston,D.M., and Gaubatz,S. (2002). Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *EMBO Rep.* 3, 695-700.

Ref ID: 3128

Strober,B.E., Dunaief,J.L., Guha, and Goff,S.P. (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell Biol.* 16, 1576-1583.

Ref ID: 275

Bibliografia

Takahashi,A., Ohtani,N., Yamakoshi,K., Iida,S., Tahara,H., Nakayama,K., Nakayama,K.I., Ide,T., Saya,H., and Hara,E. (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* 8, 1291-1297.

Ref ID: 3152

Takahashi,Y., Rayman,J.B., and Dynlacht,B.D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14, 804-816.

Ref ID: 3141

Tassan,J.P., Jaquenoud,M., Fry,A.M., Frutiger,S., Hughes,G.J., and Nigg,E.A. (1995). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J.* 14, 5608-5617.

Ref ID: 2717

Taubert,S., Gorrini,C., Frank,S.R., Parisi,T., Fuchs,M., Chan,H.M., Livingston,D.M., and Amati,B. (2004). E2F-dependent histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol. Cell Biol.* 24, 4546-4556.

Ref ID: 3143

Tetsu,O. and McCormick,F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell* 3, 233-245.

Ref ID: 3181

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

Ref ID: 3103

Trimarchi,J.M., Fairchild,B., Wen,J., and Lees,J.A. (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1519-1524.

Ref ID: 3231

Trimarchi,J.M. and Lees,J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11-20.

Ref ID: 2076

Tsai,L.H., Harlow,E., and Meyerson,M. (1991). Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* 353, 174-177.

Ref ID: 1

Tsihlias,J., Kapusta,L., and Slingerland,J. (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu. Rev. Med.* 50, 401-423.

Ref ID: 3111

Tsutsui,T., Hesabi,B., Moons,D.S., Pandolfi,P.P., Hansel,K.S., Koff,A., and Kiyokawa,H. (1999). Targeted Disruption of CDK4 Delays Cell Cycle Entry with Enhanced p27(Kip1)

Activity. *Mol. Cell Biol.* 19, 7011-7019.
Ref ID: 745

Tsvetkov,L.M., Yeh,K.H., Lee,S.J., Sun,H., and Zhang,H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* 9, 661-664.
Ref ID: 3104

Ubersax,J.A., Woodbury,E.L., Quang,P.N., Paraz,M., Blethrow,J.D., Shah,K., Shokat,K.M., and Morgan,D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859-864.
Ref ID: 3051

van den,H.S. and Harlow,E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262, 2050-2054.
Ref ID: 3169

Vassilev,L.T. (2006). Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell Cycle* 5, 2555-2556.
Ref ID: 3215

Vidal,A. and Koff,A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.
Ref ID: 1574

Vidal,A., Carneiro,C., and Zalvide,J.B. (2007). Of mice without pockets: mouse models to study the function of Rb family proteins. *Front Biosci.* 12, 4483-4496.
Ref ID: 3126

Vielba,R., Bilbao,J., Ispizua,A., Zabalza,I., Alfaro,J., Rezola,R., Moreno,E., Elorriaga,J., Alonso,I., Baroja,A., and de la,H.C. (2003). p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 113, 167-172.
Ref ID: 3073

Voorhoeve,P.M. and Agami,R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* 4, 311-319.
Ref ID: 3168

Wang,T.C., Cardiff,R.D., Zukerberg,L., Lees,E., Arnold,A., and Schmidt,E.V. (1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369, 669-671.
Ref ID: 1889

Wei,G., Lonardo,F., Ueda,T., Kim,T., Huvos,A.G., Healey,J.H., and Ladanyi,M. (1999). CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *Int. J. Cancer* 80, 199-204.
Ref ID: 3081

Bibliografia

- Wells,J., Boyd,K.E., Fry,C.J., Bartley,S.M., and Farnham,P.J. (2000). Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol. Cell Biol.* *20*, 5797-5807.
Ref ID: 2017
- Williams,B.O., Schmitt,E.M., Remington,L., Bronson,R.T., Albert,D.M., Weinberg,R.A., and Jacks,T. (1994). Extensive contribution of Rb-deficient cells to adult chimeric mice with limited histopathological consequences. *EMBO J.* *13*, 4251-4259.
Ref ID: 347
- Wong,C.K., Zhang,J.P., Lam,C.W., Ho,C.Y., and Hjelm,N.M. (1999). Opposing effects of sodium salicylate and haematopoietic cytokines IL-3, IL-5 and GM-CSF on mitogen-activated protein kinases and apoptosis of EoL-1 cells. *Immunol. Invest* *28*, 365-379.
Ref ID: 3206
- Wu,L., Timmers,C., Maiti,B., Saavedra,H.I., Sang,L., Chong,G.T., Nuckolls,F., Giangrande,P., Wright,F.A., Field,S.J., Greenberg,M.E., Orkin,S., Nevins,J.R., Robinson,M.L., and Leone,G. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* *414*, 457-462.
Ref ID: 2102
- Xiang,J., Lahti,J.M., Grenet,J., Easton,J., and Kidd,V.J. (1994). Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms. *J. Biol. Chem.* *269*, 15786-15794.
Ref ID: 27
- Xie,Z. and Tsai,L.H. (2004). Cdk5 phosphorylation of FAK regulates centrosome-associated microtubules and neuronal migration. *Cell Cycle* *3*, 108-110.
Ref ID: 3057
- Xiong,Y. and Beach,D. (1991). Population explosion in the cyclin family. *Curr. Biol.* *1*, 362-364.
Ref ID: 3048
- Xiong,Y., Zhang,H., and Beach,D. (1993). Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev.* *7*, 1572-1583.
Ref ID: 20
- Yamasaki,L., Jacks,T., Bronson,R., Goillot,E., Harlow,E., and Dyson,N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* *85*, 537-548.
Ref ID: 9
- Yan,Y., Frisen,J., Lee,M.H., Massague,J., and Barbacid,M. (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* *11*, 973-983.
Ref ID: 3109

- Ye,X., Zhu,C., and Harper,J.W. (2001). A premature-termination mutation in the *Mus musculus* cyclin-dependent kinase 3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1682-1686.
Ref ID: 3214
- Zhang,P., Liegeois,N.J., Wong,C., Finegold,M., Hou,H., Thompson,J.C., Silverman,A., Harper,J.W., DePinho,R.A., and Elledge,S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151-158.
Ref ID: 683
- Zhang,R., Poustovoitov,M.V., Ye,X., Santos,H.A., Chen,W., Daganzo,S.M., Erzberger,J.P., Serebriiskii,I.G., Canutescu,A.A., Dunbrack,R.L., Pehrson,J.R., Berger,J.M., Kaufman,P.D., and Adams,P.D. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8, 19-30.
Ref ID: 3097
- Zhu,J.W., DeRyckere,D., Li,F.X., Wan,Y.Y., and DeGregori,J. (1999). A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ.* 10, 829-838.
Ref ID: 3133
- Zhu,J.W., Field,S.J., Gore,L., Thompson,M., Yang,H., Fujiwara,Y., Cardiff,R.D., Greenberg,M., Orkin,S.H., and DeGregori,J. (2001). E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* 21, 8547-8564.
Ref ID: 3136
- Zhu,L., van,d.H., Helin,K., Fattaey,A., Ewen,M., Livingston,D., Dyson,N., and Harlow,E. (1993). Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 7, 1111-1125.
Ref ID: 1327
- Zhu,W., Giangrande,P.H., and Nevins,J.R. (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J.* 23, 4615-4626.
Ref ID: 2595
- Ziebold,U., Lee,E.Y., Bronson,R.T., and Lees,J.A. (2003). E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol. Cell Biol.* 23, 6542-6552.
Ref ID: 3137
- Zindy,F., Quelle,D.E., Roussel,M.F., and Sherr,C.J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, 203-211.
Ref ID: 1194

Bibliografía

Zindy,F., van Deursen,J., Grosveld,G., Sherr,C.J., and Roussel,M.F. (2000). INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol. Cell Biol.* 20, 372-378.

Ref ID: 3093

Zou,X., Ray,D., Aziyu,A., Christov,K., Boiko,A.D., Gudkov,A.V., and Kiyokawa,H. (2002). Cdk4 disruption renders primary mouse cells resistant to oncogenic transformation, leading to Arf/p53-independent senescence. *Genes Dev.* 16, 2923-2934.

Ref ID: 2058

Zwijsen,R.M., Wientjens,E., Klompmaker,R., van,d.S., Bernards,R., and Michalides,R.J. (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88, 405-415.

Ref ID: 798