

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Proteínas INK4 en el mantenimiento de la integridad del genoma : participación de p19INK4d en los mecanismos de reparación del DNA en células neuronales

Ceruti, Julieta María
2007

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Proteínas INK4 en el mantenimiento de la
integridad del genoma.**

Participación de p19INK4d en los mecanismos de
reparación del DNA en células neuronales.

Lic. Julieta María Ceruti

Director: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

Laboratorio de Biología Molecular
Departamento de Química Biológica

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

2007

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Al Dr. Eduardo Cánepa, por haber dirigido este proyecto, intentando siempre transmitir sus conocimientos con precisión y sobre todo con cariño. Por haber confiado en mí para llevarlo a cabo, alentándome para continuar el camino de la investigación científica.

A la Dra. María E. Scassa, por el aporte intelectual, la colaboración constante durante este trabajo y, especialmente por su amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Abel Carcagno, Mariela Marazita, Pablo Sirkin, Florencia Ogara y Willy Videla.

Deseo agradecer especialmente a la Dra. Silvia Moreno de Colonna; al Dr. Juan M. Fló; y a la Dra. Adalí Pecci, por los buenos consejos, las discusiones enriquecedoras y, por supuesto, por la colaboración recibida.

Al Dr. Alberto Kornblihtt, por ser ejemplo de excelencia, tanto en la docencia como en la investigación, contagiando su entusiasmo por la biología molecular desde el inicio de la carrera.

A todas aquellas personas del Departamento de Química Biológica y del Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular que nunca dudaron en darme una mano.

A toda mi familia, en especial a mis padres, Luis M. Ceruti y Graciela C. S. de Ceruti por ser mis primeros formadores, dándome el ejemplo y al mismo tiempo, la libertad de elegir y su apoyo incondicional.

A Néstor Romero y Graciela C. de Romero, por interesarse en mi trabajo con mucho cariño.

A Hernán y a Ignacio,

mis dos soles.

Resumen

En neuronas, así como en otras células somáticas la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular depende de la actividad de las enzimas CDK4 y CDK6, y luego, de CDK2.

La familia INK4 incluye a cuatro polipéptidos, p16, p15, p18 y p19, los cuales se unen e inhiben específicamente CDK4/CDK6. A pesar de ser estructuralmente redundantes e igualmente potentes como inhibidores, cada uno se expresa diferencialmente durante el desarrollo en ratón. Además, distintos inhibidores han sido implicados en la inducción de la diferenciación terminal, la senescencia y la apoptosis. La gran diversidad en el patrón de expresión, sugirió que estos inhibidores podrían tener funciones específicas de tipo celular o de tejido. En el sistema nervioso central p19 es una de las INK4 mayoritaria. Es expresada tempranamente durante el desarrollo en el cerebro y allí su expresión es mantenida en la adultez. Aparte de sus roles fisiológicos, las proteínas INK4 se encuentran comúnmente perdidas o inactivadas por mutaciones en diversos tipos de cáncer.

En este estudio, investigamos el rol de p19 en la respuesta celular frente al daño del DNA con distintos agentes genotóxicos en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y otros tipos celulares. Al contrario de las otras INK4, solamente la expresión de p19 es periódica a lo largo del ciclo. En este trabajo demostramos que p19 es la única INK4 cuya expresión es inducida por UV en células de neuroblastoma, que esta inducción se da a nivel transcripcional y que requiere parcialmente la síntesis de proteínas. Además, observamos la translocación de p19 desde el citoplasma al núcleo luego de la irradiación con UV. La sobreexpresión de p19 claramente reduce la apoptosis inducida por el daño y mejora la eficiencia de la reparación del DNA. Experimentos llevados a cabo con mutantes de CDK4, con mimosina o en células Saos-2, sugieren que estos efectos de p19 serían independientes de su rol como controlador del ciclo. Además, con ensayos clonogénicos y de supervivencia celular, observamos que p19 influencia la sensibilidad celular a largo plazo y confiere resistencia al estrés genotóxico.

Estos resultados descubren una nueva función de p19 como regulador del nivel de apoptosis inducida por daño en el DNA, sugiriendo que p19 protegería a las células de morir por apoptosis mediante el aumento en la eficiencia de reparación del DNA. Postulamos que p19 pertenecería a una red proteica integrando la reparación del DNA, la apoptosis y los checkpoints del ciclo celular para mantener la integridad genómica.

Abstract

In neurons, as in other somatic cells, progression through the G1 phase of the cell cycle depends upon the activities of CDK4/6, and later, upon the activity of CDK2.

The INK4 family includes four polypeptides, p15, p16, p18 and p19 that specifically bind to and inhibit CDK4/6. Although they are structurally redundant and equally potent as inhibitors, members of the INK4 family are differentially expressed during mouse development. Moreover, different inhibitors have been implicated in regulating terminal differentiation, senescence or apoptosis. The striking diversity in the pattern of expression, suggests that this family of cell cycle inhibitors might have cell-lineage or tissue-specific functions. In the central nervous system, p19 is one of the major INK4 proteins. It is expressed early during brain development and its expression is maintained into adulthood. Apart from their physiological roles, the INK4 proteins are commonly lost or inactivated by mutations in diverse types of cancer.

In the present study, we investigated the role of p19 in the response driven by human neuroblastoma cells, against DNA injury caused by different genotoxic agents. In contrast to the other INK4, p19 expression is periodic through the cell cycle. In this work, we demonstrated that p19 is the only INK4 protein whose expression is induced by UV in neuroblastoma cells, that this induction acts at the transcriptional level and partially requires protein synthesis. Furthermore, we observed p19 translocation from cytoplasm to nucleus after UV irradiation. Ectopic expression of p19 clearly reduces DNA damage induced apoptosis and improves the cellular ability to repair DNA lesions. Experiments performed with a CDK4 mutant, or with mimosine, or Saos-2 cells, suggest that p19 exerts its effects independently of its role as a cell cycle checkpoint gene. Moreover, performing clonogenic and viability assays we observed that p19 influences the long term cellular sensibility and confers resistance to genotoxic stress.

These results uncover a new role for p19 as regulator of DNA damage induced apoptosis and suggest that p19 might protect cells by allowing a more efficient DNA repair. We postulate that p19 would belong to a protein network that integrates DNA repair, apoptosis, and cell cycle checkpoints to surveil and maintain genome integrity.

Trabajos publicados

Los resultados presentados en este trabajo dieron origen a las siguientes publicaciones:

Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves DNA repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells.

Oncogene (2005) 24, 4065–4080

Julieta M. Ceruti, María E. Scassa, Juan M. Fló, Cecilia L. Varone and Eduardo T. Cánepa.

Transcriptional regulation of p19INK4d by different DNA lesions.

Manuscrito en preparación.

Julieta M. Ceruti, María E. Scassa and Eduardo T. Cánepa.

Resumen	I
Abstract	II
Trabajos publicados	III
Indice	IV
Introducción	1
CAPITULO 1: El ciclo celular.....	2
Quinasas dependientes de ciclinas.....	3
Reguladores de CDKs.....	4
Ciclinas.....	5
Ciclinas de tipo D	5
CKIs.....	6
Sustratos de CDK4/6 y CDK2.....	6
Regulación de G1 e inhibidores de CDKs.....	8
Proteínas INK4.....	9
Función de las proteínas INK4 en ratón.....	11
Cooperación entre los inhibidores de las familias INK4 y Cip/Kip.....	13
CAPITULO 2: Mantenimiento de la integridad del genoma.....	14
Consecuencias del daño al DNA.....	14
Mecanismos de reparación del DNA.....	17
NER.....	18
BER.....	19
HR y NHEJ.....	22
CAPITULO 3: Puntos de control en el ciclo celular: una respuesta al estrés.....	25
Los checkpoints de G1 y G1/S.....	26
Las vías checkpoint de fase S.....	27
El checkpoint de G2.....	28
CAPITULO 4: Integrando la información sobre el estatus del genoma.....	30
Daño al DNA, arresto del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis.....	30

Objetivos.....	34
Hipótesis.....	35
Resultados	36
PRIMERA PARTE	
Estudio de la expresión y la localización subcelular del inhibidor de CDKs p19INK4d en condiciones basales y como respuesta al tratamiento con agentes genotóxicos en células de neuroblastoma.....	37
1-p19INK4d se expresa en forma periódica en el ciclo celular de neuroblastoma.....	38
2- p19INK4d es inducida por radiación UV en células de neuroblastoma.....	40
3- El efecto de UV sobre p19INK4d no está restringido a un solo tipo celular.	41
4- p19 es la única INK4 inducida por UV en células de neuroblastoma.....	44
5- Los agentes genotóxicos cisplatino y péptido β -amiloide inducen p19INK4d en células de neuroblastoma.....	46
6- La estabilidad del mRNA de p19INK4d no es afectada por agentes genotóxicos.....	48
7- La estabilidad de la proteína p19INK4d no es modificada con la radiación UV.	50
8- Los agentes genotóxicos UV y β -amiloide provocan un incremento en la tasa de iniciación de la transcripción del gen de p19INK4d.....	52
9- La inducción transcripcional de p19INK4d en respuesta al daño al DNA requiere la síntesis de novo de proteínas.....	54
10- p19INK4d transloca al núcleo cuando las células son irradiadas con UV.....	55
SEGUNDA PARTE	
Estudio de la participación de p19INK4d en los mecanismos de reparación del DNA luego de tratar células con distintos agentes genotóxicos.....	57
11- La sobreexpresión de p19INK4d protege a las células de neuroblastoma de la muerte provocada por la radiación UV.	57

12- La muerte celular observada en SH-SY5Y luego de la irradiación con UV es un evento apoptótico que puede ser disminuído por p19INK4d.....	59
13- La sobreexpresión de p19INK4d disminuye la apoptosis causada por dos agentes genotóxicos distintos de UV en células de neuroblastoma.....	61
14- La sobreexpresión de p19INK4d mejora la capacidad de las células de reparar un DNA plasmídico dañado con UV.....	63
15- p19INK4d aumenta la eficiencia de reparación del DNA genómico independientemente del agente genotóxico utilizado.	65
16- El arresto del ciclo celular no es suficiente para observar una reparación más eficiente del DNA.	68
17- p19INK4d disminuye la apoptosis y mejora la habilidad de las células de neuroblastoma de reparar el DNA dañado con UV independientemente de su interacción con CDK4.....	70
18- p19 ejerce su efecto sobre reparación y apoptosis de un modo independiente de retinoblastoma y de p53.....	72
19- Relación causal entre el aumento en la reparación del DNA y la disminución de la apoptosis en células tratadas con UV y que sobreexpresan p19INK4d.....	74
20- La presencia de moléculas de DNA dañadas con UV no es suficiente para inducir p19INK4d.....	77
21- La sobreexpresión de p19INK4d confiere mayor resistencia a distintos agentes genotóxicos.....	79
Discusión	82
Materiales y Métodos	91
1- Cultivo de líneas celulares.....	92
2- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	93
3- Análisis de RNA por Northern blot.....	93
4- Análisis de proteínas por Western Blot.....	97
5- Agentes genotóxicos.....	99
6- Análisis de la estabilidad proteica. Ensayo de <i>Pulse- Chase</i> con	

³⁵ S- metionina.	99
7- Estudio de la tasa de iniciación de la transcripción. Ensayo de <i>Run-on</i>	100
8- Inmunocitoquímica. Determinación de la localización subcelular de p19INK4d.....	102
9- Preparación de plásmidos	103
10- Clonado del cDNA de p19ink4d en el plásmido de expresión pSG5.....	105
11- Transfección transitoria de células y selección.....	106
12- Actividad de la enzima caspasa-3.....	106
13- Ensayo de fragmentación internucleosomal de DNA.....	107
14- Síntesis de DNA no programada (UDS, <i>Unscheduled DNA Synthesis</i>).....	107
15- Ensayo de reactivación en la célula huésped (<i>HCR: host cell reactivation assay</i>)	108
16- Incorporación de ³ H-timidina.....	110
17- Generación de líneas celulares estables para p19INK4d.....	110
18- Ensayo de MTT: estimación de viabilidad celular.....	111
19- Ensayo clonogénico.....	111
Referencias.....	113

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: El ciclo celular

El ciclo celular es el proceso universal mediante el cual las células se reproducen y que sustenta el crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivos (Paul Nurse, 2000). El ciclo celular básico está dividido en cuatro fases (Figura 1). Durante dos de estas fases, las células ejecutan los dos eventos más importantes de la división celular: la generación de una copia confiable de su material genético (fase S o de síntesis) y la partición de todos los componentes celulares entre dos células hijas idénticas (fase M o mitosis). Las otras dos fases del ciclo (G1 y G2) representan intervalos (*Gaps*) durante los cuales las células se

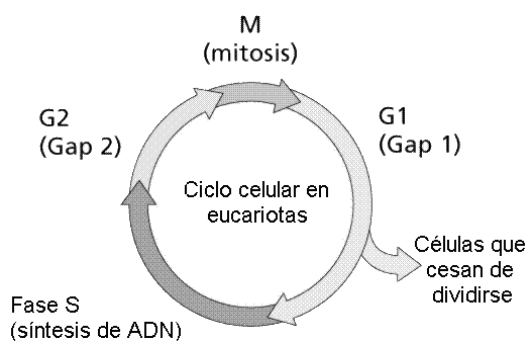
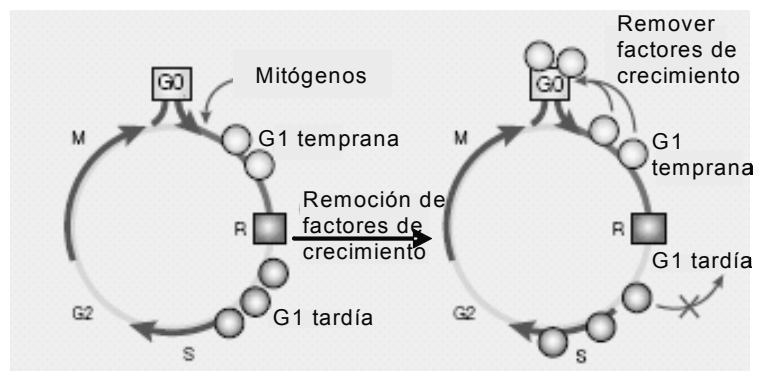


Figura 1. Las etapas del ciclo celular.

preparan para completar con éxito las fases S y M, respectivamente (Malumbres and Barbacid, 2001; Norbury and Nurse, 1992). Cuando las células completan la división mitótica, ya sea debido a señales antimitogénicas específicas o a la ausencia de señales mitogénicas adecuadas, abandonan el ciclo e ingresan en un estado quiescente, de “no-proliferación”, conocido como G0.

Las células en cultivo, pasan por un período de dependencia de mitógenos antes de entrar en el ciclo y volverse independientes de ellos (Pardee, 1974). Sin embargo, la remoción de mitógenos antes de este momento les permite retornar a G0. Esta transición, el Punto de Restricción, R, representa un punto de no-retorno que compromete a las células a llevar a cabo una nueva ronda de división celular. Hoy en día, R, es comúnmente utilizado para dividir las fases G1 temprana y G1 tardía (Malumbres and Barbacid, 2001)(Figura 2).



Malumbres y Barbacid, Nat Rev Cancer, 2001

Figura 2. El punto de restricción

Existen controles o *checkpoints* que actúan para regular el establecimiento de todos estos eventos y que compensan o solucionan los errores cometidos durante su ejecución.

La base molecular de estos controles está altamente conservada, desde simples eucariotas unicelulares como las levaduras hasta complejos metazoos, como nosotros mismos. La precisión con la que los eventos del ciclo celular son llevados a cabo, asegura la supervivencia de los organismos, mientras que la pérdida de esta precisión aumenta la inestabilidad genómica, un factor importante en la formación del cáncer.

El ciclo celular mitótico es modificado hacia un ciclo meiótico durante la formación de las gametas, llevando a la reducción del número de cromosomas, esencial para la reproducción sexual, y al aumento en la variabilidad genética, que es la fuerza que dirige la evolución (Nurse, 2000). Por lo tanto, el ciclo celular juega un rol central en la concreción y el desarrollo de toda la vida, y asegura la continuidad de esta a través de las generaciones.

Quinasas dependientes de ciclinas

Algunas de las moléculas que controlan los eventos tempranos del ciclo celular han sido caracterizadas extensamente. Estas proteínas, integran el flujo de información proveniente desde el exterior celular para dirigir la progresión en la fase G1 e iniciar la replicación del DNA. Los actores centrales son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), un grupo de serina treonina quinasas que forman complejos activos heterodiméricos luego de unirse a las ciclinas, sus subunidades regulatorias (Morgan, 1997; Sherr, 2000).

Varias CDKs, principalmente CDK4, CDK6 y CDK2 cooperan para dirigir el pasaje de las células a través de G1 y hacia la fase S. CDK4 y CDK6 están involucradas en la fase G1 temprana, mientras que CDK2 es requerida para completar G1 e iniciar S. CDK4 y CDK6 forman complejos activos con las ciclinas de tipo D (ciclina D1, D2 y D3). Evolutivamente, estas quinasas están muy relacionadas y han resistido la diferenciación funcional, excepto por los distintos patrones de activación (Jinno et al., 1999; Meyerson and Harlow, 1994). CDK2 es activada secuencialmente por ciclinas de tipo E (ciclina E1 y E2), durante la transición G1/S, y las ciclinas de tipo A (ciclina A1 y A2) durante la fase S. Luego, en mitosis, la quinasa principal es CDK1, activada primero por ciclinas A y más tarde por ciclinas de tipo B (B1 y B2) (Figura 3).

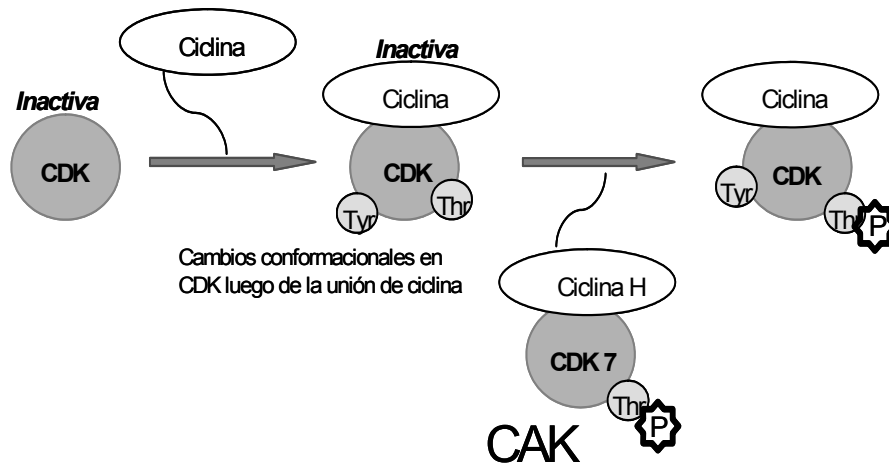


Figura 3. Activación de una CDK, mediada por la unión de una ciclina y por la acción de CAK (*CDK activating kinase*)

Reguladores de CDKs

Las células eucariotas en fase G1 expresan niveles relativamente bajos de actividad CDK neta. Esta actividad aumenta progresivamente mientras las células avanzan en el ciclo de división, tiene un pico y luego decae rápidamente durante mitosis (Morgan, 1997). El nivel reducido de actividad CDK durante la fase G1 es requerido para la formación de los complejos de preiniciación en los orígenes de replicación del DNA cromosómico (Massague, 2004). Luego, la entrada y la progresión a través de la fase S y la entrada en mitosis puede proceder únicamente en la presencia de una actividad enzimática más robusta (Sherr and Roberts, 2004). Por lo tanto, los reguladores de CDKs, al modular su actividad, pueden controlar el destino del ciclo celular.

Los reguladores incluyen activadores, principalmente las ciclinas, e inhibidores, conocidos como CKIs (*CDK kinase inhibitors*). Las CDKs también son reguladas por fosforilación: deben ser fosforiladas en un residuo treonina (localizado en el Loop T), para poseer actividad catalítica apropiada. Esto es llevado a cabo por el complejo CDK7-ciclina H (también conocido como CAK; *CDK activating kinase*), una serina/ treonina quinasa que también está involucrada en mecanismos de transcripción y reparación del DNA (Malumbres and Barbacid, 2001). Al mismo tiempo, existen fosforilaciones inhibitorias en residuos treonina y tirosina (en el caso de CDK1 son adyacentes), mediadas por quinasas de especificidad dual (como Wee1 y MYT1). Esta inhibición es retirada cuando las fosfatasas CDC25 (CDC25A, CDC25B o CDC25C) defosforilan estos residuos, disparando la entrada en mitosis (Figura 4).

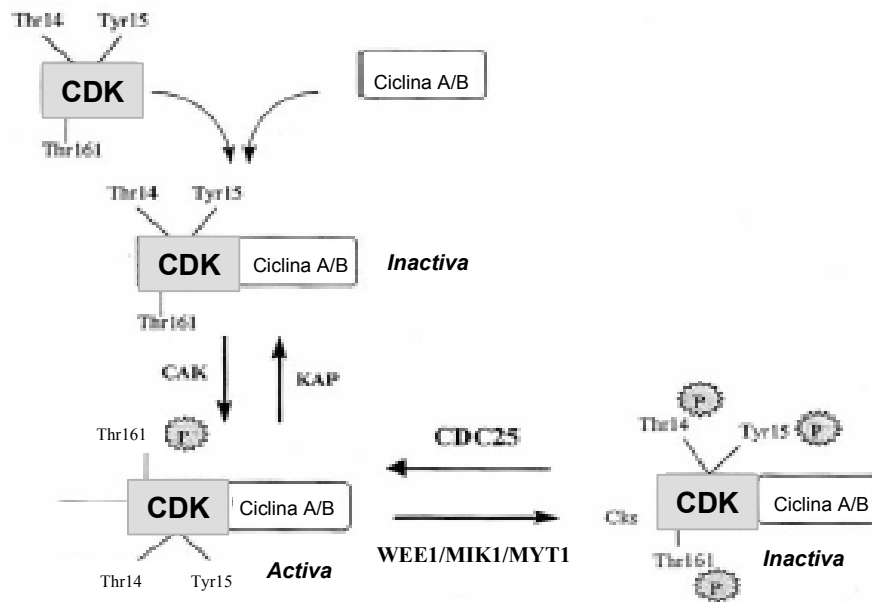


Figura 4. Ejemplo de regulación de la activación de CDK1. CDK1 es activada si se reúnen ciertas condiciones: la unión de una ciclina, la fosforilación en Thr161 por CAK y la ausencia de fosforilación en Thr14 y Tyr15. Estos últimos residuos son fosforilados por una kinasa cuyo nombre varía según las especies.

Ciclinas

Las ciclinas componen una familia de proteínas que sufren variaciones en su cantidad a lo largo del ciclo y que comparten cierto grado de similitud en cuanto a su composición aminoacídica. En efecto, las ciclinas son definidas por una región común denominada *cyclin box* que permite la unión a las CDKs y su activación.

Ciclinas de tipo D

Las ciclinas de tipo D son integradores importantes de señales mitogénicas, ya que su síntesis es una de las principales metas de la vía de RAS/RAF/MAPK (Malumbres and Pellicer, 1998). La ciclina D1 es una molécula bastante inestable que es transportada desde el núcleo al citoplasma donde es marcada (por la ligasa de ubiquitina, SCF) para ser degradada mediante proteólisis. La exportación nuclear es mediada por la enzima glicógeno sintasa quinasa 3- β (GSK-3 β), una quinasa que a su vez es inhibida por la vía de RAS/PI3K/AKT (Alt et al., 2000; Diehl et al., 1998). Por lo tanto, la disponibilidad de ciclina D1 es controlada por el balance entre las vías mitogénicas de RAS/RAF/MAPK (síntesis de ciclina D1) y RAS/PI3K/AKT (estabilidad de ciclina D1), tanto como por la

actividad de GSK-3 β y de SCF (degradación de ciclina D1). Debido a que las tres ciclinas de tipo D poseen alta homología de secuencia y son coexpresadas en varios tejidos, es posible que tengan ciertos roles redundantes. La sobreexpresión de ciclina D1 facilita el pasaje a través de la fase G1 y promueve la proliferación celular (Malumbres and Barbacid, 2001).

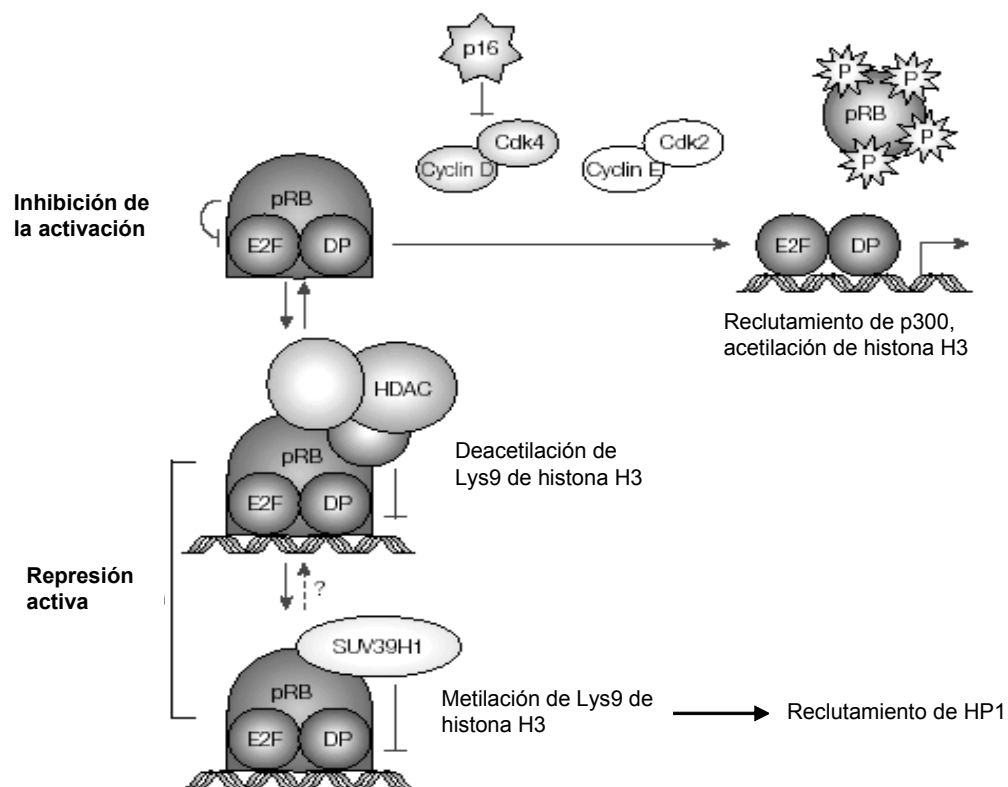
CKIs

Existen dos familias de CKIs (Ortega et al., 2002; Sherr and Roberts, 1999). Los cuatro miembros de la familia INK4 (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d) ejercen su actividad inhibitoria uniéndose a las quinasas CDK4 y CDK6 e impidiendo su asociación con las ciclinas D (ver más adelante). Por otro lado, los complejos ciclina D-CDK4/6 se unen a otra familia de inhibidores del ciclo celular, la familia Cip/Kip (p21Cip1, p27Kip1 y p57Kip2), cuyo rol principal es inhibir la actividad CDK2-ciclina E/A y CDK1-ciclina B (Hengst and Reed, 1998; Nakayama and Nakayama, 1998). La formación de complejos heterotriméricos CDK4/6-ciclina D-Cip/Kip contribuye en la progresión de G1 secuestrando estos inhibidores, impidiéndoles la unión a los complejos CDK2-ciclina E y su inactivación (Sherr and Roberts, 1999). Más aún, se ha propuesto que la unión de los inhibidores Cip/Kip podría ser necesaria para la actividad de CDK4/6-ciclina D ya que fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) que carecen de p21Cip1 y p27Kip1 no poseen actividad detectable de CDK4 (Cheng et al., 1999). Sin embargo, estos resultados no han podido ser confirmados por otros investigadores (Bagui et al., 2000). Por lo tanto, no es claro hasta qué punto el secuestro de inhibidores Cip/Kip por los complejos CDK4/6-ciclina D contribuye a la progresión de G1 (Olashaw et al., 2004; Ortega et al., 2002; Pei and Xiong, 2005). Los CKIs se inducen en respuesta a distintos procesos celulares (Sherr and Roberts, 1999; Sherr, 2000).

Sustratos de CDK4/6 y CDK2

Los principales sustratos de CDK4/6 y CDK2 en la progresión de la fase G1 son los miembros de la familia de proteínas de retinoblastoma (Rb, p107 y p130) (Adams, 2001). Estas moléculas funcionan como sitios de anclaje para una serie de proteínas que deben ser fuertemente reguladas durante el ciclo celular. Por ejemplo, la proteína Rb se une a los

factores de transcripción de la familia E2F, asegurando que estos permanezcan inactivos durante las fases M y G0. Además, los complejos Rb-E2F participan en un mecanismo de represión activa sobre algunos promotores: este proceso involucra otras familias de proteínas, como las deacetilasas de histonas (HDACs), complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF y metiltransferasas de histonas como SUV39H1. La actividad de las proteínas Rb es modulada mediante fosforilación secuencial por los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E. Rb también puede ser regulada por acetilación, mediada por histonas acetilasas asociadas a p300/CBP. Estas acetilasas están bajo el control del ciclo celular e impiden la eficiente fosforilación de Rb por el complejo CDK2-ciclina E. Las proteínas Rb hiperfosforiladas liberan las moléculas que se unen a sus isoformas hipofosforiladas. Esta “liberación” les permite llevar a cabo sus roles específicos en el ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2001) (Figura 5).



Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 (2002), 11

Figura 5. Mecanismos generales que controlan la actividad represora de E2F

Regulación de G1 e inhibidores de CDKs

El nivel de ciclina E en embriones tempranos es elevado, para permitir que CDK2 inicie la fase S tan pronto como concluya la fase M. En cambio, en la mayoría de los otros tipos celulares, varios mecanismos colaboran en la existencia de la fase G1 manteniendo CDK2 inactiva hasta la llegada de señales mitogénicas.

Uno de estos mecanismos se basa en limitar el abastecimiento de ciclina E. La expresión de ciclina E es dependiente de los factores E2F. En células quiescentes y en aquellas que recién han salido de la fase M, los factores E2F están unidos a Rb y por lo tanto la expresión de ciclina E está reprimida (o no activada) (Massagué, 2004).

Durante la fase G1 temprana, la célula integra información externa que deriva de estímulos mitogénicos y de la disponibilidad de nutrientes. Así, se prepara para atravesar las fases del ciclo celular. Una vez que se generan cantidades suficientes de ciclina D y de los subsecuentes complejos ciclina D-CDK4/6, Rb (y otros miembros de la familia Rb, dependiendo del tipo celular) se fosforila parcialmente, resultando en la activación de los factores transcripción E2F. Rb también puede ser fosforilada por CDK2-ciclina E, creando una retroalimentación positiva que precipita la entrada en la fase S una vez que suficientes moléculas de CDK2 han sido activadas (Malumbres and Barbacid, 2001) (Figura 6).

Otro mecanismo que previene la entrada prematura en la fase S, y que liga la transición G1/S a señales regulatorias, recae en proteínas inhibitorias que se unen a los complejos ciclina- CDK y afectan su centro catalítico. Uno de estos inhibidores, p27Kip1, funciona como un freno integral del ciclo celular. Otros, como p15INK4b, p16INK4a, p21Cip y p57Kip2 son mediadores de señales citostáticas. p27 silencia el complejo ciclina E-CDK2 que pudiera estar presente en células quiescentes o en fase G1 temprana. Los estímulos mitogénicos liberan a CDK2 de la inhibición impidiendo la transcripción, traducción, estabilización o localización nuclear de p27, o inducen el secuestro de 27 por los complejos ciclina D-CDK4/6. La activación de CDK2 es completada por la acción de CAK (CDK- activating kinase) y la remoción de la fosforilación inhibitoria por la fosfatasa CDC25. Una vez que el equilibrio se desplaza hacia la activación de CDK2, p27 es fosforilada por la misma CDK2, un evento que la marca para ser poliubiquitinada y degradada por el sistema del proteasoma (Massagué, 2004; Malumbres y Barbacid, 2001). El descenso en la actividad de CDK2 durante la transición G1/S está controlada

principalmente por la degradación de las ciclinas de tipo E, mediada por la enzima ligasa de ubiquitina específica CDC4/AGO (Moberg et al., 2001); (Koepp et al., 2001).

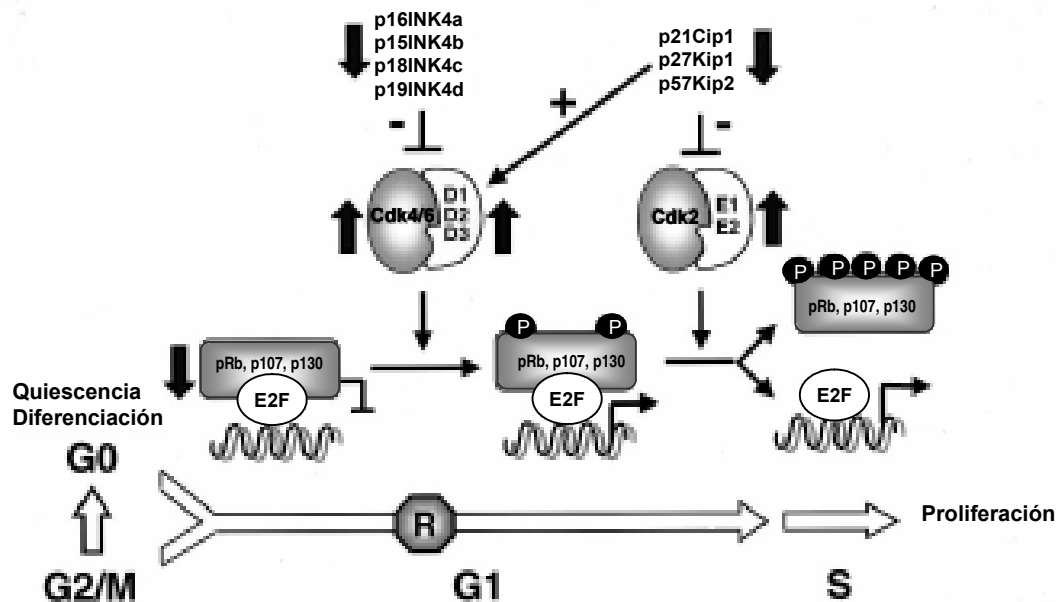


Figura 6. Regulación de la transición G1/S por la vía CDK4/6-ciclina D/ INK4/ Rb. La progresión a través de la fase G1 es controlada por el estado funcional de las proteínas de la familia Rb, pRb, p107 y p130. En G0 las proteínas Rb no están fosforiladas, y se unen a los factores de transcripción E2F, impidiendo la transcripción dependiente de E2F. Uno de los eventos tempranos de G1 es la activación de las quinasas CDK4/6 por las ciclinas D, y la consecuente fosforilación de las proteínas Rb. Esto lleva a su parcial inactivación lo que permite la transcripción de los genes controlados por E2F, como la ciclina E1 que a su vez activa la quinasa CDK2. La actividad de CDK4/6 es negativamente regulada por la familia INK4 al impedir la unión de la ciclina D. La hiperfosforilación de las proteínas Rb por el complejo CDK2/ciclina E es requerida para la correcta transición G1/S y la iniciación de S. Las flechas gruesas y oscuras representan mutaciones halladas frecuentemente en cáncer humano que resultan en la actividad aumentada (flecha ascendente) o disminuida (flecha descendente) de estos reguladores de G1/S.

S. Ortega et al. *Bioch et Bioph Acta* 1602 (2002) 73-87

Proteínas INK4

En 1994, el gen supresor de tumores, designado MTS1 (multiple tumor supresor 1), fue localizado en el cromosoma humano 9p21 (Kamb et al., 1994a; Kamb et al., 1994b). Este gen había sido previamente descrito como una proteína inhibidora del ciclo celular (Serrano et al., 1993). Actualmente este gen es conocido como p16INK4a y sirve de prototipo para la familia de inhibidores del ciclo INK4. El análisis detallado de la región cromosómica 9p21 descubrió la presencia de otro supresor tumoral MTS2 (Kamb et al., 1994a), identificado independientemente como un miembro de la familia INK4, p15INK4b. Dos miembros adicionales de esta familia génica, p18INK4c y p19INK4d, fueron clonados mediante estrategias basadas en PCR o identificados con ensayos de

doble-híbrido (Chan et al., 1995; Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995). De aquí en más los denominaremos p16, p15, p18 y p19.

Las proteínas INK4 tienen actividades muy similares *in vitro*. Cuando son expresadas ectópicamente, arrestan las células en G1, pero únicamente en presencia de las proteínas Rb funcionales (Bruce et al., 2000). Las bases estructurales para la inhibición de la actividad quinasa de CDK4/6 por las proteínas INK4 están claramente establecidas. Las cuatro INK4 comparten un motivo estructural, las repeticiones ankirina. Estas repeticiones consisten en pares de α -hélices antiparalelas, conectadas por una serie de motivos horquilla (Pavletich, 1999). Mientras que p16 y p15 tienen cuatro motivos ankirina, p18 y p19 tienen cinco. Estos dominios estructurales están involucrados en la unión a la región no-catalítica de CDK4 y CDK6, opuesta al sitio de unión de ciclina D. La unión de INK4 induce un cambio alostérico en CDK4/6, rotando los dos lóbulos estructurales de la quinasa en 15° alrededor del eje vertical. Esto altera el sitio de unión de las ciclinas D y reduce su afinidad por ATP (Pavletich, 1999), dos mecanismos que reducen en gran medida la actividad quinasa de CDK4/6 (Figura 7). Mas aún, al impedir la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6, las proteínas INK4 también fuerzan la redistribución de los inhibidores Cip/Kip hacia los complejos ciclina E-CDK2, causando la regulación negativa de esta quinasa (Reynisdottir et al., 1995; Sherr and Roberts, 1999). Además de compartir los motivos ankirina, los genes correspondientes a las cuatro INK4 poseen un intrón que interrumpe la secuencia codificante en la misma posición, indicando que han evolucionado desde un ancestro común (Ruas and Peters, 1998).

A pesar de ser estructuralmente redundantes e igualmente potentes como inhibidores, los miembros de la familia INK4 son expresados diferencialmente durante el desarrollo del ratón (Cunningham and Roussel, 2001; Thullberg et al., 2000b). p18 y p19 son expresadas principalmente en el embrión, mientras que p16 y p15 son detectadas únicamente luego del nacimiento en la mayoría de los tejidos. En términos de funciones biológicas, distintos inhibidores participan en la regulación y coordinación de los eventos del ciclo celular que

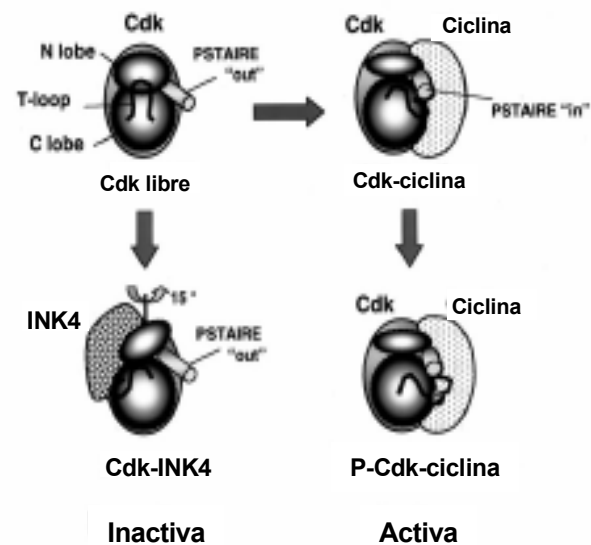


Figura 7. Regulación de la actividad de CDK4/6 por las ciclinas D y los inhibidores INK4

siguen a la estimulación mitogénica, a la privación de mitógenos o a cambios en la interacción célula-célula o célula-matriz (Harper and Elledge, 1996), y han sido también implicados en la inducción de la diferenciación terminal y el envejecimiento celular o senescencia (Zindy et al., 1999; Zindy et al., 1997a; Zindy et al., 1997b).

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de las INK4 no están del todo definidos. Solamente la expresión de p19 es periódica a lo largo del ciclo celular. La transcripción de p19 es inducida durante las fases S y G2. Luego, es rápidamente degradada por un mecanismo dependiente de ubiquitina/proteasoma, de manera tal que en G1, el nivel de p19 es bajo para facilitar el ensamble de los complejos ciclina D-CDK4/6 (Thullberg et al., 2000a). El mayor nivel de expresión proteica de p19 ocurre en cerebro, testículos, bazo y timo. p19 está relativamente bien caracterizada en el sistema nervioso central, donde es una de las proteínas INK4 mayoritarias. Es expresada tempranamente durante el desarrollo en el cerebro y allí su expresión es mantenida en la adultez (Zindy et al., 1997b). La expresión de p16 aumenta con la edad (Zindy et al., 1997a) y en cultivo su expresión se incrementa por la acumulación de duplicaciones celulares. En células humanas jóvenes, donde este inhibidor no se expresa, el promotor de p16 está metilado en islas CpG; además, la metilación de novo de las islas CpG correlaciona con la expresión reducida de p16 en tumores y en células inmortalizadas (Foster et al., 1998; Wong et al., 1999).

La expresión de las INK4 también es inducida diferencialmente en respuesta a varias vías inhibitorias del crecimiento. El stress oncogénico y la senescencia celular replicativa inducen específicamente la expresión de p16 (Serrano et al., 1997). Además, p16 actúa como mediador de la actividad inhibitoria del crecimiento de JunB en células de ratón (Passegue and Wagner, 2000). Los estímulos oncogénicos también regulan positivamente a p15. Su expresión aumenta en células epiteliales por la acción de TGF β (Hannon and Beach, 1994), y su promotor responde a proteínas Smad (Ekholm and Reed, 2000).

Función de las proteínas INK4 en ratón

El rol específico de cada miembro de la familia INK4 está siendo definido principalmente mediante la generación de cepas de ratones genéticamente modificadas, deficientes en uno o varios miembros de esta familia génica (Tabla 1). Ratones que expresan una versión inestable de p16 se desarrollan normalmente y sólo un pequeño

porcentaje tienen linfomas de células-B luego de una latencia prolongada. Por otro lado, ratones homocigoto para una mutación que

Tabla 1 *

Resumen de los principales fenotipos de ratones *knock out* para los genes Cdk4 o INK4

Gen blanco	Efecto funcional	Fenotipo principal
P16INK4a	Proteína p16INK4a truncada, inestable	Linfomas de células B, luego de latencia prolongada
P16INK4a	No hay expresión de p16INK4a	Variedad de tumores con latencia prolongada
INK4a ^{A2,3}	No hay expresión de p16 ni de p19ARF	Linfomas y sarcomas similares a aquellos observados en ratones p19ARF ^{-/-} y p53 ^{-/-}
P15INK4b ^{-/-}	No se expresa p15INK4b	Desórdenes linfoproliferativos y angiosarcomas
P18INK4c ^{-/-}	No se expresa p18INK4c	Tamaño corporal aumentado y sobrecrecimiento de algunos órganos, desórdenes linfoproliferativos, quistes en riñón y glándula mamaria, tumores de hipófisis.
P19INK4d ^{-/-}	No hay expresión de p19INK4d	Ratones normales y fértiles, a pesar de que los machos exhiben atrofia testicular
P15INK4b ^{-/-} ; P18INK4c ^{-/-}	Ausencia de p15INK4b y p18INK4c	Similar al de los animales Knock out individuales. También hay quistes múltiples en testículos y páncreas
P18INK4c ^{-/-} ; P19INK4d ^{-/-}	Ausencia de p18INK4c y p19INK4d	Infertilidad en machos
P18INK4c ^{-/-} ; P27Kip1 ^{-/-}	Ausencia de p18INK4c y p27Kip1	Sobrecrecimiento de varios órganos y latencia reducida de tumores de hipófisis
P19INK4d ^{-/-} ; P27Kip1 ^{-/-}	Ausencia de p19INK4d y p27KIP1	Proliferación de neuronas diferenciadas en el sistema nervioso central. Ratones mueren por defectos neurológicos en 3 semanas
Cdk4 ^{-/-}	No hay expresión de Cdk4	Tamaño corporal reducido, esterilidad y diabetes depend. de insulina debida al número reducido de células pancreáticas β.
Cdk4 R24C/R24C	Expresión endógena de la mutante Cdk4R24C	Tamaño corporal aumentado. Hiperproliferación de células de Leydig y pancreáticas β. Sarcomas y neoplasias endócrinas

* Traducida de S. Ortega et al., *Bioch et Bioph Acta* 1602 (2002) 72

elimina el exón 1α de p16 desarrollan una variedad de tumores a una tasa más elevada (25% de incidencia al año de edad) (Krimpenfort et al., 2001; Sharpless et al., 2001). Por lo tanto, p16 parece tener una actividad supresora tumoral moderada en ratones. En humanos, está ampliamente reportada la existencia de mutaciones puntuales que afectan específicamente la expresión de p16 en tumores (Ruas and Peters, 1998).

El fenotipo de ratones nulos para p16 se asemeja al de animales mutantes para las otras INK4. Las distintas cepas desarrollan variados tipos de tumores, con baja incidencia y no presentan anormalidades significativas en el desarrollo. Ratones deficientes en proteínas INK4 son propensos a tener desórdenes hematopoiéticos. La alteración frecuente de p15 en tumores hematopoiéticos humanos y murinos, sugiere que la ausencia de esta proteína podría predisponer a la transformación maligna en células hematopoiéticas. p18 actúa

como supresor tumoral o regula la homeostasis celular dependiendo del tejido y tipo celular (Franklin et al., 1998; Latres et al., 2000).

Ratones deficientes en p19 no desarrollan tumores u otro tipo de desórdenes proliferativos. Estos ratones poseen atrofia testicular, sin embargo son fértiles. Este fenotipo está asociado con un aumento en la apoptosis de las células germinales, un resultado que correlaciona directamente con la elevada expresión de p19 en este tejido (Zindy et al., 2000). Los ratones doble mutantes (p18; p19) presentan una incidencia tumoral similar a la de los animales deficientes en p18 parentales. Estos resultados en conjunto indicarían que p19 no es un supresor tumoral propiamente dicho.

En MEFs, también existen evidencias que indican roles diferenciales para las INK4 individuales (Franklin et al., 1998; Latres et al., 2000; Zindy et al., 2001; Zindy et al., 2000).

Cooperación entre los inhibidores de las familias INK4 y Cip/Kip

El cruzamiento entre ratones deficientes para los miembros individuales de las familias INK4 y Cip/Kip han revelado un nivel significativo de cooperatividad funcional (Malumbres et al., 2000). Por ejemplo, p18 y p27 cooperan en la supresión tumoral en células de hipófisis, inhibiendo la fosforilación de Rb mediada por CDK4 (o CDK6) y CDK2. Ratones deficientes en p18 y p21 desarrollan hiperplasia neuroendócrina gástrica y tumores de pulmón, fenotipos observados solamente en la cepa doble mutante. Estos resultados indican que el rol de varios inhibidores INK4 y Cip/Kip, así como sus efectos cooperativos están influenciados por el tipo celular (Pei and Xiong, 2005).

Finalmente, p19 y p27 cooperan en mantener las neuronas post-mitóticas en un estado de diferenciación y quiescencia que es potencialmente reversible. La ausencia de ambos inhibidores lleva a la proliferación ectópica de las neuronas post-mitóticas en todo el cerebro, incluyendo las células del hipocampo (normalmente en dormición). Como consecuencia, estos ratones doble mutante sufren bradiquinesia, anomalías propioceptivas y temblores, y mueren al poco tiempo del nacimiento (Zindy et al., 1999).

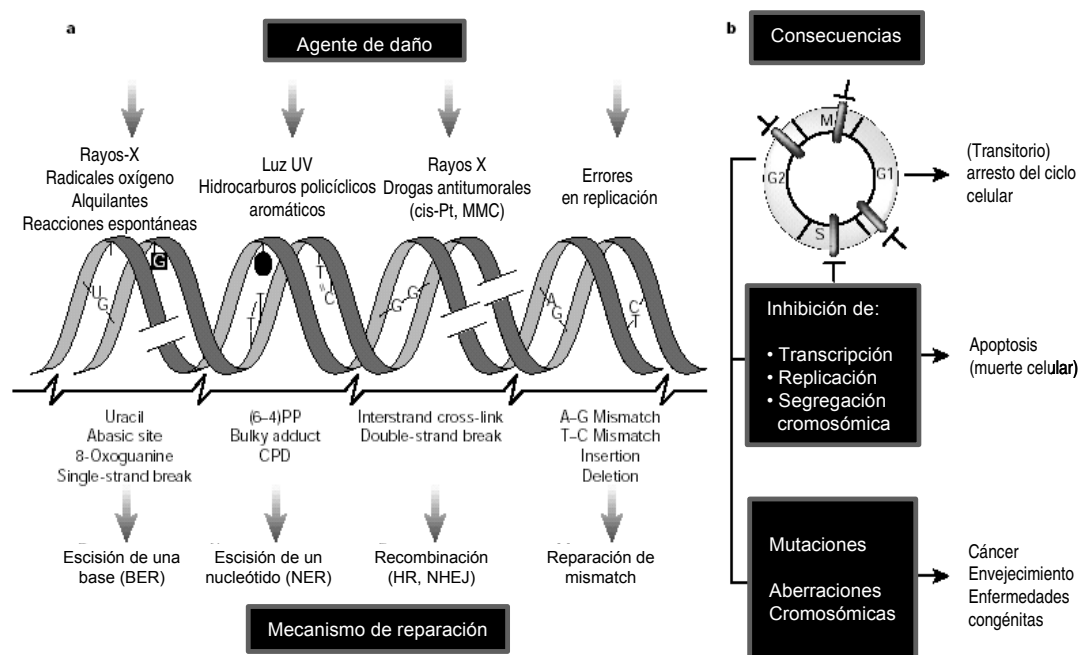
CAPÍTULO 2: Mantenimiento de la integridad del genoma

La constitución fisicoquímica de nuestros genes no garantiza una estabilidad indefinida o su adecuado funcionamiento. Cada día una célula debe enfrentar una asombrosa variedad de lesiones en el DNA que tienen tres causas principales. La primera está integrada por los agentes del medio ambiente, como la radiación UV, la radiación ionizante y ciertos agentes químicos genotóxicos. La segunda, la constituyen productos del metabolismo celular normal como las especies reactivas de oxígeno, derivadas de la respiración oxidativa y productos de la peroxidación de lípidos (Cadet et al., 1997). A pesar de que tendemos a preocuparnos más por las fuentes ambientales de daño al DNA, una célula humana debe reparar más de 10.000 lesiones en el DNA por día para contrarrestar la acción de las fuentes endógenas de daño. (Lindahl, 1993; Peterson and Cote, 2004). De hecho, se ha propuesto que la mayor parte de la maquinaria de reparación ha evolucionado para competir con este tipo de daño (Lindahl and Barnes, 2000; Lindahl and Wood, 1999). Por último, algunas uniones químicas en el DNA tienden a desintegrarse espontáneamente bajo condiciones fisiológicas. La hidrólisis de nucleótidos deja sitios abásicos, sin información. La deaminación de citosina, adenina, guanina o 5-metilcitosina convierte estas bases en las respectivas bases no codificantes uracilo, hipoxantina, xantina y timina. La falla en la reparación de tales lesiones puede originar una tasa de mutación deletérea, inestabilidad genómica, o la muerte celular. En eucariotas superiores, el daño que ocurre en genes que intervienen en la reparación del DNA y/o en la regulación del ciclo celular puede conducir a enfermedades tan amenazantes como el cáncer (Peterson and Cote, 2004). Jan Hoeijmakers ha postulado que “el cáncer es una enfermedad de nuestros genes”. La figura 8a resume los tipos de daño al DNA más comunes y sus respectivas fuentes.

Consecuencias del daño al DNA

El resultado del daño al DNA es muy diverso y generalmente adverso (Figura 9b). Los efectos agudos derivan de un metabolismo anormal del DNA, que dispara el arresto del ciclo celular o la muerte celular. Los efectos a largo plazo resultan de mutaciones irreversibles que contribuyen a la oncogénesis, el envejecimiento o las enfermedades congénitas.

Varias lesiones bloquean la transcripción, lo cual inactiva cada gen que contiene un daño en la hebra que se transcribe (un efecto directamente relacionado con la longitud del gen). Este hecho ha promovido el desarrollo de un sistema de reparación, acoplado a la transcripción, denominado TCR (por “*transcription coupled repair*”), que desplaza la RNA polimerasa atascada y asegura una reparación de alta prioridad. El estrés transcripcional, que deriva del bloqueo persistente de la síntesis del RNA, constituye un gatillo eficiente para llevar a cabo la apoptosis dependiente de p53, como un mecanismo anti-cáncer primordial.

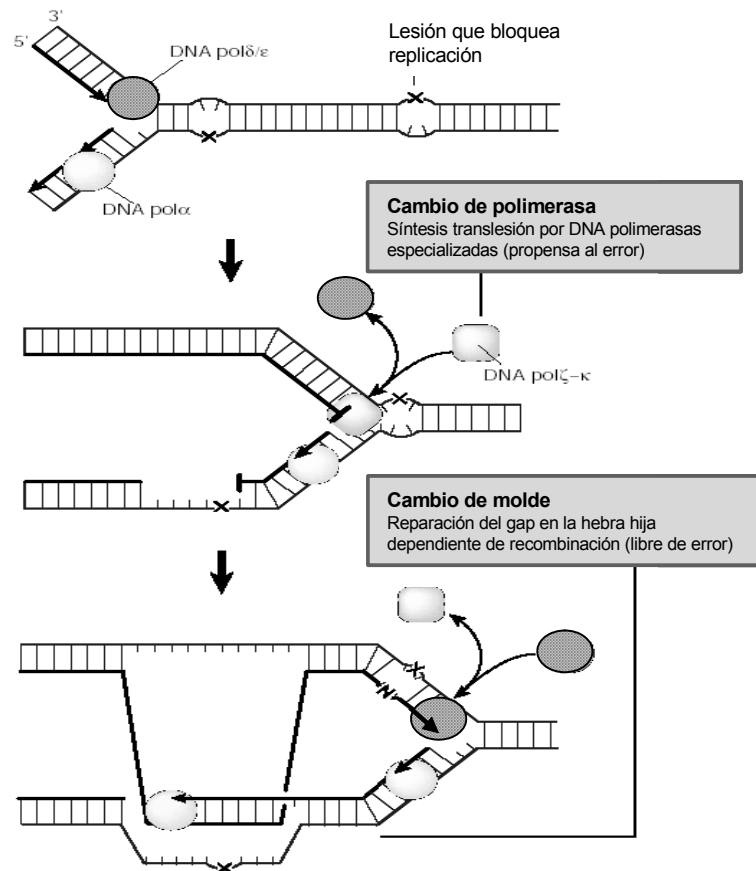


Jan Hoeijmakers, NATURE Vol 411, 17 Mayo 2001

Figura 8. Daño al DNA, mecanismos de reparación y consecuencias. a, Agentes comunes de daño al DNA (arriba); ejemplos de lesiones en el DNA inducidas por estos agentes (medio); y mecanismos de reparación más relevantes para remover las lesiones (abajo). b, Efectos agudos del daño al DNA sobre la progresión del ciclo celular, llevando a un arresto transitorio en G1, S, G2 y M (arriba), y sobre el metabolismo del DNA (medio). Las consecuencias a largo plazo del daño en el DNA (abajo) incluyen cambios permanentes en la secuencia del DNA (mutaciones puntuales que afectan un gen o aberraciones cromosómicas que pueden involucrar múltiples genes) y sus efectos biológicos. Abreviaturas: cis-Pt y MMC, cisplatino y mitomicina C, respectivamente (ambos agentes crosslinkantes del DNA); (6-4)PP y CPD, 6-4 fotoproducto y dímero ciclobutano pirimidina, respectivamente (ambos inducidos por la luz UV); BER y NER, reparación por escisión de la base y del nucleótido, respectivamente; HR, recombinación homóloga; EJ, unión del extremo.

Las lesiones también interfieren con la replicación del DNA. Existe un grupo de polimerasas, designadas ζ a κ que están dedicadas a superar el estrés replicativo inducido por el daño. Estas polimerasas especiales reemplazan temporalmente a las polimerasas replicativas δ/ϵ ($\text{pol}\delta/\epsilon$) bloqueadas y probablemente a la $\text{pol}\alpha$ (Figura 9, hebra superior). Tienen propiedades de apareamiento de base más flexibles permitiéndoles la síntesis a través de la lesión. Por lo tanto, esta solución viene acompañada de una tasa de error más elevada. Aún así, las polimerasas “de translesión” protegen el genoma (Goodman and Toppin, 2000; Kunkel and Bebenek, 2000). Existe otra vía, tal vez más importante, que permite eludir las lesiones sin cometer errores. Este mecanismo se basa en la reiniciación de la replicación del DNA río abajo de la lesión bloqueante. El espacio vacío resultante, es rellenado mediante replicación por recombinación, utilizando la nueva hebra sintetizada complementaria como molde e ignorando la original que contenía la lesión (Figura 9, hebra inferior). La desventaja reside en que, al final de ambos procesos, el daño persiste y, de no ser reparado, causará problemas similares en las rondas de replicación subsecuentes. Esto tiene particular relevancia para el daño que no es eficientemente reconocido por ningún proceso de reparación en mamíferos, tales como los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs).

El daño en ambas hebras (DSBs, por *double-strand breaks*), inducido por rayos X, sustancias químicas o durante la replicación de un daño en una hebra (SSB, por *single strand break*) y, presumiblemente durante la reparación de entrecruzamientos entre hebras, es particularmente relevante para la maquinaria de recombinación. Las células B y T son afectadas por los DSBs durante el rearrreglo de los genes de las inmunoglobulinas o de los receptores T, respectivamente. Además, los DSBs impiden la correcta segregación cromosómica durante la división celular. Estas lesiones inducen varios tipos de aberraciones cromosómicas, que incluyen aneuploidía, deleciones (pérdida de heterocigocidad) y translocaciones cromosómicas; eventos que están asociados al proceso de carcinogénesis (Hoeijmakers, 2001; Peterson and Cote, 2004).



Jan Hoeljmakers, NATURE Vol 411, 17 Mayo 2001

Figura 9. Mecanismos de "bypass" replicativo de lesiones en el ADN. Las lesiones en el ADN (indicadas con una X) pueden ser ignoradas por el aparato replicativo de dos maneras diferentes: mediante el cambio de la polimerasa de DNA (hebra superior) o mediante el cambio del DNA molde (hebra inferior). En ambos procesos la lesión original permanece.

Mecanismos de reparación del ADN

Frente a la gran variedad de lesiones, durante la evolución se ha desarrollado una amplia red de sistemas de reparación del ADN interconectados y sofisticados que en conjunto cubren la mayoría, pero no todas, de las lesiones sufridas por la información genética de una célula. Todas las vías de reparación están altamente conservadas. En mamíferos, operan al menos cuatro vías principales de reparación, parcialmente redundantes: reparación por escisión del nucleótido (NER, por *nucleotide excision repair*),

reparación por escisión de la base (BER, por *base excision repair*), recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Lindahl and Wood, 1999).

El mecanismo NER debe lidiar básicamente con la gran clase de lesiones que interfieren con el apareamiento de bases y que generalmente obstruyen la transcripción y la replicación normal (Dip et al., 2004). Las pequeñas alteraciones químicas de las bases son blanco del mecanismo BER. Estas lesiones pueden o no impedir la transcripción y la replicación, pero frecuentemente no codifican una base correcta. Por lo tanto, BER es particularmente importante para prevenir la mutagénesis. La mayor parte de las lesiones que implican la reparación vía NER provienen de fuentes exógenas (excepto por algunas lesiones oxidativas), mientras que la vía BER concierne mayormente a daños de origen endógeno. Las lesiones de ambos tipos de reparación afectan solamente una hebra del DNA (Figura 8a).

Los DSBs son más problemáticos, ya que ambas hebras son afectadas. Para reparar adecuadamente tales daños, la célula debe reconocer cuales extremos se pertenecen mutuamente, una difícil tarea dado el tamaño del genoma de los mamíferos. Dos vías, la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ), son capaces de solucionar los problemas causados por los DSBs. La recombinación homóloga parece dominar durante las fases S y G2, momento en que el DNA está replicado, proveyendo una copia fiel de la secuencia que es la cromátida hermana, para alinear los daños. En contraste, el sistema menos preciso NHEJ tiene mayor relevancia en la fase G1 del ciclo celular, cuando no existe una copia del material genético (Takata et al., 1998).

Por último, algunas proteínas revierten directamente ciertos daños, como la O⁶-metilguanina metiltransferasa, que remueve el grupo metilo no nativo de la guanina y lo transfiere a una cisteína interna. Al hacerlo, la proteína se inactiva irreversiblemente (Lindahl, 2004; Lindahl and Wood, 1999). Este hecho ilustra cómo, en determinadas circunstancias, una proteína entera puede ser sacrificada para reparar una única base dañada.

NER

En términos de reconocimiento de lesión, NER es el más versátil de todos los sistemas de reparación. Existen dos vías NER con especificidad de sustrato parcialmente distinta: la reparación global del genoma (GGR, por *global genome repair*) examina todo el genoma en busca de lesiones que distorsionan su estructura, y la reparación acoplada a la

transcripción (TCR, por *transcription coupled repair*) se focaliza sobre el daño que bloquea las polimerasas que están elongando el RNA (Batty and Wood, 2000; de Laat et al., 1999; Mitchell et al., 2003; Tornaletti and Hanawalt, 1999). TCR es crítico para la rápida recuperación de la síntesis del RNA, y por lo tanto protege a la célula de la apoptosis inducida por lesiones que bloquean la transcripción (Dip et al., 2004). La figura 10 presenta el mecanismo de acción de estas vías.

BER

La vía de reparación BER es responsable de la reparación de las bases oxidadas y alquiladas, así como de los sitios abásicos generados por depuración espontánea (Lindahl, 2000). En general, las lesiones que son sustrato de BER incluyen aquellas que no distorsionan el esqueleto de DNA suficientemente como para detener las horquillas de replicación. En consecuencia, la inactivación de BER puede ser altamente mutagénica. La lesión más prevalente y mutagénica que debe ser corregida por BER es la base oxidada, 8-oxo guanina, que puede aparearse tanto con citosina o adenina. Si no es detectada, 8-oxoG resulta en una transversión de G:C a T:A, que es la segunda mutación más común hallada en cánceres humanos (Bruner et al., 2000). El mecanismo molecular ha sido resuelto hasta la estructura terciaria de todos los componentes y está explicado en la figura 11 (Hoeijmakers, 2001; Peterson and Cote, 2004).

Poco tiempo atrás, se creía que el mecanismo simple de “parche corto” era la vía de BER predominante, pero estudios recientes indican que una vía de reparación de “parche largo” podría tener más prevalencia de lo que alguna vez se creyó (Sattler et al., 2003).

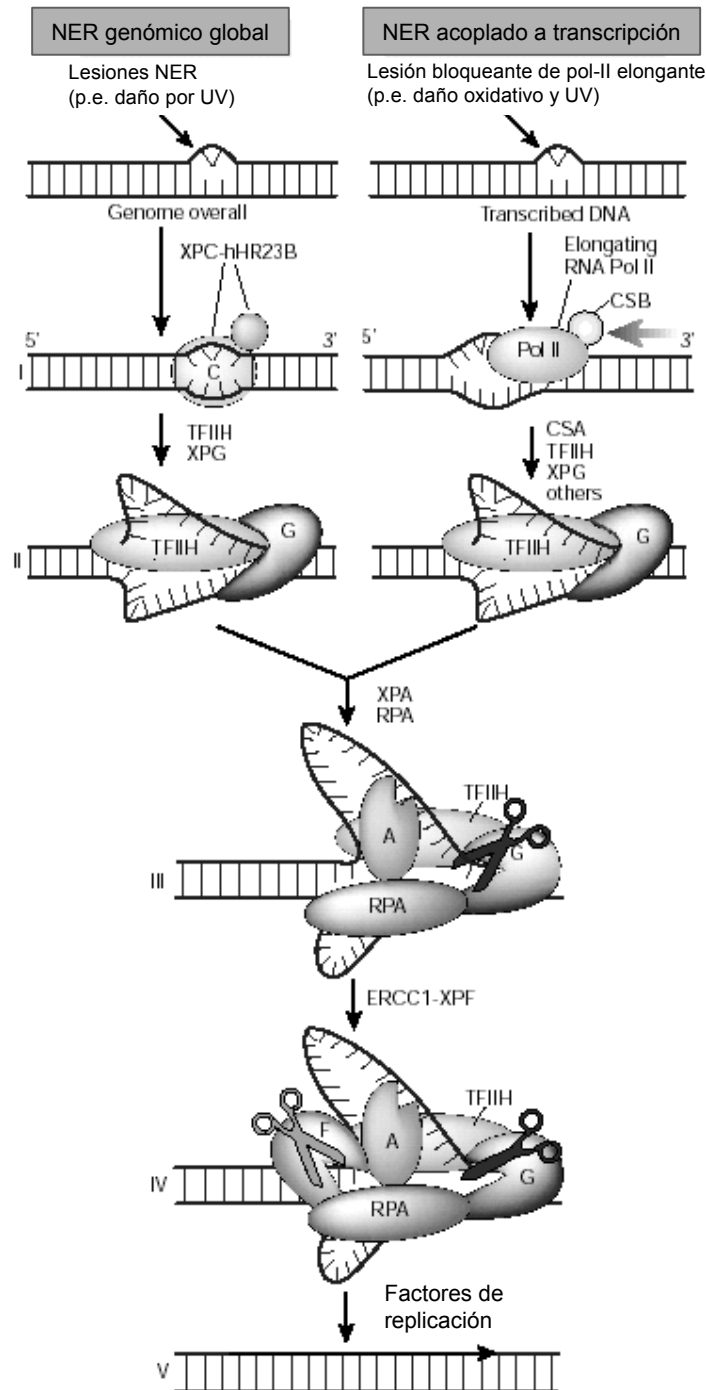
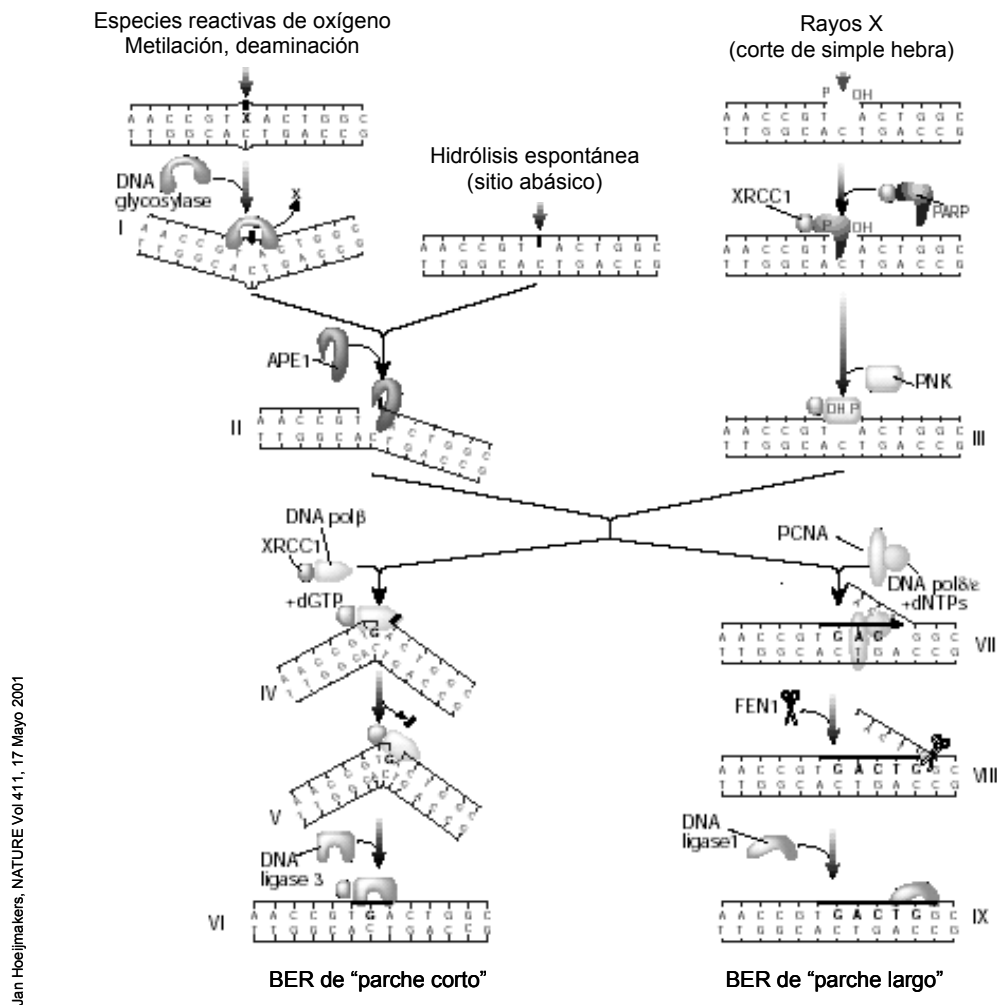


Figura 10. El complejo específico de GGR XPC-hHR23B examina la presencia de bases desapareadas en lugar de lesiones per se. En TCR, la habilidad de una lesión para bloquear la RNA polimerasa es crítica (I). La polimerasa atascada debe ser desplazada para que la lesión esté accesible a la reparación, y esto requiere al, menos dos factores específicos de TCR: CSB y CSA. Los pasos siguientes de GGR y TCR son similares. Las helicasas XPB y XPD del factor TFIIH abren aproximadamente 30 pares de bases del DNA alrededor del daño (II). XPA probablemente confirma la presencia del daño detectando una estructura anormal del esqueleto, y si no la hay, aborta NER. La proteína de unión a simple hebra RPA estabiliza el intermediario abierto uniéndose a la hebra no dañada (III). Distintos factores permiten detectar el daño con alta especificidad. Las endonucleasas XPG y ERCC1/XPF, cortan respectivamente en los bordes 3' y 5' de la región abierta solamente en la hebra que contiene la lesión generando un oligonucleótido de 24-32 bases (IV). Luego, la maquinaria de replicación completa la reparación rellenando el espacio (V). Estudios in vivo indican que la maquinaria NER es ensamblada paso a paso desde los componentes individuales en el lugar de una lesión. Luego de un evento único de reparación (que lleva varios minutos) todo el complejo es desarmado.



Jan Hoeijmakers, NATURE Vol 411, 17 Mayo 2001

Figura 11. Un gran número de diferentes glicosilasas de DNA reconocen un número limitado de distintos sustratos BER. Las glicosilasas exponen la base sospechosa fuera de la hélice mediante la compresión del esqueleto del DNA. Así, acomodan la base en una cavidad interna de la proteína. Dentro de la misma, la base dañada es cortada del esqueleto de azúcar-fosfato (paso I). El sitio abásico resultante puede también ocurrir espontáneamente por hidrólisis. La reacción BER principal es iniciada mediante la incisión de la hebra en el sitio abásico por la APE1 endonucleasa (II). La polimerasa de poli(ADP-ribose) (PARP), y la polinucleótido quinasa (PNK), serían importantes cuando VER es iniciado a partir de un SSB para proteger y cortar los extremos para permitir la síntesis reparativa. (III). En mamíferos, en la vía de reparación denominada de "parche corto", la DNA pol β lleva a cabo una reacción de reposición de un nucleótido (IV) y remueve el azúcar 5' terminal carente de base mediante su actividad liasa (V); esto continúa con el sellado del nick remanente por el complejo XRCC1-ligase 3 (VI). La proteína "scaffold" XRCC1 interactúa con la mayoría de los componentes BER y podría ser un instrumento de intercambio proteico. La vía de reparación denominada de "parche largo" involucra a la DNA pol β, pol δ/ε y al antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA) para la síntesis reparativa (2-10 bases) tanto como a la FEN1 endonucleasa para remover el flap de DNA desplazado y a la ligasa de DNA 1 para el sellado (VII-IX). Esta reacción BER opera en todo el genoma. Sin embargo, algunas lesiones BER bloquean la transcripción, y en este caso el problema es resuelto con la vía TCR descrita anteriormente, incluyendo TFIIH, XPG (que también estimula algunas de las glicosilasas) y el resto del aparato NER.

HR y NHEJ

Los DSBs son originados por radiaciones ionizantes, radicales libres, sustancias químicas y durante la replicación de un SSB. Luego de la detección de un DSB, se dispara una compleja cascada de reacciones con el objeto de detener la maquinaria del ciclo celular y reclutar factores de reparación (Khanna and Jackson, 2001; Zhou and Elledge, 2000). Uno de los iniciadores tempranos es la proteína quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM), enzima de la familia PIKK, la cual es defectiva en el síndrome que provoca sensibilidad a los rayos X, ataxia telangiectasia, una patología que predispone al cáncer (Khanna et al., 2001; Rotman and Shiloh, 1998). El arresto en G1 es mediado por p53. Otro evento temprano que depende de ATM, y de otras PIKK como ATR (ataxia telangiectasia related) y DNA-PKcs, es la fosforilación de la histona H2AX en el dominio de DNA contiguo al DSB (Burma et al., 2001; Sedelnikova et al., 2003). Este hecho otorga a la cromatina el estatus local requerido para las complejas reacciones de reparación o para reclutar las proteínas de reparación.

Como ya se mencionó, dos vías principales han evolucionado para reparar los DSBs y ambas están altamente conservadas en todos los eucariotas (Hoeijmakers, 2001; Paques and Haber, 1999) (Figura 12). El mecanismo de NHEJ involucra la religación de dos extremos de DNA, y debido a que esta reacción no es guiada por un DNA molde, es propensa a cometer errores. HR es otra vía principal de reparación de DSB y tiene una ventaja distintiva sobre otros mecanismos ya que actúa generalmente libre de errores. HR requiere miembros del grupo epistático RAD52, definido por los genes RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11, y XRS2, todos altamente conservados, resaltando la importancia de estas proteínas para la supervivencia celular (Hoeijmakers, 2001; Paques and Haber, 1999; Peterson and Cote, 2004). Estudios genéticos y bioquímicos en levaduras indican que la reparación de DSBs por NHEJ requiere del heterodímero de unión al extremo de DNA Ku70/Ku80, la ligasa de DNA IV, y el complejo Mre11/Rad50/Xrs2 (Haber, 2000; Wilson, 2002). Aún no está bien establecido un rol en NHEJ para el complejo análogo Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) en eucariotas superiores, y en contraste a las levaduras, NHEJ en este caso involucra a la DNA-PKcs (Lieber et al., 2003).

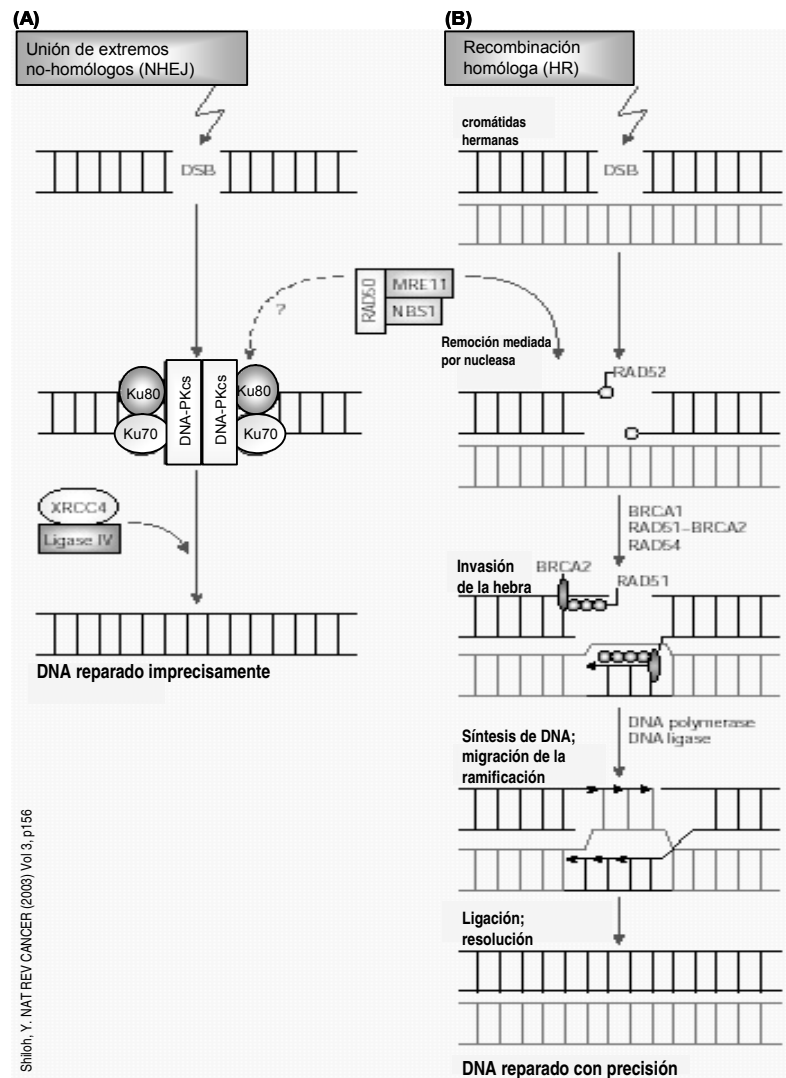


Figura 12. Las dos vías de reparación de DSB. A) La unión de extremos no homólogos media la reparación re-ligando directamente las hebras del DNA. Involucra el reconocimiento del DSB, el procesamiento de los extremos dañados o no complementarios y la subsecuente ligación de éstos. El procesamiento puede llevar a la pérdida o ganancia de nucleótidos, por lo tanto NHEJ es menos preciso que HR. B) La recombinación homóloga es un mecanismo preciso, basado en la presencia de un fragmento de DNA homólogo que puede ser utilizado como molde. Los extremos de DNA libres que se forman en el sitio del DSB son procesados, posiblemente involucrando la acción del complejo Mre11/Rad50/Nbs1. Rad51, Rad52 y RPA se asocian con las colitas de hebra simple. Este filamento nucleoproteico busca un DNA homólogo. Luego, se forma una molécula de unión entre las hebras dañada y no dañada. La síntesis de DNA guiada por el molde provee una copia de la hebra sana (Weterings E. et al, 2004).

Varios grupos han determinado los eventos moleculares que siguen a la formación de un solo DSB (Sugawara et al., 2003; Symington, 2002; Wolner et al., 2003). Primero, los extremos 5' del DNA que flanquean la lesión son removidos por una exonucleasa

desconocida dejando largas colas 3' de DNA de simple hebra. La recombinasa Rad51 une estos extremos expuestos formando un filamento nucleoproteico. *In vitro* e *in vivo*, Rad52, Rad54 y el heterodímero Rad55/Rad57 (Wolner et al., 2003) promueven este paso temprano. Luego, el filamento nucleoproteico busca un compañero de apareamiento homólogo para formar un heterodúplex (Petukhova et al., 2000). La secuencia homóloga donante está generalmente localizada en la cromátida hermana luego de la replicación del DNA. Sin embargo, la maquinaria de HR tiene la capacidad de hallar la homología dentro del genoma aún cuando la secuencia donante está en otro cromosoma. Una vez que las cadenas se han apareado, la hebra de DNA entrante es extendida por polimerasas de DNA y luego por migración de la hebra, llevando a la restauración de la información genética en el sitio de la lesión (Peterson and Cote, 2004). Notablemente, si el donante de DNA homólogo no está presente (p.e. si las células están en la fase G1), el DSB puede ser reparado mediante NHEJ. De qué manera la célula toma esta decisión no está claro, especialmente en vista de que los componentes de ambos HR y NHEJ parecen coocupar el DNA adyacente a un sitio único de DSB (Wolner y Peterson, datos no pub.)

CAPÍTULO 3: Puntos de control en el ciclo celular: una respuesta al stress.

El término punto de control o “*checkpoint*” del ciclo celular se refiere a los mecanismos regulatorios que no permiten la iniciación de una nueva fase del ciclo celular antes de que la anterior se haya completado, o que temporalmente detienen la progresión del ciclo en respuesta al estrés. El daño al DNA activa checkpoints específicos en las uniones de G1-S y G2-M y en la fase S, cada uno basado en diferentes mecanismos (Kastan and Bartek, 2004; Shiloh, 2003).

Los puntos de control (de aquí en más denominados, *checkpoints*) del daño al DNA fueron inicialmente definidos como vías regulatorias no esenciales que controlan el arresto del ciclo celular en respuesta al daño al DNA, otorgando tiempo para su reparación. Evidencias recientes indican que, además de controlar el arresto, estas vías regulan la activación de los mecanismos de reparación, la composición de la cromatina telomérica, y la movilización de proteínas de reparación hacia los sitios de daño. También, la activación de programas transcripcionales, el largo de los telómeros, y la inducción de la muerte por apoptosis. Por lo tanto, un checkpoint comprende una subrutina integrada en la respuesta mayor al daño al DNA que a su vez controla una respuesta multifacética. Además, algunos genes *checkpoint* son esenciales para la supervivencia de la célula o el organismo, implicando que estas vías no actúan sólo como vigilantes de un daño ocasional sino que son componentes integrales de la fisiología celular (Shiloh, 2003; Zhou and Elledge, 2000).

Los checkpoints constituyen cascadas de transducción de señales. Ciertas moléculas sensoras que se encuentran río arriba, monitorean y detectan moléculas de DNA alteradas, mientras que transductores centrales actúan en una cascada de proteínas quinasas para regular un gran número de efectores río abajo (Tabla 2) (Viscardi et al., 2005). Los componentes fundamentales de los checkpoints que dependen de daño al DNA son las quinasas de la familia

Tabla 2
Proteínas involucradas en checkpoints inducidos por daño al DNA en levaduras y mamíferos

Función	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Mamíferos
Quinasas ATM/ATR	Mec1	Rad3	ATR
	Tel1	Tel1	ATM
Proteínas de interacción con ATR	Ddc2	Rad26	ATRIP
Reconocimiento/ procesamiento de DSB	Mre11	Rad32	Mre11
	Rad50	Rad50	Rad50
	Xrs2	Nbs1	Nbs1
proteínas similares RFC	Rad24	Rad17	Rad17
	Rfc2-5	Rfc2-5	Rfc2-5
proteínas similares PCNA	Ddc1	Rad9	Rad9
	Rad17	Rad1	Rad1
	Mec3	Hus1	Hus1
Mediadoras	Rad9	Crb2	BRCA1
	Mrc1	Mrc1	Claspin
Quinasas efectoras	Rad53	Cds1	Chk2
	Chk1	Chk1	Chk1

PIKKs (por *PI3K-like protein kinases*), ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (*ATM and Rad3 related protein*). ATR responde al daño inducido por UV, a los DSBs y a las horquillas de replicación atascadas en células mamíferas, mientras que ATM parece estar principalmente involucrada en la respuesta a los DSBs.

Los checkpoints de G1 y G1/S

La respuesta dominante al daño al DNA en células de mamífero que están en fase G1 es la vía ATM (ATR)/CHK2(CHK1)-p53/MDM2-p21 (Figura 13), que es capaz de inducir un arresto sostenido, y a veces permanente en fase G1. ATM/ATR fosforilan directamente el factor de transcripción p53, que también es blanco de CHK1 y CHK2. Además, la ligasa de ubiquitina MDM2, que normalmente se une a p53 asegurando su degradación, también es fosforilada luego del daño por ATM/ATR y por CHK2/CHK1. Esto contribuye a la acumulación de p53 y al aumento de su actividad como factor de transcripción. En consecuencia, aumenta el nivel de p21Cip1 causando un arresto en G1. Este hecho, no sólo impide el inicio de la síntesis de DNA, sino que también preserva la vía Rb/E2F en su forma activa, supresora del crecimiento, causando un bloqueo en G1 sostenido. Por lo tanto, el checkpoint de G1 tiene como blanco dos vías supresoras tumorales, gobernadas por p53 y Rb. Estos son los dos mecanismos más comúnmente desregulados en cáncer humano (Kastan and Bartek, 2004; Massague, 2004). La mayoría de los tumores que poseen Rb salvaje están ligados a la pérdida de la función de p53 debido a la inactivación del gen o como resultado de un efecto epigenético (Bartek et al., 2004; Wang et al., 2004).

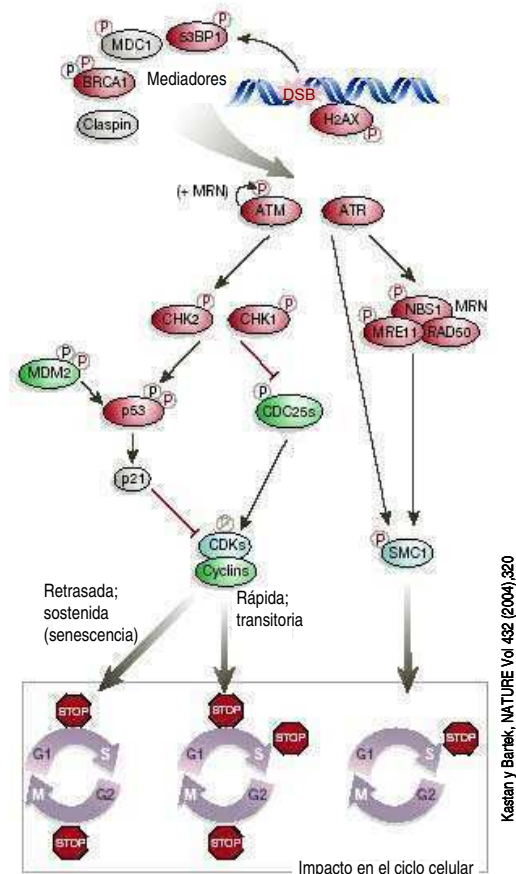


Figura 13. Esquema simplificado de los checkpoints del ciclo celular inducidos en respuesta al daño al DNA (aquí DSBs), con los supresores tumorales en rojo, y los proto-oncogenes en verde. El control global regulado por ATM/ATR y CHK2/CHK1 afecta otras respuestas celulares además de la progresión del ciclo celular, incluyendo reparación del DNA, transcripción, ensamble de la cromatina y apoptosis.

Sin embargo, algunas células malignas expresan la proteína p53 salvaje. Esta circunstancia nos indujo a pensar que estas células podrían carecer de un checkpoint en G1 totalmente competente en respuesta al daño en el DNA, a pesar de la presencia de p53. En este contexto, es razonable pensar que otras moléculas, como las proteínas INK4, que inhiben las actividades de CDK4/6 causando un arresto en G1, serían necesarias para reforzar esta respuesta.

En G1 tardía, como respuesta a un estrés genotóxico y por las actividades aumentadas de CHK1 y CHK2 se produce la degradación de CDC25A y en consecuencia la inhibición de los complejos ciclina E(A)/CDK2 (Bartek and Lukas, 2003; Donzelli and Draetta, 2003). El checkpoint de CHK1/CHK2-CDC25A es implementado rápidamente, independientemente de p53, y retrasa la transición G1/S por un par de horas, a menos que el mecanismo sostenido dependiente de p53 prolongue el arresto en G1.

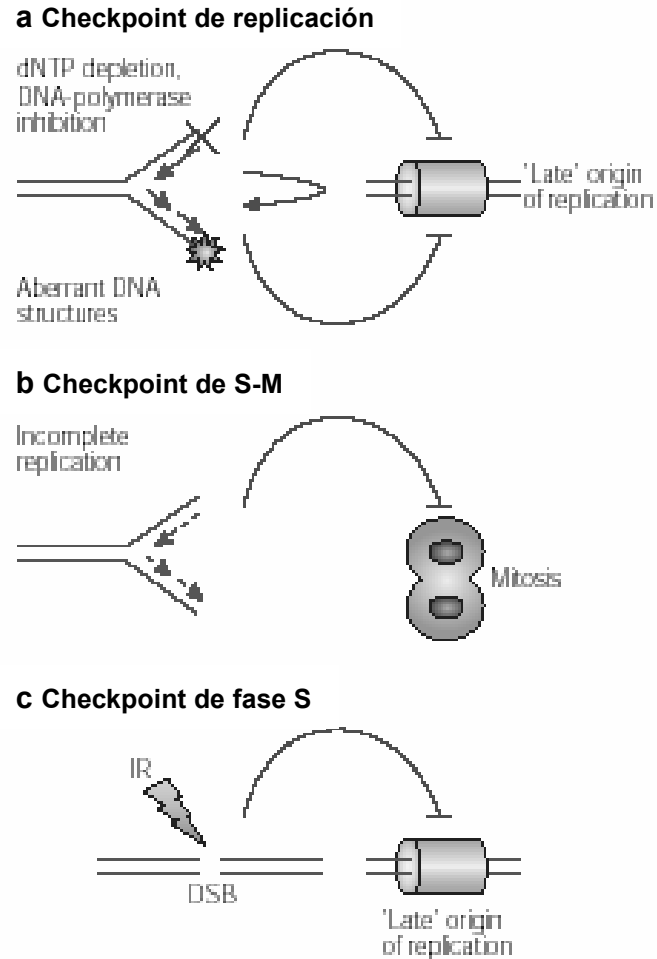
Las vías checkpoint de fase S

El checkpoint de replicación: es iniciado cuando la horquilla de replicación queda atascada en un DNA dañado (Figura 14a). Los componentes clave de esta maquinaria son la proteína RPA, el complejo ATR-ATRIP, la proteína mediadora claspina, RAD17 y el complejo (9-1-1). Este checkpoint tiene dos funciones: inhibir la iniciación de la replicación de orígenes nuevos y proteger la integridad de las horquillas y permitir la recuperación de la progresión del ciclo celular luego de la reparación del DNA.

El checkpoint de S-M: asegura que la célula no trate de dividirse antes de que el genoma completo esté fielmente duplicado (Figura 14b). También depende de la replicación. La falla de este checkpoint resulta en una mitosis catastrófica. El blanco clave de esta vía es el complejo ciclina B-CDK1 y varios componentes son compartidos con el checkpoint de replicación.

El checkpoint intra-fase-S: es activado por DSBs generados en los loci genómicos externos a los replicones activos (Figura 14c). La característica fundamental que diferencia este control de los otros dos es su independencia de las horquillas de replicación (Bartek et al., 2004).

Notablemente, ninguno de estos checkpoints de S requiere p53, que es el blanco principal del checkpoint de G1-S.

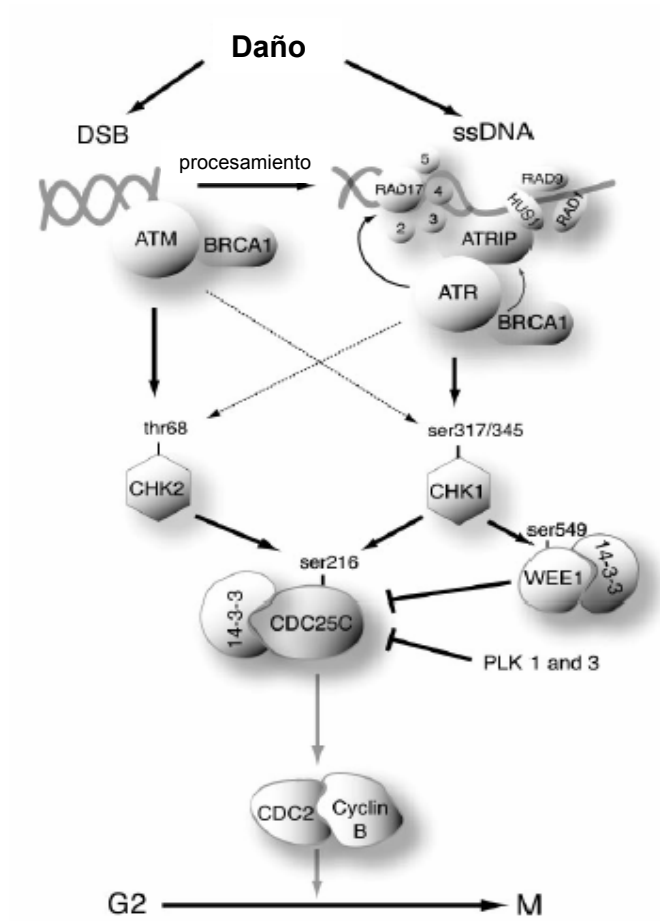


Bartek, Lukas y Lukas, NatRev MolCellBio, Vol5, Oct 2004

Figura 14. Puntos de control en la fase S.

El checkpoint de G2

Este control impide que las células inicien mitosis cuando sufren daño en el DNA durante G2, o cuando pasan por G2 con algún daño no reparado inflingido durante las fases previas S o G1. El blanco crítico es la actividad de ciclina B/CDK1, cuya activación luego del stress es inhibida por ATM/ATR, CHK1/CHK2 y/o el secuestro subcelular, la degradación o inhibición de la fosfatasa CDC25 (que normalmente activa CDK1 en G2/M) mediada por la quinasa p38. El hecho de que tumores deficientes en otros checkpoints, como aquellos con p53 mutante, tiendan a acumularse selectivamente en G2 luego del daño, indica que mecanismos independientes de p53 son suficientes para sostener el arresto en G2 (Kastan and Bartek, 2004; Nyberg et al., 2002).



Nyberg et al., AnnRevGenDev, 2002, 36:617

Figura 15. El checkpoint de G2 en mamíferos funciona principalmente para bloquear Ciclina B/CDK1. Las flechas grises indican funciones perdidas luego de la activación de la cascada de checkpoint.

CAPITULO 4: Integrando la información sobre el estado del genoma.

Daño al DNA, arresto del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis.

Las células, para asegurar su supervivencia y la propagación de copias fieles del genoma en las siguientes generaciones, responden al daño en el DNA con una respuesta multifacética que coordina la progresión del ciclo celular con la reparación del DNA, el remodelamiento de la cromatina, los programas transcripcionales o la muerte celular (Hoeijmakers, 2001; Lukas et al., 2004; Sancar et al., 2004).

Durante la apoptosis o muerte celular programada, las proteasas conocidas como caspasas ejecutan la ordenada destrucción de la célula (Danial and Korsmeyer, 2004). Las caspasas pueden ser activadas por factores extracelulares, como FasL (ligando de Fas), el que actúa por medio de los receptores de muerte en membrana. También pueden ser activadas por señales intrínsecas de la célula que liberan citocromo *c* y la proteína Smac/DIABLO de la mitocondria. En células de mamífero, la liberación de estos factores es llevada a cabo por los miembros pro-apoptóticos de la familia génica Bcl2, incluyendo Bad, Bax, Bim, Noxa, Puma y otros. Estos actúan en oposición a los miembros anti-apoptóticos BclXL, Mcl-1 y Bcl2. El citocromo *c* dirige la formación del “apoptosoma”, un complejo formado por las proteínas señalizadoras caspasa-9 y Apaf-1, mientras que Smac/DIABLO bloquea las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), una familia de inhibidores de caspasas. En conjunto, estos efectos derivan en una robusta activación de las caspasas (Lowe et al., 2004; Massague, 2004).

La relación entre la integridad genómica y la regulación de la muerte celular puede ser manifestada en diferentes circunstancias. Por ejemplo, la inestabilidad genómica puede llevar a la mutación, o nivel de expresión alterado, de reguladores de la apoptosis. Además, bajo condiciones normales, las células eucariotas que experimentan un daño excesivo en el DNA y que no puede ser reparado durante el arresto del ciclo celular controlado por un checkpoint, inician la muerte celular a través de la vía apoptótica o ingresan en un estado de senescencia (arresto permanente). Sin embargo, si por alguna razón la apoptosis es inhibida, se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica. Las células que son lo suficientemente fuertes para sobrevivir, tendrían una ventaja de crecimiento, que en última instancia podría llevar al cáncer (Zhivotovsky and Kroemer, 2004). La apoptosis deficiente afecta el resultado terapéutico, dado que la mayoría de los agentes utilizados en el tratamiento del cáncer activan vías apoptóticas para precipitar la muerte celular (Johnstone

et al., 2002). La inestabilidad genética, incluyendo el cambio en el número de cromosomas y las aberraciones cromosomales, es frecuente en el cáncer humano y se cree que es requerida para generar los múltiples errores genéticos necesarios para la transformación maligna (Rouse and Jackson, 2002). La inestabilidad genómica es un evento que correlaciona con una reparación del DNA inadecuada, y se lo ha asociado con mutaciones que la restringen, incluyendo BRCA1, BRCA2, Ku80, XRCC4, NBS1 y genes involucrados en anemia Falconi (D'Andrea and Grompe, 2003; Rooney et al., 2003; Roth, 2002). Por último, es posible que una única proteína o proceso esté involucrada tanto en el control de la apoptosis como de la estabilidad genómica (Zhivotovsky and Kroemer, 2004).

Luego del reconocimiento de un daño en el DNA mediante Rad17 y el complejo 9-1-1, se activa Chk2, blanco de ATM/ATR, que fosforila p53, aumentando su estabilidad y unión al DNA. Además, una mutante dominante negativa de Chk2, inhibe la apoptosis mediada por p53 (Peters et al., 2002). Ratones deficientes en Chk2 tienen reducida apoptosis inducida por radiación en neuronas, timocitos y esplenocitos (Takai et al., 2002). La fosforilación de H2AX, otro *target* de ATM y ATR, es una consecuencia aguda del daño al DNA y un indicador de apoptosis inducida por daño al DNA (Taneja et al., 2004).

El supresor tumoral p53 puede estimular la reparación del DNA o, más allá de un cierto umbral de daño, iniciar apoptosis (Figura 16). P53 transactiva una serie de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2, en particular BAX, BID, PUMA y NOXA (Vousden and

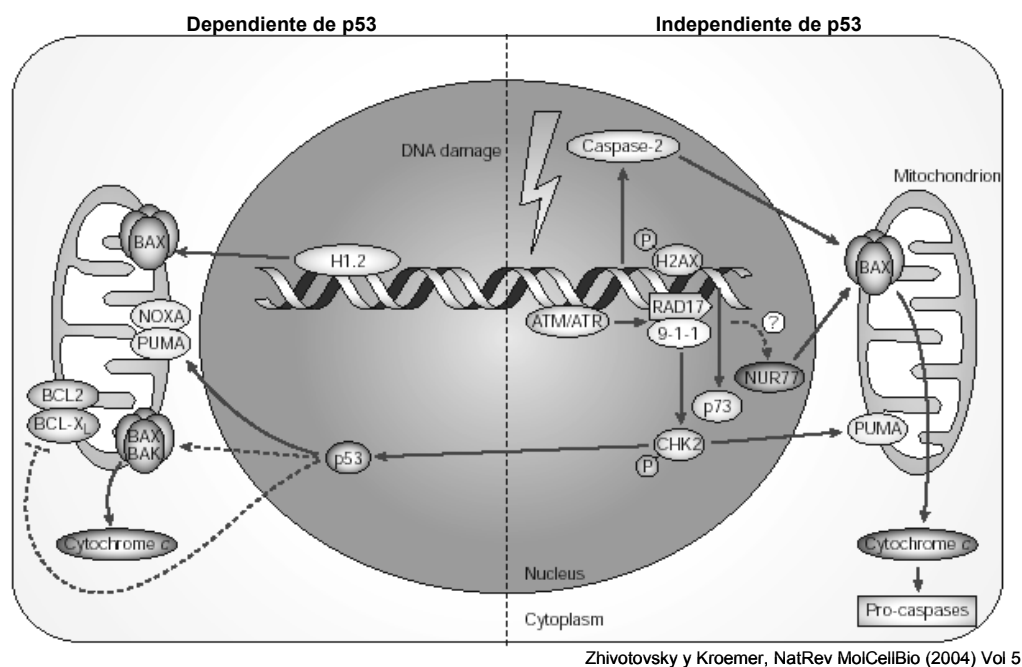


Figura 16. Procesos dependientes e independientes de p53 que relacionan DSBs con la vía apoptótica.

Lu, 2002) y reprime la proteína anti-apoptótica Bcl2. Finalmente, en respuesta a DSBs, p53 puede estimular la liberación nuclear de la histona H1.2, que estimula la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) (Konishi et al., 2003). También existen efectos directos de p53 sobre la mitocondria (Chipuk et al., 2004; Chipuk et al., 2003; Leu et al., 2004; Marchenko et al., 2000; Mihara et al., 2003). Por lo tanto, p53 dispara numerosas vías dependientes e independientes de la transcripción que relacionan el daño al DNA y la apoptosis. Esto es importante si consideramos que la inactivación genética o funcional de p53 puede llevar a la inestabilidad genómica.

Otros eventos, independientes de p53, unirían el daño al DNA y la regulación de la apoptosis. Tal relación podría involucrar a p73, un factor de transcripción similar a p53 (Melino et al., 2004) y a Nurr77, un receptor esteroideo huérfano que puede translocar a la mitocondria e interactuar con Bcl2, induciendo MMP (Lin et al., 2004). La activación nuclear de la caspasa-2, mediada por el PIDDosoma en respuesta a estrés genotóxico, puede disparar la apoptosis por vía mitocondrial (Tinel and Tschopp, 2004). Por otro lado, existe una coordinación entre la reparación del DNA y el destino celular apoptótico, controlada por la liberación de Ku70 (subunidad regulatoria de unión al DNA de la DNA-PK) desde el núcleo al citoplasma (Norbury and Zhivotovsky, 2004).

Podemos decir entonces, que existen mecanismos comunes de detección del daño y transducción de la señal compartidos por las vías que controlan la reparación del DNA, el ciclo celular y la apoptosis (Figura 17).

A pesar de que la gran mayoría de proteínas involucradas en la red que conforma la respuesta al daño al DNA son conocidas, como se describe más arriba, aún quedan espacios vacíos, que esperan ser completados, en la reacción integral organizada por la célula. Por ejemplo, la identidad de los sensores que monitorean el genoma por cualquier anomalía y que ayudan a generar las señales no es conocida en su totalidad (Zhou and Elledge, 2000). Debido a que la

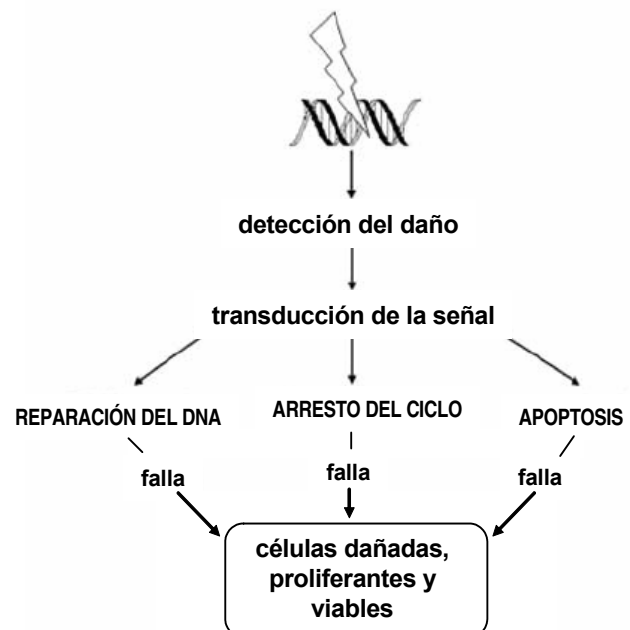


Figura 17. Decisiones de vida o muerte luego del daño al DNA.

cromatina debe estar relajada para que lesión sea eficientemente detectada y reparada, los factores de accesibilidad deberían interactuar con el genoma, especialmente en regiones no transcribibles, para tener contacto con el daño. A pesar de que se han propuesto varios complejos con esta función, la identidad de los factores de accesibilidad putativos permanece sin descubrirse.

Finalmente, se han descrito varias evidencias que involucran proteínas en la reparación del DNA así como en señalar las vías que llevan a la apoptosis; sin embargo, se requieren análisis genéticos y bioquímicos adicionales para completar el estudio. La identificación de nuevas proteínas o mecanismos relacionados con estos procesos ayudará a responder algunos de los interrogantes mencionados. Cada uno de estos eventos, potencialmente, tiene crucial importancia en el desarrollo de tumores y en la respuesta de las células cancerosas a las terapias basadas en la inducción de daño al DNA.

Objetivos

Los cuatro miembros de la familia INK4 poseen una estructura similar y son igualmente potentes como inhibidores de CDK4/6. Sin embargo, y a pesar de esta redundancia, son diferencialmente expresados en el desarrollo del ratón, y en términos de funciones biológicas, cada uno participa en la regulación de distintos eventos que siguen a la estimulación mitogénica, a la privación de mitógenos o a cambios en la interacción célula-célula o célula-matriz, y han sido también implicados en la inducción de la diferenciación terminal y el envejecimiento celular o senescencia. Además, las INK4 están ausentes o inactivadas por mutaciones en diversos tipos de cáncer, representando supresores tumorales o candidatos a serlo. Por otra parte, la gran diversidad en su patrón de expresión, sugiere que esta familia de inhibidores del ciclo celular podría tener funciones específicas de tejido o de tipo celular.

La luz UV, la radiación ionizante y sustancias químicas genotóxicas provocan lesiones en el DNA, que, si no se reparan, pueden llevar a mutaciones que aumentan el riesgo del establecimiento de un tumor.

Luego de un daño en el DNA, se activa un checkpoint en G1, que depende de p53, y es por eso que muchos tumores están ligados a la pérdida de esta proteína. Sin embargo, algunas células malignas expresan p53 wt (p.e. SH-SY5Y). Tal vez, estas células carezcan de un checkpoint en G1 competente, en respuesta al daño. En este contexto, las proteínas INK4, podrían ser necesarias para reforzar esta respuesta.

El presente trabajo tuvo dos objetivos principales:

1- Analizar el rol potencial de p19INK4d en la respuesta celular frente al daño del DNA con agentes genotóxicos, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y otros tipos celulares.

- ✓ Analizar la expresión de p19 en ese contexto.
- ✓ Estudiar la localización subcelular de p19 luego de la irradiación con UV.

2- De existir modificaciones en el estatus de p19 en un contexto celular de injuria al DNA, investigar si las mismas, forman parte de algún mecanismo fisiológico involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genética.

- ✓ Analizar el efecto que tiene p19 en el nivel de apoptosis celular inducido por distintos agentes de daño genómico.
- ✓ Estudiar la habilidad de p19 de mejorar la capacidad de las células de reparar el DNA dañado con UV y con otros agentes genotóxicos.
- ✓ Estudiar la relación entre su función como inhibidor del ciclo, el nivel de apoptosis y la reparación del DNA.
- ✓ Investigar si p19 ejerce algún efecto a largo plazo sobre la supervivencia de células tratadas con agentes genotóxicos.

Hipótesis

Actualmente se sabe que, varios procesos celulares, tales como el crecimiento celular, la diferenciación, la senescencia, y varios puntos de control o checkpoints, deben interaccionar con las vías que regulan la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Además, como hemos mencionado, la célula responde al daño en el DNA con una respuesta multifacética que coordina la progresión del ciclo celular con la reparación del DNA, el remodelamiento de la cromatina, los programas transcripcionales o la muerte celular. Y todo ello, para lograr un control preciso de la estabilidad genómica.

Nosotros postulamos que p19INK4d, además de cumplir su rol como inhibidor del ciclo celular, estaría involucrada en el mantenimiento de la integridad del DNA. Esta proteína tendría algún papel en la reparación del DNA dañado con diversos agentes genotóxicos, haciéndola más eficiente, y disminuyendo el nivel de apoptosis inducida por el daño. De esta manera, jugaría un rol integrador entre la apoptosis, la reparación y el ciclo celular.

RESULTADOS

Primera Parte

Estudio de la expresión y la localización subcelular del inhibidor de CDKs p19INK4d en condiciones basales y como respuesta al tratamiento con agentes genotóxicos en células de neuroblastoma.

La compleja diversidad en el patrón de expresión de las INK4 sugiere que esta familia de inhibidores del ciclo celular podría tener funciones específicas de tejido o de línea celular (Roussel, 1999). Dado el rol emergente de estas proteínas en procesos tanto fisiológicos como patológicos, sus similitudes bioquímicas y la homología evolutiva de las cuatro INK4, es de considerable importancia estudiar y discernir entre las funciones redundantes e individuales de cada una de ellas. En los últimos años, miembros de esta familia han sido involucrados en diversos procesos tales como control del ciclo celular, diferenciación, oncogénesis y senescencia. En conocimiento de estos antecedentes, decidimos estudiar la participación de p19INK4d en los mecanismos relacionados con el mantenimiento de la integridad del genoma. Nuestro primer objetivo consistió en analizar la expresión y localización de p19INK4d (indistintamente denominada p19) en la respuesta celular al daño del DNA con agentes genotóxicos.

1- p19INK4d se expresa en forma periódica en el ciclo celular de neuroblastoma.

El neuroblastoma es uno de los tumores más frecuentes de la infancia. Deriva de la cresta neural, la cual da origen a múltiples linajes celulares con fenotipo neuronal o melanocítico (Sadee et al., 1987). A diferencia de otros tipos de tumores, la mayor parte de los neuroblastomas humanos no presentan mutaciones en el gen de p53 (Hosoi et al., 1994). Por lo tanto, estas líneas celulares son un modelo adecuado para investigar la función y regulación de proteínas en un contexto de p53 salvaje. En primer lugar analizamos la expresión basal de p19 y su regulación en el ciclo celular. Para ello, células SH-SY5Y derivadas de neuroblastoma humano fueron arrestadas en la fase G1 temprana del ciclo cultivándolas en medio sin suero durante 36 horas. Luego, fueron inducidas a reingresar en el ciclo sincrónicamente mediante la adición de suero. El mRNA de p19 no se detectó en células quiescentes (tiempo 0), ni en células ingresando en la fase G1. Sin embargo, cuando las células se aproximaban a la transición G1/S, comenzó la síntesis del mRNA de p19 abruptamente y aumentó mientras la célula progresaba en la fase S. Luego, disminuyó nuevamente por el resto del ciclo. La cinética de expresión del mRNA de p19 es distinta de la de ciclina D1, que es inducida en fase G1 temprana y oscila mientras las células continúan proliferando. La expresión del gen gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, utilizado como control de siembra, mostró mínimas oscilaciones durante todo el ciclo celular (Figura 1a). A pesar de que las células comenzaron a perder sincronía en el segundo ciclo, el mRNA de p19 aumentó nuevamente al final de G1 y en S (ver 48 h). En paralelo cuantificamos la proporción de células en cada fase del ciclo mediante citometría de flujo (FACS) y medimos la incorporación de ³H-timidina. Con estos datos calculamos la duración del ciclo celular de SH-SY5Y, que resultó ser de aproximadamente 44 horas. La máxima proporción de células en división fue observada entre 34 y 38 h (Figuras 2a y 2b). Consistentemente con la cinética del mRNA, la síntesis de proteína p19 aumentó cerca de la transición G1/S, disminuyó mientras la célula se dividía y aumentó nuevamente en fase G1 tardía y S del siguiente ciclo (Figura 1b). La abundancia relativa de p19, está resumida en el gráfico de la figura 1c.

Por lo tanto, la síntesis de p19 (mRNA y proteína) en células de neuroblastoma es periódica, con inducción en las fases G1 media y S del ciclo celular. Estos resultados son coincidentes con lo reportado en otros tipos celulares (Guan et al., 1996; Hirai et al., 1995).

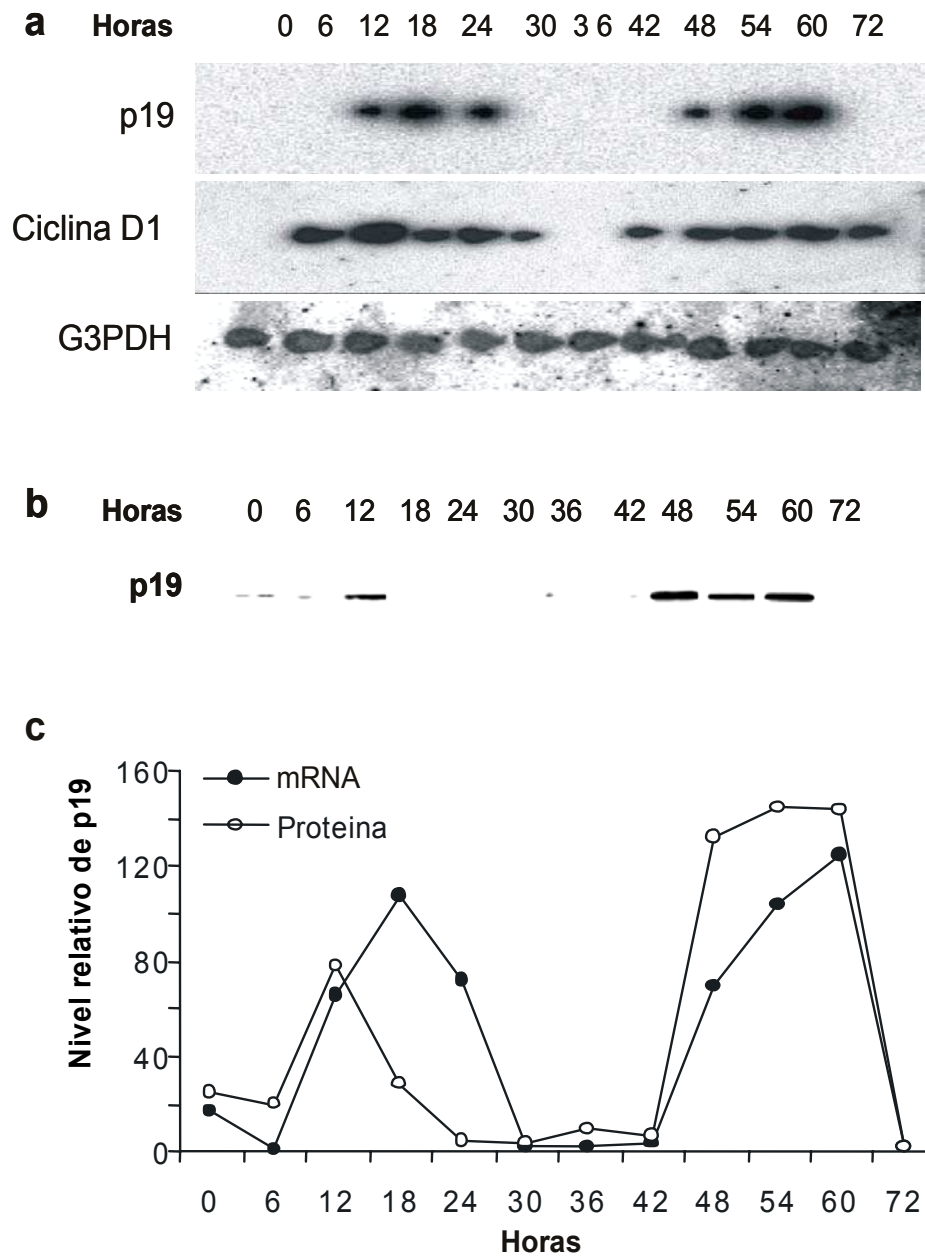


Figura 1. Expresión de p19 durante el ciclo celular de neuroblastoma. Células SH-SY5Y fueron arrestadas en fase G1 temprana por privación de suero durante 36 h y luego estimuladas con suero a entrar al ciclo sincrónicamente. a) Northern blot del RNA total (20 µg) extraído de las células en los tiempos indicados. Las sondas marcadas con ^{32}P se indican en el margen izquierdo. b) Immunoprecipitación y Western blot con anticuerpo policlonal anti-p19. c) Nivel de mRNA y de proteína p19 cuantificado con un analizador Bio-Imaging Analyzer.

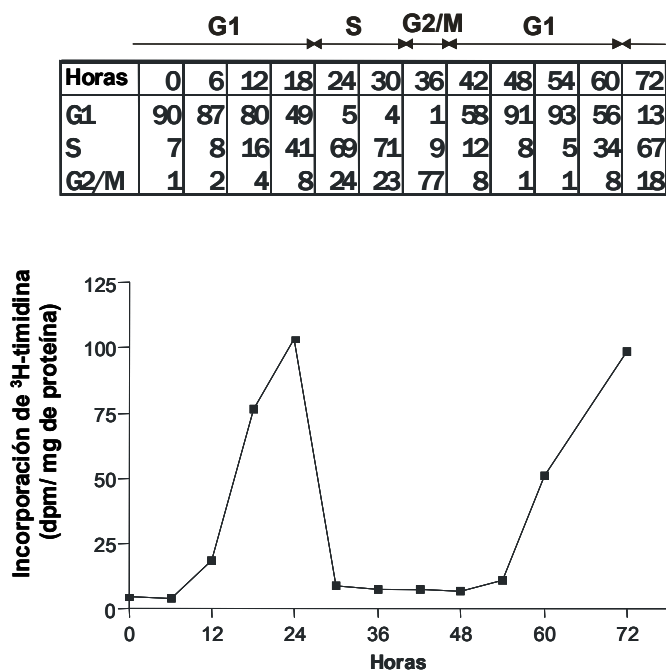


Figura 2. Las fases y la duración del ciclo celular fueron determinadas mediante citometría de flujo e incorporación de 3H-timidina. En la tabla se indica la cantidad de células en porcentaje.

2- p19INK4d es inducida por radiación UV en células de neuroblastoma.

A continuación, confrontamos nuestra hipótesis de que la proteína p19 estaría involucrada en la respuesta celular disparada por el daño al DNA. En primer lugar, estudiamos la expresión de p19 luego de irradiar células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con luz UV, un conocido agente genotóxico. Encontramos que existía una clara inducción transitoria luego de 24 horas desde la irradiación y que esta inducción era dependiente de la dosis de UV (Figuras 3a y 4). Para todos los ensayos siguientes elegimos la dosis de 8 mJ/cm² de UV. Para verificar si este aumento en el nivel de proteína era atribuible a una regulación a nivel de la transcripción medimos el nivel de mRNA a distintos tiempos luego de la irradiación y observamos que el mRNA de p19 estaba significativamente aumentado 24 horas luego del tratamiento (Figura 5). Estos resultados sugieren que la expresión de p19INK4d es inducida por luz UV principalmente en un paso pretraduccional. Como control del tratamiento, estudiamos el nivel de la proteína p53, que aumentó con la irradiación UV y el de CDK4 que permaneció inalterado (Figura 3b).

Simultáneamente realizamos un análisis por FACS en células SH-SY5Y con el objeto de evaluar su posición en el ciclo celular luego del tratamiento con luz UV. Observamos que cerca del 65% estaban arrestadas en G1 48 horas luego de la irradiación, en contraste con el 50% de células no tratadas con contenido de DNA correspondiente a fase G1. La respuesta al agente genotóxico causó un verdadero arresto del ciclo celular ya que la proporción de células en fase S disminuyó de 33% en células no irradiadas a 9% luego del tratamiento. Además, 48 horas luego de la irradiación, el número de células, la actividad metabólica y la incorporación de timidina disminuyeron significativamente comparándolas con las células control (datos no mostrados). Por otro lado, la población celular en la fase Sub G1 se incrementó de 3,5% a 13,6%, 48 luego de la irradiación, indicándonos un aumento de la muerte celular (Figura 6).

3- El efecto de UV sobre p19INK4d no está restringido a un sólo tipo celular.

Con el objeto de determinar si la inducción de p19 mediada por UV es un evento general y no una observación específica de este tipo celular, decidimos estudiar la expresión de p19 en respuesta a la luz UV en varias líneas celulares de distinto origen. Hallamos que el mRNA de p19 también era inducido en otra línea de neuroblastoma humano, como IMR32, para la que realizamos una curva de tiempo luego de irradiar las células y observamos alta acumulación del mensajero a las 24 horas (Figura 7). Así mismo, estudiamos la expresión de p19 en células de neuroblastoma de ratón Neu-2a, en fibroblastos de hamster BHK21 y en células HeLa, derivadas de adenocarcinoma de cérvix. En estos ensayos, además, transfectamos una muestra con un vector de expresión para p19 (pSG5p19) como control de sobreexpresión y que será utilizado en ensayos posteriores. En los tres tipos celulares p19 se indujo considerablemente en respuesta a la irradiación con luz UV. Es llamativa, la inducción de p19 en células HeLa, donde normalmente esta silenciada o inhibida (Figura 8).

Podemos decir, entonces, que la inducción de p19 luego de la irradiación UV es una respuesta celular general y que no está ligada a un tipo celular específico.

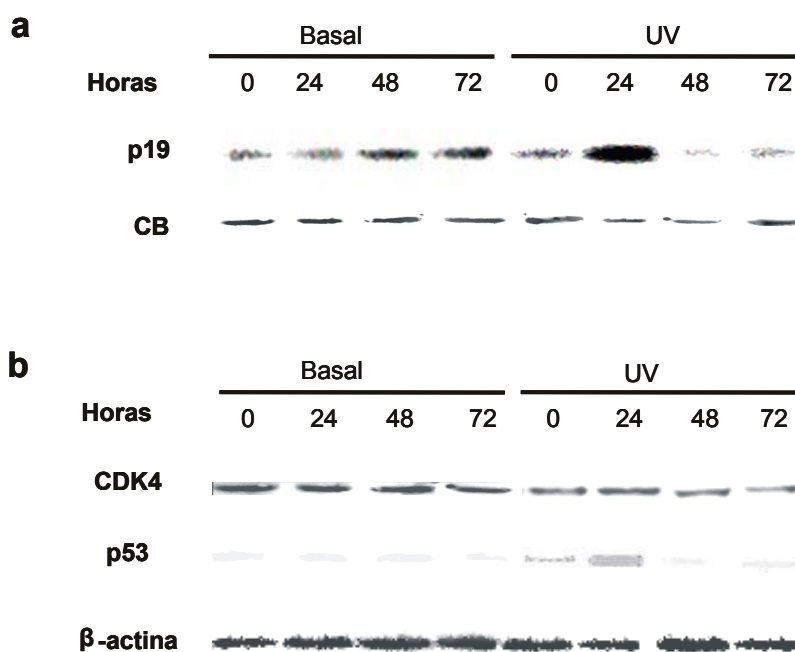


Figura 3. Inducción de la expresión de la proteína p19INK4d luego de irradiación UV.

Células SH-SY5Y fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UVC y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. a) Igual cantidad de proteína (100 μ g) de los lisados celulares fue sujeta a inmunoprecipitación y Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-p19. El contenido proteico de cada muestra fue verificado por tinción con Coomasie Blue (CB). En la foto se muestra una banda representativa. b) Las proteínas p53 y CDK4 fueron detectadas mediante Western blot utilizando 20 μ g de proteínas totales de células SH-SY5Y con anticuerpos policlonales anti-p53 y anti-CDK4 respectivamente. La figura muestra el resultado de uno de tres experimentos independientes.

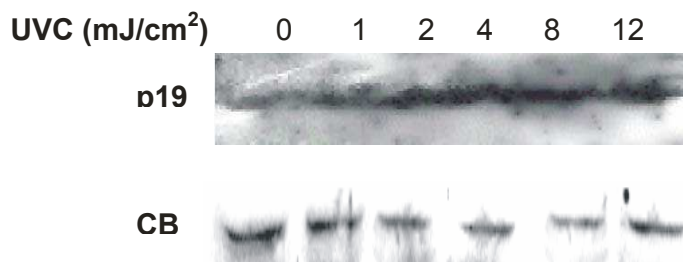


Figura 4. El aumento de p19 es dependiente de la dosis de UV. Células SH-SY5Y fueron irradiadas con las dosis de UV indicadas y cosechadas 24 h luego de la irradiación. Igual cantidad de proteína (100 μ g) de los lisados celulares fue sujeta a inmunoprecipitación y Western Blot con un anticuerpo policlonal anti-p19. El contenido proteico de cada muestra fue verificado por tinción con Coomasie Blue (CB). En la foto se muestra una banda representativa. La figura muestra el resultado de uno de tres experimentos independientes.

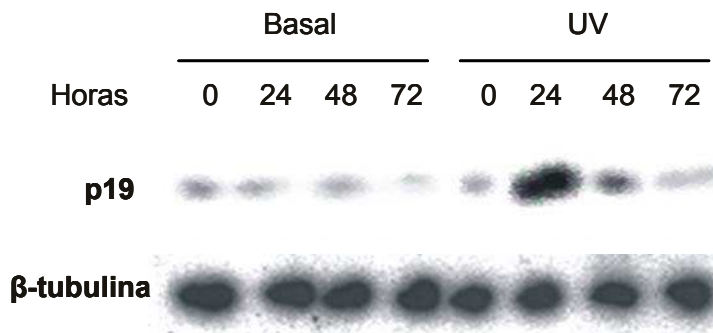


Figura 5. El mRNA de p19 aumenta luego de la irradiación con UV. Células SH-SY5Y fueron irradiadas con 8mJ/cm² de UV y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. 20 µg de RNA total fue sujeto a northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana marcada con ³²P. La membrana fue rehibridizada para b-tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de uno de tres experimentos independientes.

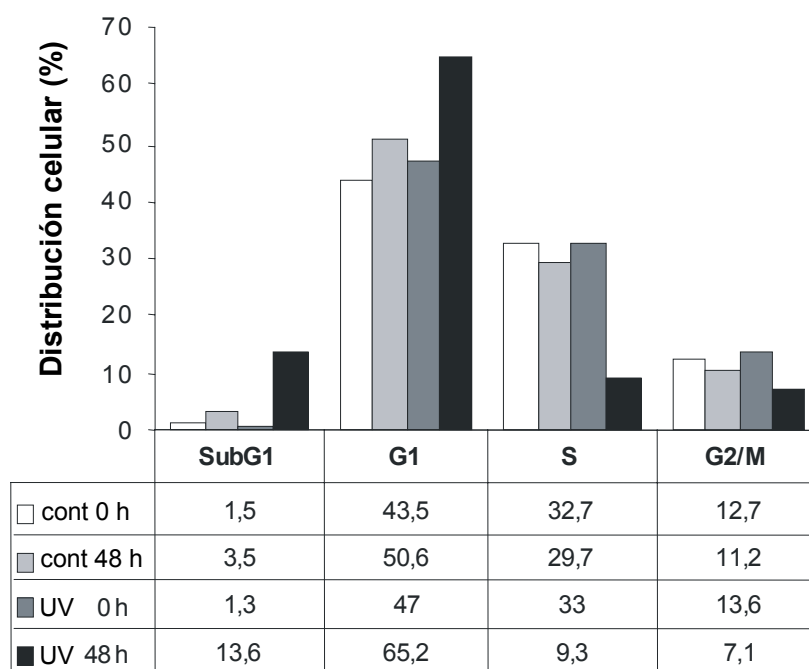


Figura 6. Arresto en fase G1 en células de neuroblastoma luego de tratarlas con UV. Células SH-SY5Y fueron irradiadas con 8mJ/cm² de UV. Cuarenta y ocho horas luego de la irradiación, las células fueron sometidas al análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. La figura muestra el resultado de un experimento de tres realizados en forma independiente.

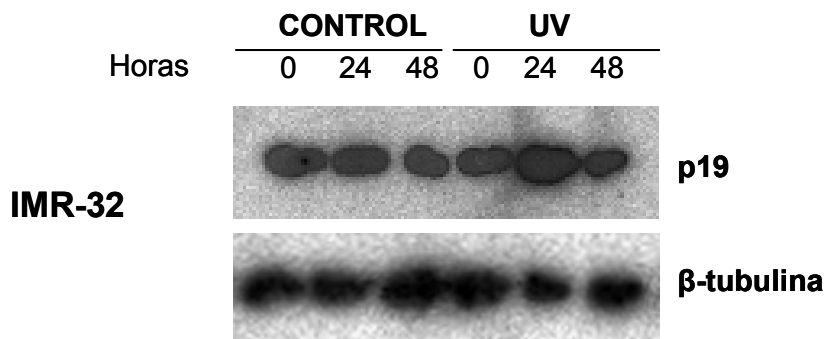


Figura 7. Inducción de la expresión de p19 en células IMR-32. Células IMR-32 fueron irradiadas o no con 8mJ/cm² de UVC y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. Veinte μ g de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

4- p19 es la única INK4 inducida por UV en células de neuroblastoma.

A continuación pusimos énfasis en dilucidar si la luz UV tenía el mismo efecto sobre los otros miembros de la familia INK4. Irradiamos células SH-SY5Y con 8 mJ/cm² de UV, tomamos alícuotas a distintos tiempos y aislamos el RNA de las mismas para analizar la expresión de varios CKIs mediante northern blot. Como era esperable p21^{Cip1} se indujo considerablemente luego del tratamiento; sin embargo, la expresión de la otras INK4, p15, p16 o p18 no fue afectada por la luz UV (Figura 9). Realizamos este ensayo en células BHK21, obteniendo el mismo resultado. Estos experimentos sugieren que p19 es el único miembro de la familia de proteínas INK4 cuya expresión es inducida por irradiación con luz UV. Es importante destacar que esta inducción se produce en respuesta a dosis de UV que causan un daño efectivo en el DNA, tal como se desprende de las observaciones referidas al aumento de p53 (Figura 3) y de p21.

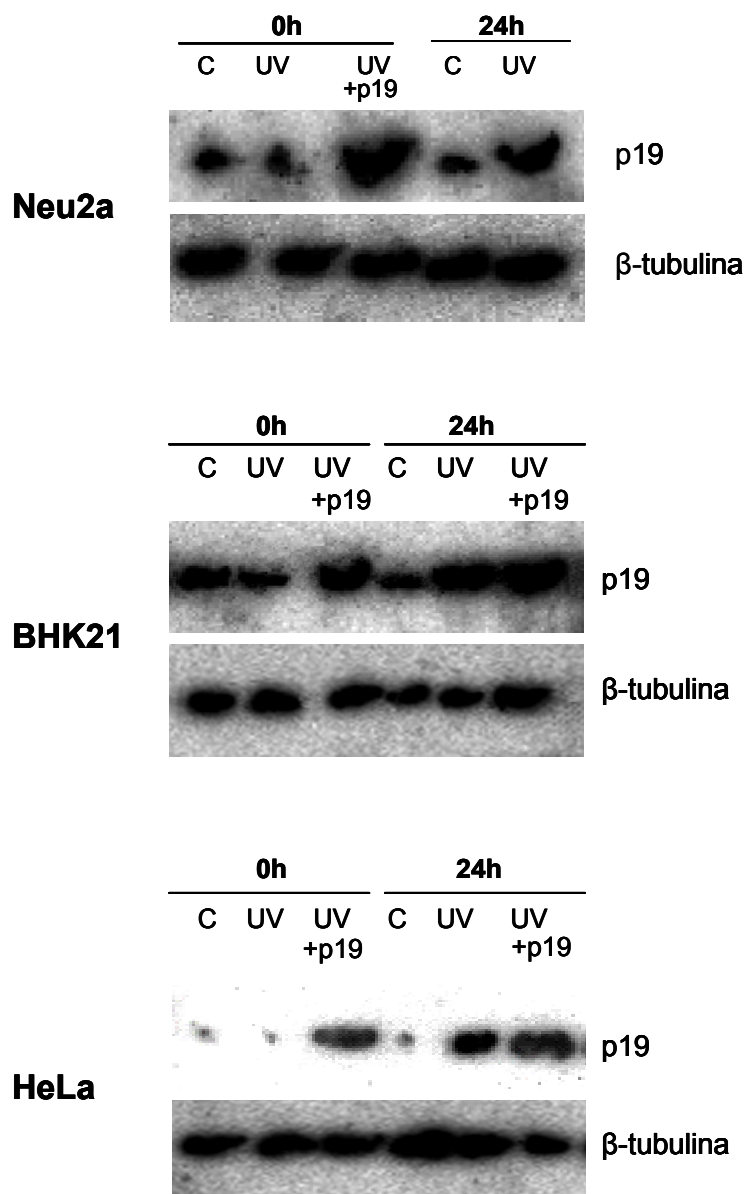


Figura 8. La expresión de p19 es inducida por UV en distintos tipos celulares. Células Neu2a, BHK21 y HeLa fueron irradiadas o no con 8mJ/cm² de UV y luego de 24 horas fueron cosechadas. Veinte μ g de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. Por lo menos una muestra en cada ensayo fue transfectada con el vector de expresión pSG5p19 48 horas antes de la irradiación, como control de sobreexpresión. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de carga. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

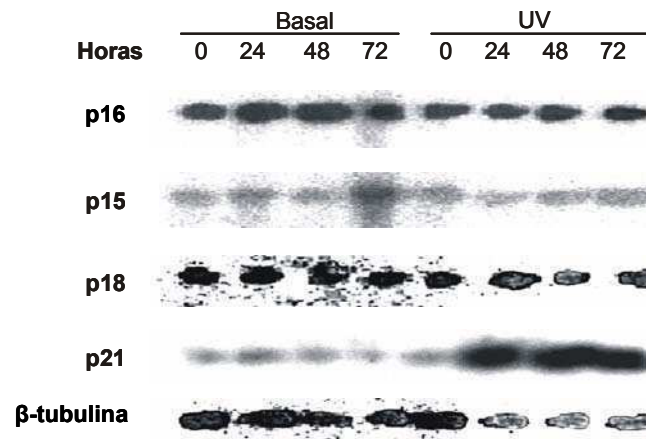


Figura 9. Análisis de la expresión de INK4 y Cip/Kip luego de irradiación UV. Células SH-SY5Y fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UVC y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. Se realizó análisis de Northern blot con RNA total (20 µg). Las sondas marcadas con ³²-P se indican en el margen izquierdo. Se muestra una autorradiografía representativa de dos experimentos independientes con resultados similares.

5- Los agentes genotóxicos cisplatino y péptido β-amiloide inducen p19INK4d en células de neuroblastoma.

Ya que p19 se induce en respuesta al daño con UV, quisimos comprobar si también respondía a otros tratamientos que dañan el DNA. El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II), un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado, produce aductos de DNA no codificantes de manera similar a la luz UV (Quiñones et al, 2002). El péptido β-amiloide, es un componente proteico de las placas seniles extracelulares presentes en pacientes con enfermedad de Alzheimer, y se cree que es neurotóxico. El mecanismo de la toxicidad aún es poco claro, pero se sabe que el estrés oxidativo y la inflamación están implicados como mediadores de la misma, y que estas lesiones, a su vez, dañan componentes celulares que incluyen proteínas, lípidos de membrana y el DNA (Suram, et al., 2006). Por lo tanto, una lesión originada por cisplatino, activa principalmente el mecanismo de reparación NER, mientras que los daños derivados de la acumulación del péptido β-amiloide provocan la activación de las vías de reparación BER y/o HR.

Para estudiar la respuesta de p19 frente a estos agentes genotóxicos, tratamos células SH-SY5Y con cisplatino 20 µM o péptido β-amiloide 20 µM y tomamos muestras a distintos

tiempos para analizar el RNA total por Northern blot. Observamos que la expresión de p19 se incrementó en función del tiempo con ambos tratamientos presentando máxima acumulación del RNA a las 12 horas (Figura 11a). A continuación, tratamos a las células con dosis crecientes de los agentes genotóxicos. La expresión de p19 resultó ser dependiente de la dosis para ambos dañadores. El efecto del cisplatino se observó con una dosis mínima de 10 μM y el del péptido con una de 2 μM . En ambos casos el RNA de β -tubulina se mantuvo inalterado (Figura 11b).

Concluimos entonces que, diversos agentes genotóxicos que causan distintos tipos de daño sobre el DNA y que activan distintos mecanismos de reparación, conducen igualmente a la inducción de la expresión del gen de p19.

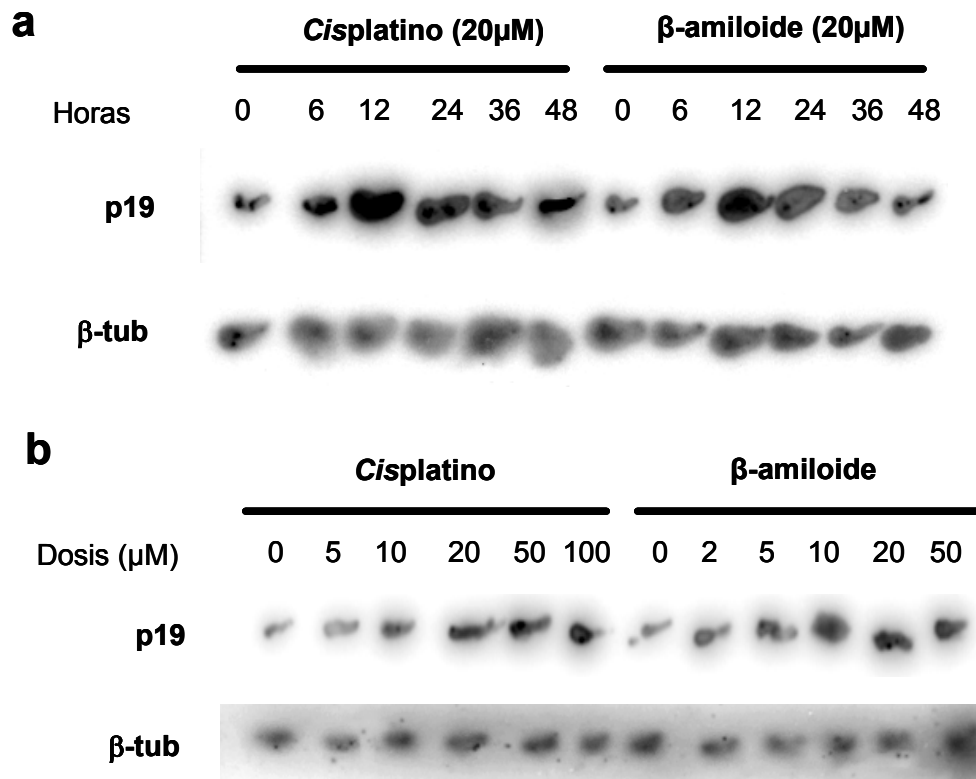


Figura 11. Los agentes genotóxicos cisplatino y péptido β -amiloide inducen p19INK4d en células de neuroblastoma. a) Células SH-SY5Y fueron tratadas con cisplatino 20 μM o con péptido β -amiloide 20 μM y cosechadas en los tiempos indicados luego del tratamiento. Veinte μg de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra. b) Células SH-SY5Y fueron tratadas con las dosis indicadas de cisplatino o péptido β -amiloide durante 12 horas. El RNA total fue sometido a Northern blot de la misma forma que en a). La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

6- La estabilidad del mRNA de p19INK4d no es afectada por agentes genotóxicos.

El incremento del nivel de mRNA de p19 en respuesta al tratamiento de las células con agentes genotóxicos puede ser causado por diversos motivos. Uno de ellos podría ser que el agente de daño produzca un aumento en la estabilidad de este mRNA.

Con el objeto de dilucidar si el aumento del mRNA de p19 se debía a un incremento en la estabilidad de la molécula, realizamos un ensayo agregando el inhibidor de la transcripción actinomicina D 1 μ M en el mismo momento de tratar a las células con UV o con el péptido β -amiloide en células BHK21 o SH-SY5Y respectivamente. Tomamos muestras a distintos tiempos y analizamos la cantidad de RNA de p19 remanente y de esta manera calculamos la vida media del mensajero en células control y dañadas con ambos tipos de genotóxicos. Observamos que la estabilidad del mensajero de p19 se mantiene aproximadamente constante luego de los distintos tratamientos ya que la vida media es de 190 minutos para las células control, de 185 minutos para las células tratadas con UV (Figura 12) y de 200 minutos para las tratadas con β -amiloide (Figura 13), diferencias que no son suficientes para justificar la acumulación del mensajero observada con los tratamientos.

En el ensayo anterior existe una limitación, que es el hecho de agregar actinomicina D simultáneamente con el tratamiento de UV. Si la luz UV necesitara la transcripción temprana de alguna molécula para aumentar la estabilidad de p19, esto no sería posible ya que toda la transcripción se encontraría inhibida. Por tal motivo, considerando que el efecto de UV sobre el mensajero de p19 podría requerir la transcripción de una o varias moléculas intermediarias, realizamos un nuevo ensayo en el que irradiamos las células y dejamos transcurrir 3 horas antes del agregado de actinomicina D. Obtuvimos resultados similares a los del ensayo anterior, o sea, que no se observó variación en la estabilidad del mRNA de p19 con luz UV (Figura 14).

En conclusión, estos resultados sugieren fuertemente que los agentes genotóxicos ensayados no modifican la estabilidad del mensajero de p19.

Por lo tanto, podemos suponer que los agentes genotóxicos estarían provocando un incremento en la tasa de transcripción de este gen. Para poner a prueba esta hipótesis, más adelante estudiaremos el inicio de la transcripción mediante un ensayo de *run-on* (ver ítem 8).

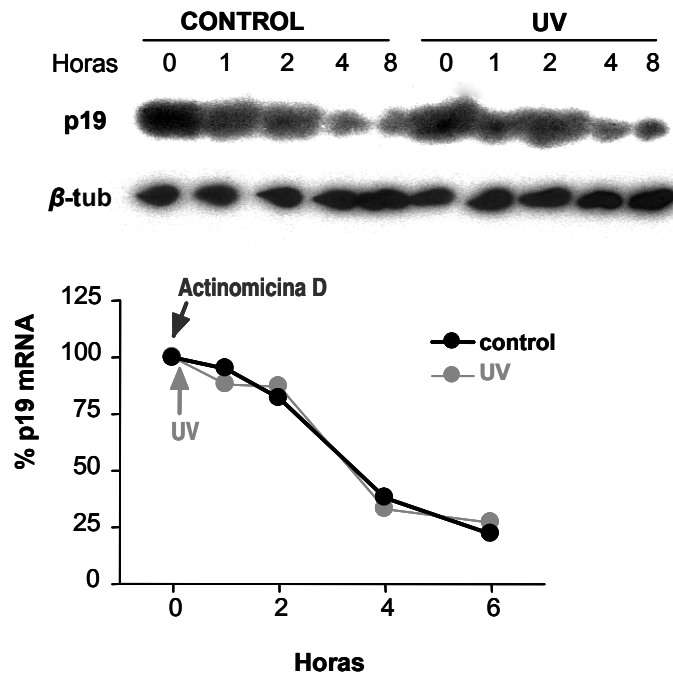


Figura 12. La estabilidad del mRNA de p19 no es modificada por UV. Células BHK21 fueron irradiadas o no, con 8mJ/cm² de UVC simultáneamente con el tratamiento con actinomycin D 1 μ M y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. Veinte μ g de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

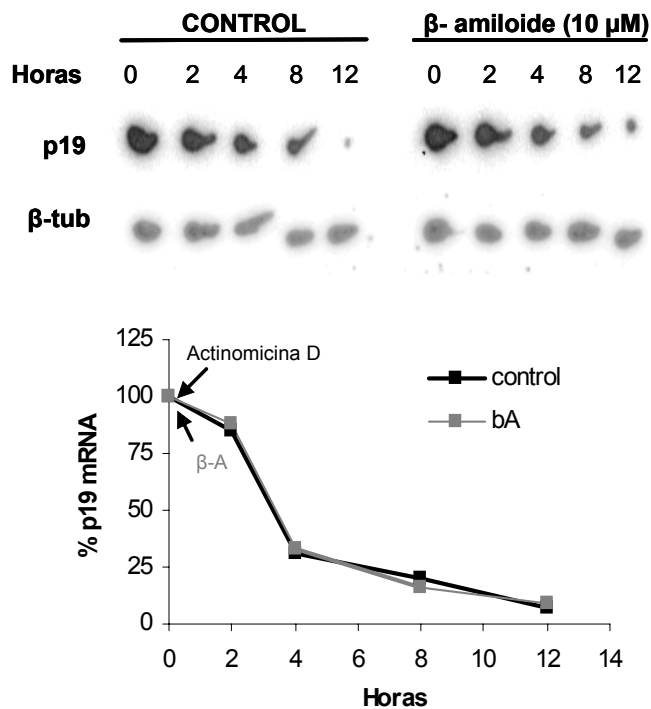


Figura 13. La estabilidad del mRNA de p19 no es modificada por el tratamiento con β -amiloide. Células SH-SY5Y fueron tratadas o no, con péptido β -amiloide 10 μ M simultáneamente con el tratamiento con actinomycin D 1 μ M y cosechadas en los tiempos indicados. Veinte μ g de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

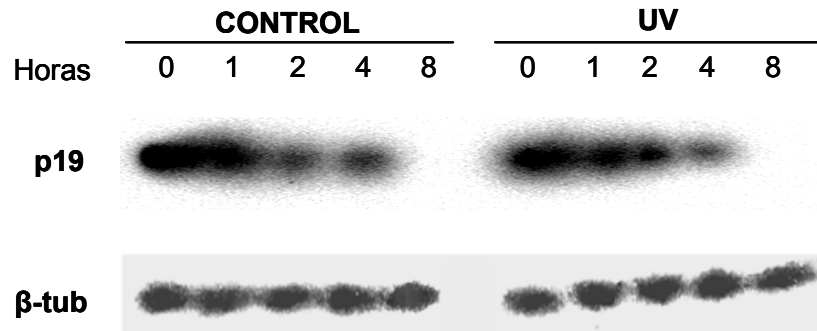


Figura 14. La estabilidad del mRNA de p19 no es modificada por UV. Células BHK21 fueron irradiadas o no, con 8mJ/cm² de UVC luego de tratarlas con actinomicina D 1 μM durante 3 horas y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. Veinte μg de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β-tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

7- La estabilidad de la proteína p19INK4d no es modificada con la radiación UV.

Se ha reportado que la oscilación periódica de p19 durante el ciclo celular es determinada en gran medida por la degradación, utilizando el mecanismo del proteasoma luego de su ubiquitinación (Thullberg et al., 2000). Este hecho permitiría que la abundancia de la proteína siga los cambios en la expresión de su mensajero.

En vista de los resultados que indican que, además del RNA mensajero, la proteína p19 también está aumentada en células irradiadas con UV, a continuación consideramos la posibilidad de que este aumento sea producto de un incremento en la estabilidad de p19 causada por la luz UV. Para ello realizamos experimentos de *pulse-chase*. Células BHK21 fueron incubadas con 50 μCi de ³⁵S-metionina y luego de 2 horas de pulso, fueron lavadas, irradiadas con 8 mJ/cm² de UV y se les agregó medio con metionina fría extrayendo alícuotas a distintos tiempos. Como podemos observar en la figura 15, la estabilidad de la proteína p19 no fue modificada significativamente en células irradiadas respecto de las células control. En células sin tratar la vida media es de 130 minutos y en las células tratadas con UV la vida media es de 112 minutos.

Estos resultados indican que la estabilidad de la proteína p19 no es aumentada por la radiación UV, apoyando la idea de que el aumento en el nivel de proteína debe estar dado por la inducción del gen y el aumento de la síntesis proteica.

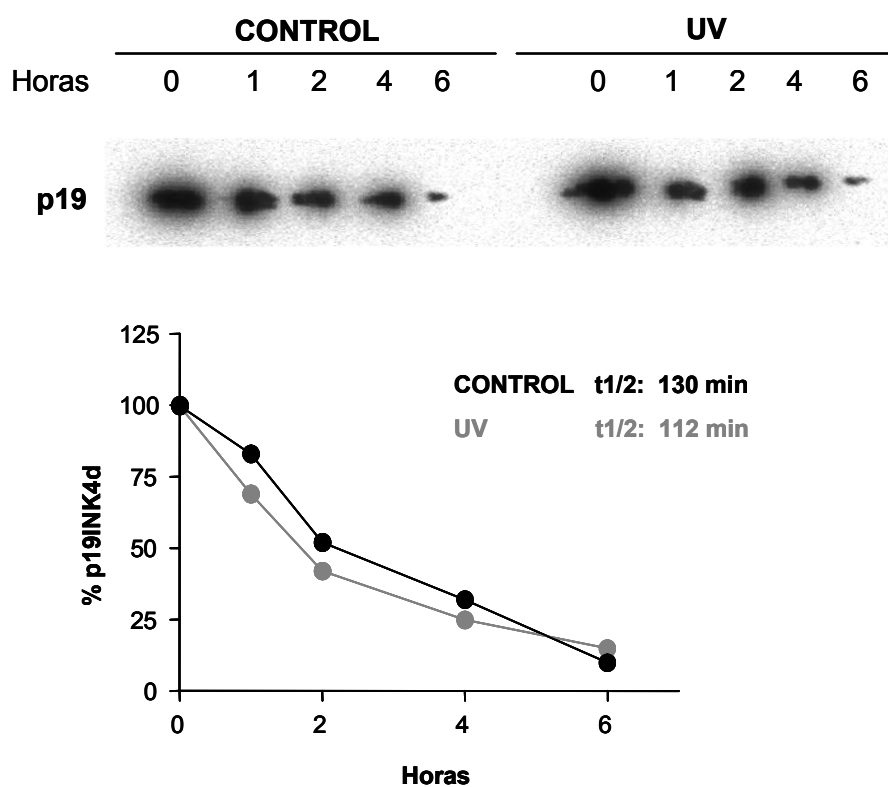


Figura 15. La estabilidad de la proteína p19INK4d no es modificada por UV. Células BHK21 fueron incubadas 15 minutos en medio libre de metionina y luego 2 horas en medio con metionina marcada con ^{35}S ($50 \mu\text{Ci}/\text{muestra}$). Se removió el medio, se lavaron las células y se irradiaron o no, con $8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ de UV. Se readicionó medio fresco con metionina y se tomaron alícuotas a distintos tiempos para someterlas a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-p19.

8- Los agentes genotóxicos UV y β -amiloide provocan un incremento en la tasa de iniciación de la transcripción del gen de p19INK4d.

Como concluimos en el punto 6, habiendo descartado un efecto estabilizador de los agentes genotóxicos como causa de la acumulación del mRNA de p19, decidimos estudiar el efecto de estos agentes sobre la iniciación de la transcripción. Para ello llevamos a cabo ensayos de *run-on*.

En nuestro estudio comparamos la iniciación de la transcripción de varios genes, incluyendo el de p19, en células control y en células irradiadas con UV o tratadas con el péptido β - amiloide. Para este ensayo utilizamos las líneas de fibroblastos BHK21 (hamster) o WI38 (humana) respectivamente. Las células fueron sembradas y una vez adheridas a las placas, irradiadas con $8\text{mJ}/\text{cm}^2$ de UV o tratadas con el péptido β - amiloide $10\ \mu\text{M}$ e incubadas en estufa por 24 o 12 horas respectivamente. Luego de extraer los núcleos y hacer la marcación radioactiva del RNA que se estaba sintetizando en ese momento, analizamos la expresión de cada gen. Observamos que la transcripción de p19 aumentó aproximadamente 3 veces en las células tratadas con los agentes genotóxicos con respecto a las células control (Figuras 16 y 17). Los genes elegidos para ser utilizados como controles del método, tienen funciones conocidas en el ciclo celular, en la reparación del DNA o bien en apoptosis. Los mismos tuvieron una respuesta similar a la reportada luego del daño. La transcripción de p21 fue inducida 4 veces con UV y la de GADD45 2,5 veces con β -amiloide, mientras que la expresión de CDK4 y de p16 se vió inalterada con ambos tratamientos (Al-Mohanna et al., 2004; Jabbur et al., 2000; Santiard-Baron et al., 1999). Ciclina D1 y Bcl-X presentaron una significativa disminución en su expresión luego del daño con UV o con β -amiloide respectivamente (Hiyama and Reeves, 1999; Lutzen et al., 2004).

Por lo tanto, el conjunto de resultados obtenidos hasta el momento indicarían que el aumento en el nivel de proteína y mRNA de p19 en respuesta a agentes genotóxicos como UV o péptido β -amiloide está regulado a nivel transcripcional, más precisamente sobre la iniciación.

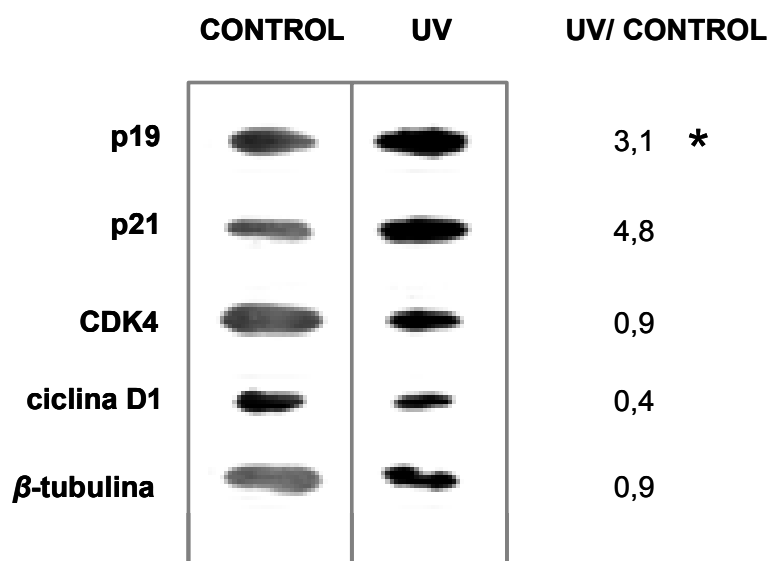


Figura 16. La luz UV incrementa la transcripción de p19INK4d. Células BHK21 fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV 24 horas antes de ser cosechadas. Los núcleos fueron extraídos con buffer de lisis y luego fueron incubados en buffer de marcación conteniendo 50 μ Ci ³²P γ .rUTP durante 20 minutos a 30°C para marcar los nuevos RNAs sintetizados. El RNA total fue extraído y 20 μ g de plásmidos conteniendo el cDNA de p19, p21, CDK4, ciclina D1 y β -tubulina fueron desnaturalizados y fijados en una membrana de nylon. El RNA total marcado fue utilizado como sonda. La radioactividad fue cuantificada en un analizador FUJIFILM BASII 1800 Phosphorimager Analyzer.

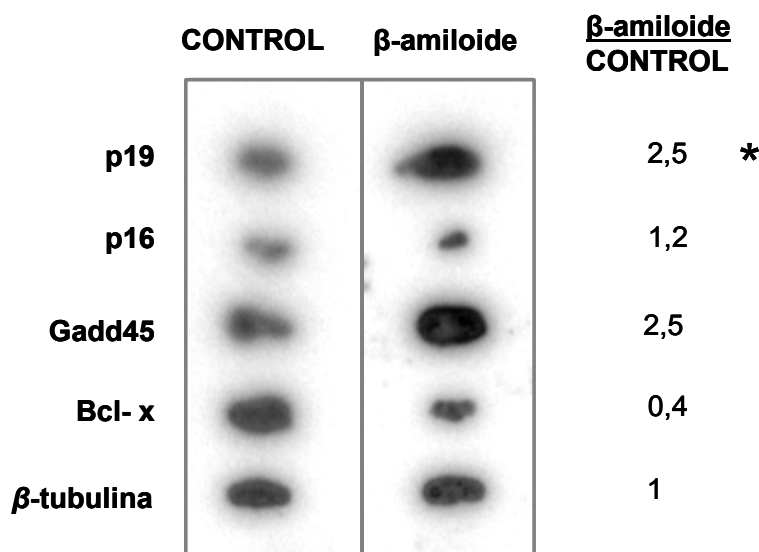


Figura 17. El péptido β -amiloide incrementa la transcripción de p19INK4d. Células SH-SY5Y fueron tratadas con péptido β -amiloide 10 μ M durante las 12 horas previas a la cosecha. Los núcleos fueron extraídos con buffer de lisis y luego fueron incubados en buffer de marcación conteniendo 50 μ Ci ³²P γ .rUTP durante 20 minutos a 30°C para marcar los nuevos RNAs sintetizados. El RNA total fue extraído y 20 μ g de plásmidos conteniendo el cDNA de p19, p16, Gadd45, Bcl-X y β -tubulina fueron desnaturalizados y fijados en una membrana de nylon. El RNA total marcado fue utilizado como sonda. La radioactividad fue cuantificada en un analizador FUJIFILM BASII 1800 Phosphorimager Analyzer.

9- La inducción transcripcional de p19INK4d en respuesta al daño al DNA requiere la síntesis de novo de proteínas.

A continuación nos preguntamos si la inducción génica del inhibidor de CDK4/6 observada luego del tratamiento con UV, requería en alguna medida de la síntesis *de novo* de proteínas. Para encontrar la respuesta, analizamos la expresión del mRNA de p19 a lo largo del tiempo, luego de tratar con UV células que habían sido previamente incubadas (o no) con cicloheximida (CHX) 10 μ M durante 3 horas. Este compuesto interfiere con la actividad peptidil-transferasa de la subunidad 60S del ribosoma y por lo tanto inhibe la síntesis de proteínas.

El resultado, mostrado en la figura 18 pone de manifiesto que la cantidad de RNA sintetizado luego del daño, es menor en las células tratadas con CHX que en las células dañadas pero no tratadas con CHX, y sugiere que, al menos parcialmente, es necesaria la síntesis de proteínas para obtener la inducción máxima frente al daño con UV. Además, pudimos comprobar que la CHX no afecta la transcripción basal de p19, ni por su efecto inhibitorio de la síntesis proteica, ni como agente de daño al DNA.

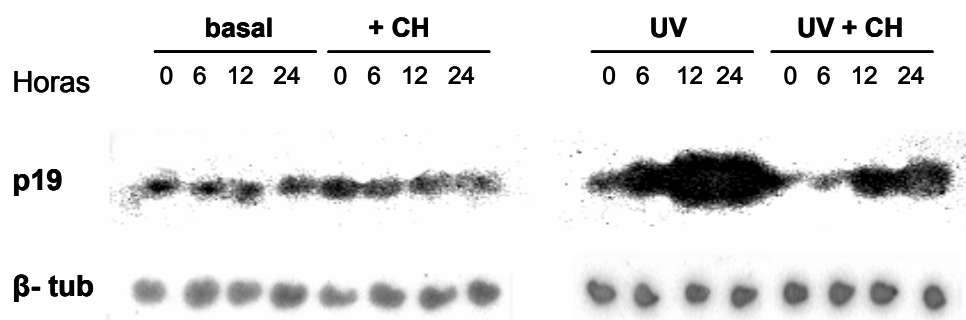


Figura 18. La inducción de p19INK4d en respuesta al daño al DNA requiere la síntesis de novo de proteínas. Células BHK21 fueron irradiadas o no, con 8mJ/cm² de UVC luego de tratarlas o no, con cicloheximida 10 μ M durante 3 horas y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. Veinte μ g de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

10- p19INK4d transloca al núcleo cuando las células son irradiadas con UV.

Se ha reportado que la localización de p19INK4d en varios tipos celulares es predominantemente citoplasmática (Guan et al., 1996). Con el objetivo de confirmar este hecho en células de neuroblastoma SH-SY5Y, realizamos ensayos de inmunocitoquímica. En primer lugar determinamos la distribución subcelular de p19 en células ciclantes de neuroblastoma utilizando un anticuerpo primario anti-p19 y un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (FITC). Los preparados fueron teñidos con Hoescht para identificar los núcleos (Figura 19). En condición basal observamos que sólo el 43% de las células control expresan p19, consistentemente con su expresión periódica en el ciclo celular. La proteína p19 se encuentra principalmente en el citoplasma (93% de las células positivas). A continuación analizamos la distribución subcelular de la proteína luego de exponer a las células a un agente de daño como la luz UV. Observamos que luego de irradiarlas con 8 mJ/cm² de UV p19 comienza a acumularse en el núcleo alcanzando un máximo a las 48 horas (54%). Además de la translocación, determinamos que existe un incremento en el número de células que expresan p19 (75%) 48 horas luego del tratamiento. Luego de 72 horas, el número de células que expresan esta proteína disminuye y p19 posee una distribución subcelular que se asemeja a la situación basal (Figura 19 y Tabla 1).

Tabla 1. Localización subcelular de p19 en células SH-SY5Y tratadas con luz UV

Tiempo luego de UV (hs)	% de células ^a			p19 negativas
	p19 positivas	p19 positivas		
	Total	Citoplasma	Núcleo	
0	43 (136)	93 (126)	7 (10)	57 (182)
24	68 (54)	89 (48)	11 (6)	32 (26)
36	60 (195)	66 (128)	34 (67)	40 (132)
48	75 (138)	42 (58)	54 (80)	25 (45)
72	55 (50)	90 (45)	10 (5)	45 (40)

Los datos provienen de un experimento, representativo de dos experimentos independientes. ^a Los datos entre paréntesis refieren al número de células.

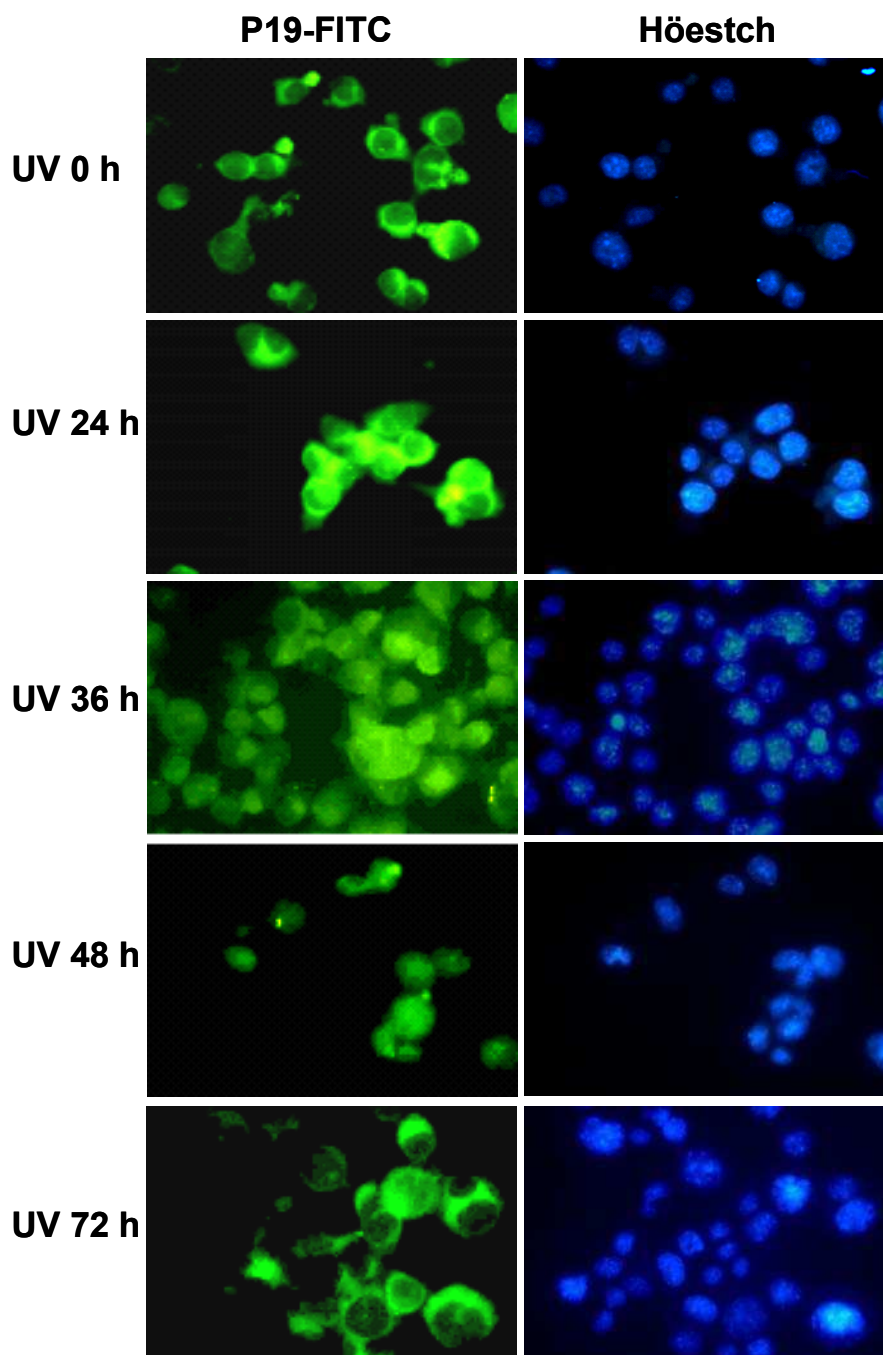


Figura 19. Localización subcelular de p19 luego de irradiación UV. Células SH-SY5Y fueron irradiadas con 8 mJ/cm^2 de UV y fijadas a distintos tiempos luego de la irradiación. La inmunocitoquímica fue realizada con un anticuerpo primario anti-p19 hecho en conejo y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína (FITC).

Segunda Parte

Estudio de la participación de p19INK4d en los mecanismos de reparación del DNA luego de tratar células con distintos agentes genotóxicos.

Hasta aquí hemos demostrado que p19 está involucrada en la respuesta ejecutada por las células de neuroblastoma humano frente al tratamiento con diversos agentes genotóxicos tales como UV, cisplatino y el péptido β -amiloide. Existe un aumento en la expresión del gen de p19 que se traduce en un incremento de los niveles proteicos y en su translocación al núcleo. Este efecto parece manifestarse en distintos tipos celulares.

En esta segunda parte investigamos si estas modificaciones en el estatus de p19 en un contexto celular de injuria al DNA forman parte de un mecanismo fisiológico involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genética.

11- La sobreexpresión de p19INK4d protege a las células de neuroblastoma de la muerte provocada por la radiación UV.

Se sabe que p19 arresta las células en la fase G1 del ciclo celular, mediante la interacción con CDK4 e impidiendo la formación del complejo Ciclina D/CDK4. Por otro lado, la luz ultravioleta activa el checkpoint de G1, ya que, como respuesta al daño en el DNA, el nivel de p53 aumenta, resultando en la activación transcripcional de p21^{Cip1}, la cual puede mediar dicho arresto (Dash and El-Deiry, 2004). Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar el efecto que tiene el nivel intracelular de p19 y el tratamiento con UV en el ciclo celular de las células de neuroblastoma. Para llevar a cabo dicho análisis, estudiamos las fases del ciclo mediante citometría de flujo. Utilizamos células SH-SY5Y transfectadas con el vector pSG5 (vacío) como control, células transfectadas con el vector de expresión que contiene el cDNA de p19 sentido (pSG5p19) y células tratadas con UV. Además, las cotransfectamos con el vector pBABE puro, para poder seleccionar las células transfectadas con el antibiótico puromicina. Observamos que, luego de 48 horas, tanto p19 como la luz UV produjeron un aumento del porcentaje de la población celular en fase G1, comparado con las células control (de 50% a 70 %). Al mismo tiempo, la irradiación con UV provocó la acumulación de células en fase SubG1, indicando un incremento de la muerte celular (de 2% a 18,4%) (Figura 20 a).

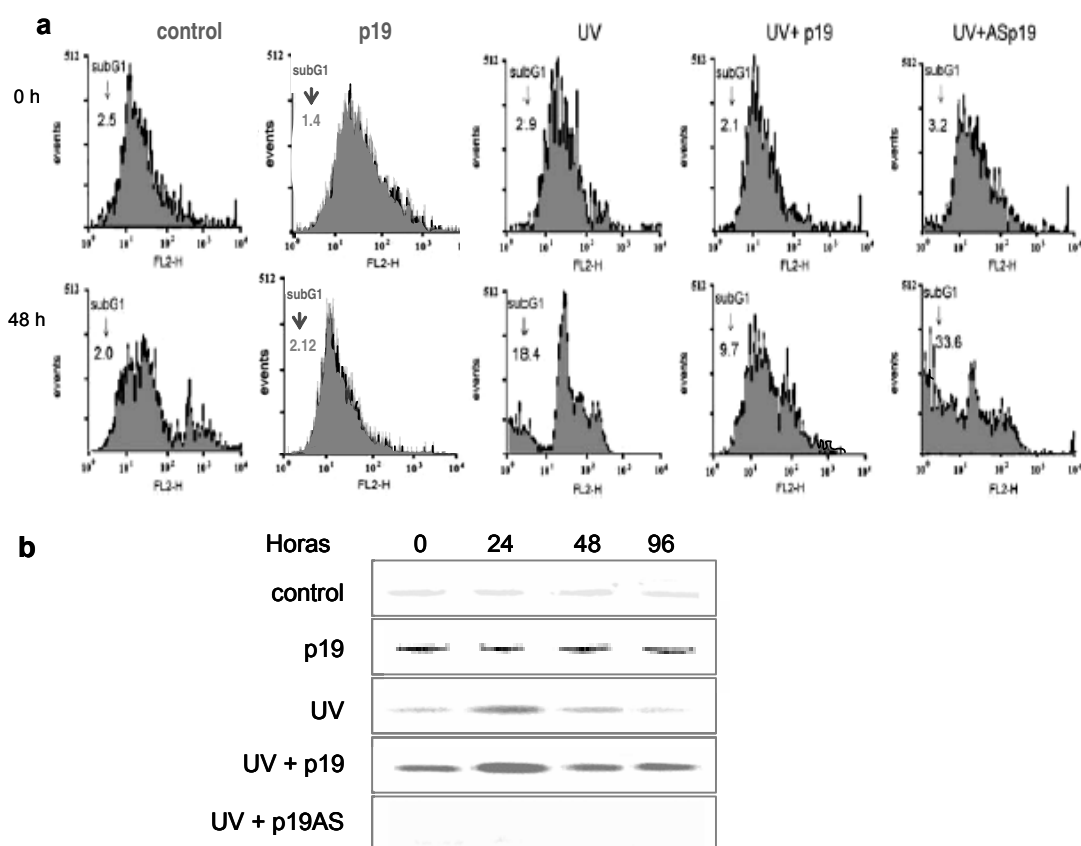


Figura 20. p19INK4d disminuye la población de células de neuroblastoma en SubG1 luego de la irradiación UV. Células SH-SY5Y fueron cotransfectadas con 2 μ g del vector de expresión que contiene el cDNA sentido (p19) o antisentido (p19AS) o el vector vacío junto con 0,5 μ g del vector puroBABE. Veinticuatro horas luego de la transfección las células fueron tratadas por otras 60 horas con puromicina. Las células resistentes fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV. a) Inmediatamente y 48 horas luego de la irradiación con UV, las células fueron cosechadas y sujetas al análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. En cada gráfico se indica el porcentaje de células en la fase SubG1. b) Las células fueron cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación e iguales cantidades de proteínas de lisados celulares fueron sometidas a inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-p19 policlonal. Los complejos inmunes fueron corridos en un SDS-PAGE 10%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa y analizados en Western blot con el mismo anticuerpo.

Un daño en el DNA podría, de algún modo, activar los componentes de la maquinaria celular que participan en la activación de vías apoptóticas. Estudios previos sugieren que la muerte neuronal causada por agentes genotóxicos requiere la participación de CDKs involucradas en la transición de G1 a S (Park et al., 1998). A continuación, para estudiar el rol de p19, un CKI, en la muerte celular inducida por UV, realizamos un análisis mediante citometría de flujo y determinamos el porcentaje de muerte celular provocada por UV en células que expresan p19 en niveles elevados o disminuidos. Para llevar a cabo esto,

transfectamos dos poblaciones de células. Una de ellas con un vector de expresión que contiene el cDNA de p19 sentido (pSG5p19), otra con un vector que contiene el cDNA de p19 antisentido (pSG5p19AS). Luego, tratamos o no las células seleccionadas con 8 mJ/cm² de UV y las incubamos por distintos tiempos (0-96 h). Examinamos si el aumento o la disminución en la expresión de p19 afectaba la muerte celular luego de la irradiación con UV. Las células que expresaban alto nivel de p19 mostraron resistencia a la irradiación con UV, ya que luego de 48 horas, solamente el 9,7% de estas células se encontraba en fase SubG1. Estos resultados indican que la muerte celular inducida por UV en las células que sobreexpresan p19 es dos veces menor que las células transfectadas con el plásmido vacío. Por otro lado, la población en SubG1 fue significativamente mayor (33,6%) luego de la irradiación en las células de neuroblastoma con niveles de p19 indetectables (Figura 19a). Verificamos la transfección y expresión de los plásmidos en las células seleccionadas, mediante western blot. El nivel de p19 fue notablemente mayor cuando transfectamos el vector pSG5p19, mientras que fuimos incapaces de detectar la proteína en las células que contenían el pSG5p19AS, aún cuando éstas fueron irradiadas con UV (Figura 20b).

12- La muerte celular observada en SH-SY5Y luego de la irradiación con UV es un evento apoptótico que puede ser disminuído por p19INK4d.

Con el objeto de confirmar la variación en la muerte celular inducida por UV en relación con los niveles de p19 observada por citometría de flujo y si esta muerte correspondía a un proceso apoptótico, determinamos la actividad de caspasa-3 en células control o expuestas a UV, y transfectadas con pSG5p19 o pSG5p19AS. La activación de caspasas juega un papel importante en las fases ejecutoras de la apoptosis ya que las caspasas efectoras activadas, como la caspasa-3, llevan a cabo el programa de muerte celular mediante la degradación de proteínas vitales. En nuestro sistema, la inducción de la actividad de caspasa-3, demostró que las células de neuroblastoma sufren apoptosis luego de ser irradiadas con UV (Figura 21a, 24h). La magnitud de esta inducción fue mayor en las células con el nivel de p19 disminuído (células con p19AS). Por el contrario, observamos una significativa reducción de esta actividad en las células que estaban sobreexpresando p19. En la figura 21b se observa la expresión de los plásmidos transfectados sobre el nivel de mRNA endógeno.

Estos resultados, en conjunto, indican que luego de la exposición a UV las células de neuroblastoma experimentan apoptosis inducida por el daño al DNA (DDIA) y ponen de manifiesto una función protectora de p19 frente a este tipo de muerte celular.

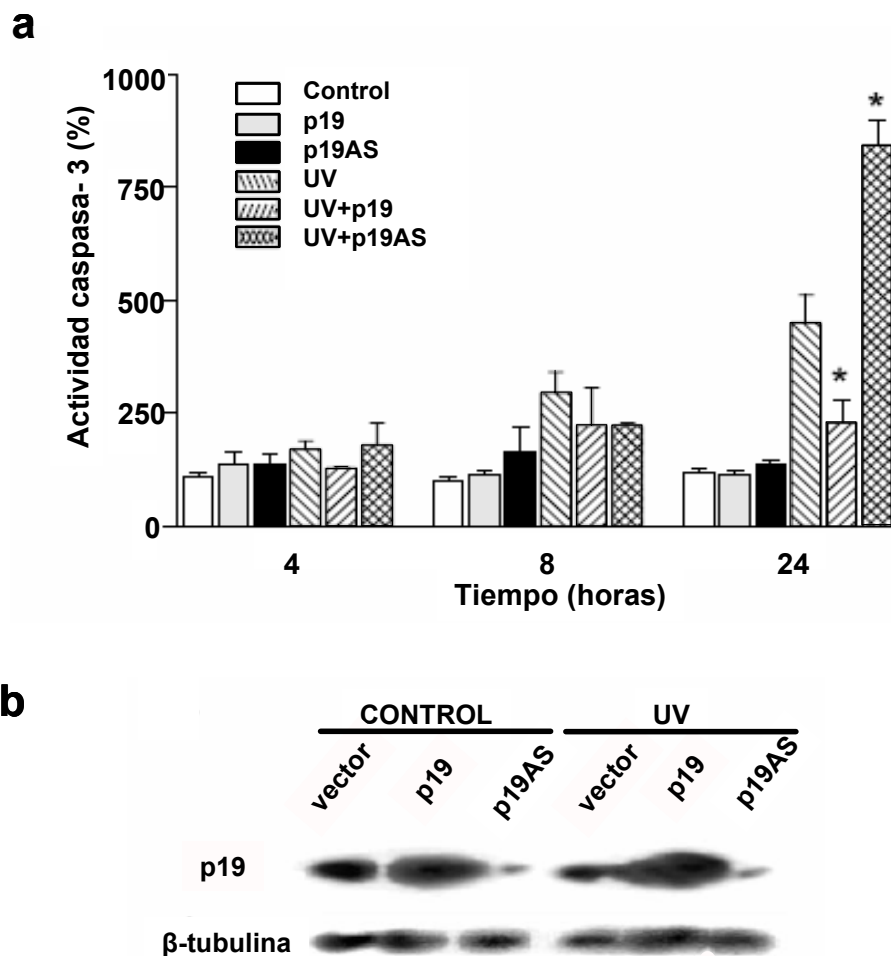


Figura 21. p19INK4d regula la actividad de caspasa-3 inducida por la luz UV. Células SH-SY5Y fueron cotransfectadas con 2 μ g del vector de expresión que contiene el cDNA sentido (p19) o antisentido (p19AS) o con el vector vacío junto con 0,5 μ g del vector puroBABE. Veinticuatro horas luego de la transfección las células fueron tratadas por otras 60 horas con puromicina. Las células resistentes fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV. a) A diferentes tiempos luego de la irradiación, la actividad de caspasa-3 fue testeada en los lisados celulares. El resultado está expresado como porcentaje de la actividad de caspasa-3 con respecto a la actividad basal de los lisados transfectados con el vector vacío y sin tratamiento con UV, medido a 4 horas, y al que se le dio un valor de 100. Las barras representan la media \pm d.e. de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 o p19 AS y tratadas con UV, con muestras tratadas con UV pero transfectadas con el vector vacío (*P<0,05). b) RNA total fue extraído de las células irradiadas o no, inmediatamente luego de la irradiación y 20 μ g fueron sometidos a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana marcada con ³²P-ATP. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra.

13- La sobreexpresión de p19INK4d disminuye la apoptosis causada por dos agentes genotóxicos distintos de UV en células de neuroblastoma.

A continuación, quisimos analizar si la protección ejercida por p19 frente a la apoptosis inducida por UV, se observaba también cuando las células eran tratadas con otros agentes genotóxicos.

Para ello, realizamos el ensayo de caspasa-3 de manera similar al anterior pero luego de tratar a las células con 20 μM de cisplatino o 10 μM de péptido β -amiloide durante 24 horas (chequear). (Figura 22). Como era de esperar, observamos que con ambos tratamientos las células de neuroblastoma presentaron un incremento en la actividad de caspasa-3, indicando la presencia de células apoptóticas. Sin embargo, aquellas células que habían sido transfectadas con p19 estaban significativamente protegidas contra este tipo de muerte celular inducida por cualquiera de los genotóxicos mencionados. Las células con el nivel de p19 disminuido y tratadas con β -amiloide tuvieron mayor inducción de la actividad de caspasa-3, sin embargo, estas células tratadas con cisplatino no presentaron diferencias significativas con respecto a las células sin transfectar. Esta observación particular, podría estar relacionada con la concentración de cisplatino utilizada. Es probable que con una dosis mayor, tal que en las células control la actividad de caspasa-3 sea superior (pero no máxima), podamos poner en evidencia el efecto de bajar el nivel de p19 y observar un incremento en la actividad de caspasa-3 con respecto al control.

Estos resultados, refuerzan la idea de que p19 jugaría un rol fundamental en proteger a las células de la apoptosis inducida por un daño en el DNA independientemente del agente genotóxico utilizado.

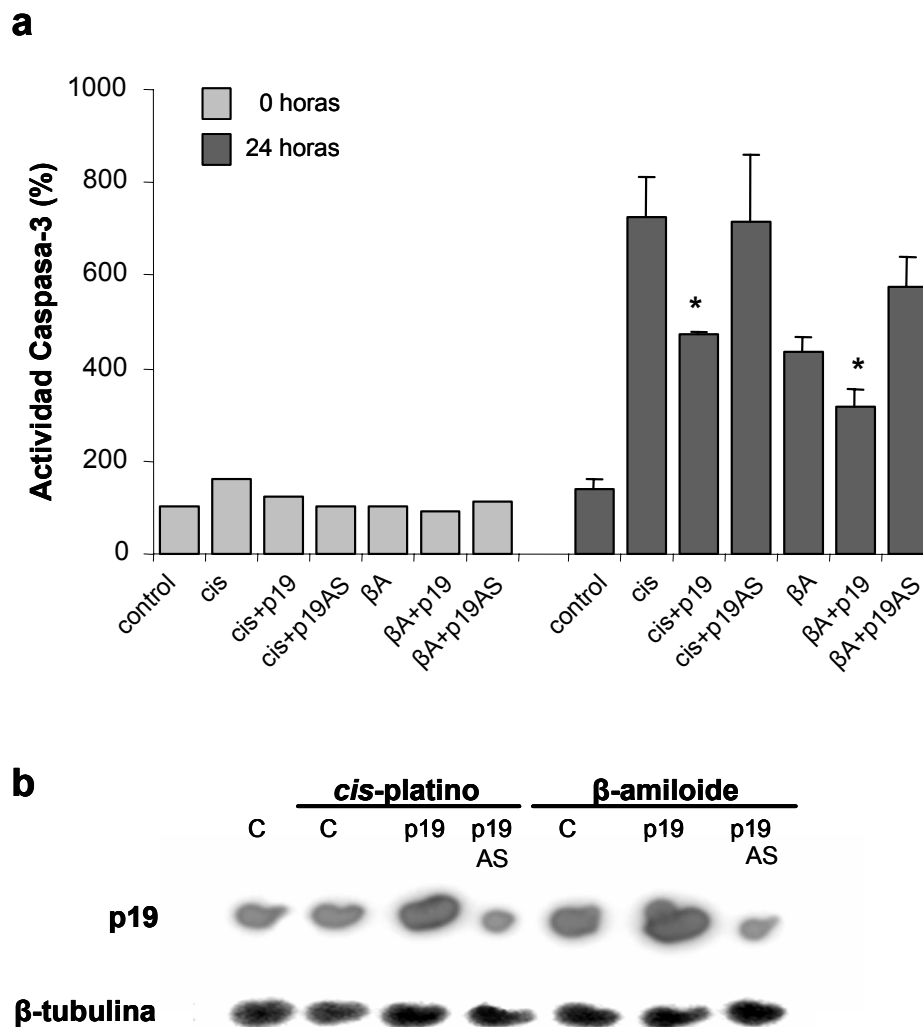


Figura 22. p19 regula la actividad de caspasa-3 inducida por los agentes genotóxicos *cis*platino y péptido β -amiloide. Células SH-SY5Y fueron cotransfectadas con 2 μ g del vector de expresión que contiene el cDNA de p19 sentido (p19) o antisentido (p19AS) o el vector vacío junto con 0,5 μ g del vector puroBABE. Veinticuatro horas luego de la transfección las células fueron tratadas por otras 60 horas con puromicina. Las células resistentes fueron tratadas con *cis*platino (cis) 10 μ M o péptido β -amiloide (β A) 10 μ M. a) La actividad de caspasa-3 fue testeada en los lisados celulares inmediatamente y 24 horas más tarde. El resultado está expresado como porcentaje de la actividad de caspasa-3 con respecto a la actividad basal de los lisados transfectados con el vector vacío y sin tratamiento, medido a la hora 0, y al que se le asignó el valor de 100. Las barras representan la media \pm d.e. de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 o p19 AS y tratadas con el agente de daño, con muestras tratadas pero transfectadas con el vector vacío (* $P < 0,05$). b) RNA total fue extraído de las células irradiadas o no inmediatamente luego de la irradiación y 20 μ g fueron sometidos a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β -tubulina como control de siembra.

14- La sobreexpresión de p19INK4d mejora la capacidad de las células de reparar un DNA plasmídico dañado con UV.

Uno de los mecanismos principales que posee la célula para responder a los efectos citotóxicos de la radiación UV, es la activación de las vías de reparación del DNA (Guan et al., 1996). Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo consistió en estudiar si la relación inversa que observamos entre sobreexpresión de p19 y disminución de apoptosis causada por UV tiene alguna relación con la reparación del DNA. Para ello utilizamos el ensayo “*host cell reactivation*” (HCR) por el cual se estima la capacidad que tienen las células de reparar un DNA dañado agregado exógenamente. Transfectamos células BHK21 con el plásmido pCMVCAT que contiene el gen reportero CAT bajo la regulación de un promotor fuerte y constitutivo. Este plásmido había sido previamente irradiado con distintas energías de UV (0-256 mJ/cm² UV). A distintos tiempos luego de la transfección determinamos la expresión del gen reportero CAT. La cuantificación de la expresión de CAT con el plásmido dañado en relación con el plásmido control es una medida de la reparación de este DNA en la célula receptora. En primer lugar, confirmamos que el tratamiento con UV había dañado efectivamente el DNA ya que la expresión de CAT cuantificada 36 horas luego de la transfección, disminuye a medida que la irradiación con UV aumenta (Figura 23a). A continuación realizamos una curva de tiempo postransfección utilizando el DNA dañado con 64 mJ/cm² de UV. El daño es evidente ya que la actividad de CAT a las 24 horas es mucho menor con el plásmido previamente irradiado (280 unidades) que con el que no fue tratado (1355 unidades). Por otro lado, la reparación también se evidencia, ya que la actividad de CAT en función del tiempo aumenta más rápidamente en las células con plásmido dañado que en las control. Esto se puede ver 48 horas postransfección (Figura 23b y 23c). Estos resultados indican que, como era de esperar, las células utilizadas en nuestro sistema tienen la capacidad de reparar el DNA dañado por UV.

Para investigar si la sobreexpresión de p19 modifica la reparación del DNA de acuerdo al ensayo de HCR, cotransfectamos los fibroblastos con el gen reportero CAT dañado o no con UV y con el plásmido de expresión para p19 o p19 antisentido. Cuarenta y ocho 48 horas postransfección determinamos la expresión de CAT. Vimos que la recuperación de la expresión de CAT fue mayor en las células con sobreexpresión de p19. Sin embargo la sobreexpresión de p19AS no modificó significativamente la actividad CAT. Estos

resultados indican que p19 mejoraría la capacidad de las células de reparar fotolesiones en un DNA dañado con UV (Figura 24).

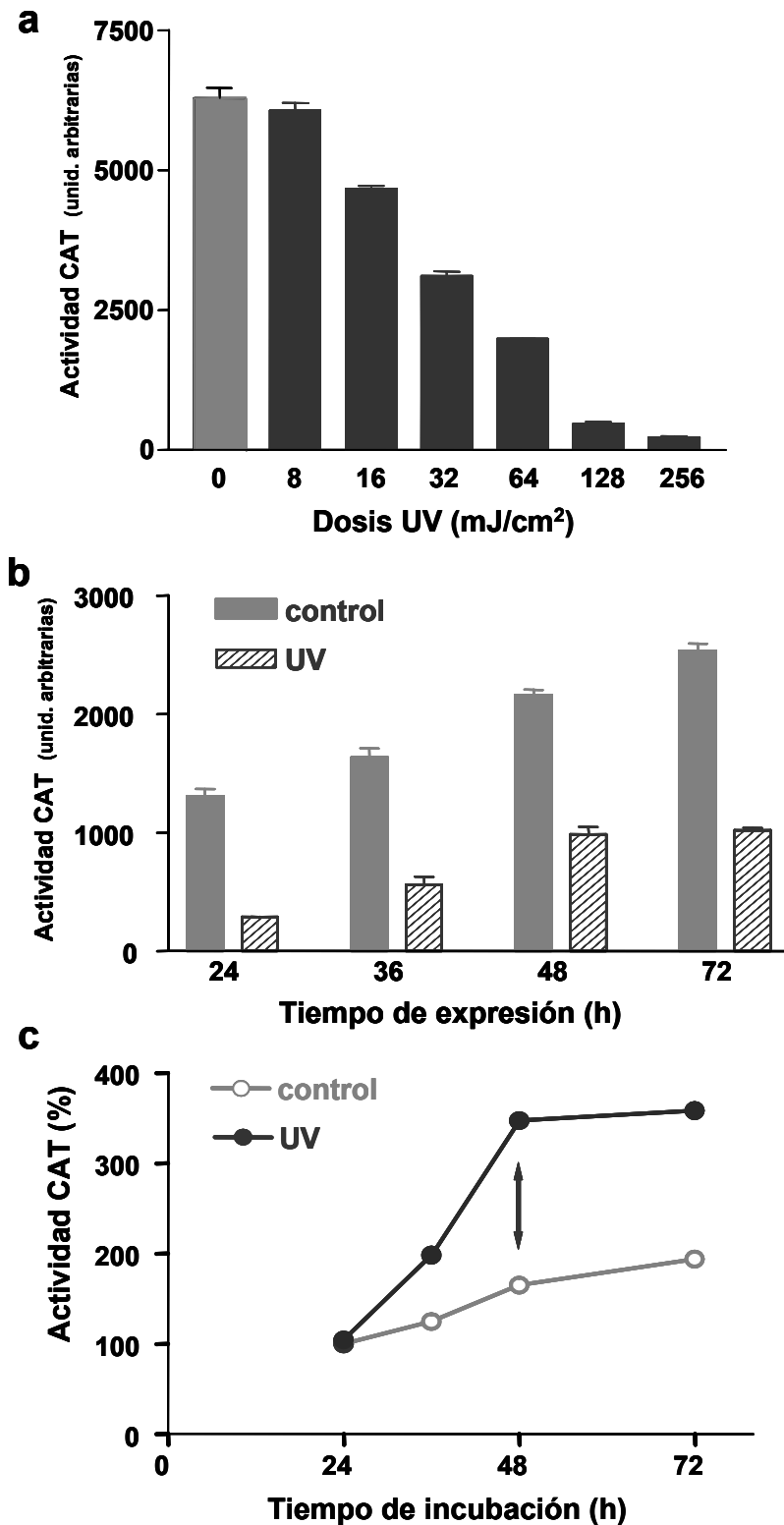


Figura 23. Reparación de un plásmido dañado con UV en células BHK21. Ensayo HCR. Células BHK21 fueron transfectadas con 2 μ g del plásmido pCMVCAT previamente irradiado o no, con distintas energías de UV (0-256 mJ/cm² UV). a) La expresión de CAT fue cuantificada 36 horas luego de la transfección y relativizada con la expresión de β -galactosidasa. La misma disminuye a medida que la irradiación con UV aumenta confirmando la eficacia del tratamiento. b) Las células fueron transfectadas con el DNA dañado con 64 mJ/cm² de UV y la actividad de CAT fue determinada a distintos tiempos luego de la transfección y relativizada con la expresión de β -gal. c) El resultado de b) expresado como porcentaje de la actividad CAT en relación a la actividad de la muestra de 24 horas que fue tomada como 100. Las figuras muestran la media \pm d.e. de los valores obtenidos en dos ensayos independientes realizados por duplicado.

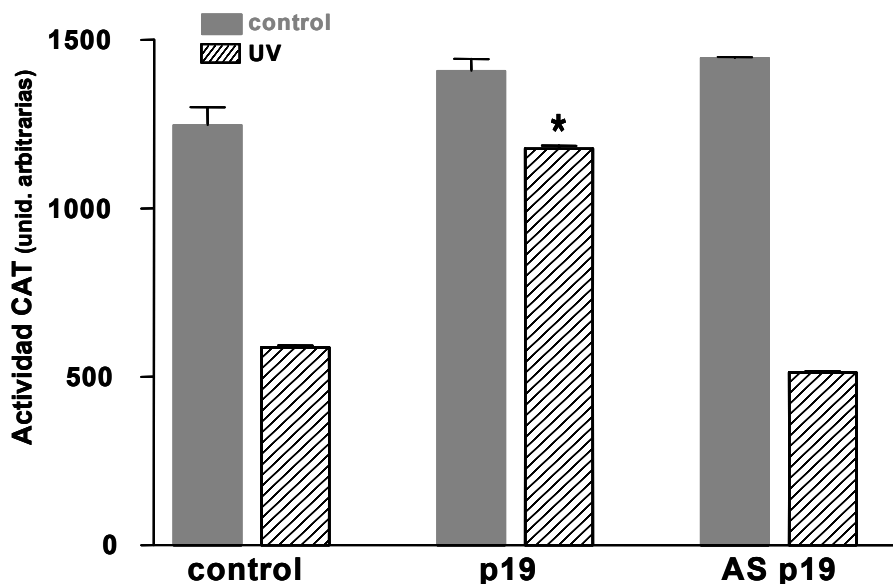


Figura 24. p19INK4d mejora la reparación de un plásmido dañado con UV. Células BHK21 fueron transfectadas con 2 μ g del plásmido pCMVCAT previamente irradiado o no, con 64 mJ/cm² de UV y cotransfectadas con pSG5p19 o pSG5p19AS o vector. La expresión de CAT fue cuantificada 36 horas luego de la transfección y relativizada con la expresión de β -gal. Las figuras muestran la media \pm d.e. de los valores obtenidos en dos ensayos independientes realizados por duplicado.

15- p19INK4d aumenta la eficiencia de reparación del DNA genómico independientemente del agente genotóxico utilizado.

Con el objeto de profundizar el estudio sobre el efecto que tiene p19 sobre la reparación del DNA, utilizamos el ensayo de UDS, el cual refleja la habilidad celular para reparar su propio DNA. Brevemente, seleccionamos células de neuroblastoma previamente transfectadas con el vector pSG5 o pSG5p19 o pSG5p19AS y las incubamos en medio libre de arginina y bajo suero (1%) durante 60 hs. De esta manera las arrestamos en G0/G1 y minimizamos la síntesis de DNA semiconservativa. Luego, irradiamos los cultivos con 8 mJ/cm² de UV y medimos la incorporación de ³H-timidina a distintos tiempos. Ya que en estas condiciones la replicación está inhibida, toda la incorporación de ³H-timidina observada se debe a la reparación del DNA. Hallamos que las células que sobreespresaban p19 incorporaron 50% más ³H-timidina que las células con nivel basal de p19 (Figura 25a). Por el contrario, la reparación fue dramáticamente reducida en las células deficientes en

p19. Esta reducción en la síntesis de DNA no programada, no sólo indica que el aumento en la reparación proviene específicamente de la sobreexpresión de p19, sino también que la proteína p19 endógena es necesaria para llevar a cabo una respuesta completa contra el daño en el DNA.

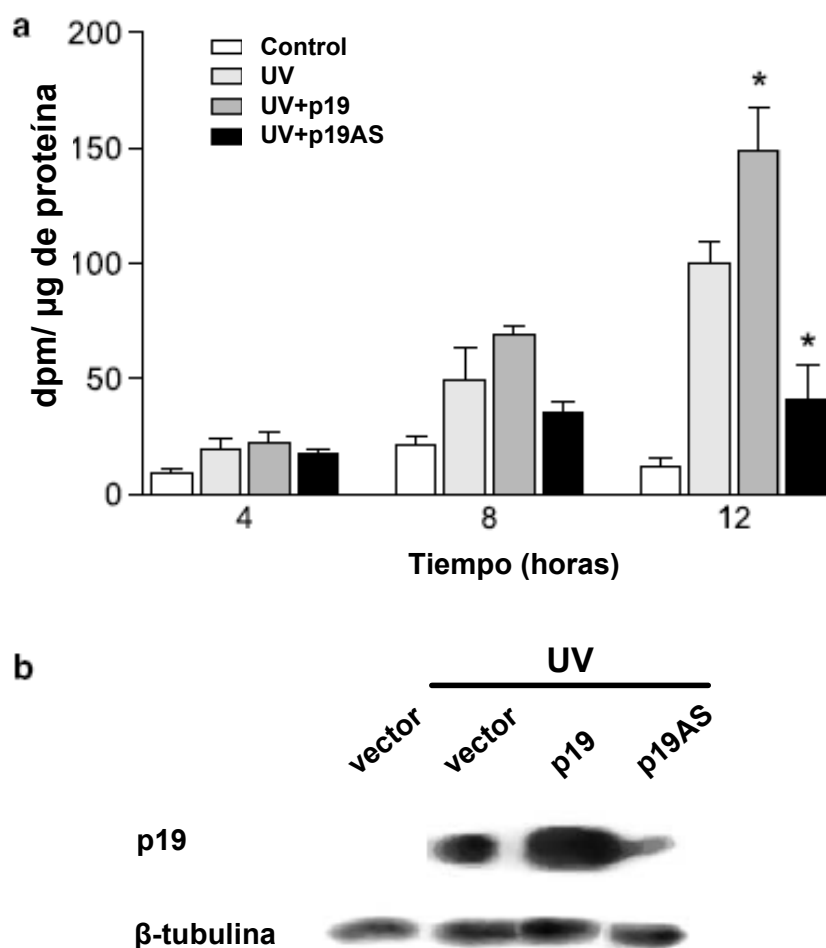


Figura 25. p19 aumenta la capacidad de las células SH-SY5Y de reparar el DNA genómico dañado con UV. Células SH-SY5Y fueron cotransfectadas con 2µg del vector de expresión que contiene el cDNA sentido (p19) o antisentido (p19AS) o el vector vacío junto con 0,5 µg del vector puroBABE. Veinticuatro horas luego de la transfección el medio fue sustituido por medio libre de arginina conteniendo suero fetal bovino 1% y las células fueron incubadas con puromicina por otras 60 h. Las células resistentes fueron irradiadas con 8 mJ/cm² UV. a) Luego de la irradiación las células fueron incubadas con 10 mCi [3H] timidina durante distintos tiempos y luego se cuantificó la incorporación de timidina en los lisados celulares. Las barras representan la media +/- e.s. de tres experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 o p19 AS y tratadas con UV, con muestras tratadas con UV pero transfectadas con el vector vacío (*P<0,05). b) RNA total fue extraído de las células irradiadas o no, 8 horas luego de la irradiación y 20 µg fueron sometidos a Northern blot utilizando una sonda marcada con ³²P específica para p19 humana. La membrana fue rehibridada para β-tubulina como control de siembra.

Paralelamente realizamos el mismo ensayo utilizando cisplatino (20 μM) y β -amiloide (10 μM) como agentes de daño y determinamos UDS 12 horas postratamiento. Las células transfectadas con p19 incorporaron significativamente mayor cantidad de ^3H - timidina que las células transfectadas con vector vacío para ambos tratamientos, indicando que existe una reparación del DNA más eficiente. Bajo estas circunstancias, la expresión de p19 antisentido no afectó la respuesta celular basal frente a estos daños (Figura 26a). Suponemos que el daño con cisplatino y β -amiloide no fue excesivo como para que la ausencia de p19 represente una desventaja para la célula.

Estas evidencias, en conjunto, confirman la hipótesis de que p19 es una proteína que participa de manera directa o indirecta en la reparación del DNA, independientemente del agente genotóxico, mejorando la eficiencia de la respuesta celular frente al daño.

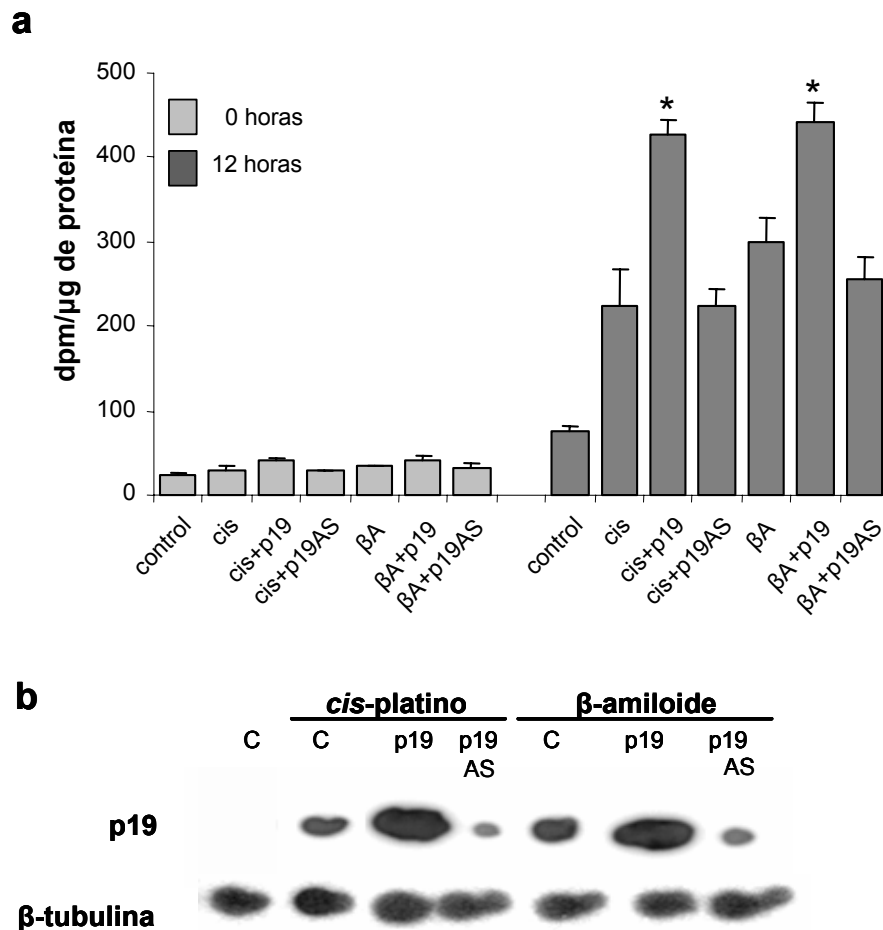


Figura 26. p19 aumenta la capacidad de las células SH-SY5Y de reparar el DNA genómico dañado con cisplatino o con péptido beta-amiloide. En a y b, la metodología es similar a la empleada en la figura 25 excepto porque las células resistentes luego de la transfección fueron tratadas con cisplatino 20 μM (cis) o péptido β -amiloide 10 μM (BA) por 12 horas. Las barras representan la media \pm e.s. de tres experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 o p19AS y tratadas con alguno de los agentes genotóxicos, con muestras dañadas pero transfectadas con el vector vacío (* $P < 0,05$).

16- El arresto del ciclo celular no es suficiente para observar una reparación más eficiente del DNA.

La respuesta primaria de la célula luego de la agresión por un genotóxico, consiste en el arresto del ciclo de proliferación, mediante la activación de los “checkpoints”. Esto permite a la célula ejecutar los programas de reparación del DNA dañado. Una hipótesis adecuada para explicar nuestras observaciones acerca de la mayor eficiencia de la reparación causada por p19, consiste en que su sobreexpresión, al igual que la de cualquier INK4, produce un arresto en el ciclo celular, dando de este modo más tiempo para la reparación del DNA. De acuerdo a esta hipótesis, el tratamiento de las células dañadas con una droga que arresta el ciclo en fase G1 o la sobreexpresión de otra INK4, debería aumentar la reparación del DNA en forma similar a la causada por p19.

Para contrastar esta hipótesis, determinamos la reparación del DNA, mediante el ensayo de HCR, en células dañadas con UV y con sobreexpresión de p16INK4a, otra INK4 con igual potencial de inhibición de CDK4/6, o tratadas con mimosina, una molécula que causa arresto en G1/S a través de la disminución del pool intracelular de deoxirribonucleótidos (Krude, 2000). Previamente, medimos incorporación de ³H-timidina para corroborar si efectivamente, estos tratamientos provocan un arresto similar al de p19 (Figura 27). Observamos que tanto p19 como p16 o mimosina produjeron una disminución de la incorporación de ³H-timidina similar entre sí, y además, un arresto parecido al causado por UV.

Sin embargo, y en oposición a lo observado con p19, ni la sobreexpresión de p16 ni el tratamiento con mimosina modificaron significativamente la reparación del DNA plasmídico determinado por el ensayo de HCR (Figura 28).

Estos resultados sugieren que el efecto reparador de p19 no estaría relacionado con su capacidad de arrestar el ciclo en G1.

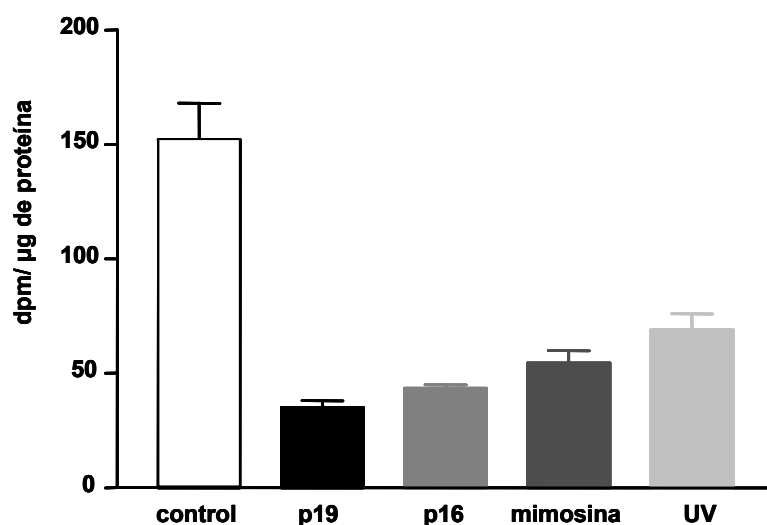


Figura 27. Mimosina y p16 provocan un arresto celular similar al producido por p19 y por UV. Células BHK21 fueron transfectadas con 2µg del vector de expresión pBABEp16 ó pSG5p19 ó tratadas con mimosina X µM ó con 8 mJ/cm² de UV. Cuarenta y ocho horas luego de la transfección y 12 horas luego del tratamiento con mimosina y con UV el medio fue reemplazado por uno conteniendo 1µCi/ml de ³H-timidina y la incorporación en el DNA fue medida 12 horas más tarde. Las barras representan la media ± e.s. de dos experimentos llevados a cabo por triplicado.

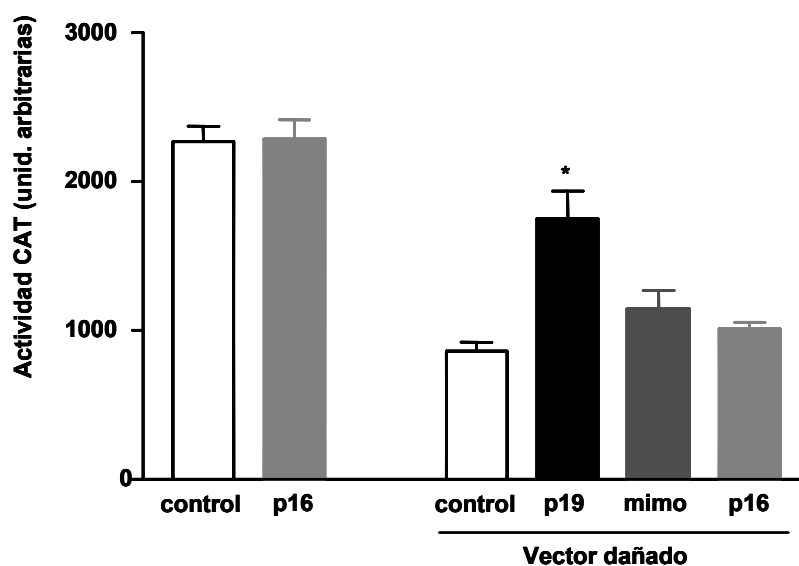


Figura 28. El arresto del ciclo celular no es suficiente para observar una reparación más eficiente del DNA. Células BHK21 fueron transfectadas con 2 µg del plásmido pCMVCAT previamente irradiado o no, con 64 mJ/cm² de UV y cotransfectadas con 2µg del pSG5p19 o pBABEp16 o tratadas con mimosina durante 12 horas. La expresión de CAT fue cuantificada 36 horas luego de la transfección. Las barras representan la media +/- e.s. de dos experimentos llevados a cabo por triplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras cotransfectadas con p19 ó p16 ó tratadas con mimosina (mimo) y pCMVCAT dañado con UV, con muestras transfectadas solamente con pCMVCAT dañado (*P<0,05).

17- p19INK4d disminuye la apoptosis y mejora la habilidad de las células de neuroblastoma de reparar el DNA dañado con UV independientemente de su interacción con CDK4.

La proteína p19, como las otras INK4, detiene la progresión del ciclo mediante la unión a CDK4 o CDK6 e inhibiendo la acción de la ciclina D (Roussel, 1999). Para verificar si la interacción con CDK4 es necesaria para llevar a cabo los efectos observados sobre apoptosis y reparación de DNA, realizamos ensayos de transfección coexpresando CDK4 salvaje o una versión mutada CDK4R24C, junto con p19. La quinasa CDK4R24C, tiene una mutación puntual que reemplaza el aminoácido arginina 24 por cisteína en el primer exón codificante y que determina que esta variante tenga actividad quinasa normal pero que no una las proteínas INK4. Por lo tanto, no es inhibida por ellas (Sotillo et al., 2001). Pensamos que si p19 ejerciera su rol sobre reparación y apoptosis asociada con CDK4, la sobreexpresión combinada de p19 y CDK4 salvaje debería aumentar estos efectos, mientras que la sobreexpresión de una mutante CDK4, deficiente en la unión a INK4, debería atenuarlos. Por el contrario, si p19 ejerciera su efecto de manera independiente de CDK4, el aumento en la reparación del DNA y la disminución de la apoptosis observadas con la sobreexpresión de p19 deberían estar atenuados en presencia de CDK4 y no modificarse en presencia de CDK4R24C. Los resultados están graficados en la figura 29. La sobreexpresión de CDK4 salvaje potenció la inducción de caspasa-3 mediada por UV. Esta potenciación fue aún mayor en células que sobreexpresaban la mutante CDK4R24C. Luego analizamos la expresión combinada de p19 y CDK4 en células irradiadas con UV. Llamativamente, la inducción de la actividad de caspasa-3 en respuesta a la radiación UV en células que sobreexpresan p19 fue totalmente diferente dependiendo del contexto de CDK4. La coexpresión de p19 en células sobreexpresando CDK4 salvaje no modificó la actividad de caspasa-3 según lo evaluado por la relación $(UV+ CDK4wt+ p19)/(UV+ CDK4wt) = 0,96$. Por el contrario, en un contexto de sobreexpresión de CDK4R24C p19 causó una importante reducción en la actividad de caspasa-3 inducida por UV $(UV+ CDK4R24C+ p19)/(UV+ CDK4R24C) = 0,38$ (Figura 29a).

Así mismo, decidimos estudiar el efecto de CDK4 salvaje o mutante R24C sobre la habilidad de reparación del DNA de las células SHSY-5Y irradiadas con UV y con el nivel de p19 endógeno o sobreexpresado. Llevamos a cabo ensayos de UDS en células crecidas en paralelo a las utilizadas para medir actividad caspasa. Como podemos ver en la figura 29b, la habilidad de p19 de aumentar la reparación del DNA genómico, se vio disminuida

en las células que sobrepresaban la quinasa CDK4 salvaje (UV+ CDK4 wt+ p19)/(UV+ CDK4 wt)

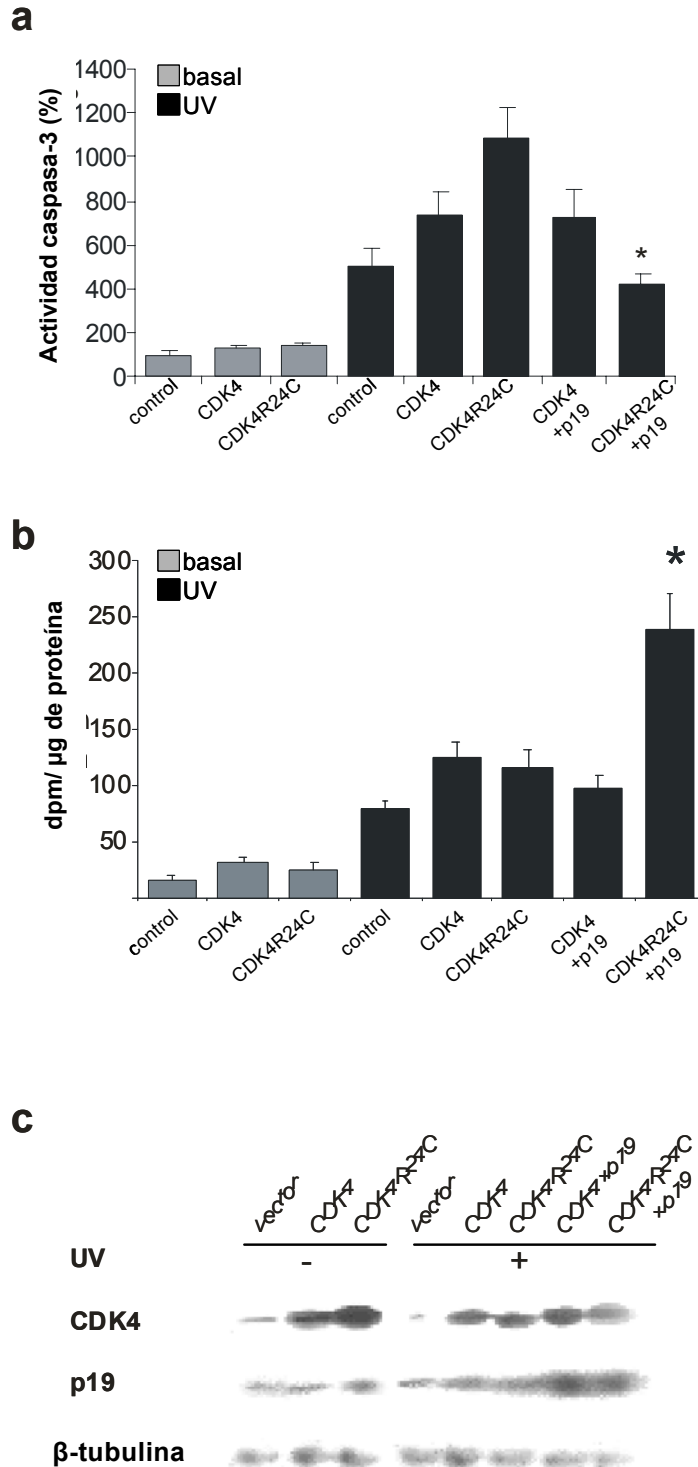


Figura 29. p19 ejerce su efecto independientemente de su interacción con CDK4. Células SH-SY5Y fueron transfectadas con 2 µg de pSG5p19 y cotransfectadas o no, con 2 µg del vector de expresión de CDK4 wt ó mutante CDK4(R24C) junto con 0.5 µg de puroBABE. a) Las células resistentes a puromicina fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV. La actividad de caspasa-3 se determinó en los lisados celulares inmediatamente y 24 horas luego de la irradiación. Los resultados están expresados como porcentaje de actividad de caspasa-3 con respecto a la actividad basal de lisados celulares sin transfectar y sin tratar con UV que fue seteado en 100. Las barras representan la media +/- e.s. de tres experimentos llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con una versión de CDK4 y p19, con muestras transfectadas con la respectiva CDK4 sola (P < 0,05). b) Luego de la transfección las células se incubaron por otras 60 horas en medio libre de arginina, con suero fetal bovino 1% y puromicina. Las células resistentes fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV e incubadas con 10 µCi [3H] timidina durante 12 horas y luego se cuantificó la incorporación de timidina en los lisados celulares. Las barras representan la media +/- e.s. de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con una versión de CDK4 y p19, con muestras transfectadas con la respectiva CDK4 sola (P < 0,05). c) Veinte µg de RNA total extraído de células tratadas como en a) fue sujeto a Northern blot con una sonda marcada con ³²P específica para p19 humana y rehibridado para CDK4 y β-tubulina. La figura muestra una autorradiografía representativa de tres experimentos independientes con resultados similares.

= 0,78. Sin embargo, la síntesis de DNA asociada al daño con UV aumentó dos veces al coexpresar p19 en las células que sobrexpresaban la mutante CDK4R24C, incapaz de unir este CKI (UV+ CDK4R24C+ p19/UV+ CDK4R24C =2.08). La correcta expresión de los vectores transfectados fue verificada mediante northern blot (Figura 29c).

Estos resultados indican que CDK4 salvaje, pero no la mutante CDK4R24C, impide que p19 mejore la reparación inducida por UV y reduzca la apoptosis, y sugieren que p19 ejerce los mencionados efectos de manera independiente de CDK4.

18- p19 ejerce su efecto sobre reparación y apoptosis de un modo independiente de retinoblastoma y de p53.

Con el objeto de verificar la hipótesis anterior, llevamos a cabo experimentos en la línea celular Saos-2, deficiente en la proteína retinoblastoma (Rb) (Fogh and Tempre, 1975). Varios autores han confirmado que la sobreexpresión de proteínas INK4 arresta el ciclo celular en fase G1 dependiendo de la integridad de Rb (Guan et al., 1996; Lukas et al., 1996; Sherr and Roberts, 1999). Por lo tanto, en esta línea celular derivada de osteosarcoma humano, la sobreexpresión de cualquier INK4, incluyendo a p19, no causaría un arresto en G1 tal como lo hace en células con Rb salvaje (p.e. SH-SY5Y). La idea, al realizar este experimento, fue tratar de dilucidar si p19 era capaz de mejorar la reparación del DNA dañado con UV y disminuir la apoptosis en células carentes de Rb, como las Saos-2. En caso afirmativo, esto indicaría una disociación entre estas funciones nuevas de p19 y aquellas ya descritas relacionadas con la inhibición de CDK4/6. Los resultados de estos ensayos muestran que la actividad de caspasa-3 fue reducida en células Saos-2 sobrexpresando p19, mientras que se observó un incremento significativo en las células transfectadas con p19 antisentido (Figura 30a). Además, la habilidad de reparar el DNA dañado con UV de las células Saos-2 fue notablemente mejorada por la sobreexpresión de p19, mientras que esta capacidad de reparación fue parcialmente impedida en células deficientes en p19 (Figura 30b).

Los resultados mencionados demuestran que, luego del daño en el DNA, p19 tiene un efecto muy similar en ambas líneas celulares, SH-SY5Y (Rb positivas) y Saos-2 (deficientes en Rb).

A continuación, evaluamos el efecto de p19 sobre la proliferación celular tanto en SH-SY5Y como en Saos-2. Los ensayos de incorporación de 3H-timidina mostraron que, al igual que lo observado previamente, la proliferación celular en SH-SY5Y fue

significativamente disminuída al sobreexpresar p19 (Figura 30d). Por el contrario, p19 fue incapaz de causar el arresto en fase G1 cuando fue sobreexpresada en células Saos-2 (Figura 30c). Sin embargo, la entrada en fase S tanto en células Saos-2, como en SH-SY5Y fue bloqueada al incubarlas con mimosina.

La línea celular Saos-2 también es deficiente en la proteína supresora tumoral p53. Por lo tanto, estos resultados nos hacen suponer que la acción de p19, también sería independiente de p53. Son necesarios más experimentos para confirmar este indicio, y para responder una gran cantidad de preguntas que se presentan con estos nuevos hallazgos. En el presente trabajo no vamos a profundizar en el estudio de la relación de p19 y p53.

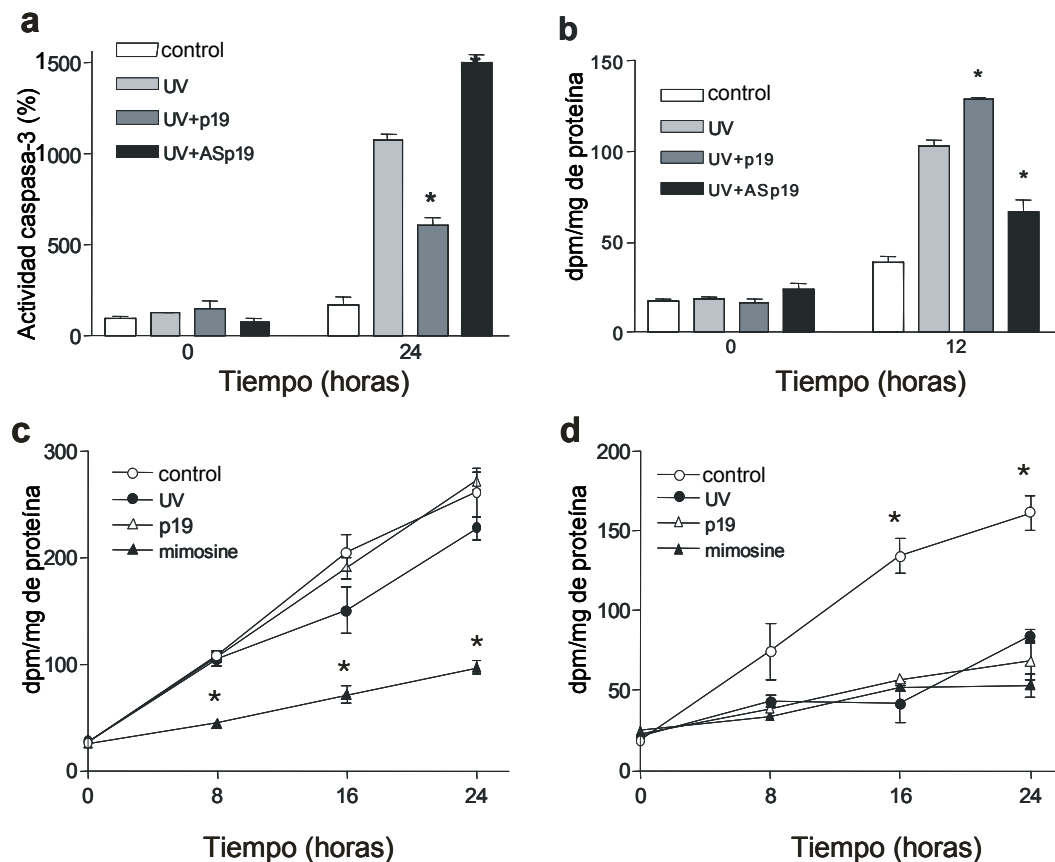


Figura 30. Efecto de p19 en células Saos-2, deficientes en Rb y p53. a) Células Saos-2 fueron cotransfectadas con 2 μ g del vector de expresión que contiene el cDNA sentido (pSG5p19) o antisentido (pSG5p19AS) o el vector vacío con 0,5 μ g del vector puroBABE. Las células resistentes a puromicina fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV. Inmediatamente y 24 horas luego de la irradiación, la actividad de caspasa-3 fue testeada en los lisados celulares. b) Células Saos-2 fueron cotransfectadas con el vector de expresión que contiene el cDNA sentido (p19) o antisentido (p19AS) o el vector vacío con el vector puroBABE. Lisados celulares fueron sometidos al ensayo de UDS como está descrito en la figura 25. En a y b, las barras representan la media \pm e.s. de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 o p19 AS y tratadas con UV, con muestras tratadas con UV pero transfectadas con el vector vacío (*P<0,05). c) Células Saos-2 ó d) SH-SY5Y fueron transfectadas con 0,5 μ g de pBABEpuro y con 2 μ g del vector pSG5p19 según está indicado y seleccionadas con puromicina 36 horas y en este instante fueron tratadas con mimosina 500 mM e incubadas por otras 24 horas en presencia de puromicina. Las células resistentes fueron irradiadas con 8 mJ/cm². Los cultivos fueron incubados con 1 μ Ci [³H] timidina y la incorporación del nucleótido fue medida a diferentes tiempos. Las barras representan la media \pm e.s. de tres experimentos. El test de student fue utilizado para comparar las muestras transfectadas con las basales en el punto de tiempo correspondiente (*P<0.05).

En conjunto estos resultados demuestran que, el mecanismo mediante el cual p19 mejora la reparación del DNA y disminuye la apoptosis disparada por UV, es independiente de su rol como regulador del ciclo celular.

19- Relación causal entre el aumento en la reparación del DNA y la disminución de la apoptosis en células tratadas con UV y que sobreexpresan p19INK4d.

El siguiente objetivo fue analizar si existe alguna relación entre los efectos de p19 sobre reparación de DNA y apoptosis. Para ello llevamos a cabo ensayos de UDS y de caspasa-3 en células de neuroblastoma tratadas con UV, en presencia de F11782, un inhibidor del mecanismo de reparación NER (Barret et al., 2002). Este inhibidor bloquea la actividad endonucleasa de los complejos ERCC1/XPF o ERCC1/XPG. Los resultados obtenidos del ensayo UDS mostraron nuevamente, que en células SH-SY5Y sobreexpresando p19, la reparación del DNA luego del tratamiento con UV estaba aumentada. Además, el tratamiento con F11782 fue efectivo para inhibir el mecanismo NER ya que la síntesis de DNA asociada al daño fue indistinguible de la síntesis en las células no irradiadas (Figura 31a). Luego determinamos la actividad de caspasa-3 en células SH-SY5Y en presencia o ausencia de F11782. Las células irradiadas con UV e incubadas en ausencia del inhibidor de NER mostraron una elevada actividad de caspasa-3 que fue disminuida parcialmente con la sobreexpresión de p19. Notablemente, la inducción de caspasa-3 por UV fue mayor en presencia de F11782, y en este caso, p19 fue incapaz de atenuarla (Figura 31b).

A continuación, repetimos estos ensayos reemplazando el inhibidor de NER por un inhibidor general de caspasas, el zVAD-fmk a una concentración de 20 μ M. En este caso, las células transfectadas con las distintas construcciones fueron tratadas durante 1 hora con el inhibidor de caspasas antes de ser irradiadas con UV. Los resultados de UDS demuestran que la reparación no estuvo afectada a pesar de la presencia del inhibidor de apoptosis y confirman que las células transfectadas con p19 son más eficientes para responder frente al daño con UV (Figura 32a). Por otro lado, comprobamos que la actividad de caspasa-3 fue prácticamente anulada bajo el efecto del inhibidor zVAD-fmk, con un nivel similar al basal (Figura 32b).

Por lo tanto, el conjunto de los resultados señala a la reparación del DNA como el blanco de acción principal de p19, y sugieren que la disminución de la apoptosis sería una consecuencia de esa reparación.

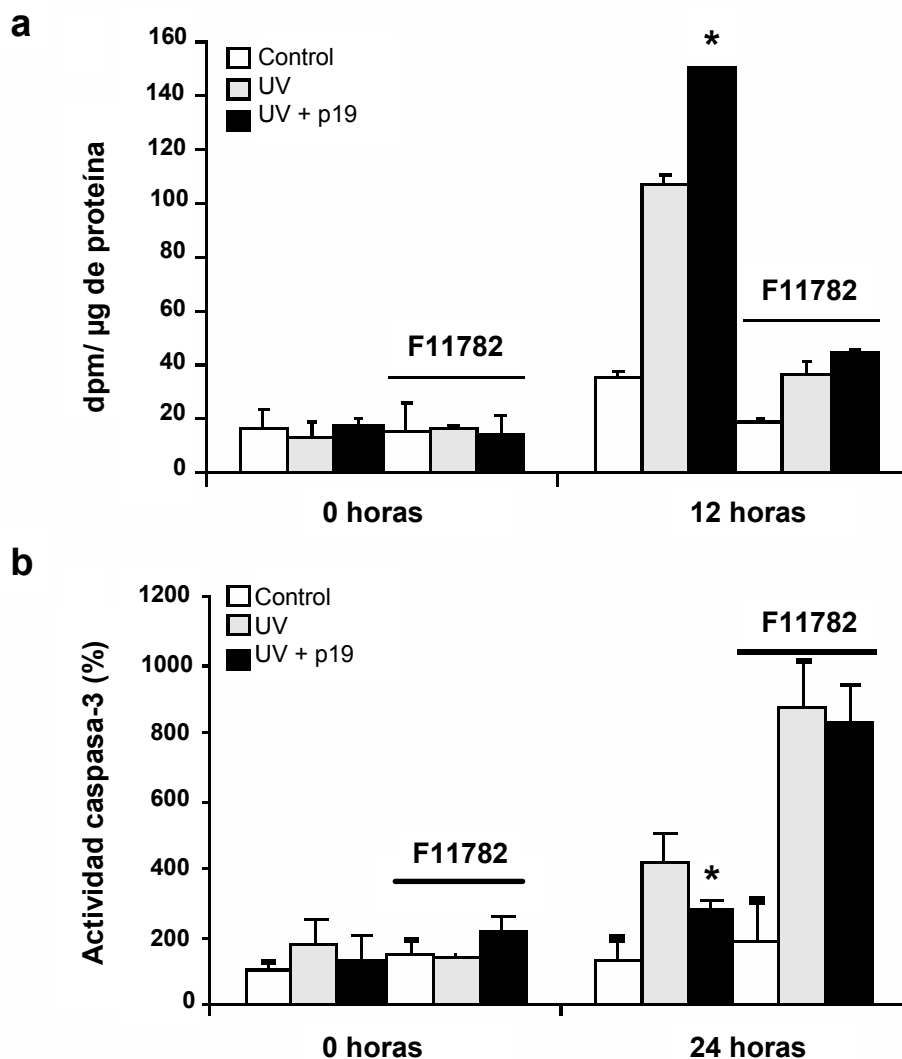


Figura 31. Relación entre el aumento en la reparación del DNA y la disminución de la apoptosis en células irradiadas con UV y que sobrepresan p19. Células SH-SY5Y fueron cotransfectadas con 2 µg del vector de expresión que contiene el cDNA de p19 o el vector vacío con 0,5 µg del vector puroBABE. a) Veinticuatro horas luego de la transfección el medio fue sustituido por medio libre de arginina conteniendo suero fetal bovino 1% y las células fueron incubadas con puromicina por otras 60 h. Las células resistentes fueron tratadas con el inhibidor de NER F11782 50 µM durante 30 minutos y fueron irradiadas con 8 mJ/cm² UV. Las células fueron incubadas con 10 µCi [3H] timidina e inmediatamente y 12 horas más tarde se cuantificó la incorporación de timidina en los lisados celulares (UDS). b) Veinticuatro horas luego de la transfección el medio fue reemplazado por medio fresco y las células fueron incubadas con puromicina por otras 60 h. Las células resistentes fueron tratadas con el inhibidor de NER F11782 50 µM durante 30 minutos y luego fueron irradiadas con 8 mJ/cm² UV. La actividad de caspasa-3 fue testeada en los lisados celulares inmediatamente y 24 horas más tarde. El resultado está expresado como porcentaje de la actividad de caspasa-3 con respecto a la actividad basal de los lisados transfectados con el vector vacío y sin tratamiento con UV, medido a la hora 0, y que fue seteado en 100. Las barras representan la media \pm e.s. de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 y tratadas con UV, con muestras tratadas con UV pero transfectadas con el vector vacío (*P<0,05).

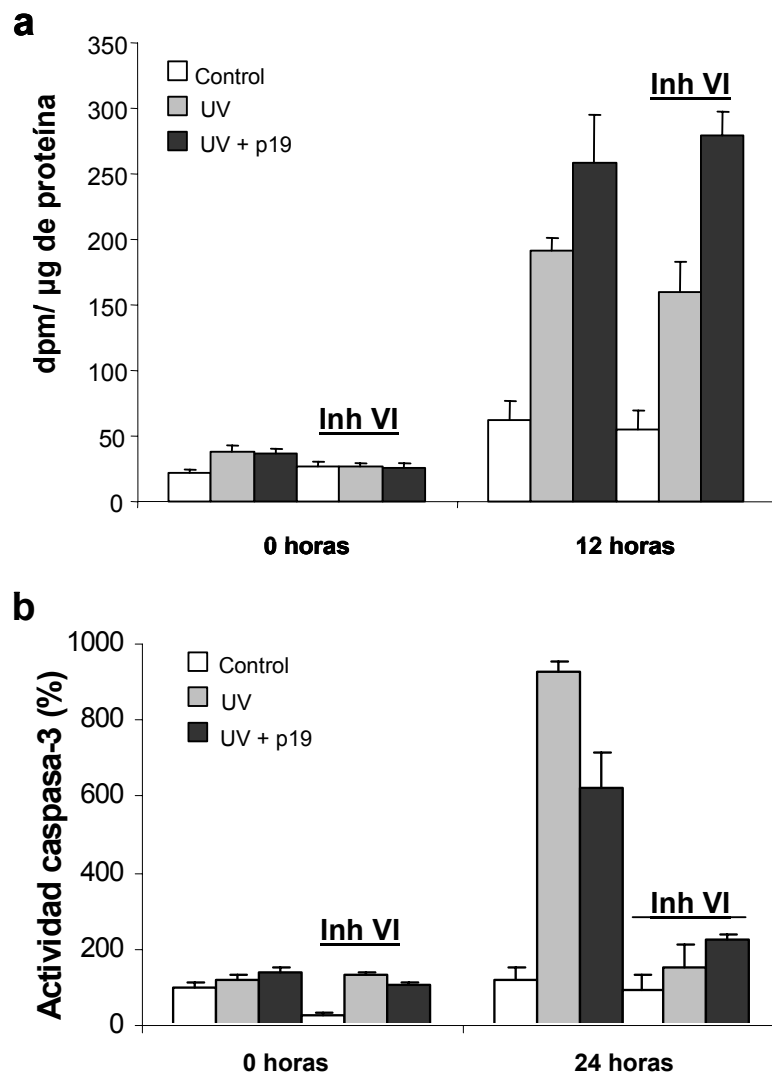


Figura 32. Relación entre el aumento en la reparación del DNA y la disminución de la apoptosis en células irradiadas con UV y que sobreexpresan p19. Células SH-SY5Y fueron cotransfectadas con 2 µg del vector de expresión que contiene el cDNA de p19 o el vector vacío con 0,5 µg del vector puroBABE. a) Veinticuatro horas luego de la transfección el medio fue sustituido por medio libre de arginina conteniendo suero fetal bovino 1% y las células fueron incubadas con puromicina por otras 60 h. Las células resistentes fueron tratadas con el inhibidor pancaspásico 20 µM durante 30 minutos y fueron irradiadas con 8 mJ/cm² UV. Las células fueron incubadas con 10 µCi [3H] timidina e inmediatamente y 12 horas más tarde se cuantificó la incorporación de timidina en los lisados celulares (UDS). b) Veinticuatro horas luego de la transfección el medio fue reemplazado por medio fresco y las células fueron incubadas con puromicina por otras 60 h. Las células resistentes fueron tratadas con el inhibidor pancaspásico 20 µM durante 30 minutos y luego fueron irradiadas con 8 mJ/cm² UV. La actividad de caspasa-3 fue testada en los lisados celulares inmediatamente y 24 horas más tarde. El resultado está expresado como porcentaje de la actividad de caspasa-3 con respecto a la actividad basal de los lisados transfectados con el vector vacío y sin tratamiento con UV, medido a la hora 0, y al que se le dio el valor de 100. Las barras representan la media +/- e.s. de tres experimentos diferentes llevados a cabo por duplicado. El test de Student fue utilizado para comparar muestras transfectadas con p19 y tratadas con UV, con muestras tratadas con UV pero transfectadas con el vector vacío (*P<0,05).

20- La presencia de moléculas de DNA dañadas con UV no es suficiente para inducir p19INK4d.

Se sabe, por ejemplo que p21, inhibidor de CDKs de la familia Cip/Kip y regulado predominantemente por p53 frente al estrés celular, se induce a nivel transcripcional luego de la irradiación con UV, IR o hipoxia (O'Reilly, 2005). A pesar de que ATM y ATR son requeridas para activar p53 luego de IR, solamente se requiere de ATR para activar p53 luego del daño con UV (Siliciano et al., 1997; Tibbetts et al., 1999). Además, el mRNA de p21 está aumentado en presencia de oligonucleótidos conteniendo dímeros de timidina (Goukassian et al., 1999). O sea, que el daño propiamente dicho es una señal suficiente para inducir este gen.

En base a estos antecedentes nos propusimos estudiar si la sola presencia de moléculas de DNA dañadas es una señal suficiente para causar la inducción de p19. Para ello, realizamos un ensayo de northern blot, luego de incubar y transfectar las células con un oligonucleótido previamente irradiado con 64 mJ/cm² de luz UV. Este fragmento posee en su secuencia dos bases T consecutivas, lo que asegura que luego de la irradiación se formarán dímeros de timidina, fotolesiones que deben ser reconocidas por el NER y por las proteínas sensoras que inician los checkpoints. Paralelamente, otras muestras fueron transfectadas con un plásmido dañado con 64 mJ/cm² de luz UV o irradiadas directamente con 8 mJ/cm² de UV. Los resultados indican que las células incubadas con el oligonucleótido irradiado, o transfectadas con el plásmido dañado, o bien irradiadas directamente presentan una notable inducción del mRNA de p21. Sin embargo, p19 solamente se indujo transcripcionalmente luego de que las células habían sido irradiadas (Figura 33). Además, es evidente que la cinética de inducción de p21 es más rápida, observándose la acumulación del mensajero desde las 8 horas luego de los tratamientos; en cambio el aumento de p19 es más lento siendo evidente desde las 16 horas.

Este resultado tiene dos posibles explicaciones: la primera, es que p19 requiera más de una señal para inducirse luego del daño con UV, por ejemplo otras señales extracelulares y/o activación de cascadas de transducción además de las lesiones propiamente dichas sobre las moléculas de DNA. La segunda, es que la cantidad de moléculas dañadas, ya sean de oligonucleótido o de plásmido, que hayan entrado en las células no sean suficientes para disparar la respuesta de inducción. Si esto es así, el umbral de daño para la inducción de p19 sería mayor que el de p21, y podría tratarse de un segundo mecanismo que se active cuando el daño es excesivo y como reaseguro de la reparación del DNA. La dosis de UV

aplicada a las células es bastante elevada, y en este caso p19 se induce, lo que estaría en concordancia con la última suposición (Figura 33). Por otro lado, como observamos en experimentos anteriores, p19 se induce luego del tratamiento con cisplatino, agente que se intercala y daña directamente el DNA. Este hecho es llamativo, reforzando la segunda hipótesis de que p19 podría inducirse por la sola presencia de lesiones en el DNA. Son necesarios más experimentos para poder responder este interrogante, sin embargo, los mismos exceden la extensión de este trabajo.

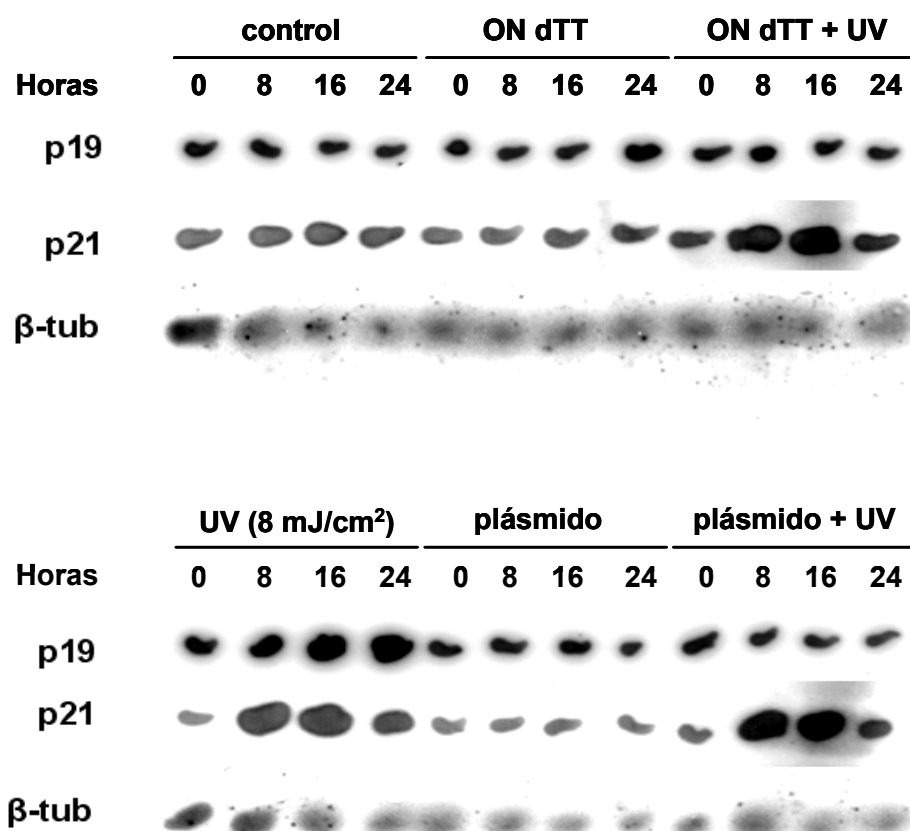


Figura 33. El daño en el DNA no es suficiente para inducir transcripcionalmente a p19. Células BHK21 fueron irradiadas o no, con 8mJ/cm² de UVC luego de tratarlas con actinomicina D 1 μM durante 3 horas y cosechadas en los tiempos indicados luego de la irradiación. Veinte μg de RNA total fue sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humana. La membrana fue rehibridizada para β-tubulina como control de siembra. La figura muestra el resultado de un experimento de dos realizados en forma independiente.

21- La sobreexpresión de p19INK4d confiere mayor resistencia a distintos genotóxicos.

Por último, deseamos verificar si la expresión aumentada o disminuída de p19 tiene alguna significancia biológica o juega un rol funcional en la respuesta celular al tratamiento con genotóxicos. En primer lugar, examinamos la supervivencia celular en clones de células BHK21 establemente transfectadas con el vector pMTCBp19 (BHK21p19), o pMTCBp19AS (BHK21p19AS), que contienen el cDNA de p19 o la versión invertida del mismo, respectivamente, bajo el promotor inducible por zinc de la enzima metalotioneína, o el vector vacío (BHK21v). Estos clones celulares fueron obtenidos en nuestro laboratorio. Debido a que la sobreexpresión de p19 arresta las células en fase G1, para evitar este efecto antiproliferativo de p19, indujimos el promotor de metalotioneína, únicamente 6 horas antes y durante las 24 horas posteriores al tratamiento con distintos agentes genotóxicos. Luego estimamos la supervivencia celular mediante el ensayo de reducción de MTT en los siguientes 5 días.

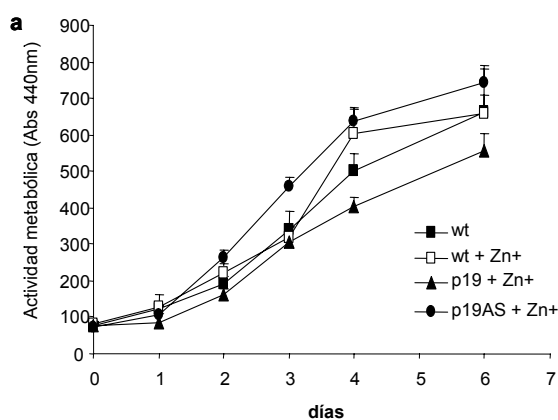
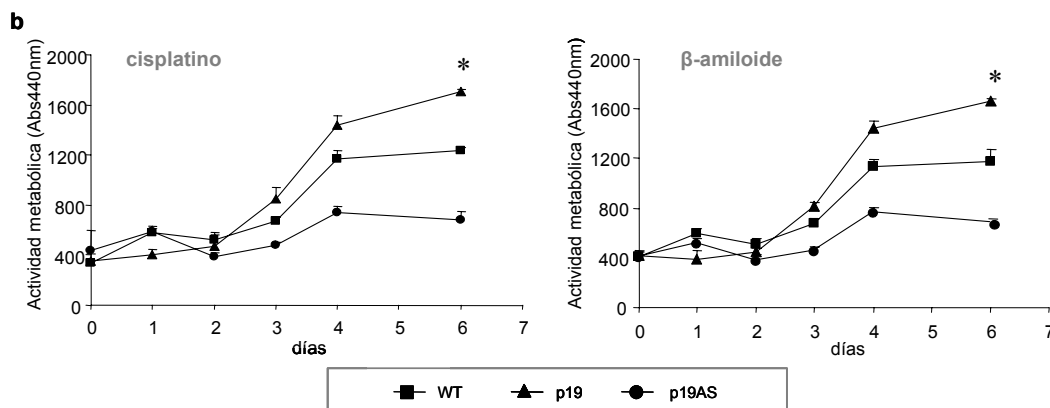


Figura 34. p19INK4d incrementa la supervivencia de las células con daño genómico. La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de MTT. Clones celulares BHK21 transfectados en forma estable con p19 sentido (p19) o p19 antisentido (p19AS) bajo el promotor de metalotioneína (MT), o con el vector vacío fueron tratados en (a) con ZnCl₂ por 30 horas o en (b) tratados con ZnCl₂ durante 30 horas y péptido β-amiloide 10μM o cisplatino 20μM por 12 horas e incubados en medio completo durante 6 días. El medio fue reemplazado por medio conteniendo MTT (3- [4,5- dimethylthiazol-2-yl]- 2,5 diphenyltetrazolium bromide, 1 mg/ml) y las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C. Luego, el medio fue reemplazado por 500 μl de isopropanol. La absorbancia en el solvente fue determinada a 440 nm. Cada punto representa la media ± d.s. de 2 experimentos diferentes llevados a cabo por sextuplicado. El análisis estadístico se realizó con el test de Student (*P<0,05).



El ensayo control sin agentes genotóxicos muestra que el ZnSO₄ no tiene efecto sobre la proliferación celular (Figura 34 a). En los clones estables, observamos diferencias significativas en la habilidad de las células BHK21p19 o BHK21p19AS, con respecto a las células control para reducir MTT; esto correlaciona con la diferencia inicial en el nivel de p19. En la figura 34 b, vemos que luego de 6 días las células BHK21p19 tienen un crecimiento celular mayor (37 % y 39%) luego de los tratamientos con cisplatino (20 μ M) o β -amiloide (10 μ M), respectivamente, comparado con la línea clonal BHK21v. Por el contrario, las células BHK21p19AS fueron más sensibles frente a sendos daños genotóxicos (45% y 42%) que el clon con vector vacío. Este efecto protector de p19 se torna aún más relevante si consideramos que inicialmente las tres líneas celulares poseían distintos potenciales proliferativos (Figura 34 b).

En segundo lugar y con el objetivo de analizar el efecto a largo plazo y la relevancia fisiológica de p19 en la supervivencia celular, realizamos ensayos clonogénicos. No observamos diferencias sinificativas en las células tratadas solamente con ZnSO₄ indicando que todas las líneas poseen una capacidad similar para formar colonias a pesar de la variación en la tasa de proliferación inicial (Figura 35). Como era esperable, tanto el tratamiento con *cis*platino como con β -amiloide tienen alta citotoxicidad en todas las líneas celulares ensayadas. Sin embargo, las curvas de dosis-respuesta son diferentes dependiendo del nivel de p19 expresado para cada tipo celular. Hallamos que el 31% de las colonias de BHK21v sobrevivieron con 20 μ M de cisplatino, mientras que el 50% de las colonias BHK21p19 permanecieron vivas con la misma dosis. En este ensayo no hallamos diferencias significativas entre BHK21v y BHK21p19AS. Las células tratadas con β -amiloide demostraron estar más protegidas cuando sobreexpresaban p19, ya que el 51% de BHK21p19 formó colonias, mientras que sólo el 29% de las BHK21v y el 14% de las BHK21p19AS lo hizo (para 20 μ M). En este caso también hay diferencias significativas para BHK21p19AS con respecto a las células con el vector vacío (Figura 35). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio para el tratamiento con UV (Scassa et al., 2007).

Podemos decir entonces, que p19 influencia la sensibilidad celular frente a distintos agentes de daño y confiere una notable resistencia al estrés genotóxico.

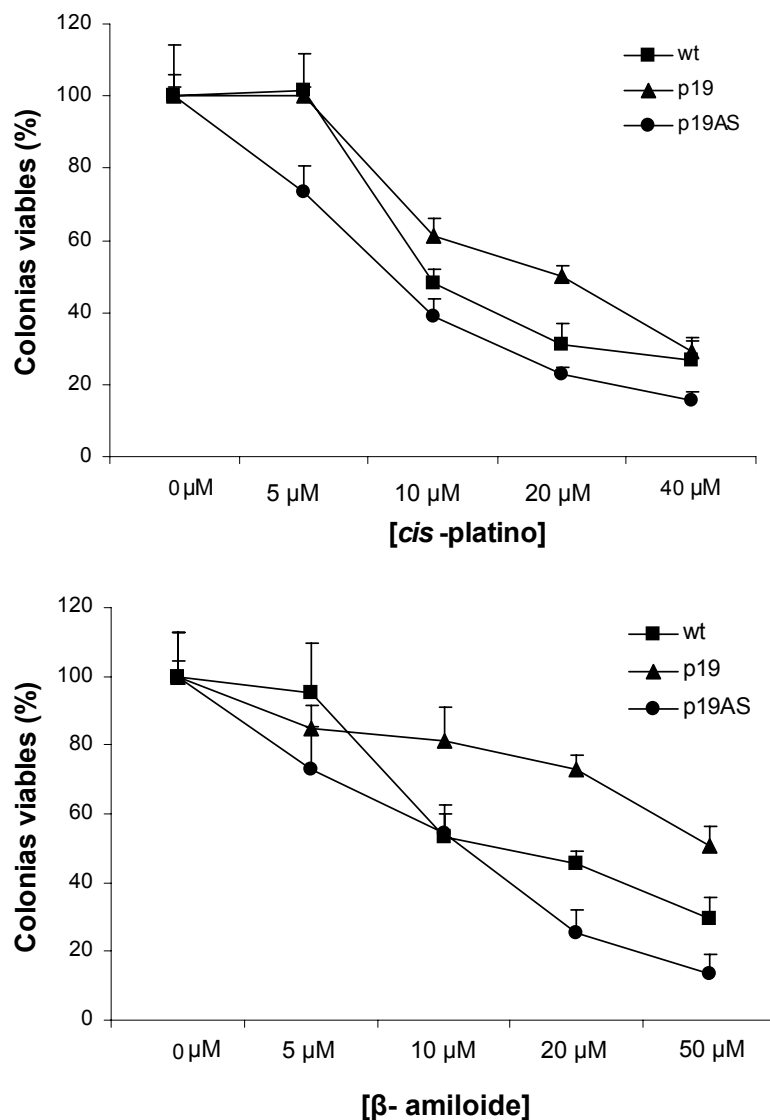


Figura 35. p19INK4d promueve la supervivencia celular frente al daño con los agentes genotóxicos cisplatino y péptido β -amiloide. Ensayo clonogénico. Células BHK21 provenientes de clones transfectados en forma estable con p19 sentido (p19) o p19 antisentido (p19AS) bajo el promotor de metalotioneína (MT), fueron sembradas a razón de 1500 células /placa de 10 cm de diámetro. Luego de inducir el promotor de MT durante 6 horas con 75 mM ZnCl₂, las células fueron tratadas con las concentraciones indicadas de cisplatino o péptido β -amiloide durante 12 horas e incubadas en medio completo durante 6 días. Luego se procedió a cuantificar los clones supervivientes. Las colonias que contenían más de 50 células fueron consideradas como derivadas de células clonogénicamente activas.

DISCUSIÓN

La inestabilidad genética, causa primordial de la tumorigénesis, es alimentada por daños en el DNA y por los errores cometidos durante la replicación del mismo. La maquinaria del ciclo celular detecta de alguna manera la lesión genómica y arresta la célula en checkpoints específicos de G1, S, G2 y M para permitir la reparación de las lesiones antes de que sean convertidas en mutaciones permanentes (Hoeijmakers, 2001; Sandal, 2002). Cuando el daño es muy significativo, una célula puede optar por el último modo de rescate iniciando el programa apoptótico a expensas de la pérdida de una célula (Hahn and Weinberg, 2002; Martin et al., 2003). En los últimos años se ha delineado la hipótesis de que frente al daño en el DNA, la célula organiza una respuesta integrada, no solamente mediante los mecanismos clásicos de reparación, sino involucrando también mecanismos de replicación, transcripción, dinámica de la estructura de la cromatina, progresión del ciclo celular y apoptosis. En el contexto de esta nueva visión del control de la estabilidad genómica, nosotros proponemos que, además de su rol en la inhibición del ciclo celular, p19 está involucrada en el mantenimiento de la integridad del DNA.

El presente trabajo tuvo dos objetivos principales. El primero fue analizar el rol potencial de p19 en la respuesta celular al daño en el DNA. El segundo, estudiar la habilidad de p19 de mejorar la capacidad de las células de reparar el DNA dañado con UV y con otros agentes genotóxicos. Para llevar acabo estos objetivos, utilizamos la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, que expresa p19. Tal como fue reportado por otros autores para otros tipos celulares (Hirai et al, 1995; Guan et al, 1996), el mRNA y la proteína p19 presentan una expresión periódica durante el ciclo celular de SH-SY5Y. Esta característica de p19 parece ser distintiva de las otras proteínas INK4. Su expresión es baja en G0/G1 y tiene un pico al final de G1 y en fase S. La periodicidad de la proteína p19 durante el ciclo celular está regulada en parte por el mecanismo de degradación dependiente de ubiquitina/proteasoma permitiendo que la abundancia de la proteína siga los cambios en la expresión del mensajero (Thullberg et al., 2000). Sin embargo, los mecanismos que determinan la expresión cíclica del gen de p19 aún permanecen desconocidos.

Nosotros hallamos que la exposición de células de neuroblastoma a la irradiación UV induce cambios en el estado celular de p19 incluyendo activación transcripcional y translocación nuclear. Luego de 24 horas desde la irradiación, los niveles del mRNA y de la proteína p19 aumentaron significativamente. Esta regulación positiva de p19 parece ser un fenómeno general ya que fue observado en todas las líneas celulares estudiadas, incluyendo células HeLa, que en estado basal no expresan niveles detectables de p19 (Hirai

et al, 1995). Este aumento no podría deberse solamente al incremento de células en fase G1 que se observa luego de la irradiación, ya que existe una inducción del mRNA de p19 que es de 4 a 5 veces con respecto al nivel basal.

Otros autores han reportado que, en respuesta a la irradiación UV, el nivel de p16 aumenta en células de cáncer de cérvix HeLa y en células de melanoma A2058 (Milligan et al., 1998). Sin embargo, nosotros no detectamos cambios mediados por UV en la expresión de las otras INK4. Una explicación molecular posible para este comportamiento diferente podría recaer en la especificidad de tejido de la expresión de las INK4 (Zindy et al., 1997a). Más aún, se sabe que su transcripción responde diferencialmente a diversos estímulos. La inducción de p15INK4b en respuesta a TGF β , la regulación positiva de p16INK4a que sigue a ciertos estímulos oncogénicos, o la expresión aumentada de p18INK4c asociada con la acción antiproliferante de interleuquina-6, son otros ejemplos de esta regulación de la transcripción diferencial (Serrano, 1997; Ruas y Peters, 1998). En este aspecto, la expresión de p19 comenzó a ser estudiada recientemente y está reportada la regulación mediante el factor de transcripción Sp1 y mediante inhibidores de deacetilasas de histonas (Matsuzaki et al., 2002; Yokota et al., 2004a; Yokota et al., 2004b). El análisis *in silico* de la región 5' regulatoria proximal del gen de p19 reveló un sitio de unión de alta homología para el factor de transcripción NF- κ B. Además, observamos que fibroblastos transfectados con RelA tienen el nivel del mRNA de p19 elevado (datos no publicados). NF- κ B es un gen de respuesta temprana inmediata involucrado en la modulación de la respuesta celular, incluyendo la apoptosis siguiente a diversos daños ambientales (Fan et al., 2002; Wu et al., 2004). Estímulos activadores comunes, como lipopolisacáridos, hipoxia, o UV inducen la translocación al núcleo luego de su activación y podría explicar la inducción de p19 mediada por UV. Análisis *in silico* adicionales, revelaron la presencia de sitios con alta homología para la unión de E2F. Además, fibroblastos humanos que sobrepresan transitoriamente E2F1 muestran un aumento en el mRNA de p19 (datos no publicados). Se ha demostrado que la proteína E2F1 es inducida por varios agentes que dañan el DNA incluyendo UV y drogas quimioterápicas. Esta inducción es rápida y dependiente de la actividad quinasa ATM/ATR que específicamente fosforila E2F1 promoviendo la estabilidad de la proteína (Lin et al., 2001; Stevens and La Thangue, 2004). Esta acumulación de E2F1 podría ser crítica para la inducción de p19 en respuesta a UV.

Hemos observado que la inducción de p19 es una respuesta amplia frente al daño en el DNA, ya que también se produce luego del tratamiento con otros agentes genotóxicos,

como cisplatino y péptido β -amiloide. El daño causado por cada uno de estos agentes es reparado por distintos mecanismos; NER repara principalmente el daño generado por cisplatino y UV, mientras que BER y HR reparan las lesiones derivadas de la presencia de β -amiloide. Estos hechos nos permiten postular una atractiva hipótesis acerca del papel central que podría desempeñar p19 actuando como nexo entre varias vías de reparación activadas frente a distintos tipos de daño. Esta hipótesis es actualmente evaluada en nuestro laboratorio.

Mediante ensayos de northern con actinomicina D, marcación metabólica de la proteína con ^{35}S -metionina y *run-on* determinamos que, luego de tratar las células con UV o péptido β -amiloide, la estabilidad del mRNA de p19 no es afectada, ni tampoco la de la proteína. Sin embargo, la tasa de inicio de la transcripción aumenta considerablemente luego de ambos tratamientos, y esta sería la causa de la acumulación de p19 observada.

La distribución subcelular de p19 en SH-SY5Y fue examinada mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta. Estudios previos en otras líneas celulares (Guan et al., 1996; Hirai et al., 1995), y los resultados presentados aquí, demuestran que p19 posee localización citoplasmática. Nosotros determinamos que luego de la irradiación con luz UV, p19 es translocada al núcleo con un máximo entre 36 y 48 horas. La importación de proteínas al núcleo no es un proceso constitutivo, parece estar modulado por estímulos externos, el ciclo celular, y el desarrollo. Una variedad de agentes genotóxicos afectan varios aspectos de la fisiología celular, y la respuesta al estrés celular incluye la translocación desde el citoplasma al núcleo de los factores responsables de la misma. Sin embargo, la manera en que estos factores son translocados y cómo las vías de translocación son reguladas en células con daño no está aclarada (Miyamoto et al., 2004).

El análisis de la secuencia de p19 en las bases de datos muestra que p19 no contiene la señal de localización nuclear (NLS) estándar monopartita o bipartita encontrada en la mayoría de las proteínas nucleares (Dingwall and Laskey, 1991). Aún sin tener una NLS estándar conocida en su secuencia, no podemos descartar completamente la existencia de una NLS no estándar.

Un mecanismo esencial de regulación de la localización subcelular involucra la fosforilación directa de la proteína transportada (Lim et al., 2003; Mattaj and Englmeier, 1998). En este aspecto, p19 es la única INK4 capaz de ser fosforilada *in vivo* en dos residuos serina conservados (Thullberg et al., 2000). Tales eventos de fosforilación en residuos filogenéticamente conservados, surgen como un potencial y atractivo mecanismo para controlar el transporte nuclear de la proteína p19.

Los resultados obtenidos nos indujeron a considerar que p19 podría formar parte de un mecanismo de señalización frente a estrés en mamíferos, iniciado en respuesta a agentes que dañan el DNA. Por lo tanto, postulamos que p19 jugaría un rol importante en el mantenimiento de la integridad del DNA. El presente trabajo provee fuertes evidencias de que la apoptosis inducida por daño en el DNA (DDIA, por su sigla en inglés) en células de neuroblastoma y en otras líneas celulares, está regulada negativamente por p19. Mediante el análisis por citometría de flujo, demostramos que células SH-SY5Y que sobreexpresan p19 son más resistentes a la apoptosis que sigue al tratamiento con luz UV, que aquellas células que expresan el cDNA antisentido de p19 y por lo tanto poseen niveles indetectables de p19. Estos resultados fueron avalados por aquellos obtenidos en los ensayos de actividad de caspasa-3. Además, resultados similares fueron obtenidos con cisplatino y péptido β -amiloide en ensayos de caspasa-3.

La apoptosis es la consecuencia de un programa de muerte celular determinado genéticamente, que puede ser iniciado por diversos estímulos como la falta de factores de crecimiento, señales a través de receptores apoptóticos, o señales de estrés celular. La inducción de la apoptosis por agentes que dañan el DNA juega un rol central en la eliminación de células alteradas genéticamente, contribuyendo a la inhibición del desarrollo de un tumor (Johnstone et al., 2002; Norbury and Zhivotovsky, 2004). La pérdida de la apoptosis, por otro lado, juega un rol principal en la tumorigénesis (Igney and Krammer, 2002). Ha sido reportado recientemente que otra INK4, el supresor tumoral p16, tiene un efecto protector similar frente a la apoptosis inducida por UV en células de osteosarcoma. Los autores sugieren que p16 controla la apoptosis regulando negativamente el nivel de la proteína proapoptótica Bax (Al-Mohanna et al., 2004).

Una hipótesis atractiva para explicar el efecto antiapoptótico de p19 involucra al gen temprano Nurr77, el cual codifica para un receptor nuclear huérfano, que es rápidamente inducido por varios estímulos de estrés, incluyendo el daño en el DNA. Inicialmente, fue sugerido que la unión al DNA y la transactivación por Nurr77 podrían ser requeridas para su efecto proapoptótico. Datos más recientes muestran que, si bien es una proteína nuclear, Nurr77 es translocada al citosol en respuesta a genotóxicos donde está implicada en la liberación del citocromo c mitocondrial (Norbury and Zhivotovsky, 2004; Wilson et al., 2003). Se ha reportado que p19 puede interaccionar con Nurr77 en hibridomas de células T (Chan et al., 1995; Ruas and Peters, 1998). Por lo tanto, la inducción de p19 mediada por UV podría disminuir la apoptosis secuestrando Nurr77 y bloqueando su efecto proapoptótico.

Por otro lado, se ha observado que, tanto proteínas dominantes negativas de CDK4 y CDK6, como los CKIs p16 y p27 protegen neuronas corticales de apoptosis inducida por el daño en el DNA, sugiriendo que las correspondientes CDKs endógenas estarían elevadas en las neuronas apoptóticas debido a la expresión inducida de la ciclina D1 (Park et al., 1998). En este caso p19 podría interactuar con CDK4 y 6 y bloquear su incrementada actividad, contrarrestando las señales apoptóticas. Sin embargo, la inducción de la ciclina D1 luego del daño al DNA parece no ser una respuesta totalmente generalizada ya que otros autores han reportado un nivel de ciclina D1 disminuido en varias líneas celulares que habían sido expuestas a una variedad de genotóxicos, incluyendo la luz UV (Shapiro et al., 1998).

Finalmente, p19 podría ejercer su efecto directamente en la reparación del DNA, aumentando la eficiencia de los mecanismos implicados en la remoción de los daños, y en consecuencia, disminuir el número de células en las que se dispara la apoptosis.

Nuestros resultados apoyan fuertemente la última hipótesis, ya que la sobreexpresión de p19 en células de neuroblastoma mejora la reparación del daño en el DNA inducido por diversos agentes genotóxicos, y además, células transitoriamente carentes de p19 fueron deficientes a la hora de contrarrestar el daño. Como hemos mencionado, NER es el mecanismo de reparación del DNA responsable de la remoción de los aductos de DNA producidos por la luz UV, cisplatino y por ciertos carcinógenos ambientales (Friedberg, 2001; Sancar et al., 2004). NER comprende dos vías: reparación acoplada a transcripción (TCR), generalmente la más rápida de las dos y la cual remueve el daño en regiones transcribibles del genoma; y la reparación genómica global (GGR), la cual elimina el daño en el resto de la cromatina (Rubbi and Milner, 2003).

Nosotros medimos la capacidad de reparación del DNA de las células de neuroblastoma, mediante el ensayo de UDS. Al respecto, los resultados sugieren que p19 actuaría sobre todo el DNA dañado, ya que la detección con UDS es apropiada para cuantificar la síntesis por reparación luego del paso de escisión en todo el genoma de un mamífero, más que en un locus específico.

Los experimentos llevados a cabo con el inhibidor de NER F11782 proveen sustento adicional para considerar la reparación del DNA como el blanco de acción principal del efecto de p19. F11782 es un nuevo inhibidor dual de las topoisomerasas I y II que fue identificado como un potente inhibidor de NER, principalmente en el paso de incisión, más que en el paso de síntesis reparativa (Barret et al., 2002). En tales experimentos, la inhibición de NER causó un gran incremento en la apoptosis inducida por

UV, aún en las células que sobreexpresan p19. Estos resultados son consistentes con un modelo que proponga que p19 protege a las células de neuroblastoma de sufrir muerte apoptótica como respuesta al daño con UV, permitiendo una reparación más eficiente del daño en el DNA.

Estudios recientes realizados en ratones knock-out para p19, demostraron que la falta de p19 incrementa la sensibilidad celular a la muerte apoptótica o autofágica y sugieren un posible rol de la inducción de p19 en la quimioprevención (Tavera-Mendoza et al., 2006a; Tavera-Mendoza et al., 2006b). Considerando su función como inhibidor del ciclo celular, en conjunto, nuestros resultados sugieren que p19 podría por sí mismo, tener un papel en la reparación del DNA, en los checkpoints del ciclo celular, o en la integración de la apoptosis y la reparación.

Entonces, de qué manera p19 mejora la reparación del DNA luego del daño con genotóxicos? Una explicación simple de estos hallazgos sería que, luego del daño, una cantidad elevada de p19 se une a CDK4 y CDK6 arrojando las células en G1, lo cual a su vez permitiría la reparación de la lesión de una forma más eficiente. Con respecto a esto, p16 ha sido implicada en un checkpoint de arresto en G1 en respuesta al daño en el DNA (Shapiro et al., 1998). Sin embargo, nuestros datos indican que este no es el mismo caso. Los experimentos que utilizan CDK4 salvaje y mutante R24C demuestran que el incremento en la reparación en las células que sobreexpresan p19 fue observado en presencia de una CDK4 constitutivamente activa que no une p19. Por lo tanto, estos resultados suponen un rol de p19 independiente de CDK4, no relacionado con su función antiproliferativa. Los resultados obtenidos en células Saos-2, deficientes en Rb, otorgan un aval adicional a esta interpretación. En estas células, así como en SH-SY5Y, la sobreexpresión de p19 fue capaz de mejorar la reparación del DNA y disminuir la apoptosis. Sin embargo, en células Saos-2 a diferencia de SH-SY5Y, p19 fue incapaz de detener la proliferación celular. Estos datos sustentan la idea de que el rol de p19 como regulador del ciclo celular está disociado de su función reparadora del DNA.

En humanos, dos sistemas son esenciales para mantener la integridad del genoma, la reparación del DNA y la apoptosis. Células que son deficientes en reparar el DNA tienden a acumular un exceso de daño. Células deficientes en apoptosis tienden a sobrevivir con exceso de daño en el DNA, que no puede ser reparado en su totalidad, causando mutaciones que llevan a la carcinogénesis.

Aparentemente, las proteínas clave que contribuyen a la supervivencia celular actuando sobre la reparación del DNA se tornan ejecutoras en la fase de excesivo daño en

el DNA. El mantenimiento de un mecanismo que permita a la célula alternar entre la reparación y la apoptosis, como es apropiado en el caso de daño excesivo, parece tener central importancia evitando la progresión hacia el cáncer. El mecanismo apoptótico basal evita la expansión clonal de células en las cuales la acumulación del daño no reparado llevaría a la mutación y a la carcinogénesis.

Por lo tanto, debe existir un compromiso entre la ventana de tiempo para permitir una reparación apropiada y para disparar los mecanismos de muerte celular para evitar un aumento en la carga de mutaciones que causan inestabilidad genómica (Bernstein et al., 2002; Lengauer et al., 1998). Esto es particularmente cierto en neuronas postmitóticas del sistema nervioso central, donde la muerte celular causa una pérdida irremplazable. Además, la muerte neuronal puede ocurrir anormalmente, en tiempo, causa o magnitud. Esto tiene, obviamente particular importancia cuando concierne el sistema nervioso humano, donde se observa una muerte celular extensiva en enfermedades neurodegenerativas o luego de una apoplejía o trauma cerebral (Connor and Dragunow, 1998; Yuan and Yankner, 2000).

En este escenario, la acción de proteínas que permitan una respuesta más robusta frente al daño en el DNA, y en consecuencia impidan una apoptosis excesiva es altamente deseable. La habilidad de p19 para mantener la integridad genómica se ajustaría a esta premisa. El hecho de que el sistema nervioso central es un tejido donde p19 tiene una expresión relativamente importante y que existe alto nivel de p19 en neuronas en desarrollo y en neuronas postmitóticas adultas correlaciona directamente con esto.

Con ensayos clonogénicos y de supervivencia celular, observamos que p19 influencia la sensibilidad celular a largo plazo y confiere resistencia al estrés genotóxico.

En resumen, demostramos que como respuesta a la irradiación con UV y al tratamiento con otros agentes genotóxicos, la expresión del gen de p19 es aumentada en células de neuroblastoma y translocada al núcleo. El nivel de p19 elevado mejora la reparación del DNA. Estos eventos van acompañados por la disminución de la apoptosis inducida por genotóxicos, y en conjunto estos efectos promueven la supervivencia celular. El trabajo describe un nuevo rol para p19, como colaborador de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica de una forma que es independiente de su habilidad de inhibir CDK4 y 6. Proponemos que p19 pertenecería a una red proteica que integraría la reparación del DNA, la apoptosis y los checkpoints para mantener la integridad genómica. Si esto es así, la carencia de p19 funcional tendría claras implicancias en el desarrollo de tumores, ya que una capacidad celular reducida de reparar

el DNA podría resultar en una carga de mutaciones elevada que, en circunstancias apropiadas, llevarían a la transformación neoplásica. Actualmente, estamos llevando a cabo estudios para determinar el rol preciso de p19 en la reparación del DNA y los mecanismos que regulan su expresión génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Cultivo de líneas celulares.

Medios de cultivo. La línea celular derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y fue cultivada en botellas T 25 y T 75 (TRP) y mantenida en medio D-MEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 45%, Ham F12 45% (GIBCO) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/L, penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 µg/ml, a 37 °C y en atmósfera de aire con 5% de CO₂. La línea celular fibroblástica BHK- 21 proveniente de riñón de hamster (*Mesocricetus auratus*) y la línea derivada de osteosarcoma humano Saos-2 fueron cultivadas en placas de 100 mm y mantenidas en medio D-MEM (GIBCO) suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/L, penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 µg/ml, a 37 °C y en atmósfera de aire con 5% de CO₂.

Tripsinización. Una vez que las células formaron una monocapa, el medio de cultivo fue aspirado y descartado, las células se lavaron una vez con PBS (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, y 0,24 g de KH₂PO₄ en 1 litro de agua bidestilada, pH 7,4) para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero y luego se agregó a cada placa o botella 1,5 ml de solución de tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM (GIBCO). Se incubaron a temperatura ambiente (o a 37 °C) hasta observar en el microscopio que las células se despegaron. Luego fueron resuspendidas en medio fresco, se determinó el número y la viabilidad celular como se indica más abajo y se plaqueó a una densidad de 2,0 x 10⁴ células/ cm² en botellas T 25 o T 75 o en placas de 100 mm de diámetro.

Las células SH- SY5Y crecen como una mezcla de células adherentes y flotantes formando “clusters” de células neuroblásticas con múltiples procesos celulares, finos y cortos (neuritas). Las células pueden agregarse formando “clumps” y flotar. Por lo tanto, en el momento de tripsinizar esta línea, es necesario remover el medio con las células flotantes y recuperarlas por centrifugación para luego combinarlas con las células tripsinizadas.

Determinación del número de células y su viabilidad. Para la determinación del número de células y su viabilidad se empleó el método de exclusión del azul tripán. Se colocaron 50 µl de la suspensión celular en 30 µl de medio y 20 µl de la solución de azul

tripán 4 % (azul tripán 400 mg, NaCl 810 mg, K₂HPO₄ 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg a pH 7,4, en PBS). Se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se efectuó el recuento celular (N) al microscopio óptico en los cuatro cuadrantes de la cámara entre los 5 y los 10 minutos luego del agregado del colorante. El número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Células/ ml} = (N/4) \times 1.000 \times 2 \times 10$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \times 100$$

Arresto del ciclo celular. Células de neuroblastoma SH-SY5Y creciendo exponencialmente fueron arrestadas en la fase G1 temprana mediante la incubación en medio con 0,5 % de suero durante 36 horas y fueron inducidas a retomar el ciclo celular en forma sincrónica mediante el agregado de 10 % de suero al medio de cultivo.

2- Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Preparación de los extractos. Aproximadamente 1×10^6 células fueron cosechadas con 1 ml de PBS conteniendo 10% SFB. Luego, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió suavemente en 100 µl de PBS, se pasó a otro tubo conteniendo 1 ml de metanol y se dejó a 4°C toda la noche. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS, se les agregó 200 µl de RNAsa A 0,2 mg/ml en PBS y se incubaron 30 minutos a 37°C. Luego se resuspendieron en 200 µl de PBS conteniendo ioduro de propidio 50 µg/ml. El contenido de DNA celular fue analizado en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.8.

3- Análisis de RNA por Northern blot.

Obtención de RNA total. El RNA total fue obtenido según el método descrito previamente (Chomczynski and Sacchi, 1987), levemente modificado. Partiendo de 2×10^6 células en placas de 6 cm de diámetro, se lavaron 1 vez con PBS frío, se agregaron 700 µl de solución desnaturalizante D (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH

7, N-laurilsarcosina 5 %, β -mercaptoetanol 0,1 M), se homogeneizaron con micropipeta y se trasvasaron a un tubo eppendorf. Todo el trabajo se realizó sobre hielo. Se agregaron luego 50 μ l de acetato de sodio 2 M pH 4.5, 400 μ l de fenol saturado en Tris pH 8.0 y 90 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 segundos con un vórtex y centrifugada durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. La fase superior acuosa, que contiene el RNA se trasvasó a otro tubo y el mismo fue precipitado agregando un volumen de isopropanol y dejándolo durante 1 hora a -20 °C. Se centrifugó luego a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 150 μ l de solución D. El RNA fue reprecipitado con 150 μ l de isopropanol centrifugándolo 20 minutos a 10.000 rpm. Se lavó 2 veces con etanol 75 % y se resuspendió en 22 μ l de agua estéril libre de RNasas.

La concentración del RNA se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm (1 OD₂₆₀ = 40 μ g de RNA) aceptando como criterio de pureza un cociente A₂₆₀/A₂₈₀ mayor que 1,7 (Sambrook et al, 1989).

Electroforesis de RNA. La separación electroforética del RNA total se realizó según una adaptación del método descrito por (McMaster and Carmichael, 1977). Las muestras de RNA (20 μ g) se desnaturalizaron a 50 °C durante 60 minutos en una mezcla conteniendo glioxal 1,2 M, DMSO 7,5 M, fosfato de sodio 10 mM pH 7. Luego, las muestras fueron tratadas con el buffer de siembra (glicerol 50 %, fosfato de sodio 10 mM pH 7, azul de bromofenol 0,25 % y xilene cianol FF 0,25 %) y sembradas en gel de agarosa 1 % en buffer fosfato 10 mM. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 2-3 horas a 100 mV en buffer fosfato de sodio 10 mM.

Transferencia de RNA a membrana. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue sometido a transferencia pasiva a una membrana de nylon (Hybond-N+ Amersham) según lo descrito por Sambrook y col (1989). Dicha membrana fue humedecida previamente durante 45 minutos en SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7). La transferencia se realizó por capilaridad ascendente en una solución de SSC 20X durante 16 horas. Luego el filtro de nylon se secó entre papeles Whatman 3 MM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se colocó en estufa a 80 °C durante 1 hora para que el RNA se fije irreversiblemente al nylon.

Marcación de sondas.

p19. Con la finalidad de detectar el mRNA de p19INK4d se sintetizó un oligonucleótido de 24 bases complementario a las bases +3 a +26 del mRNA de p19INK4d humano (Newton Bishop et al., 1999) cuya secuencia es: 5'-GGC GCG AAC CTC CTC CAG CAG CAT -3'.

El oligonucleótido fue marcado radioactivamente en su extremo 5' con la enzima T₄ polinucleótido quinasa. Se preparó la mezcla de reacción conteniendo 5 pmoles de oligonucleótido, el buffer de reacción, 5 U de T₄ polinucleótido quinasa (Invitrogen), 100 μ Ci de [γ -³²P]ATP (6.000 Ci/mmol), en un volumen total de 30 μ l. Esta preparación se incubó 1 hora a 37 ° C. La sonda marcada fue purificada, para eliminar el nucleótido radioactivo no incorporado, mediante dos precipitaciones sucesivas con 1/10 del volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado fue lavado con etanol 70% y resuspendido en 100 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas poseían una actividad específica aproximada de 4-6 x 10³ cpm/fmol.

β -tubulina. Los resultados de los ensayos de Northern blot fueron normalizados con los valores de los niveles de mRNA de β -tubulina detectados en paralelo. Se eligió el gen de la β -tubulina por ser un gen de expresión constitutiva, no afectado por las fases del ciclo celular. Para detectar el mRNA de β -tubulina se empleó como molde el cDNA de β -tubulina de pollo escindido del plásmido pBR322 β -tubulina (cedido por el Dr. J. Messina; Universidad de South Florida, Florida, EEUU) por digestión con la enzima Hind III. El cDNA se marcó radioactivamente por la técnica de hibridización con hexaoligonucleótidos de secuencia al azar (“random primers”). Se mezclaron 40 ng del DNA molde, previamente desnaturalizado 5 minutos a 95°C, buffer de reacción correspondiente, 2 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli*, 0,25 DO de la mezcla de hexaoligonucleótidos de secuencia al azar, dATP, dTTP, dGTP a una concentración 500 μ M cada uno y [α -³²P]dCTP 10 μ Ci/ μ l, (3.000 Ci/mmol). La mezcla de reacción fue incubada a 25 °C deteniéndose luego de 1 hora con “stop buffer” (Tris 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y SDS 0,5 %). La sonda fue precipitada con 1/10 del volumen

de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hora a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos, se lavó el precipitado con etanol 70 % y se resuspendió en 100 µl de buffer TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas así obtenidas poseían una actividad específica aproximada de $5-7 \times 10^3$ cpm/fmol.

Para detectar el mRNA de p16^{ink4a}, p15^{ink4b}, p18^{ink4c}, p21^{CIP1}, Ciclina D1, CDK4 y G3PDH, se utilizaron como sondas, los cDNA correspondientes marcados con [α -³²P]dCTP con el método de “random primers” de manera similar a la descrita para β -tubulina.

Hibridización. Las membranas de nylon conteniendo el RNA fijado por calor fueron prehibridizadas en una solución bloqueante. Para detectar el mRNA de p19 la prehibridización se llevó a cabo en una solución conteniendo SSC 6X, SDS 0,1 %, Denhardt 2X (polivinilpirrolidona 0,04 %, Ficoll 0,04 %, seroalbúmina bovina 0,04 %) y DNA de esperma de salmón 100 µg/ml durante 2 horas a 68 °C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente, la sonda para p19 fue agregada a la solución y la hibridización se completó a 68 °C por 16 horas más. Finalizado este procedimiento, las membranas fueron lavadas 3 veces a temperatura ambiente con SSC 1X y SDS 1% durante 2 minutos y tres veces a 68 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1 % durante 2 minutos.

Para detectar los mRNA de β -tubulina, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p21^{CIP1}, Ciclina D1, CDK4 y G3PDH, la prehibridización se llevó a cabo en una solución bloqueante (SSC 6X, SDS 1%, Denhardt 2X, y DNA de esperma de salmón 100 µg/ml) durante 2 horas a 68 °C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente se agregaron las sondas correspondientes y se completó la hibridización a 68 °C por 16 horas más. Finalizado este procedimiento, las membranas fueron sometidas a dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0,1 % durante 15 minutos y dos lavados a 68°C con SSC 0,2X y SDS 0,1 % durante 15 minutos.

Autorradiografía y cuantificación. Las membranas lavadas se secaron entre papel Whatman 3MM por 30 minutos, se envolvieron con nylon impermeable y se expusieron en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente entre 24 y 72 horas. Luego de escanear las pantallas en un analizador de imágenes Bio-

Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II, las imágenes resultantes se cuantificaron con el programa ImageQuant, Amersham Biosciences.

4- Análisis de proteínas por Western Blot.

Preparación del lisado celular total. Aproximadamente $2-3 \times 10^6$ células, se lavaron una vez con PBS frío, se pasaron a un eppendorf con 1 ml de PBS, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. El lisado celular total fue preparado con 100 μ l de buffer de precipitación de complejos inmunes RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS) conteniendo inhibidores de proteasas frescos (100 μ g/ml PMSF, 60 μ g/ml aprotinina y 1 mM ortovanadato de sodio). Luego de homogeneizar las células con el tip, se dejaron en hielo 30 minutos. Se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos para remover los restos celulares y se guardó una alícuota del sobrenadante para cuantificar proteínas por el método de Bradford.

Inmunoprecipitación de p19. Debido a que la cantidad absoluta de p19INK4d en la célula es baja decidimos inmunoprecipitar la proteína presente en cada muestra para concentrarla y disminuir el fondo inespecífico del lisado celular. A 100 μ g de proteínas del lisado se las sometió a inmunoprecipitación con 1 μ g de un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-p19 humana (Santa Cruz sc-1063), incubando la mezcla durante 1 hora a 4 °C. Luego se agregaron 20 μ l de una solución de bolitas de agarosa acopladas a proteína A/G (Santa Cruz sc-2003) y se dejó toda la noche a 4 °C, con rotación. Los complejos inmunes se recuperaron por centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó 4 veces con PBS y luego se resuspendió en 25 μ l de buffer de siembra 1X (50mM Tris- HCl pH 6.8, 100mM betamercaptoetanol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol).

p53, CDK4 y β -actina. Para analizar las proteínas p53, CDK4 y β -actina se utilizaron 20 μ g de proteínas del lisado celular total (ver preparación más arriba) al que se le agregó un volumen igual de buffer de siembra 2X.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA). En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de PAA en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970).

Utilizamos el sistema vertical de Bio-Rad. El gel separador (inferior) se preparó al 12% (1,6 ml de agua destilada estéril, 2 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 1,3 ml de Tris 1,5 M pH 8,8, 50 µl de SDS 10%, 50 µl de persulfato de amonio 10% y 2 µl de TEMED) y el gel concentrador (superior) se preparó al 5% (1,4 ml de agua destilada estéril, 0,33 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,25 ml de Tris 1 M pH 6,8, 20 µl de SDS 10%, 20 µl de persulfato de amonio 10% y 2 µl de TEMED). Las muestras, con el buffer de siembra se hirvieron 3 minutos y se removió la proteína A/G por centrifugación a 10.000 rpm por 20 segundos antes de sembrarlas en el gel. En un pocillo se sembraron 5 µl del marcador de peso molecular (NEB, P7708S). Luego se realizó la electroforesis, a 150 V, en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Tris base 25mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel separador.

Transferencia a membrana. Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de nitrocelulosa (Burnette, 1981). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un trozo de nitrocelulosa del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3MM previamente humedecidos en buffer de transferencia 1X (Tris-glicina 1X, SDS 0,01%, metanol 20%) y estos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en el tanque electroforético, con buffer de transferencia 1X, con el filtro de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 200V, durante 90 minutos.

Detección de proteínas. Luego de la transferencia, se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo, 0,02% Tween 20 en PBS) entre 4-16 horas a temperatura ambiente para reducir los sitios potenciales de unión de proteínas irrelevantes. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó 3 veces con 0,02% Tween 20 en PBS, durante 5 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) diluido en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó igual que antes y se agregó un lavado con PBS. Para visualizar las proteínas de interés se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia

de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyser Fujifilm LAS-1000. Como control de carga del gel se utilizó tanto la detección de la proteína de expresión constitutiva β -actina así como la técnica de tinción de un gel de proteínas corrido en paralelo con el colorante Coomassie Blue.

Anticuerpos primarios: polyclonal rabbit anti-p19, sc-1063, dil (1: 500); polyclonal rabbit anti-p53, Novocastra NCL-p53-CM1 dil (1: 100); polyclonal rabbit anti-CDK4, sc-260 dil (1: 400), rabbit anti- β -actina H-196, sc-7210 dil (1: 500).

Anticuerpos secundarios: goat anti- rabbit conjugado con HRP, sc-2004, dil (1: 5000).

5- Agentes genotóxicos.

Irradiación ultravioleta. Células en crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 35 mm a 60% de confluencia. Veinticuatro más tarde, se removió el medio y las células fueron irradiadas en placas abiertas con 8mJ/cm² de luz UVC, de 254 nm (rango 240-280) a temperatura ambiente con una lámpara Philips TUV15WG15T8 calibrada para otorgar 0,25 mJ/cm².seg. Luego de la exposición, el medio fue readicionado y las células incubadas en estufa a 37 °C con 5% CO₂ durante los tiempos indicados en cada caso. Células control fueron tratadas idénticamente excepto por la exposición a la luz UV.

Cis-platino y péptido β - amiloide . Células en crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 35 mm a 60% de confluencia en medio completo con 10% SFB. Veinticuatro horas más tarde el medio fue reemplazado por medio fresco conteniendo cisplatino 20 μ M final o péptido β - amiloide 20 μ M y las células fueron incubadas en estufa a 37 °C con 5% CO₂ durante los tiempos indicados en cada caso antes de realizar las distintas determinaciones. Células control fueron tratadas idénticamente sin agregar al medio fresco los dañadores

6- Análisis de la estabilidad proteica. Ensayo de *Pulse- Chase* con ³⁵S- metionina.

Marcación metabólica con ³⁵S- metionina. Células BHK21 fueron sembradas en placas de 60 mm a 70% de confluencia con medio completo suplementado con 10% de SFB. Una vez que las mismas estaban adheridas, se aspiró el medio y las células se lavaron

1 vez con PBS y 2 veces con medio completo libre de metionina. Se agregaron 3 ml de medio libre de metionina y se incubaron 15 minutos en estufa para eliminar el contenido de metionina intracelular. Luego se removió el medio y se agregaron 2 ml de medio libre de metionina con 50 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S - metionina (^{35}S L- metionina 1200 Ci/ mmol, Amersham Pharmacia). Se incubaron 2 horas en estufa a 37 °C y a continuación se removió el medio radioactivo y se lavaron con 5 ml de medio completo conteniendo metionina fría. Los cultivos fueron o no sometidos a irradiación con 8 mJ/cm^2 de luz UV y se les agregó 4 ml de medio completo (con metionina fría). Se incubaron en estufa y se tomaron muestras a distintos tiempos luego de la irradiación con UV.

Immunoprecipitación. Las células se lavaron 2 veces con PBS frío. Se centrifugaron a 1000 x g por 3 minutos y el pellet celular fue resuspendido en 200 μl de buffer RIPA frío. Se incubó 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y el volumen se completó a 250 μl con agua. Se agregaron 3 μl (1 μg) del anticuerpo primario obtenido en conejo anti-p19 (Santa Cruz sc-1063) y se incubó 90 minutos a 4 °C. Luego se agregaron 20 μl de Proteina A/G Plus-agarosa y se incubó toda la noche a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos en frío, el pellet se lavó 4 veces con PBS y se resuspendió en 30 μl de buffer de siembra 1X (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM betamercaptoetanol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol).

Electroforesis. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se sembraron en un gel de poliacrilamida 12% desnaturalizante y se corrieron a 105 V durante 5 horas (SDS-PAGE). El gel se secó y se expuso durante 5 días en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente. Luego de escanear la pantalla en un analizador de imágenes (Bio-Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II), las imágenes obtenidas se cuantificaron con el programa ImageQuant, Amersham Biosciences.

7- Estudio de la tasa de iniciación de la transcripción. Ensayo de “Run- on”.

Para cada tratamiento sembramos 56×10^6 células BHK21 o WI38 en placas de 10 cm a razón de 8×10^6 células/ placa. Al día siguiente el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco conteniendo o no el péptido β - amiloide 10 μM , o, antes del agregado del

medio las células se irradiaron con 8mJ/cm² de UV e incubamos en estufa a 37°C por 12 horas.

Aislamiento de núcleos. Luego del tratamiento, descartamos el medio de cultivo, lavamos las células dos veces con PBS frío y las cosechamos en dos tubos eppendorf (dos tubos por cada tratamiento) con 1 ml de PBS frío. Luego las centrifugamos durante 5 minutos a 1.500 rpm y resuspendimos ambos pellets celulares en un tubo con 1 ml de buffer de lisis (10mM Tris- HCl pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,14 M NaCl). Agregamos 4 µl de Nonidet P40 5% y dejamos reposar 10 minutos en hielo. Verificamos la ruptura celular , por observación de una alícuota al microscopio con azul tripán. Continuamos agregando alícuotas de 2 µl de Nonidet P40 hasta que la ruptura fuera mayor al 80%. Luego centrifugamos las muestras a 1.300 rpm por un minuto para recuperar los núcleos y descartamos el sobrenadante. Lavamos 2 veces con 1 ml de buffer de lavado frío (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 140mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 20% glicerol,14mM β-mercaptoetanol).

Radiomarcación del RNA nuclear. Descartamos todo el sobrenadante del lavado y resuspendimos los núcleos en 50 µl de buffer de marcado (es el buffer de lisis con el agregado de 1 mM ATP, GTP y CTP, 10 mM fosfocreatina, 100 µg/ml fosfocreatina quinasa, 0,34 µM [α -³²P] UTP (New England Nuclear, cat. BLU507H). Incubamos la mezcla de reacción 20 minutos a 30 °C con agitación y luego la centrifugamos a 800 x g durante 5 minutos. Descartamos el sobrenadante.

Obtención del RNA. Resuspendimos los núcleos en 150 µl de HSB frío (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0,5 M NaCl) y agregamos 3 µl de solución de DNasa (2 mg de DNasa en 1 ml de 0,0025 N HCl, 50% glicerol). Pipeteamos varias veces para reducir la viscosidad y agregamos 300 µl de buffer de detención (50 mM Tris- HCl pH 7,5 20 mM EDTA pH 8.0, 0,8 % SDS). Agregamos proteinasa K (solución 20 mg/ml en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, 1,5 mM acetato de calcio) a concentración final 100 µg/ml (45 µg) e incubamos 30 minutos a 42 °C. Luego, agregamos 450 µl de fenol/agua, incubamos 15 minutos a 65 °C vortexeando cada 5 minutos, agregamos 450 µl de cloroformo/alcohol isoamilico (CHISAM), mezclamos con vórtex y centrifugamos a 2000 x g por 5 minutos, descartando la fase orgánica. La extracción se repitió con 450 µl de CHISAM. Centrifugamos y transferimos la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Adicionamos 45

µl de LiCl 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Mezclamos, centrifugamos 10 minutos a 12.000 x g y resuspendimos el pellet en 0,4 ml de agua destilada. Hicimos una segunda precipitación con 40 µl de LiCl 5 M y 2,5 volúmenes de etanol. Resuspendimos el pellet de RNA en 100 µl de agua y con una alícuota de 2 µl medimos la actividad de la preparación en un contador de centelleo líquido.

Preparación de sondas de cDNAs. Para cada tratamiento se requieren 10 µg de los plásmidos linealizados que contengan los cDNA de los genes a estudiar para ser utilizados como sondas frías.

Los plásmidos fueron linealizados y luego purificados mediante precipitación con dos volúmenes de etanol y un décimo del volumen de acetato de amonio 3M, resuspendimos cada vector en 20 µl de solución desnaturizante (NaCl 2 M, NaOH 0,1 M) y los hervimos por 2 minutos. Les agregamos 180 µl de SSC 6X. A continuación cortamos un trozo de una membrana de nylon (Hybond +, Amersham) del mismo tamaño que el dispositivo para realizar un slot blot. La humedecemos en agua y luego en SSC 6X por 10 minutos. Colocamos la misma en el dispositivo y aplicamos vacío. Añadimos los cDNAs desnaturizados y luego lavamos con 200 µl de SSC 6X. Secamos la membrana al aire y luego la cocinamos durante 1 hora a 80 °C.

Hibridización. Incubamos la membrana que contiene las sondas fijadas en solución de prehibridización (6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% w/v SDS, 1 µg/ml PolyA, 100 µg/ml DNA esperma de salmón) durante 6 horas a 68 °C. Agregamos la muestra de RNA marcado con [α -³²P] UTP e incubamos las membranas 72 horas más. Luego la membrana fue sometida a dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0,1% durante 15 minutos y dos lavados a 68 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1% durante 15 minutos y se expuso en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente 72 horas. Luego de escanear las pantallas en un analizador de imágenes Bio- Imaging Analyzer Fujifilm BAS- 1800II, las imágenes resultantes se cuantificaron con el programa ImageQuant, Amersham Biosciences.

8- Inmunocitoquímica. Determinación de la localización subcelular de p19ink4d.

Células SHSY-5Y creciendo exponencialmente fueron sembradas sobre un cubreobjetos de vidrio a 40% de confluencia y dejadas en reposo 24 horas para permitir la adherencia al

mismo antes de irradiarlas con 8 mJ/cm² UVC. En los tiempos indicados las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces con PBS las células fueron permeabilizadas con 0,1% Triton X-100 en PBS por 10 minutos, lavadas e incubadas por 30 minutos con 3% seroalbúmina bovina (BSA), 10% FCS en PBS. Luego las células fueron lavadas una vez e incubadas con anticuerpo policlonal anti-p19 (Santa Cruz, sc-1063) diluido 1:200 en buffer del anticuerpo (3% BSA en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y una vez con solución de lavado (50 mM Tris-HCL, pH 7,2; 100 mM NaCl, 0,2% Tween 20) antes de incubarlas durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, obtenido en cabra conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz) diluido 1:200 en el buffer del anticuerpo a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de lavar dos veces con PBS y dos veces con solución de lavado, los núcleos fueron teñidos con Hoescht 33258 (3 µg/ml final en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente las células fueron montadas con Mowiol 4-88 (Calbiochem). Los preparados fueron observados con un microscopio invertido IX70 Olympus Fluoview y las imágenes adquiridas con una cámara digital Zeiss AxioCam, operada bajo el programa AxioVision 3.1.

9- Preparación de plásmidos

Obtención de bacterias competentes. Las bacterias competentes se prepararon según una variante del método de Cohen (Cohen et al., 1972), descrita por Sambrook y Russell (Sambrook et al., 2001). Brevemente, se inocularon 2 ml de medio LB líquido (extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, NaCl 5 g, agua c.s.p 1 litro) con bacterias *Escherichia coli*, cepa DH5α e incubaron con agitación constante a 37 °C, durante toda la noche. Luego se diluyó el cultivo a 50 ml con medio LB y se incubó a 37 °C con agitación, hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0,35-0,4$). Se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en 10 ml de CaCl₂ 60 mM frío y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 5.000 x g y el pellet celular se resuspendió en una solución de CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%. Las bacterias competentes se alicuotaron y almacenaron a -70 °C.

Transformación de bacterias competentes. Una pequeña cantidad de DNA plasmídico (50-100 ng) se incubó con 50-100 μ l de bacterias en hielo durante 45 minutos. A continuación las bacterias fueron sometidas a un *shock* térmico a 42 °C durante 2 minutos, seguido de un enfriamiento rápido en baño de agua con hielo. Luego se agregó LB hasta completar un volumen de 1 ml y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en 50 μ l de sobrenadante. Se sembraron en placas de Petri con LB agar 1,5% con ampicilina (100 μ g/ml). Se incubaron 16 horas en estufa a 37 °C.

Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep). Se empleó el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). Las bacterias transformadas con el plásmido de interés fueron inoculadas en 2 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Luego de centrifugarlas, se resuspendieron en 150 μ l de Solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Se les agregó 200 μ l de Solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) para lissarlas y desnaturalizar el DNA. Se neutralizó con 150 μ l de Solución III (acetato de potasio 3 M, pH 5,2) y se centrifugó 5 minutos a 10.000 x g para precipitar el DNA genómico. El DNA plasmídico presente en la fase acuosa se precipitó al disminuir la polaridad del medio por el agregado de dos volúmenes de etanol absoluto. Luego de 20 minutos a -20 °C se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos y el pellet se lavó con etanol 75 %. Luego se resuspendió en 20 μ l de agua destilada o buffer TE.

Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep). Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de maxipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 500 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas durante 16 horas. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron preparaciones de concentración 0,7- 1 μ g/ml.

Análisis de las preparaciones plasmídicas. Con el objeto de determinar la concentración y calidad de las preparaciones, las mismas fueron sometidas a electroforesis en gel agarosa 0,8- 1% en buffer TAE (Tris- acético 0,4 M, EDTA 1 mM) conteniendo 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 6X (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%), sometidas a electroforesis a voltaje constante

(5 V/cm) y visualizadas por transiluminación con luz UV. Paralelamente, las preparaciones plasmídicas fueron cuantificadas espectrofotométricamente:

$DO_{260} = 1$ equivale 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA.

$DO_{260/280} > 1,5$ indica pureza aceptable (Sambrook et al., 1989).

10- Clonado del cDNA de p19^{ink4d} en el plásmido de expresión pSG5.

La secuencia codificante completa de p19 humana fue amplificada por PCR a partir de una biblioteca de cDNA de cerebro humana cedida generosamente por el Dr. Enzo Lalli (Estrasburgo, Francia) utilizando los oligonucleótidos (*primers*) apropiados diseñados con sitios de corte para las enzimas EcoRI y BamHI. El *primer forward*: 5'-GGGAATTCATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC-3', corresponde a los primeros 21 nucleótidos del cDNA de p19 y el *primer reverse*: 5'-GGGATCCTCACAGCGGGGCCACCATGTG-3' corresponde a los últimos 21 nucleótidos de la región codificante de p19. El plásmido de expresión pSG5p19 (p19 sentido) fue obtenido clonando el fragmento de PCR EcoRI – BamHI en el vector pSG5 en dichos sitios. El plásmido de expresión pSG5p19AS que contiene el cDNA de p19 antisentido (orientación 3'-5') fue obtenido con el mismo procedimiento utilizando 5'-GGG GATCCATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC-3' como *primer forward* y 5'-GGGAAT TCACAGCGGGGCCACCATGTG-3' como *primer reverse*. La fidelidad de los plásmidos generados fue analizada por secuenciación del DNA.

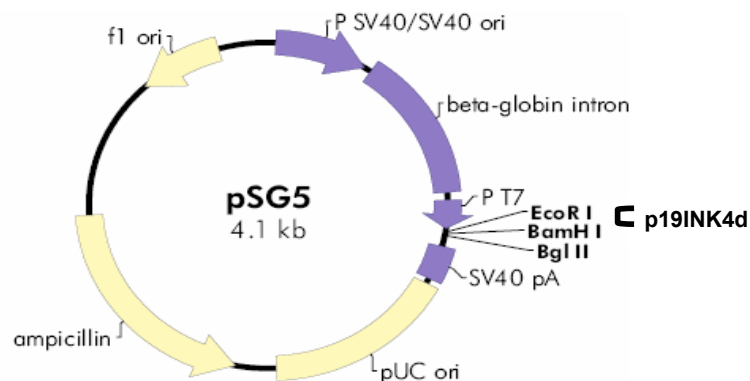


Figura 1. Vector de presión eucariota pSG5. El cDNA de p19^{INK4d} fue clonado entre los sitios únicos EcoR I y BamH I.

11- Transfección transitoria de células y selección.

Las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. En general, 1×10^6 células sembradas en pocillos de 3 cm fueron cotransfectadas con 2 μg de pSG5p19, pSG5p19AS o vector pSG5 vacío, junto con 0,5 μg de plásmido puroBABE que confiere resistencia al antibiótico puromicina. Cuando se indica, las células fueron transfectadas con 2 μg de pSG5p19 y 2 μg de vector de expresión para CDK4 wt o una mutante CDK4R24C (generosamente cedidos por Patrick O'Connor, Bethesda). Veinticuatro horas luego de la transfección se agregó al medio, el antibiótico puromicina (Sigma) 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y luego de 60 horas de selección, las células resistentes (transfectadas) fueron utilizadas en los distintos ensayos.

12- Actividad de la enzima caspasa-3.

Para determinar el nivel de apoptosis en las células luego del tratamiento con luz UV, uno de los ensayos utilizados es la medición de la actividad de la enzima caspasa-3. El ensayo fue realizado como está descrito previamente, con algunas modificaciones (Chen et al., 2005). Las células fueron cultivadas en pocillos de 3 cm a razón de 1×10^6 células/pocillo y fueron irradiadas o no, con 8 mJ/cm^2 de luz UVC, o tratadas con distintos agentes genotóxicos por 24 hs. Luego, fueron cosechadas y lavadas 1 vez con PBS y resuspendidas en 325 μl de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 μM digitonina, 500 μM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bisbenzamida, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina, y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina) en los tiempos indicados, incubadas 30 minutos a 37 °C y centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos. La actividad de caspasa-3 fue determinada con 150 μl del lisado celular utilizando 100 μM del sustrato sintético Ac- DEVD-pNA (Sigma) en buffer de reacción (100 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 5 mM ditiotreitól y 20% v/v glicerol) en un volumen final de 300 μl incubando la mezcla a 37 °C por 4 horas. La aparición de color amarillo, indicativo de la actividad de caspasa-3 fue cuantificada en espectrofotómetro a 405 nm. La actividad de caspasa-3 fue estimada como $A_{405\text{nm}}/\mu\text{g}$ proteína x hora.

13- Ensayo de fragmentación internucleosomal de DNA.

Las células fueron cultivadas en placas de 6 cm de diámetro a razón de 2×10^6 células/placa e irradiadas o no, con 8 mJ/cm^2 de luz UVC. Luego, fueron cosechadas en los tiempos indicados y lavadas 1 vez con PBS frío, centrifugadas a 5000 rpm por 2 minutos y resuspendidas en 100 μl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 20 mM EDTA pH 8,0, 0,5% v/v Triton X-100). Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue trasvasado a otro tubo eppendorf. Al pellet se le agregaron 100 μl de buffer de lisis. Ambas muestras fueron incubadas con RNAsa A (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1% SDS por dos horas a 56°C . Luego, se incubaron toda la noche con proteinasa K (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 37°C , se realizó la precipitación del DNA con 75 μl de 10 M acetato de amonio y 450 μl de etanol y las muestras se lavaron 1 vez con etanol 70%. Una alícuota de las muestras fue sembrada en un gel de agarosa 1,5% y el DNA fue visualizado por tinción con bromuro de etidio.

14- Síntesis de DNA no programada (UDS, *Unscheduled DNA Synthesis*).

Las células fueron sembradas en pocillos de 3 cm a razón de 1×10^6 células/pocillo con medio completo y se dejaron en reposo hasta que llegaron a 80-90% de confluencia. Luego fueron lavadas dos veces con PBS y el medio fue reemplazado por medio con 1% suero y libre de arginina (*medio UDS*). Luego de 24 horas se cambió el medio por *medio UDS* fresco por otras 36 hs. Bajo estas condiciones, determinamos que la síntesis de DNA semiconservativa es inhibida completamente. Las células fueron lavadas con PBS, irradiadas o no con 8 mJ/cm^2 de luz UV e incubadas nuevamente con *medio UDS* fresco y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidina. En los tiempos indicados, se determinó la incorporación de ^3H -timidina. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Luego fueron lisadas con 500 μl de 5% TCA por 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 50 μl de 1 M NaOH. La radioactividad incorporada fue cuantificada en un contador de centelleo. La reparación del DNA fue estimada como dpm/ μg de proteína.

15- Ensayo de reactivación en la célula huésped (HCR: *host cell reactivation assay*) .

La capacidad de una célula para reparar su DNA puede ser evaluada a través del método denominado *Host Cell Reactivation*. Esta técnica consiste en transfectar en una célula un plásmido que contiene el cDNA de un gen reportero bajo la regulación de un promotor fuerte, y que ha sido dañado con luz UV o con agentes químicos. La capacidad de la célula para reparar este DNA plasmídico se cuantifica mediante la expresión del gen reportero. De este modo, este ensayo permite medir la reactivación de la expresión del plásmido y relacionarla directamente con la capacidad de reparación de la célula huésped del DNA dañado. En nuestro trabajo se utilizó el plásmido pCMVCAT que contiene el promotor fuerte del citomegalovirus y el gen de la enzima cloramfenicol- acetiltransferasa (CAT) como reportero. Para este ensayo se utilizaron células BHK21.

Irradiación de plásmido. A efectos de evaluar la capacidad de reparación de las células BHK21 en condiciones basales, se realizó un experimento de transfección de plásmidos irradiados con UV, en un rango de energía entre 0 y 640 mJ/cm². Se colocó el plásmido a irradiar en placas de Petri de 6 cm colocadas sobre hielo, a una concentración de 100 µg/ml.

Transfección de células en cultivo. El día previo a la transfección, células BHK21 fueron tripsinizadas y sembradas en cajas de seis pocillos de 3 cm de diámetro a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en 2,5 ml de medio completo. Al día siguiente, y cuatro horas antes de la transfección, el medio fue reemplazado por medio fresco. El DNA plasmídico fue introducido en las células mediante el método de precipitación con fosfato de calcio (Chen and Okayama, 1988). Por cada pocillo a transfectar se preparó un tubo conteniendo 150 µl de HeBS 2X (Hepes 1% pH 7, NaCl 1,6%) y 3 µl de buffer fosfato (NaHPO₄ 0,06 M, NaH₂PO₄ 0,07 M). Por otro lado, se prepararon las distintas soluciones de plásmidos en 20 µl de CaCl₂ 2 M y H₂O c.s.p. 147 ml. Además del plásmido irradiado se cotransfectó un vector conteniendo el cDNA de la enzima β-galactosidasa como control de transfección. La cantidad final de DNA fue ajustada en todos los casos a 20 µg por pocillo, la que fue completada con cantidad necesaria de DNA “carrier” (DNA genómico de esperma de salmón). Las distintas preparaciones plasmídicas se agregaron lentamente a la solución de fosfato de sodio, mientras ésta se agitaba en forma continua con vórtex. Se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado

y se agregaron a cada pocillo 250 μ l de la correspondiente preparación de DNAs. Se dejó recuperar a las células en medio completo aproximadamente por 20 horas. Al cabo de este período, las células fueron lavadas con PBS y cultivadas con 2,5 ml de medio completo por los tiempos indicados. Luego se realizaron las distintas determinaciones.

Preparación de extractos celulares. Las células fueron lavadas 3 veces con 2 ml de PBS frío. Se agregó luego 1 ml de TEN frío (Tris 20 mM, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) para favorecer el despegado de las células. La monocapa celular fue levantada mediante el empleo de un “rastrillo de células” y cosechada en tubos eppendorf. Las células fueron centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado por aspiración y el pellet celular resuspendido en 200 μ l de buffer Tris 250 mM pH 7,5 conteniendo glicerol 15%. Las células fueron lisadas sometiéndolas a 3 ciclos consecutivos, de 5 minutos cada uno, de congelamiento y descongelamiento en baño de etanol/hielo seco y baño de agua a 37 °C respectivamente, agitando vigorosamente cada vez. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 1.000 x g 10 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante proteico se dividió en dos alícuotas para la posterior determinación de las actividades de β -galactosidasa y cloramfenicol acetiltransferasa.

Determinación de la actividad β -galactosidasa. La actividad de la enzima β -galactosidasa se determinó mediante un ensayo colorimétrico cuantificando el sustrato cromogénico liberado por hidrólisis enzimática. La reacción se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 50-65 μ l del extracto, 1 ml de buffer PM2 (Na₂ HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM y MgSO₄ 1 mM), 0,25 ml de una solución del sustrato ortonitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml en PM2 y 0,7 μ l de β -mercaptoetanol que se incubó a 37 °C hasta la aparición de color amarillo, aproximadamente luego de 3-4 horas. Se registró el tiempo de reacción y se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad específica de la enzima β -galactosidasa fue calculada según: $(A_{420nm} \text{ muestra} - A_{420nm} \text{ control})/\mu\text{l extracto} \times \text{hora}$.

Determinación de la actividad de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método descripto por Seed y Sheen (Seed and Sheen, 1988). El extracto celular fue previamente calentado a 65 °C durante 5 minutos, con el propósito de inactivar las acetilasas endógenas. Se enfrió inmediatamente en hielo y se centrifugó 15 minutos a 1.500 x g a 4 °C para eliminar las proteínas desnaturalizadas. El

ensayo fue realizado con 50 μ l de sobrenadante en una mezcla de reacción conteniendo Tris 100 mM pH 8, butiril-CoA 0,25 mg/ml y 200 nCi de 3 H-cloramfenicol (60 Ci/mmol, 0,01 mCi/ml) e incubando a 37 °C entre 90-120 minutos. A continuación se agregaron 200 μ l de xileno y luego de agitar vigorosamente, los incubados fueron centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos. Se separó la fase orgánica, la que fue sometida a una extracción reversa mediante el agregado de 200 μ l de H₂O. Luego de agitar y centrifugar bajo las mismas condiciones, la fase orgánica resultante, conteniendo los derivados butirilados de 3 H-cloramfenicol, fue colocada en viales con líquido centelleante a base de tolueno (PPO 0,4%, dimetil POPOP 0,05% en tolueno) y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad específica de CAT se determinó como (dpm pCMV-CAT – dpm control pBLCAT6)/ul x minuto). Las unidades CAT fueron normalizadas contra las unidades β -galactosidasa, para ajustar los resultados de acuerdo con la eficiencia de transfección en cada caso.

16- Incorporación de 3 H-timidina.

Las células se sembraron en pocillos de 3 cm a razón de 2×10^5 células pocillo con medio completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Inmediatamente luego del tratamiento correspondiente, las células fueron incubadas con 1 μ Ci/ml 3 H-timidina (81 Ci/mmol; Amersham Biosciences) durante 6 horas a 37 °C, lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Luego fueron lisadas con 500 μ l de 5% TCA por 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 50 μ l de 1 M NaOH durante 1 hora. La radioactividad incorporada fue cuantificada en un contador de centelleo. La reparación del DNA fue estimada como dpm/ μ g de proteína.

17- Generación de líneas celulares estables para p19INK4d.

Las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante como está descripto en el punto 12. Células BHK21, plaqueadas en pocillos de 3 cm para llegar a 90% de confluencia en el momento de la transfección fueron transfectadas con 2 μ g de plásmido de expresión pMTCB (vacío), ó pMTCBp19 ó pMTCBp19AS que expresan la proteína p19INK4d

salvaje y la secuencia antisentido respectivamente, río abajo del promotor del gen de la metalotioneína, inducible con zinc. Además, el vector pMTCB confiere a las células resistencia al antibiótico geneticina (G418). Cuarenta y ocho horas luego de la transfección, las células fueron tripsinizadas, diluídas y sembradas en placas de 10 cm con medio fresco conteniendo 200 µg/ml de geneticina (Sigma). La presión de selección se mantuvo durante 2 semanas cambiando el medio cada 4 días. Los clones de células resistentes fueron aislados y crecidos hasta tener una cantidad de células suficiente para analizar la expresión (incremento o inhibición, según el caso) del gen de p19 mediante northern blot, en ausencia o en presencia de zinc.

18- Ensayo de MTT: estimación de viabilidad celular.

La viabilidad celular fue estimada con el ensayo de bromuro de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Los clones de células SHSY-5Y estables para p19 sentido o p19 antisentido se sembraron en pocillos de 3 cm a razón de 2×10^5 células/pocillo con medio completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino y se incubaron 24 horas. Las células fueron tratadas con las dosis indicadas de luz UV y la supervivencia celular fue evaluada en los diferentes tiempos reemplazando el medio de cultivo con 1 ml de medio fresco conteniendo MTT (Sigma) 1mg/ml, e incubando las células otras 4-6 horas. El medio y el MTT fueron removidos y se agregaron 500 µl de isopropanol para disolver el precipitado de MTT reducido. Las placas fueron agitadas 15 minutos y la absorbancia en el solvente fue determinada a 570 nm. El blanco fue calculado utilizando mediciones a dos longitudes de onda a 570 y 650 nm. Se incluyeron controles de células no tratadas y de medio solo. En paralelo, se determinó el número de células viables por conteo en cámara de Neubauer con el colorante azul de tripán descripto previamente.

19- Ensayo clonogénico.

Luego de irradiar con UV células SHSY-5Y estables para p19 sentido o p19 antisentido se determinó la supervivencia celular con un ensayo clonogénico. Las células fueron sembradas diluídas para obtener clones aislados (aprox. 1000 células /placa de 10 cm) y fueron irradiadas con 8 mJ/ cm² de UV luego de inducir el promotor de MT durante 6 horas con 75 mM ZnCl₂. Veinticuatro horas más tarde se cambió el medio por medio fresco libre de ZnCl₂. Las células fueron incubadas 7 días seguido de una fijación con

formaldehído al 10%, tinción con el colorante cristal violeta (5 mg/ml en etanol) y cuantificación de los clones supervivientes. Las colonias que contenían más de 50 células fueron consideradas como derivadas de células clonógicamente activas.

REFERENCIAS

- Adams, P. D. (2001). Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* *1471*, M123-133.
- Al-Mohanna, M. A., Manogaran, P. S., Al-Mukhalafi, Z., K, A. A.-H., 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.
- Alt, J. R., Cleveland, J. L., Hannink, M., and Diehl, J. A. (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* *14*, 3102-3114.
- 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.
- Barret, J. M., Cadou, M., and Hill, B. T. (2002). Inhibition of nucleotide excision repair and sensitisation of cells to DNA cross-linking anticancer drugs by F 11782, a novel fluorinated epipodophylloid. *Biochem Pharmacol* *63*, 251-258.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 792-804.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* *3*, 421-429.
- Batty, D. P., and Wood, R. D. (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* *241*, 193-204.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., and Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* *511*, 145-178.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-1523.
- 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.
- Bruner, S. D., Norman, D. P., and Verdine, G. L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* *403*, 859-866.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* *276*, 42462-42467.

- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* *112*, 195-203.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* *131*, 1-87.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *69*, 2110-2114.
- Connor, B., and Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* *27*, 1-39.
- Cunningham, J. J., and Roussel, M. F. (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ* *12*, 387-396.
- 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.
- Chen, C. A., and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* *6*, 632-638.
- Chen, Y. C., Shen, S. C., and Tsai, S. H. (2005). Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* *1743*, 291-304.
- 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.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., and Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.
- Chipuk, J. E., Maurer, U., Green, D. R., and Schuler, M. (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* *4*, 371-381.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- D'Andrea, A. D., and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* *3*, 23-34.

- Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205-219.
- Dash, B. C., and El-Deiry, W. S. (2004). Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol* *280*, 99-161.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* *13*, 768-785.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* *12*, 3499-3511.
- Dingwall, C., and Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* *16*, 478-481.
- Dip, R., Camenisch, U., and Naegeli, H. (2004). Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* *3*, 1409-1423.
- Donzelli, M., and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* *4*, 671-677.
- Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 676-684.
- Fan, C., Yang, J., and Engelhardt, J. F. (2002). Temporal pattern of NFkappaB activation influences apoptotic cell fate in a stimuli-dependent fashion. *J Cell Sci* *115*, 4843-4853.
- Foster, S. A., Wong, D. J., Barrett, M. T., and Galloway, D. A. (1998). Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol* *18*, 1793-1801.
- 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.
- Friedberg, E. C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 22-33.
- Goodman, M. F., and Toppin, B. (2000). The expanding polymerase universe. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 101-109.

- Goukassian, D. A., Eller, M. S., Yaar, M., and Gilchrest, B. A. (1999). Thymidine dinucleotide mimics the effect of solar simulated irradiation on p53 and p53-regulated proteins. *J Invest Dermatol* *112*, 25-31.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., and Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* *8*, 2939-2952.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., O'Keefe, C. L., Noh, S., Wu, X., Zariwala, M., Matera, A. G., and Xiong, Y. (1996). Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* *7*, 57-70.
- Haber, J. E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* *16*, 259-264.
- Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* *2*, 331-341.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* *371*, 257-261.
- Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1996). Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* *6*, 56-64.
- Hengst, L., and Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* *227*, 25-41.
- 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.
- Hiyama, H., and Reeves, S. A. (1999). Role for cyclin D1 in UVC-induced and p53-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* *6*, 565-569.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* *411*, 366-374.
- Hosoi, G., Hara, J., Okamura, T., Osugi, Y., Ishihara, S., Fukuzawa, M., Okada, A., Okada, S., and Tawa, A. (1994). Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* *73*, 3087-3093.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* *2*, 277-288.

- Jabbur, J. R., Huang, P., and Zhang, W. (2000). DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene* *19*, 6203-6208.
- Jinno, S., Hung, S. C., Yamamoto, H., Lin, J., Nagata, A., and Okayama, H. (1999). Oncogenic stimulation recruits cyclin-dependent kinase in the cell cycle start in rat fibroblast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13197-13202.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* *108*, 153-164.
- Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., 3rd, Johnson, B. E., and Skolnick, M. H. (1994a). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* *264*, 436-440.
- Kamb, A., Shattuck-Eidens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N. A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., Weaver-Feldhaus, J., and et al. (1994b). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* *8*, 23-26.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.
- Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* *27*, 247-254.
- Khanna, K. K., Lavin, M. F., Jackson, S. P., and Mulhern, T. D. (2001). ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* *8*, 1052-1065.
- Koepp, D. M., Schaefer, L. K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* *294*, 173-177.
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A. I., and Tsujimoto, Y. (2003). Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* *114*, 673-688.
- 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.
- Krude, T. (2000). Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state. *J Biol Chem* *275*, 13699-13707.
- Kunkel, T. A., and Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* *69*, 497-529.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 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.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-450.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 712-720.
- Lim, M. A., Kikani, C. K., Wick, M. J., and Dong, L. Q. (2003). Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): a potential regulatory mechanism for PDK-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14006-14011.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., and Zhang, X. K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527-540.
- Lin, W. C., Lin, F. T., and Nevins, J. R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15, 1833-1844.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lindahl, T. (2000). Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res* 462, 129-135.
- Lindahl, T. (2004). Molecular biology: ensuring error-free DNA repair. *Nature* 427, 598.
- Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 127-133.
- Lindahl, T., and Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905.
- Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.

- Lukas, J., Bartkova, J., and Bartek, J. (1996). Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 16, 6917-6925.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3, 997-1007.
- Lutzen, A., Bisgaard, H. C., and Rasmussen, L. J. (2004). Cyclin D1 expression and cell cycle response in DNA mismatch repair-deficient cells upon methylation and UV-C damage. *Exp Cell Res* 292, 123-134.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.
- Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2000). Genetic analysis of mammalian cyclin-dependent kinases and their inhibitors. *Biol Chem* 381, 827-838.
- Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998). RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3, d887-912.
- Marchenko, N. D., Zaika, A., and Moll, U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275, 16202-16212.
- Martin, J., Hunt, S. L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M. A., Parlow, A. F., Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2003). Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 22, 5261-5269.
- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298-306.
- Matsuzaki, Y., Miyazawa, K., Yokota, T., Hitomi, T., Yamagishi, H., and Sakai, T. (2002). Molecular cloning and characterization of the human p19(INK4d) gene promoter. *FEBS Lett* 517, 272-276.
- Mattaj, I. W., and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- McMaster, G. K., and Carmichael, G. G. (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 4835-4838.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., Knight, R. A., Green, D. R., Thompson, C., and Vousden, K. H. (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 279, 8076-8083.

- Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* *14*, 2077-2086.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* *11*, 577-590.
- Milligan, A., Gabrielli, B. G., Clark, J. M., Hayward, N. K., and Ellem, K. A. (1998). Involvement of p16CDKN2A in cell cycle delays after low dose UV irradiation. *Mutat Res* *422*, 43-53.
- Mitchell, J. R., Hoeijmakers, J. H., and Niedernhofer, L. J. (2003). Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 232-240.
- Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., and Yoneda, Y. (2004). Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J Cell Biol* *165*, 617-623.
- Moberg, K. H., Bell, D. W., Wahrer, D. C., Haber, D. A., and Hariharan, I. K. (2001). Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* *413*, 311-316.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 261-291.
- Nakayama, K., and Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* *20*, 1020-1029.
- Newton Bishop, J. A., Harland, M., Bennett, D. C., Bataille, V., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Ponder, B. A., Cuzick, J., Selby, P., and Bishop, D. T. (1999). Mutation testing in melanoma families: INK4A, CDK4 and INK4D. *Br J Cancer* *80*, 295-300.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* *61*, 441-470.
- Norbury, C. J., and Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* *23*, 2797-2808.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* *100*, 71-78.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., and Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* *36*, 617-656.
- O'Reilly, M. A. (2005). Redox activation of p21Cip1/WAF1/Sdi1: a multifunctional regulator of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal* *7*, 108-118.

- Olashaw, N., Bagui, T. K., and Pledger, W. J. (2004). Cell cycle control: a complex issue. *Cell Cycle* 3, 263-264.
- Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602, 73-87.
- Paques, F., and Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404.
- Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1286-1290.
- Park, D. S., Morris, E. J., Padmanabhan, J., Shelanski, M. L., Geller, H. M., and Greene, L. A. (1998). Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol* 143, 457-467.
- Passegue, E., and Wagner, E. F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J* 19, 2969-2979.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-828.
- Pei, X. H., and Xiong, Y. (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 24, 2787-2795.
- Peters, M., DeLuca, C., Hirao, A., Stambolic, V., Potter, J., Zhou, L., Liepa, J., Snow, B., Arya, S., Wong, J., *et al.* (2002). Chk2 regulates irradiation-induced, p53-mediated apoptosis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11305-11310.
- Peterson, C. L., and Cote, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev* 18, 602-616.
- Petukhova, G., Sung, P., and Klein, H. (2000). Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes Dev* 14, 2206-2215.
- 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.
- Rooney, S., Alt, F. W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D. O., Schatz, D. G., and Sekiguchi, J. (2003). Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197, 553-565.
- Roth, D. B. (2002). Amplifying mechanisms of lymphomagenesis. *Mol Cell* 10, 1-2.

- Rotman, G., and Shiloh, Y. (1998). ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 7, 1555-1563.
- Rouse, J., and Jackson, S. P. (2002). Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297, 547-551.
- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311-5317.
- Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-177.
- Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J* 22, 975-986.
- Sadee, W., Yu, V. C., Richards, M. L., Preis, P. N., Schwab, M. R., Brodsky, F. M., and Biedler, J. L. (1987). Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 47, 5207-5212.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- Sandal, T. (2002). Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* 7, 73-81.
- Santiard-Baron, D., Gosset, P., Nicole, A., Sinet, P. M., Christen, Y., and Ceballos-Picot, I. (1999). Identification of beta-amyloid-responsive genes by RNA differential display: early induction of a DNA damage-inducible gene, gadd45. *Exp Neurol* 158, 206-213.
- Sattler, U., Frit, P., Salles, B., and Calsou, P. (2003). Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. *EMBO Rep* 4, 363-367.
- Scassa, M. E., Marazita, M. C., Ceruti, J. M., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F., Gonzalez-Cid, M., Pignataro, O. P., and Canepa, E. T. (2007). Cell cycle inhibitor, p19INK4d, promotes cell survival and decreases chromosomal aberrations after genotoxic insult due to enhanced DNA repair. *DNA Repair (Amst)*.
- Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Redon, C., and Bonner, W. M. (2003). Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther* 2, 233-235.
- Seed, B., and Sheen, J. Y. (1988). A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67, 271-277.
- 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.

- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Ewen, M. E., and Rollins, B. J. (1998). p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 18, 378-387.
- 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.
- Sherr, C. J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-3695.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18, 2699-2711.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., and Kastan, M. B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 11, 3471-3481.
- Sotillo, R., Dubus, P., Martin, J., de la Cueva, 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.
- Stevens, C., and La Thangue, N. B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3, 1071-1079.
- Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J. E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell* 12, 209-219.
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 630-670, table of contents.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Anderson, C. W., Appella, E., Nakanishi, M., Suzuki, H., *et al.* (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *Embo J* 21, 5195-5205.

- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17, 5497-5508.
- Taneja, N., Davis, M., Choy, J. S., Beckett, M. A., Singh, R., Kron, S. J., and Weichselbaum, R. R. (2004). Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem* 279, 2273-2280.
- Tavera-Mendoza, L., Wang, T. T., Lallemand, B., Zhang, R., Nagai, Y., Bourdeau, V., Ramirez-Calderon, M., Desbarats, J., Mader, S., and White, J. H. (2006a). Convergence of vitamin D and retinoic acid signalling at a common hormone response element. *EMBO Rep* 7, 180-185.
- Tavera-Mendoza, L. E., Wang, T. T., and White, J. H. (2006b). p19INK4D and cell death. *Cell Cycle* 5, 596-598.
- Thullberg, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000a). Ubiquitin/proteasome-mediated degradation of p19INK4d determines its periodic expression during the cell cycle. *Oncogene* 19, 2870-2876.
- Thullberg, M., Bartkova, J., Khan, S., Hansen, K., Ronnstrand, L., Lukas, J., Strauss, M., and Bartek, J. (2000b). Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *FEBS Lett* 470, 161-166.
- Tibbetts, R. S., Brumbaugh, K. M., Williams, J. M., Sarkaria, J. N., Cliby, W. A., Shieh, S. Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13, 152-157.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- Tornaletti, S., and Hanawalt, P. C. (1999). Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81, 139-146.
- Viscardi, V., Clerici, M., Cartagena-Lirola, H., and Longhese, M. P. (2005). Telomeres and DNA damage checkpoints. *Biochimie* 87, 613-624.
- Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Wang, G., Reed, E., and Li, Q. Q. (2004). Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep* 12, 955-965.
- Wilson, A. J., Arango, D., Mariadason, J. M., Heerdt, B. G., and Augenlicht, L. H. (2003). TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis. *Cancer Res* 63, 5401-5407.

- Wilson, T. E. (2002). A genomics-based screen for yeast mutants with an altered recombination/end-joining repair ratio. *Genetics* *162*, 677-688.
- Wolner, B., van Komen, S., Sung, P., and Peterson, C. L. (2003). Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol Cell* *12*, 221-232.
- Wong, D. J., Foster, S. A., Galloway, D. A., and Reid, B. J. (1999). Progressive region-specific de novo methylation of the p16 CpG island in primary human mammary epithelial cell strains during escape from M(0) growth arrest. *Mol Cell Biol* *19*, 5642-5651.
- Wu, S., Tan, M., Hu, Y., Wang, J. L., Scheuner, D., and Kaufman, R. J. (2004). Ultraviolet light activates NFkappaB through translational inhibition of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem* *279*, 34898-34902.
- Yokota, T., Matsuzaki, Y., Miyazawa, K., Zindy, F., Roussel, M. F., and Sakai, T. (2004a). Histone deacetylase inhibitors activate INK4d gene through Sp1 site in its promoter. *Oncogene* *23*, 5340-5349.
- Yokota, T., Matsuzaki, Y., and Sakai, T. (2004b). Trichostatin A activates p18INK4c gene: differential activation and cooperation with p19INK4d gene. *FEBS Lett* *574*, 171-175.
- Yuan, J., and Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* *407*, 802-809.
- Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 752-762.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.
- Zindy, F., Cunningham, J. J., Sherr, C. J., Jogal, S., Smeyne, R. J., and Roussel, M. F. (1999). Postnatal neuronal proliferation in mice lacking Ink4d and Kip1 inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13462-13467.
- Zindy, F., den Besten, W., Chen, B., Rehg, J. E., Latres, E., Barbacid, M., Pollard, J. W., Sherr, C. J., Cohen, P. E., and Roussel, M. F. (2001). Control of spermatogenesis in mice by the cyclin D-dependent kinase inhibitors p18(Ink4c) and p19(Ink4d). *Mol Cell Biol* *21*, 3244-3255.
- Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1997a). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* *15*, 203-211.
- Zindy, F., Soares, H., Herzog, K. H., Morgan, J., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1997b). Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ* *8*, 1139-1150.

Zindy, F., van Deursen, J., Grosveld, G., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2000). INK4-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol Cell Biol* 20, 372-378.